



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

THE AMERICAN BRITISH COWDRAY
MEDICAL CENTER, I.A.P.

DEPARTAMENTO DE MEDICINA INTERNA

**ENSAYO CLÍNICO ALEATORIZADO DE LA EXPRESIÓN DEL
POLIMORFISMO DE LA CETOHEXOCINASA G/A rs2304681 Y SU
ASOCIACIÓN CON PARÁMETROS DEL SÍNDROME METABÓLICO EN
MEXICANOS CON SOBREPESO Y OBESIDAD**

TESIS DE POSGRADO
PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN:

MEDICINA INTERNA

P R E S E N T A

DR. JULIO CÉSAR ARRIAGA GARCÍA RENDÓN

DIRECTOR DE TESIS:
DRA. MAGDALENA MADERO ROVALO

PROFESOR TITULAR:
DR. FRANCISCO MORENO SÁNCHEZ



MÉXICO, D.F. 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria

A mis padres Guillermo y Rosy, por sus consejos, enseñanzas y amor.

A mis hermanos Luis Jesús, Juan Pablo y Lupita; el mejor equipo que pudiera alguien tener.

A mi esposa Jess; porque tú sabes que lo más importante de cada uno de mis logros es compartirlo contigo.

Agradecimientos

A la Dra. Magdalena Madero Rovalo, jefe del departamento de Nefrología del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez por su cooperación y apoyo para el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Laura Gabriela Sánchez Lozada, investigador en Ciencias Médicas del departamento de fisiopatología Renal del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez por su interés, orientación y motivación.

Al Dr. José Manuel Fragoso Lona y al Dr. Gilberto Vargas Alarcón del departamento de Biología Molecular del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez por su instrucción en técnicas de laboratorio y enseñanza.

Índice general

	Página
1. Agradecimientos	3
2. Resumen	7
3. Introducción	9
4. Marco Teórico	
a) Síndrome metabólico	10
b) El síndrome metabólico en México	11
c) Generalidades de la fructosa	13
d) El consumo de fructosa en México	15
e) Metabolismo de la fructosa	16
f) Cetohehexocinasa y síndrome metabólico	22
g) Genética de la cetohehexocinasa	24
h) Importancia de los polimorfismos	25
i) Polimorfismos de la cetohehexocinasa	26
5. Planteamiento del problema	27
6. Justificación	28
7. Pregunta de investigación	29
8. Hipótesis	30
9. Objetivo primario	31
10. Objetivos secundarios	32
11. Metodología	33
12. Análisis estadístico	39
13. Consideraciones éticas	40
14. Resultados	41
15. Discusión	47
16. Conclusiones	49
17. Referencias	50

Anexos

	Página
Anexo 1. Análisis descriptivo de un polimorfismo	53
Anexo 2. Extracción de ADN por método de expulsión salina	56
Anexo 3. Técnica de PCR en tiempo real	58
Anexo 4. Polimorfismos de cetohecoxinasa - Hapmap SNPs	60

Índice de tablas

	Página
Tabla 1. Clasificación del síndrome metabólico	10
Tabla 2. Valores de circunferencia de cintura propuestos por la IDF (International Diabetes Federation)	11
Tabla 3. Clasificación del índice de masa corporal (IMC)	12
Tabla 4. Diseño del estudio	33
Tabla 5. Descripción de variables del estudio	35
Tabla 6. Características basales y finales de la Cohorte	41
Tabla 7. Frecuencias y modelos genotípicos	42
Tabla 8. Asociación de SNPs y variables antropométricas del síndrome metabólico	43
Tabla 9. Asociación de SNPs y variables bioquímicas del síndrome metabólico	44
Tabla 10. Frecuencia de participantes por grupo de dieta y respuesta a la pérdida de peso	45
Tabla 11. Análisis comparativo de dietas (baja en fructosa y moderada en fructosa natural) y variables del síndrome metabólico	46

Índice de figuras

	Página
Figura 1. Propiedades físicas y químicas de la fructosa	13
Figura 2. Producción del jarabe de maíz de alta fructosa	14
Figura 3. Vía metabólica de la fructosa	17
Figura 4. Fructosa y resistencia a la insulina	19
Figura 5. Efecto de la fructosa y el síndrome metabólico	20

Índice de gráficos

	Página
Gráfica 1. Consumo de refrescos (litros/persona/año) en México	15

Resumen

Introducción

El síndrome metabólico es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en México. El sobrepeso y la obesidad como factores asociados a esta enfermedad tienen relación con el aumento en el consumo de fructosa y probablemente, una predisposición genética asociada a la enzima cetohehexocinasa.

Objetivos

Evaluar la expresión de los polimorfismos de la enzima cetohehexocinasa y su relación con las variables antropométricas y bioquímicas del síndrome metabólico en mexicanos con sobrepeso y obesidad.

Métodos

Ensayo clínico aleatorizado en el que se incluyeron a 144 individuos con sobrepeso u obesidad a los cuales se les proporcionó una dieta baja en fructosa o una dieta moderada en fructosa natural durante 6 semanas. Se obtuvieron muestras de sangre total para extracción de ADN y análisis subsecuente de los polimorfismos de la cetohehexocinasa (G/A rs12714092, C/T rs3769139 y G/A rs2304681) por medio de PCR en tiempo real. Se evaluó la relación de los modelos genotípicos con la pérdida de peso en base al tipo de dieta (baja o moderada en fructosa) y las variables del síndrome metabólico.

Resultados

El modelo recesivo del polimorfismo G/A rs2304681 se asoció a mala respuesta en la pérdida de peso y en variables del síndrome metabólico OR=9.42 (1.20-76.93) ($p=0.012$) independientemente del tipo de dieta administrada. No se encontró asociación entre los polimorfismos G/A rs12714092 y C/T rs3769139 con la pérdida de peso y componentes del síndrome metabólico.

Conclusiones

La presencia del polimorfismo G/A rs2304681 es un factor de riesgo para el desarrollo de síndrome metabólico y de sus componentes en mexicanos con sobrepeso y obesidad.

Palabras clave: síndrome metabólico, fructosa, cetohexocinasa, polimorfismos

ENSAYO CLÍNICO ALEATORIZADO DE LA EXPRESIÓN DEL POLIMORFISMO DE LA CETOHEXOCINASA G/A rs2304681 Y SU ASOCIACIÓN CON PARÁMETROS DEL SÍNDROME METABÓLICO EN MEXICANOS CON SOBREPESO Y OBESIDAD

Introducción

El síndrome metabólico (SM) es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en México. La prevalencia en mexicanos es alrededor del 42.3% y se ha asociado de manera importante con el sobrepeso y la obesidad.

Una de las causas asociadas al incremento en la prevalencia de obesidad y diabetes mellitus es el consumo de fructosa en la dieta, por tal motivo es de gran importancia conocer el impacto de este edulcorante en nuestra población.

La enzima principal del metabolismo de la fructosa es la cetohehexocinasa (KHK). Aunque algunos estudios han demostrado la presencia de esta enzima y su relación con enfermedades metabólicas, no se conoce el papel de sus polimorfismos en los componentes del SM.

El estudio de los polimorfismos de la KHK nos permitirá comprender de una manera más amplia, la genética del SM.

Marco Teórico

a) Síndrome metabólico

El SM también conocido como Síndrome X fue descrito por primera vez por Reaven en 1988¹ al observar la presentación en conjunto de algunos factores de riesgo como dislipidemia, hipertensión e hiperglucemia y su relación con complicaciones cardiovasculares. Desde entonces han surgido definiciones de diversos grupos como la Organización Mundial de la Salud (OMS)², el Grupo Europeo para el estudio de la resistencia a la insulina (EGIR)³, el Programa Nacional de Educación sobre el Colesterol (NCEP-ATPIII)⁴, la Asociación Americana del Corazón e Instituto Nacional del Corazón, Pulmón y Sangre (AHA/NHLBI)⁵ y la Federación Internacional de Diabetes (IDF)⁶ [Tabla1].

Tabla 1. Clasificación del síndrome metabólico

<i>Criterios diagnósticos de síndrome metabólico</i>			
<i>Factores de riesgo</i>	<i>ATP III 2001 (3 o más de cualquiera de los criterios)</i>	<i>IDF 2005 (1.º criterio más al menos 2 de los criterios)</i>	<i>AHA/NHLBI 2005 (3 o más de cualquiera de los criterios)</i>
1. Circunferencia cintura (cm)	= 102 en hombres o	= 94 en hombres o	= 102 en hombres o
2. Glucosa en ayunas (mg/dL)	= 88 en mujeres	= 80 en mujeres	= 88 en mujeres
3. Presión arterial (mmHg)	= 110	= 100 o diabetes tipo 2	= 100
4. Colesterol de HDL (mg/dL)	= 130 PAS o =85 PAD < 40 en hombres o < 50 en mujeres	=130 PAS o = 85 PAD * < 40 en hombres o < 50 en mujeres *	=130 PAS o =85 PAD * < 40 en hombres o < 50 en mujeres *
5. Triglicéridos (mg/dL)	= 150	= 150 *	= 150 *

ATP III: The Adult Treatment Panel III of the National Cholesterol Education Program.
 IDF: International Diabetes Federation.
 AHA/NHLBI: American Heart Association and National Heart, Lung, and Blood Institute.
 PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica
 * o tratamiento específico para la anomalía.
 & o tratamiento farmacológico para la condición.

La llamada “definición consenso” combina los criterios de la AHA/NHLBI: triglicéridos (TAG) ≥ 150 mg/dl, colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad (HDL) <40 mg/dl en hombres y <50 mg/dl en mujeres, presión arterial $> 130/85$ mmHg y glucosa en ayuno ≥ 100 mg/dl, con el ajuste en el parámetro de perímetro de la cintura propuesto por la IDF, de acuerdo al promedio en los estudios poblacionales de cada país. Esta clasificación es actualmente la más adecuada para el diagnóstico de síndrome metabólico [Tabla2].

Tabla 2. Valores de circunferencia de cintura propuestos por la IDF. Para los nativos de América central y del sur, deberán aplicarse las recomendaciones de los asiáticos del sur hasta contar con más datos disponibles.

Fuente: IDF (International Diabetes Federation).

País / Grupo étnico		Circunferencia de cintura (cm)
EUROPEOS	Hombres	≥94
	Mujeres	≥80
ASIA DEL SUR	Hombres	≥90
	Mujeres	≥80
CHINOS	Hombres	≥90
	Mujeres	≥80
JAPONESES	Hombres	≥85
	Mujeres	≥90

Diversas hipótesis propuestas en la fisiopatología de este síndrome han sido evaluadas convergiendo en una variedad de alteraciones a diferentes niveles del metabolismo. Una de ellas, sugiere un estado crónico de inflamación, con un aumento en marcadores de disfunción endotelial como son la molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1) y la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1), liberación de citocinas inflamatorias como interleucina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral alfa (FNT α), e incremento de proteínas reactantes de fase aguda como la proteína C reactiva (PCR); acompañado resistencia a la insulina en el tejido adiposo y el músculo estriado.

La resistencia a la insulina es además acompañada frecuentemente de otras alteraciones no incluidas en los criterios diagnósticos de SM como, incremento en lipoproteínas apo B y apo C-III, ácido úrico, factores protrombóticos (fibrinógeno, factor activador del plasminógeno-1), viscosidad sérica, homocisteinemia y microalbuminuria, entre otras.

El síndrome metabólico en México

Las personas con SM tienen un alto riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular y diabetes mellitus tipo 2, y por consiguiente un aumento en la mortalidad. En México, la prevalencia de síndrome metabólico en los últimos 15 años se ha incrementado; algunos estudios reportan tasas de 15.4, 22.3, 22.6%

de acuerdo a los criterios de la OMS, IDF y NCEP-ATPIII respectivamente⁷. Por otro lado, en un estudio realizado en la ciudad de México, en sujetos no diabéticos de 35 a 64 años la prevalencia de síndrome metabólico fue del 54.4% en hombres y de 61.0% en mujeres, de acuerdo con la IDF⁸. De acuerdo la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición ENSANUT 2012, el 42.3% de los mexicanos presentan síndrome metabólico⁹.

Existe evidencia clara de que la prevalencia de síndrome metabólico aumenta paralelamente con la edad y el sobrepeso. La obesidad es el principal factor de riesgo modificable para el desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles, como la diabetes mellitus y las enfermedades cardiovasculares¹⁰.

De acuerdo con los puntos de corte de índice de masa corporal (IMC) propuestos por la OMS [Tabla 3], la prevalencia de sobrepeso y obesidad en México en adultos fue de 71.28% (que representan a 48.6 millones de personas). La prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad es mayor en las mujeres (73.0%) que en los hombres (69.4%)¹¹.

Tabla 3. Clasificación del índice de masa corporal (IMC)

Fuente: OMS (Organización Mundial de la Salud) 2006

Índice de masa corporal (IMC)	Categoría
18.5 - 24.9	Peso saludable
25 - 29.9	Sobrepeso
30 - 34.9	Obesidad Grado I
35 - 39.9	Obesidad Grado II
40 o más	Obesidad Grado III

El SM es un trastorno complejo, con alto costo socioeconómico, que se ha convertido en uno de los principales retos de salud pública en todo el mundo. Los determinantes de dichos factores están íntimamente relacionados con el estilo de vida y su combinación con factores genéticos, ambientales y socioculturales.

Generalidades de la fructosa

Una de las causas propuestas de la obesidad y el SM es el exceso en el consumo de productos que contienen azúcares añadidos, en particular, fructosa¹²⁻¹⁵. La fructosa es un azúcar simple que está presente en la miel y frutas [Figura 1]; pero la mayor fuente de ésta se encuentra en el azúcar de mesa o sacarosa (disacárido compuesto de glucosa y fructosa) y en el jarabe de maíz de alta fructosa (una mezcla de fructosa libre y glucosa usualmente en proporción 55%:45%).

Figura 1. Propiedades físicas y químicas de la fructosa

Propiedades físicas	
Estado de agregación	sólido
Apariencia	cristales blancos
Densidad	1587 kg/m ³ ; 1.587 g/cm ³
Masa molar	180.16 g/mol g/mol
Punto de fusión	376,15 K (103 °C)
Punto de descomposición	459 K (186 °C)
Propiedades químicas	
Solubilidad en agua	3.75 kg/l a 20°C

1CH₂OH
2=O
HO-3-H
H-4-OH
H-5-OH
6CH₂OH

H-1-C=O
H-2-OH
HO-3-H
H-4-OH
H-5-OH
6CH₂OH

Estructura de D-fructosa (izquierda) y D-glucosa (derecha)

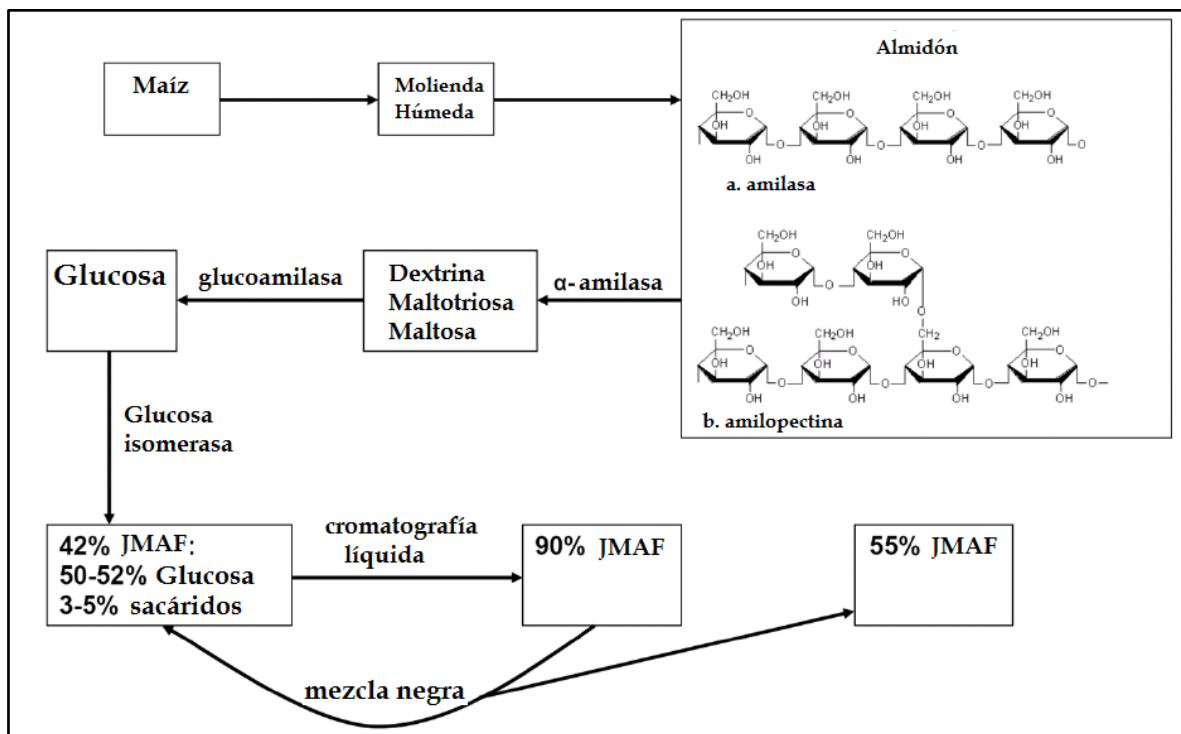
El jarabe de maíz de alta fructosa (JMAF) fue introducido por Richard O. Marshall y Earl R. Kool en 1957. El proceso de producción industrial fue desarrollado por el Dr. Yoshiyuki Takasaki en la agencia de ciencia y tecnología industrial del ministerio internacional de comercio e industria de Japón en el periodo de 1965 a 1970. Fue en el año de 1975 cuando se inició su comercialización como edulcorante de bebidas y alimentos procesados.

El JMAF se produce al moler el maíz para producir almidón, posteriormente se procesa dicho almidón para obtener jarabe de maíz el cual consiste en una mayor parte, en glucosa pura. Finalmente se añaden enzimas para generar el cambio de glucosa a fructosa. La fructosa resultante posterior a la conversión enzimática contiene en promedio 42% de fructosa, la cual puede purificarse hasta alcanzar concentraciones del 90% [Figura 2].

En el proceso enzimático de la producción de JMAF intervienen las siguientes enzimas:

- Alfa amilasa: produce cadenas cortas de carbohidratos (oligosacáridos) del almidón de maíz crudo.
- Glucoamilasa: rompe los oligosacáridos a cadenas más cortas para obtener glucosa.
- Xilosa isomerasa (glucosa isomerasa): convierte la glucosa en una mezcla de 42% de fructosa y 50-52% de glucosa con una cantidad mínima de otros azúcares.

Figura 2. Producción del jarabe de maíz de alta fructosa⁴². A través de procesos de manufactura y reacciones enzimáticas, el maíz es molido para producir almidón el cuál es hidrolizado a glucosa. Posteriormente la glucosa es convertida en fructosa por la glucosa isomerasa. Tres grados comerciales de JMAF se pueden obtener con fructosa al 42%, 55% y 90%.

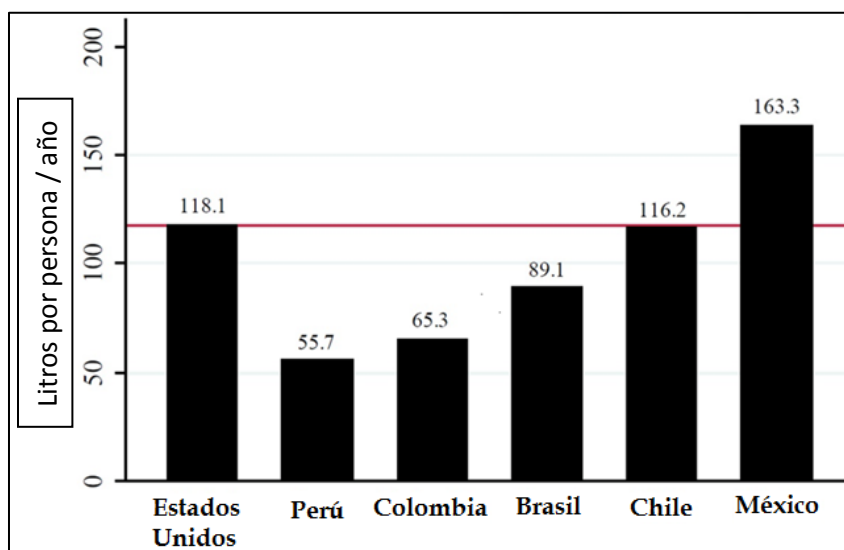


El consumo de fructosa en México

México es el mayor consumidor de bebidas azucaradas a nivel mundial. Este hecho se asocia con el incremento en la prevalencia de enfermedades crónicas del adulto y con del SM secundario al consumo de fructosa. Un porcentaje mayoritario de familias mexicanas destinan entre 7 y 12 por ciento de sus ingresos en la adquisición de productos que contienen JMAF¹⁶.

Alrededor del 70% del consumo de bebidas no alcohólicas en México es de refrescos [Gráfica 1]; y según datos recientes, los mexicanos beben aproximadamente 163 litros de refresco al año y 7 litros de jugos y néctares los cuales contienen jarabe de maíz alto en fructosa a diferentes concentraciones¹⁷.

Gráfica 1. Consumo de refrescos (litros/persona/año) en México⁴³



Aunque se calcula que el consumo de este azúcar procesado en promedio alcanza los 60 gramos por día, se han realizado encuestas en las que el consumo muchas veces supera de forma alarmante los 200 gramos al día hasta en más de un 40% de los entrevistados¹⁸. Todo esto se traduce en un aproximado de 240-700 kilocalorías carentes de valor nutricional que predisponen de manera crónica y cada vez a edades más tempranas, a un mayor riesgo de padecer diabetes mellitus, enfermedad cardiovascular y enfermedades renales.

Algunos estudios demuestran que el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas como hipertensión arterial, diabetes mellitus y enfermedad renal se observa al consumir cantidades mayores a 40-50 gramos al día de fructosa.

Metabolismo de la fructosa

La fructosa se absorbe en el intestino a través de transportadores específicos (GLUT5 y GLUT2) y obedece un metabolismo de 50-75% por el hígado, y el resto es metabolizado por el riñón y el adipocito. Aunque las concentraciones en ayuno son bajas (10-60 micromoles); las posprandiales pueden alcanzar 2.2mM en el sistema porta y de 1.0mM en la circulación sistémica^{18, 19}.

La captura de fructosa por las células es mediada por los transportadores GLUT5 y GLUT2, seguido del metabolismo por la enzima fructocinasa o cetohecoxinasa (KHK). La KHK puede existir en 2 isoformas de las cuales la KHK-C es la más importante en el metabolismo de la fructosa. Algunos sitios de expresión de la KHK-C incluyen el hígado, el epitelio intestinal, el túbulo proximal del riñón, el adipocito y probablemente el endotelio vascular.

La fructosa difiere de la glucosa por sus transportadores y las primeras 3 enzimas involucradas en su metabolismo. Una enzima clave es la KHK la cual es dependiente de adenosin trifosfato (ATP) para fosforilar la fructosa a fructosa-1-fosfato. Mientras la glucosa y sus enzimas (glucocinasa y fosfofructocinasa) regulan el metabolismo para prevenir una fosforilación excesiva, la KHK es poco regulada y fosforila toda la fructosa rápidamente con la subsecuente depleción no controlada de ATP²⁰.

La depleción de ATP causada por fructosa puede actuar como un tipo de isquemia y provocar arresto transitorio de proteínas inflamatorias, disfunción endotelial y estrés oxidante.

La fructosa es altamente lipogénica y estimula la síntesis de triglicéridos, incrementa los depósitos de grasa en el hígado (por aumento de la acetil coenzima A y diacilglicerol). Estudios de perfusión esplácnica han demostrado que la producción hepática de triglicéridos es mayor con fructosa comparada con concentraciones equimolares de glucosa. Así mismo, la administración de fructosa

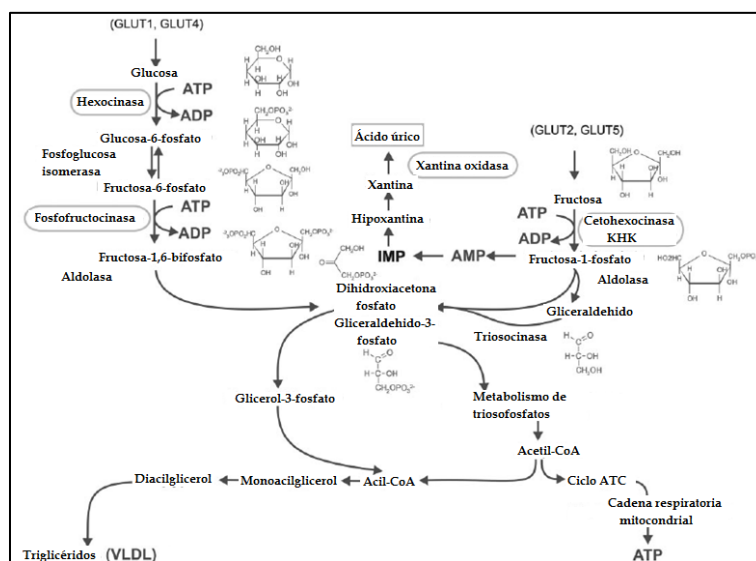
posprandial resulta en un aumento más significativo de la hipertrigliceridemia posprandial y niveles de apolipoproteína B comparado con glucosa.

Uno de los aspectos a considerar del metabolismo de la fructosa es su capacidad de estimular la producción de ácido úrico. Una vez que el ATP es consumido, el AMP resultante se acumula y estimula la AMP deaminasa resultando en producción de ácido úrico. El ácido úrico sérico puede aumentar rápidamente posterior a una ingesta de fructosa en niveles de hasta 2mg/dl en una hora. Este efecto se ha demostrado también de manera crónica en personas con dieta con alto contenido de fructosa en las que, los niveles de ácido úrico incluso en ayuno se encuentran aumentados posterior a varias semanas de ingesta²⁰.

Otra característica propia de la fructosa es que no genera liberación de insulina; y además, cuenta con un sistema de retroalimentación positiva en el que esta misma regula a la alza su transportador (GLUT5) y la KHK.

Figura 3. Vía metabólica de la fructosa. La fructosa entra a la célula a través de transportadores GLUT 5 y GLUT 2 donde es metabolizada a por la cetohexocinasa (KHK) para generar fructosa-1-fosfato. La depleción de ATP activa a la AMP deaminasa y se produce ácido úrico. Además la fructosa es lipogénica y genera glicerol fosfato y acil coenzima A, resultando esto en formación de triglicéridos.

Fuente: Endocrine Reviews 2009



Fructosa y síndrome metabólico

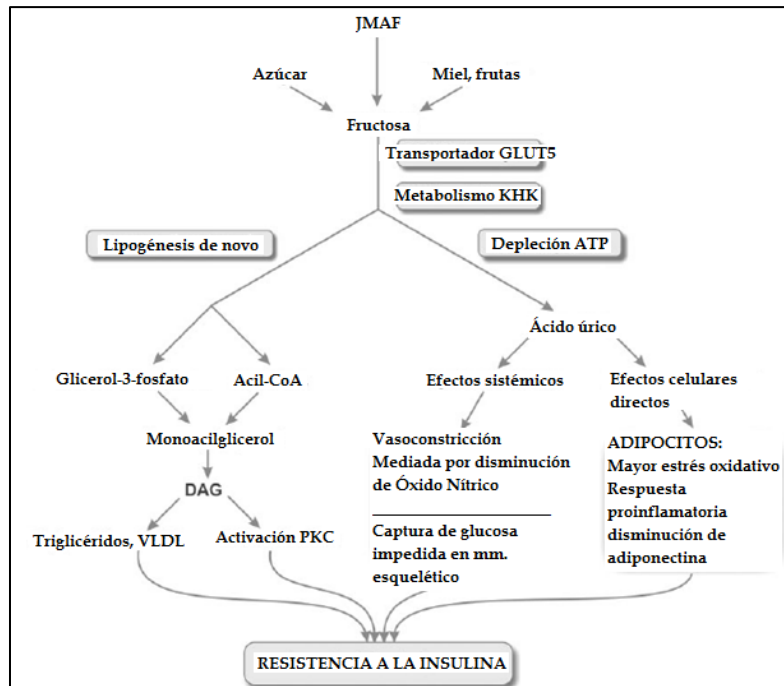
Resistencia a la insulina

La fructosa puede inducir resistencia a la insulina en parte por mecanismos clásicos asociados a la obesidad. Por ejemplo, la acumulación de triglicéridos a nivel hepático resulta en activación de la proteína cinasa C y resistencia a la insulina hepática debido al aumento en la captura de ácidos grasos libres. La elevación de lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) y de ácidos grasos libres resulta en un aumento de la captura de lípidos en el músculo y otros órganos periféricos que pueden intervenir en la resistencia a la insulina sistémica²⁰.

Existe evidencia de que la hiperuricemia inducida por fructosa genera resistencia a la insulina. Se conoce incluso que la disminución de los niveles de ácido úrico con agentes inhibidores de xantina oxidasa o agentes uricosúricos pueden prevenir el desarrollo de síndrome metabólico inducido por fructosa. Se conocen por lo menos dos mecanismos que pueden explicar estos hallazgos. Primero, la liberación de óxido nítrico endotelial mediado por insulina genera un tercio de la acción de la insulina probablemente al aumentar el flujo sanguíneo al músculo esquelético y tejidos periféricos permitiendo una mayor captura de glucosa. La hiperuricemia inhibe el óxido nítrico endotelial y genera estrés oxidante, producción de proteína C reactiva y otros mediadores inflamatorios; el aumento del ácido úrico en humanos asintomáticos genera disfunción endotelial y el disminuir estos niveles con alopurinol mejora la función endotelial en diabéticos. El segundo mecanismo propuesto es por un efecto directo del ácido úrico en el adipocito. Existe evidencia de que la resistencia a la insulina es mediada en parte por la inflamación y estrés oxidante dentro del adipocito.

Figura 4. Fructosa y resistencia a la insulina. La producción de ácido úrico como subproducto del metabolismo de la fructosa se acompaña de una depleción de ATP generando un bloqueo sistémico de la dilatación vascular dependiente de óxido nítrico (ON) mediada por insulina; así como efectos directos sobre el adipocito. La fructosa causa lipogénesis de novo, aumento de triglicéridos y resistencia a la insulina.

Fuente: Endocrine Reviews 2009



Hipertensión arterial

La hiperuricemia inducida por el consumo de fructosa tiene un papel importante en la fisiopatología de la hipertensión arterial. El ácido úrico es un factor de riesgo independiente para hipertensión arterial y se han observado niveles aumentados en personas con hipertensión esencial de reciente diagnóstico. Así mismo, la disminución del ácido úrico ha demostrado mejorar los niveles de presión arterial en el 66% de los adolescentes que padecen hipertensión esencial al compararse con controles asintomáticos.

El mecanismo por el cual la hiperuricemia eleva la presión arterial se ha descrito en modelos experimentales. La hipertensión puede ser mediada por el estrés oxidante, activación del sistema renina angiotensina y disfunción endotelial. Una vez que la enfermedad renovascular se presenta, la presión arterial y los mecanismos de regulación cambian de ser ácido úrico dependientes a ser sensible a sal y riñón dependientes. La hiperuricemia puede causar vasoconstricción renal e hipertensión glomerular y estos efectos son concentración y tiempo de exposición dependientes. El mecanismo por el cual la fructosa genera

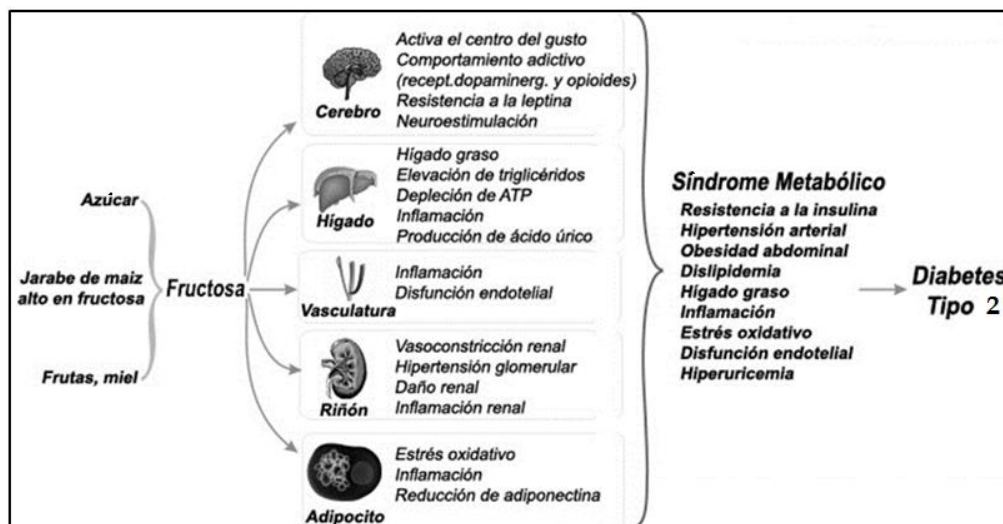
estos efectos es independiente a los comparados con la glucosa e incluso más dañinos para el organismo.

Estrés oxidativo

Existe evidencia de que la depleción de ATP intracelular y la hiperuricemia juegan un papel importante en la habilidad de la fructosa para inducir el síndrome metabólico. El ácido úrico aún considerado como uno de los mayores antioxidantes en el medio extracelular, puede producir estrés oxidante en células del músculo liso vascular y adipocitos a través de la estimulación de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH oxidasa).

Figura 5. Efecto de la fructosa y el síndrome metabólico. El azúcar de mesa, JMAF y fuentes naturales proveen fructosa, la cual en grandes cantidades tiene una gran variedad de efectos a nivel de cerebro, vasculatura, riñón y adipocito. El efecto neto induce características del síndrome metabólico y posteriormente diabetes mellitus tipo 2.

Fuente: Endocrine Reviews 2009



Algunos estudios han evaluado el papel de la fructosa en el síndrome metabólico, Stanhope y cols administraron fructosa a 34 individuos sanos que posteriormente desarrollaron hipertrigliceridemia posprandial, resistencia a la insulina y

acumulación intraabdominal de grasa; estos efectos no se observaron en dietas con glucosa o almidón. De manera similar, en individuos sanos el consumo de fructosa en exceso se asoció con dislipidemia y depósitos ectópicos de grasa en hígado y músculo²¹.

Pérez-Pozo y cols administraron 200g de fructosa diariamente en hombres sanos y observaron aumentos significativos en la presión arterial, triglicéridos séricos en ayuno, peso y resistencia a la insulina (evaluado por el índice HOMA – Homeostasis Model Assesment), con una disminución significativa de los niveles de lipoproteína de alta densidad (HDL) durante 2 semanas²².

Madero y cols evaluaron el efecto de una dieta baja en fructosa sobre los parámetros del SM. Se incluyeron a 131 individuos sanos con sobrepeso u obesidad. Los participantes se asignaron al azar en 2 grupos: dieta muy baja en fructosa (ingesta menor a 20 gramos al día) o dieta moderada en fructosa (70 gramos al día) en donde la fructosa provenía solamente de frutas naturales. Los azúcares añadidos fueron eliminados de ambos grupos. Tras un periodo de 6 semanas, en ambos grupos se observó una pérdida de peso significativa de 2.94+/-2.18 kg y 4.07+/-2.39 kg en los grupos de muy baja fructosa y fructosa moderada respectivamente, siendo esta diferencia significativa entre las dos dietas. Se observó que ambas dietas bajas en fructosa resultaron en una disminución en TA sistólica y diastólica, colesterol total, triglicéridos, resistencia a la insulina, concentración de AU, así como una reducción en la concentración de la molécula de adhesión intercelular sérica, como marcador de inflamación²³.

Cetohexocinasa y síndrome metabólico

Evidencia en investigación experimental

Estudios recientes sugieren que la capacidad de la fructosa para inducir SM no está asociada únicamente a la ingesta de energía; apoyando el papel de la enzima KHK para el desarrollo de este síndrome de manera independiente. Las complicaciones metabólicas asociadas al consumo de fructosa se previenen en ratones knockout para las 2 isoformas de la enzima cetohexocinasa (A y C). Sin embargo, en aquellas que solo carecen de la isoforma A, el metabolismo excesivo de la fructosa por la KHK-C empeora todos los parámetros del síndrome metabólico²⁴.

Al estudiar el efecto de la fructosa en el lumen intestinal de ratas, Tharabenjasin y cols observaron una disminución significativa de las concentraciones de ATP en los homogenados celulares comparados con aquellas incubadas con glucosa. Se observó además que la distribución de la KHK es homogénea, sugiriendo que el metabolismo de la fructosa ocurre en todos los enterocitos²⁵.

Algunos estudios han sugerido que las mujeres en comparación con los hombres, presentan una mayor asociación entre el consumo de fructosa y el aumento en el riesgo de diabetes mellitus tipo 2. Para ejemplificar lo anterior, Vilá y cols realizaron un estudio en ratas agrupadas por diferencia de género con la finalidad de analizar posibles mecanismos moleculares involucrados. Ambos grupos alimentados con fructosa mostraron respuestas asociadas a síndrome metabólico; sin embargo, sólo el grupo de hembras presentaron una mayor actividad de la proteína cinasa activada de AMP y una disminución en la expresión del factor nuclear hepático 4. Las diferencias se relacionaron a que la expresión hepática de la enzima KHK estaba inducida por la ingesta fructosa en las hembras, pero no en machos, generando un aumento significativo en la relación AMP/ATP²⁶.

El consumo de bebidas que contienen fructosa se relacionan con un aumento en la prevalencia de SM y esteatosis hepática no alcohólica. Un estudio enfocado en evaluar los mecanismos moleculares del efecto terapéutico de la atorvastatina, observó que la inducción de esteatosis hepática en ratas a través de un consumo elevado de fructosa se asociaba con hipertrigliceridemia, hiperleptinemia, necrosis,

inflamación, mayor expresión de genes involucrados en la síntesis de ácidos grasos y disminución de la actividad de la beta oxidación de ácidos grasos. La administración de estatina disminuyó la expresión de KHK y redujo la carga metabólica en el hígado asociada al consumo de fructosa²⁷.

La ingesta de fructosa se ha asociado con un aumento en la actividad simpática, hipertensión y SM. En un estudio experimental con ratas alimentadas con fructosa se observó una sobre expresión de los transportadores GLUT 2, GLUT 5 y de la enzima KHK aumentando la actividad vasomotora simpática en células catecolaminérgicas de la médula rostral ventrolateral del tallo cerebral²⁸.

El mecanismo por el cual el ácido úrico estimula la expresión de KHK en el hígado se relaciona con la activación del factor de transcripción ChREBP, el cual, a su vez resulta en la activación transcripcional de la KHK al unirse a una secuencia específica de su promotor. Lanasa y cols sugieren que la sensibilidad a la fructosa desarrolla fenotipos con hiperuricemia, y que, el ácido úrico juega un papel crucial en la sensibilización de los hepatocitos al metabolismo de la fructosa durante el desarrollo de obesidad, diabetes, hígado graso y síndrome metabólico²⁹.

Evidencia en investigación clínica

Estudios realizados por hibridación fluorescente in situ para mapeo de KHK en el cromosoma 2p23.2-23.3 sugieren una regulación coordinada de esta enzima con el regulador de glucocinasa GCKR, proteína que inhibe a la hexocinasa GCK en el hígado y en el islote pancreático. La co-localización metabólica de estos dos genes tiene implicaciones en estudios de asociación alélica relacionados con la diabetes mellitus tipo 2³⁰.

En un estudio que midió la actividad enzimática en la corteza y médula renal en humanos se observó que la KHK, aldolasa, NADP, aldehído deshidrogenasa y glicerato cinasa implicadas en el metabolismo de la fructosa, se encontraban presentes en ambos sitios con predominio de la corteza³¹.

En pacientes con esteatosis hepática no alcohólica el aumento en el consumo de fructosa se ha asociado a una disminución en el ATP hepático, aumento de los niveles de ácido úrico, daño hepatocelular y fibrosis. La principal hipótesis establecida para explicar estos eventos se atribuye a un aumento en la actividad de KHK, enzima clave en el metabolismo de la fructosa³².

Genética de la cetohehexocinasa

Bonthron y cols aislaron y secuenciaron clones completos del ADN de KHK en 1994; en la actualidad de acuerdo a la base de datos del laboratorio europeo de biología molecular (EMBI-EBI) se conoce que esta enzima abarca 14025 pares de bases del cromosoma 2p23.3, desde 27309615 hasta 27323640 y cuenta con 386 polimorfismos de acuerdo a la base de datos del Instituto de bioinformática de Europa (EBI)³³.

Estudios preliminares de cristalografía para el desarrollo de KHK recombinante humana demuestran que la estructura primaria de esta enzima no tiene homología significativa con otras hexocinasas de mamíferos; incluso esta enzima comparte más similitudes con ribocinasas procariotas, pero cataliza una reacción de fosforilación distinta³⁴.

La fosforilación de fructosa a fructosa-1-fosfato inicia el catabolismo intracelular de una gran cantidad de carbohidratos de la dieta. Aunque localizada a altas concentraciones el hígado, corteza renal e intestino delgado, la actividad de la cetohehexocinasa también se conoce a diferentes niveles en otros tejidos. Hayward y cols observaron que, una duplicación intragénica en el gen de la cetohehexocinasa resulta en dos exones similares de 135 pb separados por un intron (conocidos como 3a y 3c), y que éstos son mutuamente empalmados en el RNAm de la enzima; este splicing alternativo de la KHK es específico para diferentes tejidos, ya que el exón 3c se expresa en tejidos con altos niveles de KHK mientras que otros tejidos con baja expresión utilizan únicamente el exón 3a. Incluso, la comparación entre tejido fetal y adulto muestra el desarrollo de un splicing de transición del exón 3a al exón 3c³⁵.

Importancia de los polimorfismos

Un polimorfismo de un solo nucleótido o SNP (Single Nucleotide Polymorphism) es una variación en la secuencia de ADN que afecta a una sola base (adenina (A), timina (T), citosina (C) o guanina (G)) de una secuencia del genoma. Una de estas variaciones debe darse al menos en un 1% de la población para ser considerada como un SNP. Los SNP constituyen hasta el 90% de todas las variaciones genómicas humanas, y aparecen cada 1,300 bases en promedio, a lo largo del genoma humano. Dos tercios de los SNP corresponden a la sustitución de una citosina (C) por una timina (T). Estas variaciones en la secuencia del ADN pueden afectar a la respuesta de los individuos a enfermedades, bacterias, virus, productos químicos, fármacos, entre otros.

Los SNP que se localicen dentro de una secuencia codificante pueden modificar o no la cadena de aminoácidos que producen, se llama SNP no-sinónimos los primeros y SNP sinónimo (o mutación silenciosa) a los segundos. Los SNP que se encuentren en regiones no codificantes pueden tener consecuencias en el proceso de traducción, sobre todo en procesos como el splicing, la unión de factores de transcripción o modificando la secuencia de ARN no codificante. Aunque pueden estar tanto en regiones codificantes como en regiones intrónicas o intergénicas, las codificantes son las que más impacto tienen sobre la función de una proteína, pero realmente todas pueden estar relacionadas con una enfermedad. Los modelos genotípicos para la determinación de riesgos en una población se explican con mayor detalle en el **Anexo 1**. Debido a que los SNP no cambian mucho de una generación a otra, es sencillo seguir su evolución en estudios de poblaciones. Los SNP se consideran una forma de mutación puntual que ha sido lo suficientemente exitosa evolutivamente para fijarse en una parte significativa de la población de una especie. El estudio de SNPs en el metabolismo de la fructosa en específico en la enzima principal de su metabolismo y su asociación con parámetros del SM permitirá obtener información complementaria del impacto que puede tener esta enfermedad en población que incluya alguno de los componentes de este padecimiento.

Polimorfismos de la cetohecoxinasa

Actualmente la información relacionada con la genética de la fructosa es limitada. Uno de los blancos a desarrollar en protocolos de investigación es la descripción de polimorfismos de un solo nucleótido asociados a frecuencias alélicas de diferentes poblaciones.

Manal y cols investigaron la asociación del polimorfismo de la KHK rs2304681 (G/A que codifica Val49Ile) y parámetros metabólicos e histológicos de la esteatosis hepática no alcohólica. El 10.2% de los pacientes fueron hispanos y mostraron un mayor frecuencia del alelo A (81% contra 61%, $p < 0.001$) comparado con los no hispanos; al ajustar para otras variables, el alelo A del polimorfismo de KHK se asoció con niveles menores de ácido úrico y menor prevalencia de fibrosis en estos pacientes³².

En un estudio realizado en 237 europeo-americanos y 167 afroamericanos se observó una asociación del SNP transportador de fructosa SLC2A5 rs5438 con un aumento en los niveles séricos de ácido úrico en hombres europeo-americanos. Así mismo, el alelo menor del transportador de glucosa SLC2A2 rs8192675 mostró una asociación con niveles disminuidos de HDL en europeo-americanos (A/A: 51.0 mg/dl, A/G: 47.0 mg/dl, G/G: 41.5 mg/dl, $p = 0.0034$) sugiriendo un papel importante de estos polimorfismos en relación al SM y riesgo cardiovascular³⁶.

Planteamiento del problema

El metabolismo de la fructosa y la expresión de diferentes polimorfismos de la cetohexocinasa tienen relación con el sobrepeso, SM y riesgo cardiovascular. Sin embargo, las frecuencias alélicas y modelos genotípicos de la expresión de SNPs de la KHK en población mexicana al día de hoy, se desconocen.

Existe evidencia experimental y clínica relacionada con el consumo de fructosa y la fisiopatología del SM. Sin embargo, no existen estudios controlados y aleatorizados en humanos en donde se evalúe si la pérdida de peso con una dieta baja en fructosa y una dieta moderada en fructosa natural se asocia con la expresión de polimorfismos de la cetohexocinasa.

El componente multifactorial del SM comprende en uno de sus aspectos la genética de diferentes poblaciones; dentro de la vía metabólica de la fructosa se han descrito secuencias polimórficas asociadas a la enzima KHK. Sin embargo, al momento no se han realizado estudios que asocien polimorfismos de esta enzima con la respuesta a variables antropométricas y bioquímicas del SM.

Justificación

El estudio de polimorfismos relacionados con el síndrome metabólico en mexicanos permitirá la mayor comprensión de secuencias polimórficas específicas del gen de la KHK y su asociación con nuevas vías metabólicas

Los polimorfismos de la KHK seleccionados, cuentan con evidencia clínica en diferentes padecimientos; sin embargo, la relación de estos con los parámetros del SM en mexicanos es limitada.

La distribución alélica de SNPs de la KHK (rs2304681) se ha reportado en diferentes estudios; sin embargo, no se conoce la distribución de estas frecuencias alélicas en nuestra población.

Dentro del genoma humano, el gen de la KHK comparte secuencias con otras proteínas y transportadores relacionados con el SM; el conocer el papel de los SNPs de esta enzima contribuirá a la mejor comprensión de la genética del sobrepeso, obesidad y SM.

El estudio de modelos genotípicos de la KHK como uno de los factores asociados con la respuesta a la dieta en individuos mexicanos permitirá ampliar el estudio de los efectos del metabolismo de la fructosa en diferentes órganos y tejidos.

Debido al riesgo independiente de la expresión de la KHK sobre variables relacionadas con el SM, el estudio genético de SNPs de esta enzima permitirá establecer estrategias de prevención en población mexicana de alto riesgo.

El conocer el efecto en la reducción de la fructosa en la dieta, podría representar un área de oportunidad para establecer medidas de prevención factibles e intentar reducir las consecuencias que tiene el SM en la población mexicana.

El conocer la distribución alélica de los polimorfismos de la KHK y su relación con la disminución de peso y parámetros del SM permitirá conocer si existe mayor riesgo de complicaciones asociadas al consumo de fructosa en individuos mexicanos que expresen genotipos de riesgo.

Pregunta de investigación

Tomando en cuenta la información anterior se formuló la siguiente pregunta de investigación; en individuos mexicanos con sobrepeso u obesidad que recibieron una dieta baja en fructosa o una dieta moderada en fructosa natural durante un periodo de 6 semanas:

¿Es la expresión de algún polimorfismo de la enzima cetohexocinasa un factor de riesgo asociado al comportamiento de los componentes del síndrome metabólico?

Hipótesis

En individuos mexicanos con sobrepeso u obesidad que recibieron una dieta baja en fructosa o una dieta moderada en fructosa natural durante un periodo de 6 semanas:

La expresión de algún polimorfismo de la enzima cetohexocinasa se asociará a una mala respuesta en variables antropométricas y bioquímicas del síndrome metabólico.

Objetivo primario

Realizar modelos genotípicos de los polimorfismos de la enzima cetohexocinasa para conocer si la expresión de alguno de ellos participa como factor de riesgo para los componentes del síndrome metabólico en pacientes con sobrepeso y obesidad (IMC >25 kg/m²).

Objetivos secundarios

- Describir las frecuencias alélicas de los polimorfismos de la KHK en población mexicana.
- Describir si la presencia de polimorfismos de la KHK se asocia con la respuesta a la pérdida de peso posterior a la administración de una dieta con baja fructosa o moderada en fructosa natural.

Metodología

Descripción general del estudio

Se realizó un análisis genotípico por discriminación alélica a 144 individuos con sobrepeso u obesidad a los que se les administró una dieta baja en fructosa o una dieta moderada en fructosa natural durante un periodo de 6 semanas, con la finalidad de evaluar la asociación entre 3 polimorfismos de la enzima cetohexocinasa y parámetros del síndrome metabólico.

El estudio de esta cohorte se presenta como un análisis secundario del ensayo clínico controlado aleatorizado: “The effect of two energy-restricted diets, a low-fructose diet versus a moderate natural fructose diet, on weight loss and metabolic syndrome parameters: a randomized controlled trial²³” cuya finalidad fue el evaluar el efecto de la fructosa en la dieta y su asociación con la pérdida de peso y el síndrome metabólico.

El estudio fue aprobado por el comité de ética e investigación el instituto nacional de cardiología Ignacio Chávez (número de protocolo 09-630). Todos los participantes dieron su consentimiento informado.

Diseño del estudio

Para resolver la pregunta de investigación se llevó a cabo un estudio con las siguientes características:

Tabla 4. Diseño del estudio

Por el control de la maniobra por el investigador	Experimental
Por la medición en el tiempo	Longitudinal
Por la dirección de la investigación	Prospectivo
Por el tipo de muestreo	No probabilístico
Por la recolección de la información	Prolectivo
Por la asignación de la maniobra	Aleatorizado
Por el número de grupos	Comparativo

Criterios de selección

Criterios de inclusión:

- Pacientes mayores de 18 años de cualquier sexo
- Índice de masa corporal mayor a 25 kg/m²
- Nacionalidad mexicana

Criterios de exclusión:

- Diabetes mellitus tipo I o II.
- Hipertensión arterial sistémica estadio 2 de la JNC7 (definida como presión arterial sistólica >160 mmHg y/o presión arterial diastólica >100 mmHg) y/o hipertensión arterial bajo tratamiento farmacológico.
- Enfermedad renal crónica (definida como TFG <60 ml/min)
- Enfermedad hepática avanzada (clínica, bioquímica y/o histológica).
- Tratamiento farmacológico para hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia o hipoglucemiantes.
- Anemia de cualquier etiología.
- Neoplasia
- Embarazo

Criterios de eliminación:

- Pacientes que presentaran reacciones adversas a la dieta.
- Cuando el paciente así lo solicite
- No asistir a 2 visitas semanales programadas o a la valoración final de seguimiento
- Muestra de laboratorio insuficiente o mala obtención de la misma

Descripción de variables

Tabla 5. Descripción de variables del estudio

VARIABLES INDEPENDIENTES				
VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	ESCALA DE MEDICIÓN	UNIDAD DE MEDICIÓN
KHK rs12714092 A/G	Polimorfismo de un solo nucleótido de la enzima cetohehexocinasa	se obtuvo por frecuencias alélicas y genotípicas	Cuantitativa continua	Porcentaje (%)
KHK rs3769139 C/T	Polimorfismo de un solo nucleótido de la enzima cetohehexocinasa	se obtuvo por frecuencias alélicas y genotípicas	Cuantitativa continua	Porcentaje (%)
KHK rs2304681 A/G	Polimorfismo de un solo nucleótido de la enzima cetohehexocinasa	se obtuvo por frecuencias alélicas y genotípicas	Cuantitativa continua	Porcentaje (%)
Buena respuesta	Pérdida de 3kg o más durante 6 semanas	Resta del peso final menos el peso basal	Cualitativa nominal	Si/no
Mala respuesta	Pérdida menor a 3kg durante 6 semanas	Resta del peso final menos el peso basal	Cualitativa nominal	Si/no
Dieta baja en fructosa	Administración de dosis de ≤20g de fructosa /día	Valoración semanal de recordatorio de alimentación y apego a la dieta	Cualitativa nominal	Administrada/No administrada
Dieta moderada en fructosa natural	Administración de dosis de 50-70g de fructosa (frutas) /día	Valoración semanal de recordatorio de alimentación y apego a la dieta	Cualitativa nominal	Administrada/No administrada

VARIABLES DEPENDIENTES				
VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	ESCALA DE MEDICIÓN	UNIDAD DE MEDICIÓN
Presión arterial sistólica	Es la máxima presión que registra el sistema circulatorio, coincidiendo con la sístole del ventrículo	Cifras de presión arterial sistólica obtenidas de los sujetos en estudio sentados, habiendo guardado reposo por lo menos 5 minutos	Cuantitativa discreta	Milímetros de mercurio (mmHg)
Presión arterial diastólica	Valor de la presión arterial cuando el corazón se encuentra en fase de	Cifras de presión arterial diastólica obtenidas de los sujetos en estudio	Cuantitativa discreta	Milímetros de mercurio (mmHg)

	diástole. Es la presión de la sangre sobre las arterias entre dos latidos cardíacos	sentados, habiendo guardado reposo por lo menos 5 minutos		
Porcentaje de grasa corporal	Porcentaje del peso corporal que se compone de grasa.	Medición obtenida por impedancia en báscula TANITA	Cuantitativa continua	Porcentaje (%)
Índice cintura cadera	Estimado antropométrico de los niveles de grasa intraabdominal	Relación que se obtiene al dividir el perímetro de la cintura entre el de la cadera	Cuantitativa continua	cm/cm
Colesterol total	Medida aproximada de todo el colesterol y triglicéridos en el suero	Cifra obtenida mediante el procesamiento de una muestra de sangre del sujeto de estudio en ayuno de 9-10 hrs	Cuantitativa continua	mg/dl
Colesterol de alta densidad HDL	Es el colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad, tiene la función de llevar los lípidos desde los tejidos hacia el hígado para ser utilizado	Cifra obtenida mediante el procesamiento de una muestra de sangre del sujeto de estudio en ayuno de 9-10 hrs	Cuantitativa continua	mg/dl
Triglicéridos	Son la principal forma de almacenamiento de energía en las células. Son lípidos formados por una molécula de glicerol esterificado con tres ácidos grasos	Cifra obtenida mediante el procesamiento de una muestra de sangre del sujeto de estudio en ayuno de 9-10 hrs	Cuantitativa continua	mg/dl
Glucosa sérica	Es la medida de concentración de glucosa libre en la sangre, suero o plasma sanguíneo.	Cifra obtenida mediante el procesamiento de una muestra de sangre del sujeto de estudio en ayuno de 9-10 hrs	Cuantitativa continua	mg/dl

VARIABLES DEMOGRÁFICAS				
VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	ESCALA DE MEDICIÓN	UNIDAD DE MEDICIÓN
Edad	Tiempo transcurrido a partir del nacimiento de un individuo	Se comprobó la edad del paciente mediante la presentación de una credencial oficial	Cualitativa nominal	años
Sexo	Género que tiene el paciente de acuerdo a sus características fenotípicas	Se clasificó de acuerdo a las características fenotípicas del sujeto	Cualitativa nominal	Masculino/ Femenino

Material y métodos

Extracción de ADN por método de expulsión salina

Se obtuvieron las muestras de sangre periférica por punción. Se realizó lisis de eritrocitos y de leucocitos; posteriormente se precipitaron las proteínas de la muestra y se retiró el sobrenadante. Se agregó alcohol absoluto al 70% para deshidratar el ADN y se realizaron lavados para remover exceso de sales. Se

agregaron 200 microlitros de TRIS-EDTA al sedimento celular obtenido y se calentó la muestra a 65 grados centígrados. La lectura se llevó a cabo con el equipo NANODROP® para cuantificación y pureza del ADN. Se reportó la cantidad de ADN en ng/microlitos cuantificando absorbancias de 260-280 URLs. Por último se realizó técnica de PCR en tiempo real para 96 pozos en la que se incluyeron los reactivos Taqman SNPs y las sondas correspondientes a los polimorfismos de la cetohexocinasa: G/A rs12714092, C/T rs3769139 y G/A rs2304681. Se realizó análisis de discriminación alélica y se obtuvieron las frecuencias relevantes para el estudio. Se ofrece una descripción detalla de la técnica en el **Anexo 2 y Anexo3**.

El análisis de muestras agrupadas de ADN se llevó a cabo en 144 pacientes que completaron el seguimiento con cualquiera de las dietas (baja en fructosa y fructosa moderada natural). Se estableció como punto de referencia para definir a los grupos el cambio (delta) en el peso perdido de cada participante durante 6 semanas de seguimiento.

De acuerdo a lo reportado con otras dietas y tomando en cuenta una disminución de 0.5kg semanal, el valor predeterminado para la elaboración de los grupos fue de 3kg. En base a esto se dividió a los participantes en 2 grupos definidos como “buena respuesta” (pérdida de peso ≥ 3 kg comparado con basal) y “mala respuesta” (pérdida de peso < 3 kg comparado con basal) ambos durante un periodo de 6 semanas de seguimiento respectivamente.

Intervención por grupo de dieta

Las metas nutricionales en ambos brazos del estudio fueron 55% carbohidratos, 15% proteínas y 30% grasas. Los pacientes recibieron un plan de alimentación de acuerdo a su requerimiento calórico calculado con la fórmula de Harris Benedict.

El grupo de baja fructosa fue asignado a un consumo inicial de 2 semanas de menos de 10g de fructosa al día seguido de un periodo de 4 semanas de menos de 20 gramos de fructosa por día. La dieta con fructosa moderada natural consistía en 50-70g de fructosa en su mayor parte de frutas naturales. Los pacientes completaron un seguimiento de 6 semanas.

Variables antropométricas del síndrome metabólico

El peso corporal fue medido con 2 diferentes básculas: una báscula mecánica calibrada y una báscula de impedancia eléctrica (TANITA BF-681, WA, USA) la cual fue utilizada para calcular el porcentaje de grasa corporal. El índice de masa corporal fue calculado con la fórmula: peso (kilogramos) / estatura (metros al cuadrado). La circunferencia de cintura y cadera fueron medidas por una sola persona con una cinta antropométrica de fibra de vidrio Gulick. La presión arterial fue evaluada con un esfigmomanómetro de mercurio (Tycos Welch Allyn, NY, USA) previamente calibrado. Las mediciones de presión arterial se realizaron de manera semanal con el paciente sentado durante 10 minutos y posterior medición por triplicado con intervalos de 5 minutos.

Variables bioquímicas del síndrome metabólico

Los niveles de glucosa sérica, colesterol total, colesterol HDL y triglicéridos fueron medidos de manera basal y al término del seguimiento con el analizador VetACE (Alfa Wassermann, West Caldwell, NJ). Para la medición de triglicéridos se utilizó el ensayo enzimático glicerol fosfato oxidasa. El colesterol total fue analizado por el ensayo de esterasa/oxidasa. El procedimiento de precipitación de ácido-Mg²⁺ fosfotúngstico fue utilizado para precipitar lipoproteínas que contuvieran apolipoproteína B previa cuantificación de colesterol HDL. El análisis de glucosa se realizó con el ensayo de hexocinasa.

Análisis estadístico

Para el análisis descriptivo de polimorfismos se realizó un cálculo de frecuencias alélicas con el software Haploview® 4.1 (Broad Institute of Massachusetts Institute of Technology and Harvard University, Cambridge, MA, USA). Previo al análisis de asociación se comprobó a través de chi cuadrada que el principio de equilibrio de frecuencias alélicas de Hardy-Weinberg se cumpliera. Para evaluar la magnitud de la asociación de los polimorfismos con la variables del síndrome metabólico se calcularon los odds ratios (OR) de cada genotipo tomando como punto de corte la respuesta a la reducción de peso definida como la disminución de 3kg comparado con basal durante las 6 semanas de seguimiento; y estableciendo grupos de “buena respuesta” y “mala respuesta”. El análisis de regresión logística ajustado para variables antropométricas y de laboratorio fue realizado con la respuesta de los participantes y los modelos genotípicos correspondientes definidos como: dominante, co-dominante, recesivo, heterocigoto y aditivo.

El análisis descriptivo de la cohorte relacionado con las de variables del síndrome metabólico entre el grupo de dieta baja en fructosa y dieta de fructosa moderada natural se estableció con la prueba de Wilcoxon para dos muestras relacionadas. Para la comparación entre grupos de variables cuantitativas se utilizó U de Mann Whitney considerando un valor de p significativo <0.05 .

Consideraciones éticas

Riesgo de la Investigación

Esta investigación se considera de riesgo mínimo de acuerdo a la Ley General de Salud contenida en la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos en materia de Investigación para la salud en seres humanos, título segundo, capítulo I, artículo 17, publicada en el Diario Oficial de la Federación el día 6 de enero de 1987.

Consentimiento informado

Se proporcionó a todos los participantes previa inclusión al estudio el consentimiento informado donde se especifican en lenguaje claro y sencillo los objetivos del proyecto, los beneficios y riesgos de la administración de las dietas; haciendo hincapié que en caso de solicitar el abandono del estudio, esto no influirá en la atención médica actual o futura.

El presente proyecto fue evaluado y aceptado por un comité de ética e investigación el cual destaca su valor y validez como original, trascendente y con rigor científico; todo esto como requisito de futuras investigaciones que se apeguen a los principios de beneficencia y respeto de las personas de acuerdo a los aspectos éticos y regulatorios de la investigación biomédica tomando como referencia las siguientes declaraciones:

- Código de Núremberg 1947
- Reporte Belmont 1976
- Reglamento de la ley general de salud en materia de investigación para la salud 1987
- CIOMS biomédica 2002
- CIOMS epidemiológicas 2009
- Declaración de Helsinki de la asociación médica mundial 2013

Resultados

Un total de 144 participantes completaron el estudio. El consumo total de fructosa fue de 139.48 ± 121.06 gramos/día; y el consumo de fructosa proveniente únicamente de azúcares añadidos de 75.12 ± 70.85 gramos/día. La edad promedio de la cohorte fue de 39.76 ± 8.71 años con una frecuencia de mujeres $n=111$ (77.1%) y de hombres $n=33$ (22.9%).

El análisis comparativo de mediciones basales y finales de las variables del síndrome metabólico fue significativo en el total de los participantes incluidos en el estudio ($p < 0.001$). La pérdida de peso fue de 3.1 (2.9-4.4) kg.

Tabla 6. Características basales y finales de la Cohorte (n=144)

Variable SM	Basal	Final	Δ	Valor p
Antropométricas				
Peso (kg)	78.2 (70.4-88.9)	75.1 (67.5-84.5)	3.1 (2.9-4.4)	<0.001
IMC (kg/mts ²)	31.6 (29.4-34.3)	30.0 (27.9-32.9)	1.6 (1.5-1.4)	<0.001
Cintura (cm)	95.3 (87.9-103.7)	89.7 (82.2-97.0)	5.6 (5.7-6.7)	<0.001
Cadera (cm)	107.1 (102.5-114.4)	104.3 (99.3-110.9)	2.8 (3.2-3.5)	<0.001
Grasa (%)	39.1 (35.6-44.0)	37.7 (33.6-42.4)	1.4 (2.0-1.6)	<0.001
TA sistólica (mmHg)	108.6 (102.6-115.3)	100.0 (98.0-104.3)	8.6 (4.6-11.0)	<0.001
TA diastólica (mmHg)	68.6 (66.0-70.6)	64.0 (60.6-67.3)	4.6 (6.0-3.3)	<0.001
Bioquímicas				
Triglicéridos (mg/dl)	161.0 (123.0-230.0)	129.0 (101.5-191.5)	32.0 (21.5-38.5)	<0.001
Colesterol (mg/dl)	194.5 (170.0-217.0)	182.0 (157.0-209.0)	12.5 (13.0-8.0)	<0.001
Glucosa (mg/dl)	86.0 (79.0-93.0)	81.0 (75.0-90.0)	5.0 (4.0-3.0)	<0.001

Polimorfismos de cetohexocinasa

Los polimorfismos analizados en la cohorte corresponden a 2 variantes intrónicas silenciosas y, 1 variante intrónica de sentido erróneo:

- **rs12714092**
(TCTGACTGGGGTGAAAGGTGAGGAG[**A/G**]AGATGACCTGGAGTTAGTGGGTCTC)
- **rs3769139**
GTACCCATCCTCCCCCAGGTCCAGG[**C/T**]CCACAGTTTCTGTCCCAGTTGAGAG
- **rs2304681**
AGGCAACGCGTCCAACCTCCTGCACC[**A/G**]TTCTCTCCCTGCTCGGAGCCCCCTG.

Se ofrece una descripción de los mismos obtenida de la base de datos <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>³⁷ en el **Anexo 4**.

Análisis de frecuencias alélicas

La distribución de frecuencias alélicas de acuerdo a la buena o mala respuesta del tratamiento (definida como pérdida igual o mayor a 3kg, o menor a 3 kilogramos respectivamente) fue la siguiente: alelo G>rs12714092, alelo T>rs 3769139 y alelo G>rs2304681.

La frecuencia genotípica GG del SNP rs2304681 fue 12% mayor en el grupo de mala respuesta. Se calcularon las frecuencias alélicas menores (FAM) de los grupos de buena respuesta y mala respuesta.

Al realizar los modelos genotípicos correspondientes se observó una mayor expresión del SNP rs2304681 (G/G) en el modelo recesivo OR=9.42 (1.20-76.93) (p=0.012). En el mismo modelo del SNP 3769139 se observó una tendencia a favor del alelo T/C con un valor de p=0.08.

Tabla 7. Frecuencias y modelos genotípicos

SNP - KHK	Frecuencia genotípica (%)			FAM
G/A rs 12714092	<i>AA</i>	<i>AG</i>	<i>GG</i>	
Buena respuesta	43 (0.538)	33 (0.412)	4 (0.05)	0.26
Mala respuesta	32 (0.500)	24 (0.375)	8 (0.125)	0.31
C/T rs3769139	<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>	
Buena respuesta	45 (0.562)	32 (0.400)	3 (0.038)	0.24
Mala respuesta	38 (0.594)	19 (0.297)	7 (0.109)	0.26
G/A rs2304681	<i>AA</i>	<i>AG</i>	<i>GG</i>	
Buena respuesta	44 (0.550)	34 (0.425)	2 (0.025)	0.24
Mala respuesta	35 (0.547)	21 (0.328)	8 (0.125)	0.29

SNP-KHK	Modelo	OR (95% IC)	Valor p
G/A rs 12714092			
	Co-dominante	3.94 (0.33-2.92)	0.29
	Dominante	1.40 (0.58-3.57)	0.45
	Recesivo	3.15 (0.63-15.80)	0.15
	Heterocigoto	0.98 (0.39-2.43)	0.16
	Log-aditivo	1.53 (0.70-3.33)	0.28
C/T rs3769139			
	Co-dominante	4.14 (0.60-28.44)	0.17
	Dominante	0.93 (0.33-2.59)	0.89
	Recesivo	4.53 (0.75-32.23)	0.08
	Heterocigoto	0.53 (0.18-1.55)	0.24
	Log-aditivo	1.29 (0.59-2.84)	0.52
G/A rs2304681			
	Co-dominante	8.85 (1.06-73.76)	0.07
	Dominante	1.28 (0.46-3.58)	0.64
	Recesivo	9.42 (1.20-76.93)	0.012
	Heterocigoto	0.64 (0.23-1.82)	0.4
	Log-aditivo	1.75 (0.77-3.96)	0.17

Se realizó un análisis ajustado entre los modelos genotípicos de los SNPs de KHK y las variables del SM. Las variables antropométricas incluyeron IMC, cintura, cadera y porcentaje de grasa corporal [Tabla 8]. Las variables bioquímicas evaluaron triglicéridos, colesterol y glucosa [Tabla 9].

El análisis de regresión lineal mostró una diferencia significativa en variables antropométricas del polimorfismo rs2304681 dentro del modelo genotípico recesivo; OR=9.62 (1.20-77.25) (p=0.025).

Los modelos co-dominante y recesivo de los polimorfismos rs2304681 y rs3769139 respectivamente, mostraron diferencias sin alcanzar significancia estadística 8.55 (1.02-71.53) p=0.069 vs 5.90 (0.84-41.50) p=0.072).

Tabla 8. Asociación de SNPs y variables antropométricas del síndrome metabólico

SNP-KHK	Modelo	Genotipo	OR (95% IC)	valor p
G/A rs12714092				
		A/A	1.00	
	Co-dominante	G/A	0.83 (0.30-2.33)	0.24
		G/G	4.10 (0.66-25.62)	
	Dominante	A/A	1.00	0.86
		G/A-G/G	1.09 (0.41-2.87)	
	Recesivo	A/A-G/A	1.00	0.098
		G/G	4.44 (0.75-26.27)	
	Heterocigoto	A/A-G/G	1.00	0.45
		G/A	0.68 (0.25-1.84)	
	Aditivo	---	1.39 (0.65-2.98)	0.4
C/T rs3769139				
		C/C	1.00	
	Co-dominante	C/T	0.59 (0.20-1.72)	0.12
		T/T	4.88 (0.67-35.78)	
	Dominante	C/C	1.00	0.73
		C/T-T/T	0.84 (0.31-2.26)	
	Recesivo	C/C-C/T	1.00	0.072
		T/T	5.90 (0.84-41.50)	
	Heterocigoto	C/C-T/T	1.00	0.19
		C/T	0.50 (0.18-1.42)	
	Log-aditivo	---	1.20 (0.55-2.63)	0.64
G/A rs2304681				
		A/A	1.00	
	Co-dominante	G/A	0.74 (0.26-2.11)	0.069
		G/G	8.55 (1.02-71.53)	
	Dominante	A/A	1.00	0.88
		G/A-G/G	1.08 (0.40-2.88)	

	Recesivo	A/A-G/A	1.00	0.025
		G/G	9.62 (1.20-77.25)	
	Heterocigoto	A/A-G/G	1.00	0.3
		G/A	0.59 (0.21-1.62)	
	Log-aditivo	---	1.51 (0.69-3.32)	0.3

El análisis de variables bioquímicas del SM fue significativo para el modelo genotípico del polimorfismo rs2304681 de la KHK; OR=5.08 (1.03-25.14) (p=0.026).

Tabla 9. Asociación de SNPs y variables bioquímicas del síndrome metabólico

SNP-KHK	Modelo	Genotipo	OR (95% IC)	valor p
G/A rs12714092				
		A/A	1.00	
	Co-dominante	G/A	0.94 (0.46-1.91)	0.33
		G/G	2.48 (0.67-9.12)	
	Dominante	A/A	1.00	0.75
		G/A-G/G	1.11 (0.57-2.18)	
	Recesivo	A/A-G/A	1.00	0.14
		G/G	2.54 (0.71-9.07)	
	Heterocigoto	A/A-G/G	1.00	0.6
		G/A	0.83 (0.41-1.66)	
	Log-aditivo	---	1.26 (0.75-2.12)	0.38
C/T rs3769139				
		C/C	1.00	
	Co-dominante	C/T	0.66 (0.32-1.37)	0.15
		T/T	2.59 (0.62-10.89)	
	Dominante	C/C	1.00	0.59
		C/T-T/T	0.83 (0.42-1.64)	
	Recesivo	C/C-C/T	1.00	0.11
		T/T	3.02 (0.74-12.35)	
	Heterocigoto	C/C-T/T	1.00	0.16
		C/T	0.60 (0.29-1.22)	
	Log-aditivo	---	1.06 (0.62-1.82)	0.82
G/A rs2304681				
		A/A	1.00	
	Co-dominante	G/A	0.74 (0.36-1.52)	0.061

		G/G	4.48 (0.88-22.82)	
	Dominante	A/A	1.00	0.89
		G/A-G/G	0.95 (0.49-1.88)	
	Recesivo	A/A-G/A	1.00	0.026
		G/G	5.08 (1.03-25.14)	
	Heterocigoto	A/A-G/G	1.00	0.2
		G/A	0.63 (0.31-1.28)	
	Log-aditivo	---	1.24 (0.72-2.13)	0.43

Respuesta y tipo de dieta

El total de la cohorte (n=144) se distribuyó de la siguiente manera: 76 pacientes en el grupo de baja fructosa y 68 en el de fructosa moderada natural. La respuesta al tratamiento durante 6 semanas en relación a la pérdida de peso fue similar en el grupo de baja fructosa; mientras que, en el grupo de fructosa moderada natural se observó una buena respuesta a la dieta (definida a como pérdida de ≥ 3 kg) en casi el doble de los participantes (42 vs 26 participantes) [Tabla10]. El análisis comparativo entre grupos (baja vs moderada natural) no mostró diferencias (p=0.15).

Tabla 10. Frecuencia de participantes por grupo de dieta y respuesta a la pérdida de peso

	Buena respuesta	Mala respuesta	Total
Dieta baja Fructosa	38	38	76
Dieta moderada fructosa natural	42	26	68
	80	64	114

Las dietas baja en fructosa (n=76) y moderada en fructosa natural (n=68) se asociaron con pérdida de peso y mejoría significativa de todos los parámetros del síndrome metabólico comparadas con basal; tanto en variables antropométricas como bioquímicas [Tabla11].

Los resultados del análisis comparativo entre grupos de dieta mostraron una mejoría en el peso (kg) y en el IMC (kg/mts²) en el grupo de fructosa moderada natural. El cambio en el perímetro de cintura fue significativo solo en el grupo de fructosa moderada natural (p= 0.003).

En el grupo de fructosa moderada natural se observó una tendencia a la mejoría en el parámetro de glucosa sérica con un valor de p=0.06.

Tabla 11. Análisis comparativo de dietas (baja en fructosa y moderada en fructosa natural) y variables del síndrome metabólico

Variables SM	Baja fructosa		Fructosa moderada natural		Comparación entre grupos
	n=76		n=68		
Antropométricas	Δ final - basal	valor p	Δ final - basal	valor p	valor p
Peso (kg)	2.7 (1.5-4.4)	<0.001	3.8 (2.1-5.2)	<0.001	0.01
IMC (kg/mts ²)	1.1 (0.7-1.8)	<0.001	1.5 (0.8-2.1)	<0.001	0.01
Cintura (cm)	4.7 (3.1-6.0)	<0.001	6.5 (4.1-8.4)	<0.001	0.003
Cadera (cm)	2.5 (1.7-4.4)	<0.001	3.3 (1.5-4.5)	<0.001	0.37
Grasa (%)	1.6 (-0.3-3.8)	<0.001	2.0 (-0.8-3.9)	<0.001	0.65
TA sistólica (mmHg)	8.0 (3.3-12.7)	<0.001	6.0 (2.0-12.0)	<0.001	0.53
TA diastólica (mmHg)	4.0 (2.0-8.0)	<0.001	6.0 (2.0-8.9)	<0.001	0.15
Bioquímicas	Δ final - basal	valor p	Δ final - basal	valor p	valor p
Triglicéridos (mg/dl)	24.0 (-9.0-71.5)	<0.001	19.5 (2.0-45.0)	<0.001	0.99
Colesterol (mg/dl)	10.0 (-8.0-27.5)	<0.001	15.0 (-9.5-34.0)	<0.001	0.81
Glucosa (mg/dl)	2.0 (-5.5-10.0)	<0.001	5.5 (0.0-12.0)	<0.001	0.06

Discusión

Se realizó un estudio para evaluar la asociación de polimorfismos de la enzima KHK y su relación con parámetros del SM en mexicanos con sobrepeso u obesidad.

El análisis genético de la población en cuanto a frecuencias alélicas mostró ser predominante para el alelo G del rs2304681. Tomando como referencia el estudio de Manal en el que observó una mayor frecuencia del alelo A del SNP rs2304681 y su asociación con menores niveles de ácido úrico, fibrosis y probablemente SM.

Nuestro estudio es congruente con los hallazgos para el alelo G y modelo genotípico de tipo recesivo observados, sugiriendo un papel de riesgo para variables antropométricas y bioquímicas del SM.

El análisis genotípico mostró una frecuencia alélica estimada mayor al 2.5% de la población general; lo cual representa una cantidad importante de individuos y probablemente predominio de mujeres mexicanas con mayor riesgo de complicaciones asociadas al síndrome metabólico. Además, la distribución de frecuencias alélicas observadas en los modelos genotípicos de los SNPs seleccionados es congruente con los observados en la literatura.

Un modelo recesivo para el SNP G/A rs2304681 en aquellos individuos con mala respuesta a la reducción de peso, se asoció a un riesgo aproximado nueve veces mayor en variables antropométricas y 5 veces mayor en variables de laboratorio del síndrome metabólico. Esto sugiere que los individuos homocigotos para el alelo variante GG de este SNP presentan un factor de riesgo atribuible a la menor reducción de peso y a los parámetros de índice de cintura-cadera, grasa corporal, triglicéridos, colesterol y glucosa en población mexicana. La elección de este modelo genotípico es el más adecuado tomando en cuenta que el modelo co-dominante como el heterocigoto no resultaron significativos.

Ambas dietas fueron efectivas en mejorar el SM. La dieta con fructosa moderada natural se asoció con una mayor pérdida de peso y de perímetro de cintura. Las principales hipótesis de este hallazgo pueden estar relacionadas con la presencia de antioxidantes naturales propios de la fruta en el grupo de fructosa moderada; y por otro lado, el mayor índice glucémico de la dieta en el grupo de baja fructosa, lo cual pudo haber condicionado mayor apetito en los sujetos de estudio.

La no diferencia encontrada entre la distribución de los polimorfismos de la KHK evaluados y la buena o mala respuesta de los participantes a la dieta, apoyan el papel de la KHK como factor de riesgo independiente a la ingesta calórica que estudios experimentales y clínicos han sugerido.

El comportamiento único y congruente del polimorfismo G>A rs2304681 tanto en variables independientes del síndrome metabólico como en el análisis ajustado por antropometría y laboratorio; apoya la asociación molecular de la enzima limitante del metabolismo de la fructosa con la obesidad y el mayor riesgo metabólico en mexicanos.

Conclusiones

El modelo recesivo del SNP G/A rs2304681 de la enzima cetohecoxinasa podría contribuir a la mala respuesta antropométrica y bioquímica de los componentes del SM en población mexicana.

La frecuencia alélica del polimorfismo de la KHK G/A rs2304681 es 12% mayor para el alelo de riesgo G en población mexicana.

La restricción de fructosa proveniente de JMAF en forma de azúcares añadidos, mejora todos los componentes del SM. La dieta con fructosa moderada natural durante un periodo corto de evaluación, genera una mayor disminución de peso y de perímetro de cintura en comparación con la dieta baja en fructosa. Por lo tanto, son recomendables las dietas sin jarabe de maíz de alta fructosa, y cuya fuente de fructosa proviene de las frutas naturales.

La presencia del polimorfismo de riesgo G/A rs2304681 no tiene relación con la buena o mala respuesta (evaluada como pérdida de peso) de las dietas baja o moderada en fructosa, por lo que, este polimorfismo de la KHK es un riesgo independiente para SM en mexicanos.

Los resultados de este estudio abren una ventana para el desarrollo de investigaciones más amplias que comprendan diferentes locus del gen de la KHK. Los resultados obtenidos permiten ampliar el conocimiento de nuevos factores de riesgo para desarrollo de SM en nuestra población y posiblemente en otras poblaciones del mundo.

Son necesarios estudios más amplios, con periodos de seguimiento más prolongados con la finalidad de evaluar el impacto de la genética de la fructosa y así, explorar el potencial efecto de las medidas terapéuticas orientadas a reducir la frecuencia de la obesidad y el SM.

Referencias

1. Reaven, G.M. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*.1988;37(12):1595-1607.
2. Alberti, K. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO Consultation. *Diabetic Med* 1998;15(7):539-53.
3. Balkau, B. Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *Diabet Med* 1999;16:442-3.
4. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001;285:2486–2497.
5. Grundy, S. Diagnosis and Management of the Metabolic Syndrome: An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation* 2005;112:2735-2752.
6. Alberti, K. Metabolic syndrome-A new world-wide definition. A consensus statement from the international diabetes federation. *Diabetic Med* 2006;23(5):469–480.
7. Guerrero, F. Concordance between the 2005 International Diabetes Federation definition for diagnosing metabolic syndrome with the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III and the World Health Organization definitions. *Diabetes Care* 2005;28:2588-2589.
8. Serrano, L.C. Geographic variations of the International Diabetes Federation and the National Cholesterol Education Program–Adult Treatment Panel III definitions of the metabolic syndrome in nondiabetic subjects. *Diabetes Care* 2006;29:685-6911.
9. Encuesta Nacional de Salud 2012. Instituto Nacional de Salud Pública. [En línea]: <http://ensanut.insp.mx/>. Acceso: 20 de julio 2014.
10. Stirpe, F. Fructose-induced hyperuricemia. *Lancet* 1970;2:1310.

11. World Health Organization Obesity and overweight. Report of a WHO Study Group. Fact Sheet N° 311. Geneva: World Health Organization 2006. [En línea]: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/print.html>. Acceso: 20 de julio 2014.
12. Johnson, R. Potential role of sugar (fructose) in the epidemic of hypertension, obesity and the metabolic syndrome, diabetes, kidney disease, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 2007;86:899-906.
13. Bray, G. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *Am J Clin Nutr* 2004;79:537-43.
14. Hallfrisch, J. Metabolic effects of dietary fructose. *Faseb J* 1990;4:2652-60.
15. Elliott, S. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. *Am J Clin Nutr* 2002;76:911-22.
16. United States Department of Agriculture. Economic Research Service. US Sweetener Consumption per capita, 1966-2012. [En línea]: <http://www.ers.usda.gov/data-products/sugar-and-sweeteners-yearbook-tables.aspx#UfdQ3mRxte4>. Acceso: 20 de julio 2014.
17. Gitanjali, M. Mortality Due to Sugar-Sweetened Beverage Consumption: A Global, Regional, and National Comparative Risk Assessment. Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors Nutrition and Chronic Diseases Expert Group. *Circulation*. 2013;127:22.
18. Zafranet comunicaciones. Este año, productores de fructosa y refresqueras grandes ganadores en México. [En línea]: <http://www.zafranet.com/2012/09/este-año-productores-de-fructosa-y-refresqueras-grandes-ganadores-en-mexico/>. Acceso: 20 de julio 2014.
19. Stavric, B. Effect of fructose administration on serum urate levels in the uricase inhibited rat. *Experientia* 1976;32:373.
20. Richard, J. Hypothesis: Could Excessive Fructose Intake and Uric Acid Cause Type 2 Diabetes? *Endocrine Reviews* 2008;30(1):96–116.
21. Stanhope, K.L. Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *J Clin Invest* 2009;119:1322-1334.

22. Pérez-Pozo, S.E. Excessive fructose intake induces the features of metabolic syndrome in healthy adult men: role of uric acid in the hypertensive response. *Int J Obes* 2010;34(3):454-61.
23. Madero, M. The effect of a very low fructose diet versus a moderate natural fructose diet on weight loss and metabolic syndrome parameters. A randomized trial. *Metabolism* 2011;60:1551-1559.
24. Lanaspa, M. Opposing effects of fructokinase C and A isoforms on fructose-induced metabolic syndrome in mice. *PNAS* 2012;109(11):4320–4325.
25. Tharabengasin, P. Acute interactions between intestinal sugar and calcium transport in vitro. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 2013;(306):10.1152.
26. Vilá, L. Liver AMP/ATP ratio and fructokinase expression are related to gender differences in AMPK activity and glucose intolerance in rats ingesting liquid fructose. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 2011;(22):741-751.
27. Vilá, L. Reduction of liver fructokinase expression and improved hepatic inflammation and metabolism in liquid fructose-fed rats after atorvastatin treatment. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2011;(251):32-40.
28. Wu, K. An increase in adenosine-5'-triphosphate (ATP) content in rostral ventrolateral medulla is engaged in the high fructose diet-induced hypertension. *Journal of Biomedical Science* 2014;(21):8.
29. Lanaspa, M. Uric Acid Stimulates Fructokinase and Accelerates Fructose Metabolism in the Development of Fatty Liver. *PLOS ONE* 2012;7(10):e47948.
30. Hayward, B. Co-localization of the ketohexokinase and glucokinase regulator genes to a 500-kb region of chromosome 2p23. *Mamm Genome* 1996.
31. Heinz, F. Enzymes of fructose metabolism in human kidney. *Enzyme* 1975.
32. Manal, F. Fructokinase Polymorphisms in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease are Associated with Decreased Uric Acid and the Presence of Hepatic Fibrosis. *The Liver Meeting AASLD* 2010.
33. European Bioinformatics Institute. European molecular biology laboratory. [En línea]: <http://www.ebi.ac.uk/>. Acceso: 20 de julio 2014.

34. Kozak, M. Expression, purification and preliminary crystallographic studies of human ketohexokinase. *D Biol. Crystallogr* 2001.
35. Hayward, B. Structure and alternative splicing of the ketohexokinase gene. *Eur. J. Biochem* 1998.
36. Myphuong, T. Impact of Genetic Polymorphisms of SLC2A2, SLC2A5 and KHK on Metabolic Phenotypes in Hypertensive Individuals. *PLOS ONE* 2013;8(1).
37. International Hapmap Project. [En línea]: <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acceso: 20 de julio 2014.
38. Iniesta, R. Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. *Gac Sanit* 2005;19(4):333-41.
39. Lahiri, N. A rapid non enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Research* 1991;19:5444.
40. Guerrero, E. Estudio de los polimorfismos del gen ET-1 en la susceptibilidad genética al desarrollo de restenosis tras el implante de un stent coronario. *INCICH* 2013. Tesis.
41. Barrios, A. Estudio de los polimorfismos del gen sNOS en la susceptibilidad genética al desarrollo de restenosis en pacientes con stent coronario. *INCICH* 2013. Tesis.
42. Myphuong, T. Factors impacting fructose bioavailability and its adverse metabolic effects. *University of Florida* 2010. Tesis.
43. Andreyeva, T. Yale Rudd Center for Food Policy and Obesity. *Datamonitor* 2011.

Anexo 1. Análisis descriptivo de un polimorfismo³⁸

Obtenido de: Iniesta, R. Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. Gac Sanit. 2005;19(4):333-41

Un polimorfismo se caracteriza porque diferentes individuos presentan distintos nucleótidos o variantes en una posición concreta del genoma, que se denomina locus. A cada posible variante se le denomina alelo. Si se trata de un SON, normalmente serán 2 los posibles alelos de un locus: por ejemplo, el cambio de T por C (T>C).

Si el locus corresponde a un cromosoma autosómico (del 1al 22), cada individuo es portador de 2 alelos, uno en cada copia del cromosoma, que se heredan del padre y madre de manera independiente. La pareja de alelos observada en un individuo se denomina genotipo y, para el locus T>C del ejemplo, las 3 posibilidades de parejas de alelos son: TT, TC y CC.

Los individuos con 2 alelos idénticos, sean TT o CC se denomina homocigotos y los que tienen diferentes alelos (TC), heterocigotos. En general se considera variante el alelo menos frecuente, pero esto puede diferir de una población a otra.

Los 4 modelos principales de herencia son los siguientes:

Modelo dominante: Supone que la única copia de C es suficiente para modificar el riesgo y que ser portador de 2 copias lo modifica en igual magnitud; es decir, heterocigotos TC y homocigotos CC tienen el mismo riesgo. Se puede comparar la combinación de estos 2 genotipos respecto a los homocigotos TT.

Modelo recesivo: Supone que son necesarias 2 copias de C para modificar su riesgo, por tanto, heterocigotos TC y homocigotos del alelo más frecuente TT tienen el mismo riesgo. Se compara la combinación de ellos respecto a los homocigotos del alelo variante C.

Modelo aditivo. Supone que cada copia de C modifica el riesgo en una cantidad aditiva; por lo tanto, los homocigotos CC tienen el doble de riesgo que los heterocigotos TC. Se compara la combinación ponderada, donde se da peso 1 a los heterocigotos TC y peso 2 a los homocigotos CC.

Modelo co-dominante. Es el más general. Cada genotipo proporciona un riesgo de enfermedad diferente y no aditivo. Se comparan heterocigotos (He) y homocigotos variantes (Va) por separado respecto a los homocigotos del alelo más frecuente. Este modelo emplea 2 coeficientes (grados de libertad).

**Codificación de variables indicadoras para evaluar
diferentes modelos de herencia**

	Codominante	Dominante	Recesivo	Aditivo	
Genotipo ^a	He	Va	Do	Re	Ad
TT	0	0	0	0	0
TC	1	0	1	0	1
CC	0	1	1	1	2

^aGenotipos posibles para un polimorfismo en un *locus* bialélico T > C

Anexo 2. Extracción de ADN por método de expulsión salina modificado^{39,40,41}

Desarrollo de la técnica

- Recolectar 5-6 ml de sangre total con EDTA como anticoagulante
- Centrifugar a 3000rpm durante 10 minutos y desechar el plasma
- Separar las células nucleadas con TKM-1 (3/4 partes)
- Pasar la muestra a un tubo Falcon de 50ml
- Adicionar 130 microlitros de Tritón X-100
- Agitar durante 10 minutos en el Orbitron Rotator II
- Centrifugar a 10 minutos a 3000rpm
- Desechar sobrenadante

Resuspender el pellet en TKM-1 hasta la marca y centrifugar a 3000rpm durante 5 minutos (repetir este paso las veces necesarias hasta obtener pellet de color blanco)

- Agregar 800 microlitros de TKM-2
- Con la ayuda de una pipeta traspasar a un tubo eppendorf y adicionar 50 microlitros de SDS 10%
- Agitar la muestra en el vortex
- Incubar 10 minutos a 55°C
- Agitar nuevamente la muestra en el vortex
- Adicionar 300 microlitros de NaCl a una concentración 5M
- Colocar la muestra en la microcentrifuga a 14000 rpm durante 5 minutos
- Tomar el sobrenadante y transvasar el volumen a dos tubos eppendorf (rotulados como 20°C y -70°C)
- Adicionar 900 microlitros de etanol absoluto a temperatura ambiente en cada uno de los dos tubos
- Centrifugar a 14000rpm durante 10 minutos a 4°C de temperatura
- Decantar el sobrenadante
- Adicionar 900 microlitros de etanol al 70% frío
- Centrifugar a 4°C por 5 minutos a 14000rpm
- Descartar el sobrenadante
- Introducir las muestras abiertas en el Speed back 10 minutos (para eliminar el exceso de etanol de la muestra)
- Agregar 150 microlitros de TE (para diluir el ADN)
- Incubar a 65°C mínimo durante 15 minutos

Medir la concentración del ADN a 260nm. Este proceso se lleva a cabo directamente en el equipo NanoDrop, la pureza del ADN se mide a 260nm y las proteínas a 280; la relación 260/280 nos da la pureza la cual debe oscilar entre 1.7-2.0

Anexo 3. Técnica de PCR en tiempo real^{39, 40,41}

La amplificación de por medio de la técnica de PCR en tiempo real utiliza el equipo Fast Real-Time 7900 de la casa comercial Applied Biosystems de la cual se obtuvieron los reactivos master mix y los ensayos para Taqman para polimorfismos.

Los componentes del reactivo master mix comprenden: AmpliTaq DNA polimerasa, dNTP's referencia pasiva ROX, buffer y MgCl.

Los ensayos Taqman contienen los iniciadores y la sonda que detecta el sitio polimórfico. En el extremo 5' presentan una marca fluorescente (reportero) y en el extremo 3' un apagado (quencher). Cuando estas dos moléculas se encuentran unidas en una misma secuencia de ADN y a una distancia determinada, toda la energía emitida en forma de fluorescencia por el reportero, es absorbida por el apagador obteniendo una fluorescencia global observada igual a cero.

La detección de PCR en tiempo real se llevó a cabo mediante la medición de fluorescencia generada en cada ciclo de amplificación y detectada por el sistema óptico especialmente diseñado para este propósito. La cantidad de fluorescencia generada en cada ciclo es proporcional a la cantidad de producto de amplificación generado.

La determinación de SNP's se realiza por medio de dos sondas y cada una contiene en su posición central las variantes del nucleótido dimórfico marcadas con los reporteros FAM y VIC para diferenciarlas entre sí. El principio de la técnica consiste en que la sonda se hibride perfectamente con la secuencia blanco escindida por la Taq polimerasa mientras que ésta hace una diferencia en el nucleótido dimórfico, se reduce la eficiencia de unión de la sonda a la secuencia blanco y por lo tanto se degrada por la misma Taq polimerasa que tiene función de exonucleasa liberando el fluorocromo para permitir su identificación. De esta forma el aumento en la señal de uno de los reporteros indicará homocigosidad para el nucleótido dimórfico que reporta la fluorescencia específica; mientras que, si reporta fluorescencia de ambos reporteros es indicativo de heterocigosidad.

Programa de amplificación

- Amplificación: 50°C durante 2 minutos
- Desnaturalización: 95°C durante 10 minutos
- Alineación y elongación: 95°C durante 15 segundos
- Alineación y elongación final: 60°C durante 1 minuto
- Se llevaron a cabo 40 ciclos

Software

Una vez realizado el proceso de amplificación, se analizaron los resultados en el mismo equipo por medio del software SDS 3.1. El análisis se llevó a cabo mediante discriminación alélica a través de identificación por figuras y colores: rombo azul para homocigotos en la variante silvestre, círculo rojo para homocigotos tipo mutante y triángulo verde para heterocigotos.

Anexo 4. polimorfismos de cetohexocinasa - Hapmap SNPs

KHK ketohexokinase (fructokinase) [*Homo sapiens* (human)]

Official Symbol KHK
Official Full Name ketohexokinase (fructokinase)
Organism [Homo sapiens](#)
Lineage Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo
Summary This gene encodes ketohexokinase that catalyzes conversion of fructose to fructose-1-phosphate. The product of this gene is the first enzyme with a specialized pathway that catabolizes dietary fructose. Alternatively spliced transcript variants encoding different isoforms have been identified.

Location: 2p23.3 See KHK in [Epigenomics](#), [MapView](#)
Sequence: Chromosome: 2; NC_000002.11 (27309611..27323619)

rs12714092

Reference SNP(refSNP) Cluster Report: rs12714092

RefSNP	Allele
Organism: human (Homo sapiens)	Variation Class: SNV: single nucleotide variation
Molecule Type: Genomic	RefSNP Alleles: A/G
Created/Updated in build: 121/138	Allele Origin:
Map to Genome Build: 37.5	Ancestral Allele: G
Validation Status:	Clinical Channel: unknown
	Clinical Significance: NA
	MAF/MinorAlleleCount: A=0.294/640
	MAF Source: 1000 Genomes

rs3769139

Somatic Allele

Reference SNP(refSNP) Cluster Report: rs3769139

RefSNP	Allele
Organism: human (Homo sapiens)	Variation Class: SNV: single nucleotide variation
Molecule Type: Genomic	RefSNP Alleles: C/T
Created/Updated in build: 107/138	Allele Origin:
Map to Genome Build: 37.5	Ancestral Allele: C
Validation Status:	Clinical Channel: unknown
	Clinical Significance: NA
	MAF/MinorAlleleCount: C=0.433/942
	MAF Source: 1000 Genomes



Reference SNP(refSNP) Cluster Report: rs2304681	
RefSNP	Allele
Organism: human (Homo sapiens)	Variation Class: SNV: single nucleotide variation
Molecule Type: Genomic	RefSNP Alleles: A/G
Created/Updated in build: 100/138	Allele Origin:
Map to Genome Build: 37.5	Ancestral Allele: G
Validation Status:	Clinical Channel: unknown
	Clinical Significance: NA
	MAF/MinorAlleleCount: A=0.340/741
	MAF Source: 1000 Genomes