



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

**“Influencia de los polimorfismos rs1527479
del gen *CD36* y rs675 de *APOA4* en las
concentraciones séricas de vitamina E y perfil
de lípidos en escolares de Chimalhuacán”**

Tesis

Para obtener el título de
Química Farmacéutica Bióloga

Presenta:
María del Carmen Marroquín Fernández



México D.F.

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: CERVANTES PEREDO ALICIA BEATRIZ

VOCAL: Profesor: CANIZALES QUINTERO SAMUEL

SECRETARIO: Profesor: MENJIVAR IRAHETA MARTA ALICIA (asesor)

1er. SUPLENTE: Profesor: COELLO COUTIÑO MARTHA PATRICIA

2° SUPLENTE: Profesor: CARMONA SALAZAR LAURA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: FACULTAD DE QUÍMICA

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Marta Alicia Menjivar Iraheta

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. Ma. De los Ángeles Granados Silvestre

SUSTENTANTE (S):

María del Carmen Marroquín Fernández

**Esta Tesis fue apoyada por el proyecto PAPIIT IN221014, de la DGAPA,
UNAM.**

Contenido

Lista de abreviaturas	5
Resumen	6
1.0 Introducción	8
1.1 Genómica nutricional.....	8
1.2 Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP)	9
1.3 Papel y función de las vitaminas	10
1.3.1 Generalidades de la Vitamina E	11
1.3.2 Importancia de la vitamina E en el desarrollo	12
1.3.3 Fuentes de Vitamina E	13
1.3.4 Absorción, metabolismo y distribución.....	13
1.3.5 Suplementación de los alimentos en México	14
1.4 Las lipoproteínas y su importancia en el metabolismo de los lípidos.	16
1.4.1 Estructura de las lipoproteínas	16
1.4.2 Clasificación de las lipoproteínas.....	17
1.4.3 Importancia de las HDL en el buen funcionamiento cardiovascular ..	19
1.5 CD36	20
1.5.1 rs1527479.....	21
1.6 APOA4	22
1.6.1 rs675.....	23
1.7 Población en estudio	24
2.0 Justificación	25
3.0 Hipótesis.....	26
4.0 Objetivo	27
4.1 Objetivo general	27
4.2 Objetivos particulares.....	27
5.0 Material y Métodos	28
5.1 Población de estudio	28
5.2 Obtención de muestras y datos antropométricos	28
5.3 Obtención de DNA	28
5.3.1 Descripción del método usado para la extracción de DNA (Miller, 1988) 28	
5.3.2 Cuantificación de DNA y determinación del grado de pureza.....	29

5.3.3	Determinación de integridad del DNA.....	30
5.4	Genotipificación de los polimorfismos seleccionados por PCR en tiempo real	30
5.4.1	Fundamento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real y de las sondas TaqMan	30
5.5	Determinación de parámetros bioquímicos	32
5.5.1	Determinación de vitamina E.....	34
5.6	Cálculo de las frecuencias alélicas y genotípicas	35
5.7	Determinación del equilibrio de Hardy-Weinberg.....	35
5.7	Determinación de la relación entre los polimorfismos en APOA4 y CD36	35
6.0	Resultados.....	36
6.1	Demografía de la población en estudio.....	36
6.2	Determinación de integridad y pureza del DNA usado para la genotipificación	38
6.3	Gráfico de discriminación alélica obtenido con la PCR-TR para CD36 y APOA4.....	39
6.4	Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos	41
6.5	Correlación entre los polimorfismos y las concentraciones séricas de vitamina E y el perfil de lípidos.....	43
7.0	Discusión.....	48
8.0	Conclusiones.....	53
9.0	Bibliografía.....	54

Lista de abreviaturas

AG	Ácido grasos
APOA4	Apolipoproteína A4
CD36	Cluster of differentiation 36 (Grupo de diferenciación)
DIF	Desarrollo Integral de la Familia
DNA	Ácido desoxirribonucleótido
DT2	Diabetes tipo 2
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
HDL	High density lipoprotein (Lipoproteína de alta densidad)
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
LCAT	Lecitin-colesterol aciltransferasa
LDL	Low density lipoprotein (Lipoproteína de baja densidad)
NCBI	National Center for Biotechnology (Centro nacional para la biotecnología)
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Polymerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
SNP	Single Nucleotid Polymorphism (Polimorfismo de un solo nucleótido)
UNICEF	United Nations Children's Fund (Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia)
VLDL	Very low density lipoprotein (Lipoproteína de muy baja densidad)

Resumen

La forma en que hoy día estudiamos y entendemos la nutrición está cambiando profundamente gracias a los hallazgos y metodologías procedentes de la biología molecular. La nutrigenética caracteriza las distintas variantes del genoma humano que influyen en la respuesta del organismo a los nutrientes. Entre estas variaciones en la secuencia del DNA que pueden afectar la respuesta de los individuos a nutrientes, enfermedades, bacterias, virus, fármacos, etc., se encuentran los polimorfismos de un solo nucleótido o SNP; estos son una variación en la secuencia de DNA que afecta a una sola base de una secuencia del genoma, representan a las variantes genéticas más comúnmente encontradas en el genoma humano. En este contexto, existen dos SNP relacionados con la absorción y metabolismo de la vitamina E y los ácidos grasos; el rs1527479 (T>C) en el gen *CD36* y el rs675 (T>A) en el gen *APOA4* respectivamente. *CD36* ha sido caracterizado como un transportador de ácidos grasos de cadena larga, relacionado con el reconocimiento de un amplio rango de moléculas lipídicas, incluyendo la vitamina E y su absorción intestinal. La vitamina E posee entre otras funciones actividad antioxidante, evitando así la lipoperoxidación. Estudios previos asocian concentraciones significativamente bajas de vitamina E con el rs1527479, así también, que los individuos con una deficiencia del transportador *CD36*, presentan alta concentración de triglicéridos y baja de HDL. Respecto a la apolipoproteína A4 (*APOA4*), esta es sintetizada en el intestino como componente de los quilomicrones y del HDL en respuesta a los lípidos provenientes de la dieta, además de ser un activador de la *LCAT*; por lo que una deficiencia en *APOA4* está relacionado con una disminución de las HDL y una elevación del colesterol total. Reportes muestran que los portadores homocigotos del alelo de riesgo (A) del rs675 presentan un aumento significativo en el nivel de colesterol total y el LDL; además de que se relaciona con un aumento en la concentración de triglicéridos y una reducción del cociente de lipoproteínas de alta/baja densidad HDL/LDL; una disminución de las HDL respecto a las LDL, se relaciona con una alta susceptibilidad de aterosclerosis y riesgo cardiovascular.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la frecuencia de los polimorfismos rs1527479 de *CD36* y rs675 de *APOA4*, así como su relación con las concentraciones de vitamina E y el perfil de lípidos, en población infantil mexicana del Municipio de Chimalhuacán, Estado de México. Se seleccionaron 252 niños de entre 8 y 12 años, se obtuvieron dos muestras de sangre periférica y registraron medidas antropométricas. Se determinaron las concentraciones del perfil de lípidos para todas las muestras y vitamina E en 98 sueros. Se extrajo el DNA por medio del método de Miller y se genotiparon por PCR-TR (Applied Biosystems, EUA), utilizando sondas TaqMan. Se realizaron análisis estadísticos de acuerdo a un modelo lineal general univariante, para evaluar la relación de las concentraciones séricas de vitamina E, HDL, LDL, VLDL, triglicéridos y colesterol total con los polimorfismos de acuerdo a tres modelos de herencia por medio del software SPSS 22.0

Resultados: Se encontraron frecuencias genotípicas para el rs1527479 (T>C) de TT: 0.28, TC: 0.52 y CC: 0.20; para el rs675 (T>A) de TT: 0.64, TA: 0.29 y AA: 0.07. Respecto a las frecuencias alélicas se encontraron el rs1527479 (T/C) 0.54/0.46 y para el rs675 (T/A) 0.79/0.21. No se encontró desviación al equilibrio de Hardy-Weinberg en ninguno de los casos. A su vez se encontró significancia estadística ($p= 0.003$ y 0.006) asociado a concentraciones bajas de HDL, con los modelos dominante y aditivo respectivamente para el rs1527479. No se encontró correlación con los parámetros evaluados para el rs675.

Conclusiones: Se determinaron las frecuencias alélicas y genotípicas en una población de niños mestizo mexicanos, para el rs1527479 en *CD36* y el rs675 en *APOA4*. No hubo desviación al equilibrio de Hardy-Winberg en ninguno de los casos. El desarrollo del presente trabajo permitió relacionar el rs1527479 con una reducción significativa de la concentración de HDL ($p<0.050$) en los modelos de herencia aditivo y dominante. Para la variante rs675 del gen *APOA4* no se encontró relación con las concentraciones de HDL, LDL, VLDL, colesterol, triglicéridos y el cociente HDL/LDL.

1.0 Introducción

1.1 *Genómica nutricional*

La forma en que hoy día estudiamos y entendemos la nutrición está cambiando profundamente gracias a los hallazgos y metodologías procedentes de la biología molecular. Una de las principales consecuencias prácticas derivada de esta nueva área de estudio, será disponer de los conocimientos necesarios para construir de manera científica y sólida, recomendaciones dietéticas que permitirán diseñar una mejor dieta, la más adecuada y recomendada para la historia genética individual (Lorenzo, 2011).

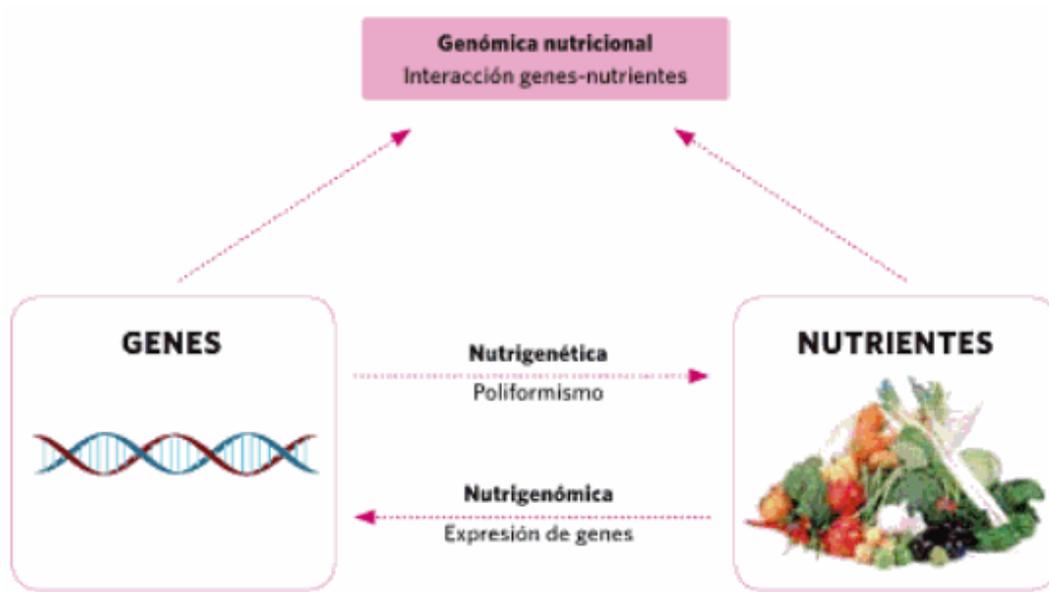


Figura 1. Genómica nutricional: Interacción genes-nutrientes

Actualmente los objetivos de la genómica nutricional son principalmente dos, marcando dos campos de investigación claramente diferenciados:

1. Entender cómo los nutrientes que incorporamos con la dieta influyen en la homeostasis celular, alterando la actividad génica, la producción de proteínas y/o la producción de metabolitos (Nutrigenómica).
2. Caracterizar cómo las distintas variantes del genoma humano influyen en la respuesta del organismo a los nutrientes, aumentando o disminuyendo el riesgo de padecer enfermedades relacionadas con la nutrición. El estudio y

caracterización de estas variantes, así como las bases moleculares de dichas predisposiciones, se denomina nutrigenética (Lorenzo, 2011).

1.2 Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP)

Entre estas variaciones en la secuencia del DNA que pueden afectar la respuesta de los individuos a nutrientes, enfermedades, bacterias, virus, fármacos, etc., se encuentran los polimorfismos de un solo nucleótido o SNP; estos son una variación en la secuencia de DNA que afecta a una sola base de una secuencia del genoma, representan a las variantes genéticas más comúnmente encontradas en el genoma humano. Una de estas variaciones debe darse al menos entre el 1-5% de la población para ser considerada como SNP; sino se llega al 1% se considera una mutación puntual (Sonestedt, 2009).

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; Debido a su amplia distribución, estos polimorfismos se localizan en cualquier parte de la estructura de los genes y el genoma. 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 (Fragoso, 2013).

En este contexto, la caracterización de factores genéticos involucrados en genes clave para la absorción de nutrientes o de su metabolismo, será muy importante ya que deberán ser tomados en cuenta para el diseño de intervenciones dietéticas que tendrán como base el conocimiento genómico y las necesidades nutricionales de la población, que tienen como objetivo la prevención del desarrollo de los efectos metabólicos resultantes (Martínez, 2005).

En esta tesis, se seleccionaron dos SNP para su estudio, con base en estudios previos se han relacionado con el estado nutricional, específicamente con el metabolismo de ácidos grasos, estos son el rs1527479 del gen *CD36* y el rs675 del gen *APOA4*

1.3 *Papel y función de las vitaminas*

Además de sus componentes mayoritarios (proteínas, ácidos nucleicos, glúcidos y lípidos) las células vivas contienen también vitaminas, sustancias orgánicas en cantidades mínimas (trazas). Aunque estas sustancias son vitales para muchas formas de vida, su importancia biológica se manifestó debido a que algunos organismos no las pueden sintetizar, y deben adquirirlas, por tanto, son de procedencia exógena (Valente, 2015)

La determinación de las cantidades precisas de vitaminas exógenas que necesita el hombre es siempre complicada, debido a que parte o toda la demanda de la misma se obtiene gracias a la presencia de los microorganismos intestinales, que sintetizan algunas de las vitaminas. Se descubrió que algunas de estas vitaminas actúan como componentes fundamentales de algunas coenzimas, entre otras cosas (Lehninger, 2005).

Las vitaminas se clasifican en dos grandes grupos, las hidrosolubles y las liposolubles (**Tabla 1**).

Tabla 1. Clasificación de las vitaminas. (Lehninger, 2005)

Tipo	
Hidrosolubles	Liposolubles
Tiamina	Retinol
Riboflavina	Colecalciferol
Ácido nicotínico	α -Tofeol
Ácido pantoténico	Menaquinona
Piridoxina	
Biotina	
Ácido fólico	
Cobalamina	
Ácido lipoíco	
Ácido ascórbico	

1.3.1 Generalidades de la Vitamina E

La vitamina E se presenta en la dieta como una mezcla de varios compuestos estrechamente relacionados, es el término general usado para todas las formas activas de tocoferoles y tocotrienoles. En forma natural existen ocho formas de isómeros (**Figura 2**), cuatro tocoferoles (α -, β -, γ -, δ -tocoferol) y cuatro tocotrienoles (α -, β -, γ -, δ -tocotrienol); los ocho isómeros tienen un anillo aromático, llamado cromano, con un grupo hidroxilo y una cadena poliprenoide de 16 carbonos, si la cadena poliprenoide es saturada corresponderán a los tocoferoles y si es insaturada (tres dobles enlaces) a los tocotrienoles. (Jiang, 2014). El más activo y abundante es el α -tocoferol. Se ha descubierto que los tocoferoles poseen actividad antioxidante, es decir, que impiden la oxidación de los ácidos grasos insaturados cuando se encuentran expuestos al oxígeno molecular, por lo que se dice que una de las funciones del tocoferol es la de proteger a los ácidos grasos insaturados presentes en los lípidos de las membranas; normalmente, los productos de auto-oxidación de las grasas insaturadas no aparecen en los tejidos, pero en el caso de deficiencia de tocoferol, son detectables en las grasas de depósito, en el hígado y en otros órganos (Lehninger, 2005).

La vitamina E es absorbida pasivamente en conjunto con otras vitaminas liposolubles en el tracto gastrointestinal, y a continuación es empacada en los quilomicrones; es la primera línea de defensa, seguida por el selenio contra la peroxidación de los lípidos contenidos en las membranas celulares.

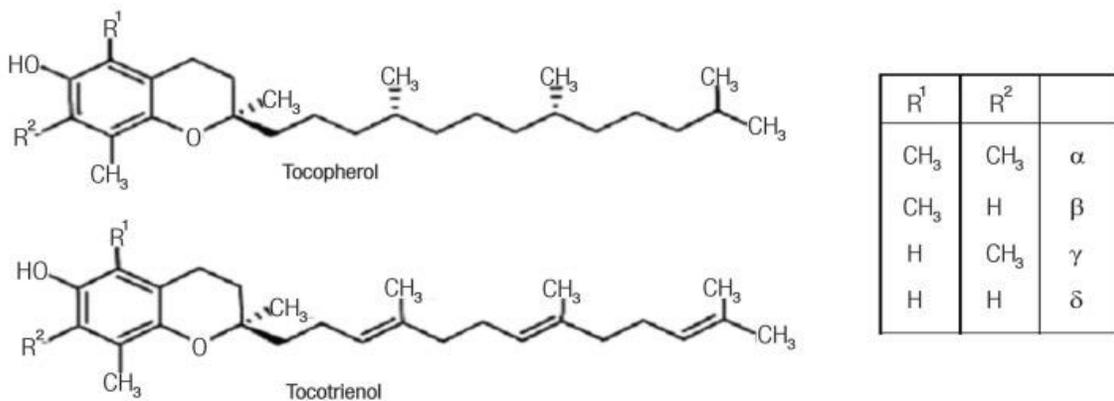


Figura 2. Estructura de los isómeros de la vitamina E en su forma natural

Los tocoferoles actúan como antioxidantes al romper la cadena de reacciones de los radicales libres, previniendo la propagación de estos en las membranas y en las lipoproteínas del plasma, este papel deriva de su estructura molecular, ya que al formarse los radicales peroxilo ($\text{ROO}\cdot$), reaccionan 1000 veces más rápido con la vitamina E (Vit E-OH), que con los AG poliinsaturados. El grupo hidróxilo de los tocoferoles reacciona con el radical peroxilo para formar el correspondiente hidroperóxido del lípido y el radical tocoferil (Vit E-O \cdot), éste radical reacciona con la vitamina C (u otro donador de hidrógenos), regresando a la vitamina E a su estado reducido (Engerlking, 2014)

1.3.2 Importancia de la vitamina E en el desarrollo

La deficiencia de vitamina E es rara en humanos, debido a que se presenta casi exclusivamente de manera hereditaria, por una condición adquirida de la habilidad de absorberla, o la presencia de desórdenes en su metabolismo. Esta deficiencia durante el desarrollo está relacionada principalmente con síntomas neurológicos incluyendo ataxia cerebelar, neuropatía periférica y miopatía; esto debido a que al jugar un papel en la estabilización de las membranas aunado a su papel antioxidante, una disminución en la concentración de esta vitamina se ha relacionado en el mecanismo neuronal del daño debido a reacciones hiperoxidativas aceleradas en los AG insaturados en la membrana de fosfolípidos (Kuroiwa, 2009).

A su vez puede resultar en anemia debido a daño oxidativo causando fragilidad de los eritrocitos, degeneración muscular, esteatosis y retinopatía (Engerlking, 2014). Si la deficiencia de vitamina no es tratada, se ha relacionado a edades más tardías con el desarrollo de ceguera, enfermedades cardíacas, daño nervioso permanente y dificultad para pensar, así como con enfermedades involucradas con procesos oxidativos como cáncer, diabetes, cuadros infecciosos, envejecimiento, etc., (Devlin, 2011) además de que algunos reportes sugieren que también causa infertilidad (Mahdi, 2014).

1.3.3 Fuentes de Vitamina E

Las principales fuentes de vitamina E son los aceites vegetales como los de maíz y de soya, así como el germen de trigo y la margarina.

1.3.4 Absorción, metabolismo y distribución

La absorción de tocoferoles depende de los mismos factores que la digestión y absorción de lípidos a nivel intestinal, siendo esenciales para este proceso la presencia de sales biliares y enzimas pancreáticas. La vitamina E es transportada a la mucosa intestinal y una vez dentro de la luz intestinal es incorporada a los quilomicrones los cuales son transportados en la circulación linfática; sólo una pequeña parte de la vitamina E consumida es transportada directamente a la circulación portal (Morrison, 2015).

El promedio del porcentaje de absorción de la vitamina E consumida en la dieta (0.4-1 mg) es entre 50 y 70%. Sin embargo la eficiencia de la absorción puede disminuir cuando se consumen mayores cantidades de tocoferol. Un incremento de los ácidos grasos poliinsaturados de la dieta, o la administración conjunta de vitamina E con sales ferrosas o resinas captadoras de ácidos biliares, interfieren con la digestión y absorción de la vitamina E (Jiang, 2014).

Los tocoferoles son distribuidos en el plasma con las lipoproteínas, la mayoría de la vitamina E está presente en el plasma humano en las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y en las de alta densidad (HDL) (Kuroiwa, 2009).

Los compuestos de vitamina E se encuentran concentrados en sitios donde haya abundantes ácidos grasos, especialmente en estructuras de las células que contienen membranas de fosfolípidos. Los tejidos con mayor contenido de lípidos tienden a tener mayor contenido de vitamina E; en la sangre la cantidad de lípidos es determinante de la concentración de vitamina E circulante. La mayoría de los tejidos incorporan vitamina E, pero el hígado es el principal depósito del que se puede movilizar rápidamente. El tejido adiposo también acumula vitamina E continuamente y puede secuestrarla; y aunque este tejido constituya una gran reserva de vitamina E, el tocoferol presente en los adipocitos no está disponible para otros tejidos con facilidad (Havlik, 1996).

1.3.5 Suplementación de los alimentos en México

En México existe la Norma Oficial Mexicana NOM-086-SSA1-1994, titulada “Bienes y Servicios. Alimentos y bebidas no alcohólicas con modificaciones en su composición. Especificaciones nutrimentales”, que fue creada con la premisa de que “Las ciencias médico-biológicas comprueban día a día la correlación que existe entre la salud y la alimentación; debido a esto en nuestros tiempos se elaboran en grandes cantidades alimentos y bebidas no alcohólicas con modificaciones en su composición por disminución, eliminación o adición de nutrimentos con la finalidad de contribuir a evitar deficiencias y prevenir excesos perjudiciales para la salud. Como consecuencia se hace necesario establecer especificaciones nutrimentales a las cuales deben sujetarse dichos productos” (NOM-086-SSA1-1994).

En esta norma se define a un suplemento alimenticio como un producto a base de hierbas, extractos vegetales, alimentos tradicionales, deshidratados o concentrados de frutas, adicionados o no, de vitaminas y minerales, que se puedan presentar en forma farmacéutica y cuya finalidad de uso sea incrementar la ingesta dietética total, complementarla o suplir algunos de sus componentes (NOM-086-SSA1-1994).

Se incluye a las vitaminas: ácido ascórbico, niacinamida, riboflavina, tiamina, vitamina A, vitamina E, vitamina B₆, vitamina B₁₂, pantotenamida, ácido fólico, vitamina D, vitamina K y biotina; enfatizando en que los límites mínimos y máximos permitidos para la adición, fortificación y enriquecimiento de alimentos y bebidas no alcohólicas será del 5 al 100% por porción de la ingesta diaria recomendada, siempre y cuando el aporte del nutrimento en las condiciones normales o usuales de consumo, no sobrepase la ingestión diaria recomendada (Cofepris, 1996).

Tabla 2. Ingesta diaria recomendada establecida por el Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán" (Cofepris, 1996)

Edad	Vitamina E (mg)
Niños de 0 a 11 meses	3-4
Niños de 1 a 3 años	6
Mayores de 3 años	10

A pesar de los enormes avances y esfuerzos que en general ha realizado México en los últimos años, la deficiente utilización de diversos nutrientes sigue siendo una de las principales causas de muerte de 2.6 millones de niños cada año (un tercio de las muertes infantiles) y deja millones más con deficiencias físicas y mentales de por vida. Esta situación afecta significativamente a todo el territorio mexicano, poniendo de manifiesto la necesidad de aumentar los esfuerzos de promover una dieta saludable y equilibrada en todos los grupos de edad, con especial hincapié en niños, niñas y adolescentes (OMS, 2013).

Existe un amplio interés en la prevención de algunas condiciones y enfermedades crónicas principalmente cáncer y enfermedad cardíaca, por lo que muchos de los esfuerzos están enfocados hacia la efectividad de los componentes de la dieta como agentes importantes en esta prevención. En este sentido en el campo de la nutrición se han focalizado investigaciones con el fin de estudiar el efecto antioxidante de diversos nutrientes así como también sus posibles efectos pro-oxidantes (Hayek, 1995). Esto debido a que a largo plazo la malnutrición favorece la aparición de enfermedades metabólicas, tales como la DT2, debido a que se ha encontrado que los síndromes clínicos secundarios de la desnutrición aguda que tienen un origen temprano en la vida, llevan consigo efectos metabólicos resultantes que pueden persistir en la vida adulta. Las personas en esta condición tienden a tener secreción de insulina significativamente más baja y mayor intolerancia a la glucosa (Boyne Michael, 2014) conduciendo a DT2, la cual es la principal causa de muerte en adultos, la primera causa de demanda de atención médica y la enfermedad que consume el mayor porcentaje de gastos en las instituciones públicas (UNICEF, 2015).

1.4 Las lipoproteínas y su importancia en el metabolismo de los lípidos.

Los lípidos y las proteínas se asocian de manera no covalente para formar lipoproteínas, las cuales son complejos unidos en una relación relativamente fija; que funcionan en el plasma sanguíneo como vehículos de transporte para los triacilgliceroles y el colesterol (Hovsepián, 2015)

1.4.1 Estructura de las lipoproteínas

Los lípidos, como fosfolípidos, triacilgliceroles y colesterol, son apenas solubles en solución acuosa, por ende, se transportan por la circulación como componentes de lipoproteínas, partículas similares a micelios globulares que presentan un centro no polar de triacilgliceroles y ésteres de colesterol rodeados por un revestimiento anfífilo de proteínas, fosfolípidos y colesterol (Devlin, 2011)

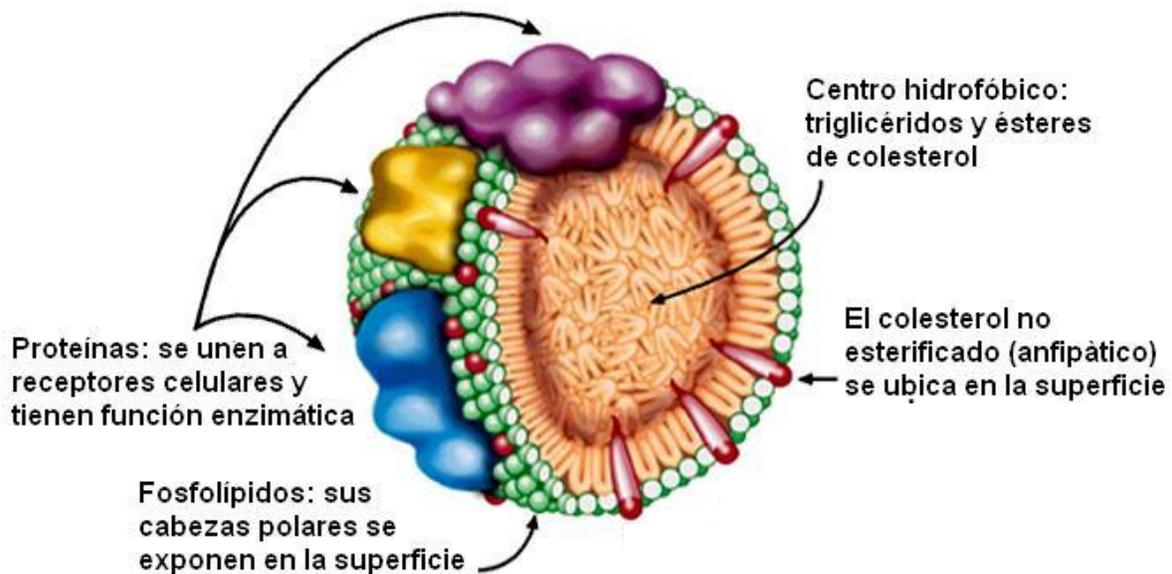


Figura 3. Estructura de una lipoproteína (Modificado de Lehninger 2005).

1.4.2 Clasificación de las lipoproteínas.

Las lipoproteínas se clasificaron en cinco categorías amplias sobre la base de sus propiedades funcionales y físicas (**Tabla 3**) (Nelson, 2007).

1.0 Quilomicrones, que transportan triacilgliceroles y colesterol exógenos (aportados en forma externa; en este caso, de la dieta) desde los intestinos hasta los tejidos.

2-4. Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) y lipoproteínas de baja densidad (LDL), un grupo de partículas relacionadas que transportan triacilgliceroles y colesterol endógenos (producidos de manera interna) desde el hígado hasta los tejidos (el hígado sintetiza triacilgliceroles a partir del exceso de hidratos de carbono)

5. Lipoproteínas de alta densidad (HDL), que transportan colesterol endógeno desde los tejidos hasta el hígado.

Tabla 3. Clasificación de lipoproteínas de acuerdo a su composición (Nelson, 2007)

Densidad (g / ml)	Clase	Diámetro (nm)	% De proteína	% De colesterol	% De fosfolípidos	% De triglicéridos
> 1.063	HDL	15.05	33	30	29	4
1.019-1.063	LDL	18-28	25	50	21	8
1.006-1.019	IDL VLDL	25-50	18	29	22	31
0.95-1.006	VLDL	30-80	10	10	18	50
<0,95	Quilomicrones	100-1000	<2	8	7	84

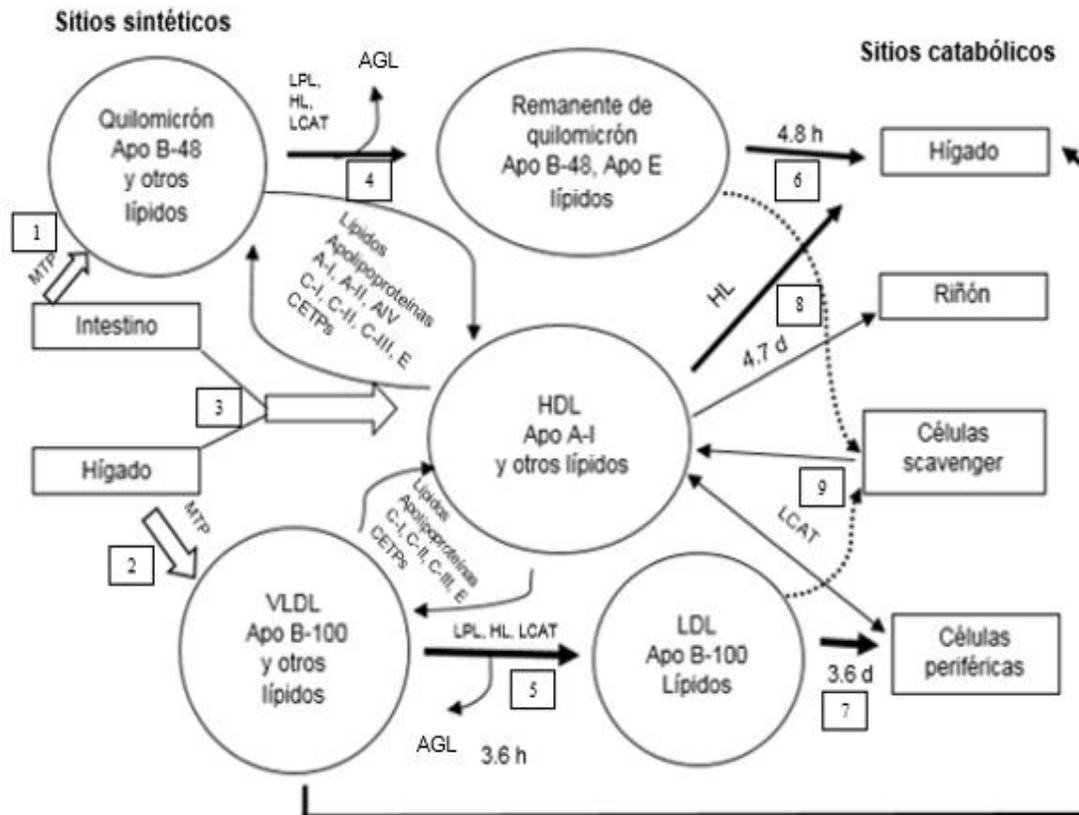


Figura 4. Esquema de la síntesis y metabolismo de lipoproteínas. CETP proteína de transferencia de ésteres del colesterol (transfiere ésteres del colesterol de las LDL y HDL a los remanentes de lipoproteínas ricas en triglicéridos; AGL, Ácidos grasos libres; HL, lipasa hepática (hidroliza los AG de fosfolípidos y triglicéridos); LCAT, lecitina colesterol acil transferasa (transfiere AG de la lecitina al colesterol para formar éster de colesterol); LPL, lipoproteína lipasa (hidroliza AG del esqueleto del glicerol en triglicéridos); MTP, proteína de transferencia microsomal (une lípidos con Apo B). Flechas blancas indican rutas de secreción. Flechas negras indican rutas catabólicas (con tiempos medios de residencia para apo-B48, apo A-I, y apo B-100, respectivamente). (Modificada de Bisgaier CL, 1983)

Las partículas de las lipoproteínas sufren un procesamiento metabólico continuo (**Figura 4**), de modo que tienen propiedades y composiciones variables; cada una de ellas contiene proteínas, fosfolípidos y colesterol sólo suficientes como para formar una monocapa de un espesor aproximado de 20 Å de estas sustancias sobre la superficie de la partícula. Las densidades de las lipoproteínas aumentan con el diámetro decreciente de las partículas, porque la densidad de su revestimiento externo es mayor que la de su centro interior (Voet, 2006).

1.4.3 Importancia de las HDL en el buen funcionamiento cardiovascular

Las HDL tienen en esencia la función opuesta de las LDL: eliminan el colesterol de los tejidos; éstas se ensamblan en el plasma a partir de componentes obtenidos en gran parte por medio de la degradación de otras lipoproteínas. Las HDL circulantes extraen su colesterol de las membranas de la superficie celular y lo convierten en ésteres del colesterol por medio de la acción de LCAT, enzima activada por APOA1/4, por lo tanto, HDL funciona como eliminador del colesterol (Shahid, 2015).

Algunos estudios epidemiológicos indican que las concentraciones plasmáticas elevadas de HDL se correlacionan con firmeza con una baja incidencia de enfermedad cardiovascular. Las mujeres tienen concentraciones de HDL más altas que los hombres y también menos enfermedad cardíaca. Muchos de los factores que disminuyen la incidencia de enfermedad cardíaca también tienden a aumentar la concentración de HDL, como lo son ejercicio extenuante y pérdida de peso, por el contrario, el hábito de fumar cigarrillos se relaciona inversamente con la concentración de HDL (Shahid, 2015).

También hay una correlación inversa firme en los seres humanos entre el riesgo de aterosclerosis y la concentración plasmática de APOA1, uno de los componentes proteicos principales de las HDL junto con APOA4, necesario para su ensamblaje (Voet, 2006).

APOA4 está involucrada en la remodelación y ensamblaje de las partículas HDL, lo que significa que participa en el proceso biológico de la adquisición, pérdida o modificación de una proteína o lípido dentro de una partícula de lipoproteína de alta densidad, incluyendo la hidrólisis de los triglicéridos por la lipasa hepática (Agrawai, 2010)

1.5 CD36

El gen *CD36* está ubicado en el cromosoma 7, región 7q11.2, tiene 18 exones y 17 intrones. Codifica para CD36, llamado a su vez receptor de trombospondina, es una glicoproteína de 88 kDa, fue originalmente descrita como un receptor en plaquetas que pertenece a la familia de receptores scavenger clase B, es expresado en un amplio rango de células y tejidos, incluyendo células del endotelio microvascular, monocitos y macrófagos, células dendríticas, adipocitos, queratinocitos, músculo cardíaco y esquelético, microglia, Creticulocitos, plaquetas, hepatocitos, intestino, entre otros; y que se une a diversos ligandos (Jay, 2015)

Ha sido mejor caracterizado como un transportador de AG de cadena larga, involucrado en diferentes procesos biológicos como angiogénesis, inflamación, metabolismo de lípidos, aterosclerosis y activación de plaquetas. Es receptor de un amplio rango de moléculas lipídicas, incluyendo el colesterol, vitamina E, provitamina A, entre otros (Li, 2015).

Además de AG, CD36 se une a lipoproteínas nativas y actúa en la recaptura de esteres del colesterol, facilitando la recaptura por parte de macrófagos de las lipoproteínas de baja/alta densidad oxidadas y colesterol. Se ha demostrado que el CD36 de monocitos/macrófagos tiene un papel crítico en el desarrollo de lesiones ateroscleróticas por su capacidad de unirse y promover la endocitosis de LDL oxidadas (oxLDL), este proceso resulta en la activación de monocitos y su diferenciación hacia macrófagos y células espumosas (Parra-Rojas, 2014).

Recientes estudios han involucrado a este receptor en la captura del α -tocoferol por las células intestinales y su distribución en diferentes tejidos específicos, en cuyo caso las concentraciones de vitamina E son moduladas por factores dietéticos, estrés oxidativo (puede disminuir las concentraciones de Vit. E) y genéticos como lo son polimorfismos en genes involucrados en el metabolismo de vitamina E y lipoproteínas (Mahdi, 2014).

1.5.1 rs1527479

La variante rs1527479 T>C, ubicada en el intrón 4, en la posición 7:80643252, da como resultado un transportador CD36 deficiente (NCBI, 2015).

El SNP se ha asociado a concentraciones significativamente bajas del α -tocoferol, a su vez, los resultados sugieren que está involucrado con su absorción intestinal y uso en tejidos de esta vitamina (Borel, 2011).

En pacientes con una deficiencia en CD36 se han visto diferentes fenotipos, entre los que se encuentran concentraciones elevadas de triglicéridos en ayunas, baja concentración de HDL, hiperglicemia en ayunas, resistencia a la insulina e hipertensión, datos similares encontrados en síndrome metabólico. Posteriormente se reportó que la acumulación de estos fenotipos metabólicos no se debe a la deposición de grasa visceral en el abdomen, sino a resistencia a la insulina o a un deficiente metabolismo de lipoproteínas y ácido grasos libres (Kawase, 2012).

Como resultado de sus múltiples ligandos y funciones, CD36 puede impactar en una variedad de condiciones ligadas al síndrome metabólico, incluida la diabetes, resistencia a la insulina, inflamación y aterosclerosis (Agrawai, 2010).

1.6 APOA4

El gen *APOA4*, está localizado cromosoma 11, en la región 11q23, contiene 3 exones separados por dos intrones (NCBI, 2015).

Codifica para la apolipoproteína A4, la cual es una glicoproteína plasmática, con un peso molecular de 46,000 D, tiene 376 residuos de aminoácidos. Se sintetiza en los enterocitos del intestino delgado posterior a una comida rica en grasas. La apolipoproteína A4 representa el mayor constituyente proteico de las nuevas lipoproteínas ricas en triglicéridos secretadas por el intestino (quilomicrones). El incremento significativo en la síntesis y secreción de *APOA4* por el intestino durante la absorción de AG y la rápida disociación de esta proteína de la superficie de los quilomicrones linfáticos durante el catabolismo de estas partículas, sugiere que tiene un papel significativo en el metabolismo de los triglicéridos. Igualmente se ve involucrada en la activación de la lecitin-colesterol aciltransferasa (LCAT), y la influencia de la reacción de LCAT en la distribución entre diferentes lipoproteínas indica que también está involucrada en el metabolismo del colesterol (Antonarakis, 1986).

APOA4 al ser secretada por los enterocitos hacia el fluido linfático como un componente de los quilomicrones en el estado de ayuno, existe normalmente tanto en estado libre como en asociación con partículas HDL, está involucrada en el eflujo del colesterol a partir de tejidos periféricos, participa en el catabolismo de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), formación de las LDL y es clave en la esterificación del colesterol; por lo tanto es esperado que cambios estructurales en *APOA4* tengan una influencia sobre la concentración de lípidos en el plasma (Kamboh, 1997). *APOA4* es secretada a la linfa mesentérica en los quilomicrones, donde es intercambiada por la apolipoproteína C-II (*APOC-II*) desde la lipoproteína de alta densidad (HDL). *APOC-II* es un cofactor requerido para la actividad de la lipoprotein lipasa (LPL), la cual lleva acabo la hidrólisis de los triglicéridos contenidos en los quilomicrones. Así la *APOA4* regula la depuración de las lipoproteínas ricas en triglicéridos de origen intestinal (Bisgaier CL, 1983).

1.6.1 rs675

La variante rs675 T>A, ubicada en el exón 3, en la posición 11:116820950, es una transversión intragénica, que da como resultado un cambio de sentido. Al ser una mutación de cambio de sentido causa que el aminoácido codificado sea otro, en este caso el cambio se da en la posición p.Thr347Ser (NCBI, 2015).

El fenotipo que ha sido asociado al rs675 es principalmente concentraciones elevadas de triglicéridos en plasma y una reducción del cociente de lipoproteínas de alta/baja densidad (HDL/LDL) (Kiyomi, 2011). Mutaciones en *APOA4* pueden producir diferentes respuestas respecto a los lípidos de la dieta, así Ostos y cols.(2015), demostraron que los portadores del alelo p.347Ser depuraron más rápido las partículas de origen intestinal ricas en triglicéridos en individuos que consumieron una dieta alta en grasa. Se conoce también que este polimorfismo puede ser modulado a través de cambios en la dieta, estudios realizados por Jansen y cols. (2013), demuestran que los individuos p.347Ser presentan un mayor descenso en el colesterol total, LDL y APOB que los homocigotos para el alelo p.347Thr, tras una dieta tipo NCEP1. (Kamboh, 1997)

1.7 Población en estudio

Chimalhuacán es uno de los 125 municipios del estado de México, forma parte de la zona Metropolitana de la Ciudad de México, está ubicado en la zona oriente del Valle de México, colindando al norte con el municipio de Texcoco, al sur con los municipios de La Paz y Nezahualcóyotl; tiene una población de 525,389 habitantes según datos del INEGI, la población es producto de una mezcla de grupos étnicos originarios de varias partes de la República (Chimalhuacán, 2015).

De los habitantes de este municipio 43.1% son menores de edad y 56.9% adultos; una gran parte de la población proviene de familias indígenas, el 2.7% de los adultos habla alguna lengua indígena; en su mayoría los adultos en edad de trabajar tienen un nivel de escolaridad básica. El tamaño promedio de los hogares es de 4.2 personas, de los cuales la mitad son niños en edad escolar, así como ambos padres como sostén económico; hay un total de 614 escuelas de educación básica y media superior, con una alta tasa de deserción debido a causas principalmente económicas (INEGI, 2015).

2.0 Justificación

Chimalhuacán es un municipio en el cual el 48% de la población es menor de edad, según un estudio realizado por el Sistema Municipal para el Desarrollo Integral de la Familia (DIF), 8 de cada 10 niños que estudian en el nivel escolar básico presentan desnutrición, por lo que es considerado el municipio urbano más marginado del país. En este municipio existen alrededor de 200 primarias donde acuden 82 mil alumnos, y 100 preescolares con una matrícula de 40 mil niños (INEGI 2015).

Esto es de gran importancia debido a que durante la infancia y adolescencia es necesario un aporte nutricional equilibrado y ejercicio físico para obtener un estado de salud adecuado, un crecimiento y desarrollo físico óptimos; así como ayudar al establecimiento de hábitos alimentarios saludables que permitan prevenir problemas de salud futuros, debido a que la alimentación constituye el factor extrínseco más determinante en el crecimiento y desarrollo del individuo durante la infancia; esto aunado a que un individuo desnutrido se adapta a su ambiente restringido en nutrimentos mediante un aumento lento del peso corporal sobre todo en los períodos tempranos del desarrollo, además de ajustar su metabolismo a la deficiente disponibilidad de nutrimentos. Se ha demostrado que deficiencias nutricionales durante el desarrollo temprano se relacionan con diferentes enfermedades en la vida adulta, principalmente relacionadas con el uso y tolerancia a la glucosa, la resistencia a la insulina, hipertensión y daño vascular, y otras más vinculadas con el síndrome metabólico.

Por lo que el estudio de polimorfismos relacionados con la absorción de nutrientes y síntesis de moléculas relacionadas al metabolismo es indispensable para el desarrollo de futuras medidas de intervención que tienen como objetivo mejorar la calidad de vida.

3.0 Hipótesis

Se encontrará disminución de las concentraciones de vitamina E, así como cambios en el perfil de lípidos en aquellos individuos portadores de los alelos de riesgo pertenecientes a los polimorfismos rs1527479 del gen *CD36* y del rs675 del gen *APOA4*.

4.0 Objetivo

4.1 Objetivo general

- ❖ Determinar si existe relación entre los polimorfismos rs1527479 de *CD36* y rs675 de *APOA4*, con las concentraciones de vitamina E y perfil de lípidos en población infantil de Chimalhuacán.

4.2 Objetivos particulares

- ❖ Determinar la frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo rs1527479 del gen *CD36*, en niños mexicanos.
- ❖ Determinar la frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo rs675 del gen *APOA4*, en niños mexicanos.
- ❖ Determinar si existe relación entre las variantes en estudio con las concentraciones de vitamina E.
- ❖ Determinar si existe relación entre las variantes en estudio con el perfil de lípidos.

5.0 Material y Métodos

La realización de este estudio se llevó a cabo con base en el protocolo aceptado por el (Anexo 1).

5.1 Población de estudio

Niños mestizos mexicanos de la escuela Emiliano Zapata del municipio de Chimalhuacán, Estado de México, de edades entre 8 y 12 años.

5.2 Obtención de muestras y datos antropométricos

A cada uno de los individuos en estudio, así como a sus padres se les pidió firmaron sus respectivas cartas de consentimiento informado (Anexo 2). Posteriormente contestaron un cuestionario para evaluar el estado de salud, nutrición y antecedentes familiares para cada niño.

Se obtuvieron 252 muestras de sangre periférica (4 mL), 2 muestras por niño, en tubos vacutainer con EDTA como anticoagulante para la obtención de DNA y determinación de parámetros bioquímicos; para la obtención de suero, 1 por niño, se utilizaron tubos vacutainer con gel separador libres de elementos traza.

Ese mismo día se realizó el registro de las medidas antropométricas (peso, talla, circunferencia abdominal y presión arterial); además

5.3 Obtención de DNA

A cada una de las muestras se les extrajo el DNA por el método de Miller.

5.3.1 Descripción del método usado para la extracción de DNA (Miller, 1988)

1. Se utilizan 4 mL de sangre total en tubos con anticoagulante (EDTA).
2. Se diluye en tubos de polipropileno para centrifuga de 15 mL, con 3 mL de sacarosa tritón 2X (219 g sacarosa, Tris base 2.42 g, Tritón 10 mL, pH 7.6).
 - La sacarosa ayuda a la permeabilización de las membranas de eritrocitos por un desequilibrio osmótico.
 - El tritón disuelve proteínas integrales en medios acuosos.
 - El tris base interactúa con los lipopolisacáridos de la membrana celular, lo que permite la permeabilización y ruptura de ésta.
3. Se realizan lavados de las células con una solución de Sacarosa- Tritón 1x, hasta que el botón quede de un color rosa claro.

4. Se adiciona el buffer de lisis nuclear (10 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl y 2 mM Na₂EDTA, pH 8.2).
 - El EDTA disódico secuestra cationes estabilizantes de la membrana.
5. Los lisados celulares se dejan toda la noche a 37 °C con 0.2 mL de SDS al 10% y 0.5 mL de solución conteniendo a la proteinasa K (1 mg proteasa K en SDS al 1% y 2 mM Na₂EDTA).
 - La proteinasa degrada proteínas aún en presencia de detergentes.
6. Después de la digestión se adiciona 1 mL de NaCl saturado (aproximadamente 6M) y se somete a una agitación vigorosa por 15 segundos, seguido de una centrifugación a 2500 rpm por 15 min.
 - El cloruro de sodio funge como la sal para precipitar a las proteínas (salting out).
7. El botón remanente de las proteínas precipitadas se deja en el fondo del tubo y el sobrenadante conteniendo el DNA es transferido a otro tubo de polipropileno de 15 mL.
8. Se adicionan exactamente dos volúmenes de etanol absoluto y se invierten los tubos varias veces hasta la precipitación del DNA.
9. Las hebras de DNA precipitado son removidas con pipetas pasteur selladas y esterilizadas, y se deja secar.
10. El DNA es transferido a un tubo de microcentrífuga conteniendo 100-200 µL de H₂O grado molecular, y se deja disolver en un baño a 37 °C.

5.3.2 Cuantificación de DNA y determinación del grado de pureza

La cantidad de DNA obtenida posterior a la extracción fue cuantificada en un equipo Nanodrop 1000 Spectrophotometer de ThermoScientific (EUA) a 260 nm. La contaminación con proteínas se determinó a 280 nm y se consideró una muestra libre de contaminantes cuando la relación 260/280 estaba entre 1.8-2.0.

5.3.3 Determinación de integridad del DNA

Se determinó el grado de integridad del DNA contenido en estas muestras, por medio de electroforesis en geles de agarosa al 2%, con bromuro de etidio como revelador. Se consideró que el material genético estaba íntegro y libre de impurezas si en el patrón de desplazamiento de la muestra se observaba solo una banda perteneciente al DNA.

5.4 Genotipificación de los polimorfismos seleccionados por PCR en tiempo real

A partir la concentración del DNA obtenido, se realizaron diluciones de cada una de las muestras a 20 ng/μl (concentración estandarizada), para poder someterse a la genotipificación de los polimorfismos seleccionados por PCR-tiempo real en un equipo de Applied Biosystems Lifetechnologies (EUA) y sondas complementarias de la misma casa comercial.

rs1527479: Número de catálogo C___180395_10

rs675: número de catálogo C___2310409_30

5.4.1 Fundamento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real y de las sondas TaqMan

5.4.1.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La técnica utiliza colorantes fluorescentes para medir la cantidad de producto amplificado en tiempo real, permite que una pequeña cantidad de DNA sea amplificada muchas veces de una manera exponencial, en este caso es un fragmento bien definido.

Requiere la cadena de DNA que contiene el fragmento a amplificar, dos oligos que determinan el principio y el final de la región a amplificar (pequeños 18-25bp), la Taq polimerasa que copia la región a amplificar, los dNTPs para formar las nuevas hebras de DNA, el buffer que provee al ambiente adecuado para la DNA-polimerasa y un termociclador.

5.4.1.2 Etapas de la reacción en cadena de la polimerasa

1. Desnaturalización: Separa las hebras de DNA, rompe puentes de hidrógeno, la polimerasa actúa a una temperatura de entre 94 y 96 °C, dura de 1 a 5 minutos.
2. Alineación: Se baja la temperatura para que los oligos y sonda se puedan unir al DNA, dura de 1 a 2 minutos a 50 °C.
3. Extensión: La polimerasa rellena los espacios de las cadenas faltantes, la temperatura depende de la enzima.

5.4.1.3 Sondas TaqMan

Una sonda TaqMan es un oligonucleótido cuya secuencia es complementaria a la región central del amplicón, por lo general tiene una secuencia de 13 a 18 nucleótidos, el extremo 5' tiene unida una marca fluorescente (reportero), el extremo 3' tiene al apagador (quencher); si los dos están unidos a la sonda, la fluorescencia producida por el reportero es absorbida por el apagador; por tanto la fluorescencia global es igual a cero, fenómeno llamado Fluorescent Resonant Energy Transfer (FRET).

Las sondas tienen una mayor temperatura de alineamiento que los oligos, por tanto en la etapa de alineamiento éstas se unen antes a la secuencia blanco, entonces cuando la DNA polimerasa se une a extremo 3' del primer e inicia la elongación, en su paso se encuentra con la sonda y la degrada por su actividad de exonucleasa 5'→3', al ser degradada libera al reportero del apagador, se suprime el fenómeno FRET y la fluorescencia emitida es determinada por el sistema de detección del instrumento.

La fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de sonda, que a su vez es proporcional a la cantidad de templado generado, por lo que se permite visualizar el incremento del amplicón a lo largo de la reacción de PCR.

5.4.1.4 Genotipificación

El uso simultáneo de dos sondas que difieren en su secuencia en un solo nucleótido (SNP), marcadas con fluoróforos diferentes (Alelo 1 VIC, Alelo 2 FAM), es suficiente para realizar una discriminación alélica.

Tabla 4. Uso de dos sondas con diferente fluorescencia, para realizar la genotipificación

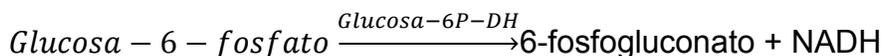
Genotipo	Resultado
1/1	FAM
1/2	FAM / VIC
2/2	VIC

5.5 Determinación de parámetros bioquímicos

Se determinaron los siguientes parámetros bioquímicos por parte del laboratorio central del Hospital Juárez de México:

- **Glucosa**

Fundamento: Método enzimático de la glucosa oxidasa; utiliza dos enzimas de gran especificidad, la hexocinasa que transforma la glucosa en glucosa-6-fosfato, y la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, que transforma el éster de fosfato en 6-fosfogluconato. El NADH formado se mide por el incremento en la absorbancia a 340 nm, el cual es directamente proporcional a la concentración de glucosa.



- **Colesterol**

Fundamento: Método enzimático; Se realiza un primer paso de hidrólisis de los ésteres del colesterol, posteriormente el colesterol libre (total) se oxida por acción de la enzima colesterol oxidasa a 4-colesteri-3-ona, produciéndose simultáneamente peróxido de hidrógeno. La 4-colesteri-3ona tiene un máximo de absorción a 240nm

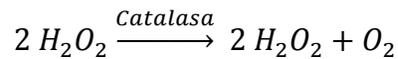
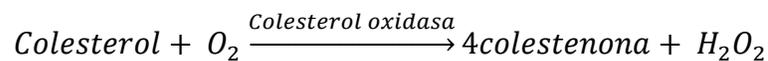
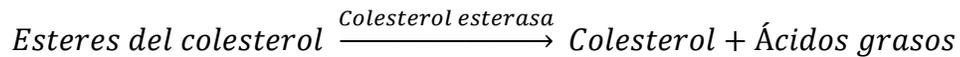
- **Triglicéridos**

Fundamento: Método enzimático; Una lipasa realiza la hidrólisis de los triacilglicerolos formando ácidos grasos libres y glicerol, este último reacciona con la glicerol-fosfato deshidrogenasa y se mide el NADH formado, que está relacionado con la cantidad de glicerol, midiendo la absorción a 340nm.

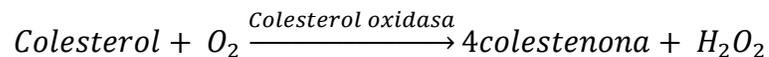
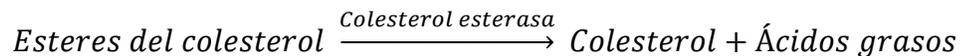
- **HDL**

Fundamento: El ensayo se lleva a cabo en dos pasos

1. Eliminación de las lipoproteínas no-HDL



2. Medición de HDL



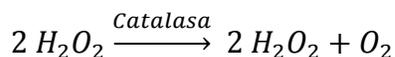
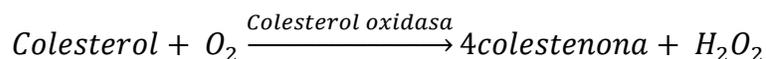
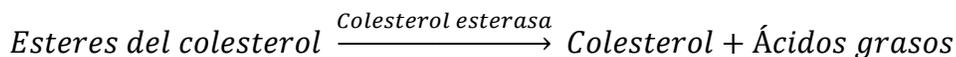
HDAOS: N,N-bis (2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico ácido pH 7.0

La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de HDL presente a 650nm.

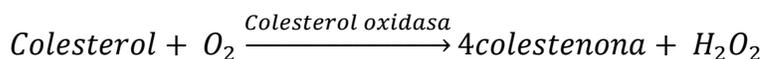
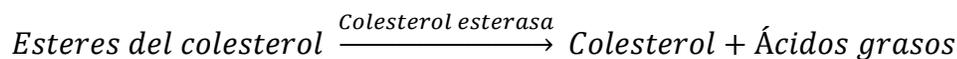
- **LDL**

Fundamento: El ensayo se lleva a cabo en dos pasos.

1. Eliminación de las lipoproteínas no-HDL



3. Medición de HDL



TOOS: N-Etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3-metilanilina

La intensidad de color formado es proporcional a la concentración de LDL presente en la muestra a 600nm.

5.5.1 Determinación de vitamina E.

La determinación de vitamina E no fue realizada por nuestro grupo de trabajo, se mandaron las muestras de suero a un laboratorio privado, para su determinación.

Para la evaluación del estado de vitamina E, no se cuenta con un índice que refleje con exactitud su consumo así como tampoco sus depósitos en el organismo. La concentración de tocoferoles totales en suero es el índice más usado para medir el estado nutricional de vitamina E, siendo de mayor precisión la determinación de los isómeros de vitamina E, a través del método de cromatografía líquida de alta eficiencia.

La cuantificación de la concentración de alfa-tocoferol sérico se realiza por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC); según el método desarrollado por el International Vitamin A Consultive Group y estandarizado para vitamina A y vitamina E, se utiliza la modalidad cromatográfica conocida como cromatografía líquida de fase reversa, la cual consiste en la partición de la muestra entre una fase estacionaria hidrofóbica (frecuentemente cadenas C-18 enlazadas covalentemente

a partículas de sílica) y una fase móvil más polar. La detección de los componentes separados por HPLC se realiza espectrofotométricamente. La cuantificación de los componentes se logra por comparación de las alturas de los picos con las de los estándares (analítico y estándar interno). La adición de un estándar interno (all trans retinil acetato) ayuda a la corrección por pérdidas durante la extracción y el análisis.

5.6 Cálculo de las frecuencias alélicas y genotípicas

Se determinaron cada una de las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos.

5.7 Determinación del equilibrio de Hardy-Weinberg

El equilibrio de Hardy-Weinberg para cada polimorfismo fue determinado por medio de la prueba de Chi cuadrada.

5.7 Determinación de la relación entre los polimorfismos en APOA4 y CD36

El efecto de los polimorfismos en APOA4 y CD36 en las concentraciones de vitamina E y perfil de lípidos, fue estimado por medio de un modelo lineal general univariante, codificando los genotipos encontrados para poder comparar a los individuos que tienen la variante con los que no la tienen, se realizó el ajuste por medio de las covariantes significativas (Edad, IMC, Género). Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo usando el paquete de software SPSS 22.0 para Windows.

6.0 Resultados

6.1 Demografía de la población en estudio.

Se incluyeron en el estudio 252 niños, de los cuales se recolectaron 252 muestras de sangre, se les determinó un perfil bioquímico en el laboratorio central del Hospital Juárez de México, y a 95 sueros se les cuantificó vitamina E; en el **Gráfico 1** se observa que de los niños participantes 46% fueron mujeres y 54% hombres.

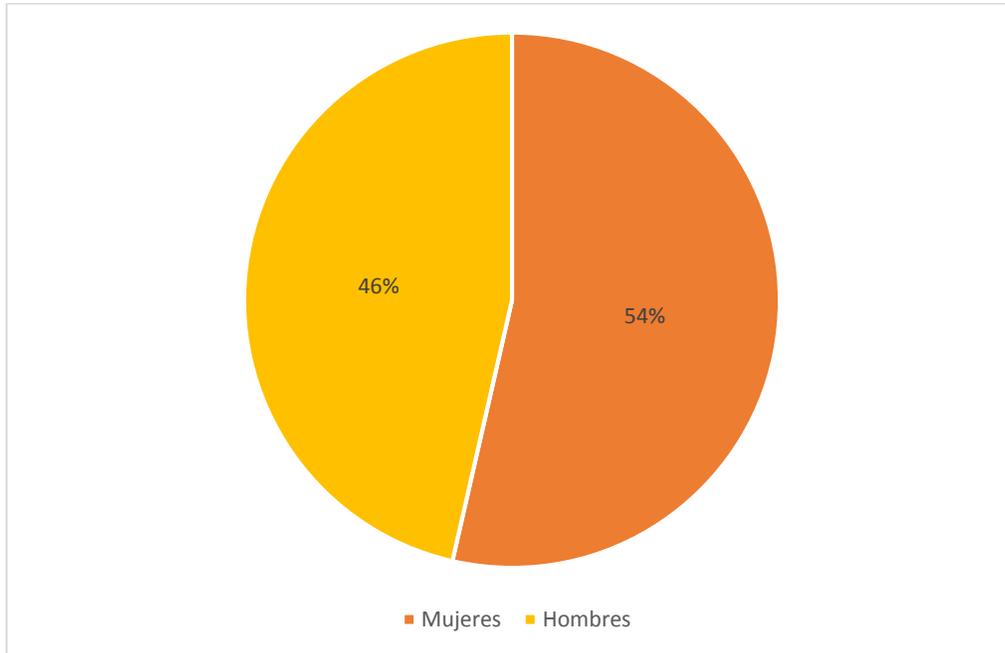


Gráfico 1. Porcentaje de género de los niños participantes

En la **Tabla 5** se presenta la descripción de los datos demográficos de la población en estudio; se utilizó el sistema z-score de la OMS el cual es una curva de distribución normal que va de -3 a 3, siendo el 0 el centro de la curva; se observa que a pesar de que las medianas están dentro de los valores de referencia y al centro de la curva, existe a su vez un gran porcentaje de niños que presentan datos fuera de los valores de referencia.

Tabla 5. Mediana, cuartil 25 y 75 de los datos antropométricos y valores bioquímicos de la población en estudio, así como el porcentaje de niños fuera de los valores de referencia.

Variable	Mediana (cuartil 25- cuartil 75)	% de niños fuera de VR
N = 252		
Edad (años)	10.0 (9.0-11.0)	-----
Talla (z-score)	0.0 (-1.0-0.5)	
Peso (z-score)	0.8 (-0.2-1.6)	
IMC (z-score)	1.0 (0.4-2.1)	
Glucosa (70-100 mg/dL)	93 (89-96)	10.4 (>100 mg/dL)
Triglicéridos (50-150 mg/dL)	88 (67.5-123)	15.8 (>150mg/dL)
Colesterol (< 200 mg/dl)	155 (137-169)	4.3 (>200 mg/dL)
HDL (> 40 mg/dl)	46.3 (39.9-53.3)	25.1 (<40mg/dL)
LDL (10-100 mg/dL)	92.4 (76.0- 104.8)	31.7 (>100 mg/dL)
Creatinina (0.4-1.3 mg/dL)	0.50 (0.50-0.60)	0
BUN (4-22 mg/dL)	10 (9-12)	0
Proteínas totales (5.7-8.2 g/dL)	8 (7.7-8.2)	0.4 (<5.7 g/dL)
Albúmina (3.2-4.8 g/dL)	4.9 (4.7-5.1)	0.4 (< 3.2 g/dL)
N = 95		
Ratio Vitamina E/Lípidos (>0.80 mg/g)	1.14 (0.85-1.44)	20.1 (<0.80 mg/g)

6.2 Determinación de integridad y pureza del DNA usado para la genotipificación

La determinación de integridad del DNA se realizó por electroforesis en geles de agarosa al 2%, con un tiempo de corrida de 45 minutos y voltaje de 80 Volts en cada caso; a su vez la determinación del grado de pureza se complementó con la cuantificación del DNA en un equipo Nanodrop a 260 nm, y posteriormente 280 nm para evaluar la contaminación por proteínas y/o solventes, se consideró una muestra libre de contaminantes cuando la relación 260/280 estaba entre 1.8-2.0. Los geles de agarosa obtenidos de 64 muestras se muestran en la **Figura 5**, donde se observa que el material genético está íntegro y libre de impurezas, al verificar que el patrón de desplazamiento de la muestra es de solo una banda perteneciente al DNA sin fraccionar.

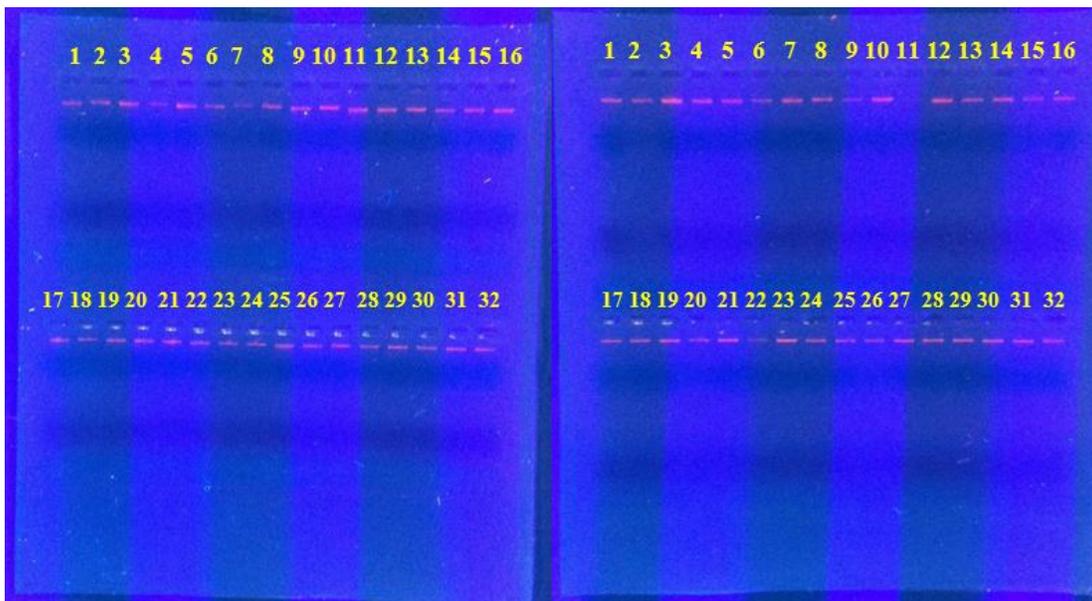


Figura 5. Geles de agarosa usados para la determinación de integridad de 64 de las muestras.

6.3 Gráfico de discriminación alélica obtenido con la PCR-TR para CD36 y APOA4

La obtención de genotipos se realizó usando el software de Applied Biosystems (EUA), diseñado y provisto por el fabricante, el cual muestra una gráfica (**Figura 6 y 7**) de la discriminación alélica. En cada corrida de la PCR-TR se determinaron 96 muestras con 3 controles negativos, hasta completar el total de muestras.

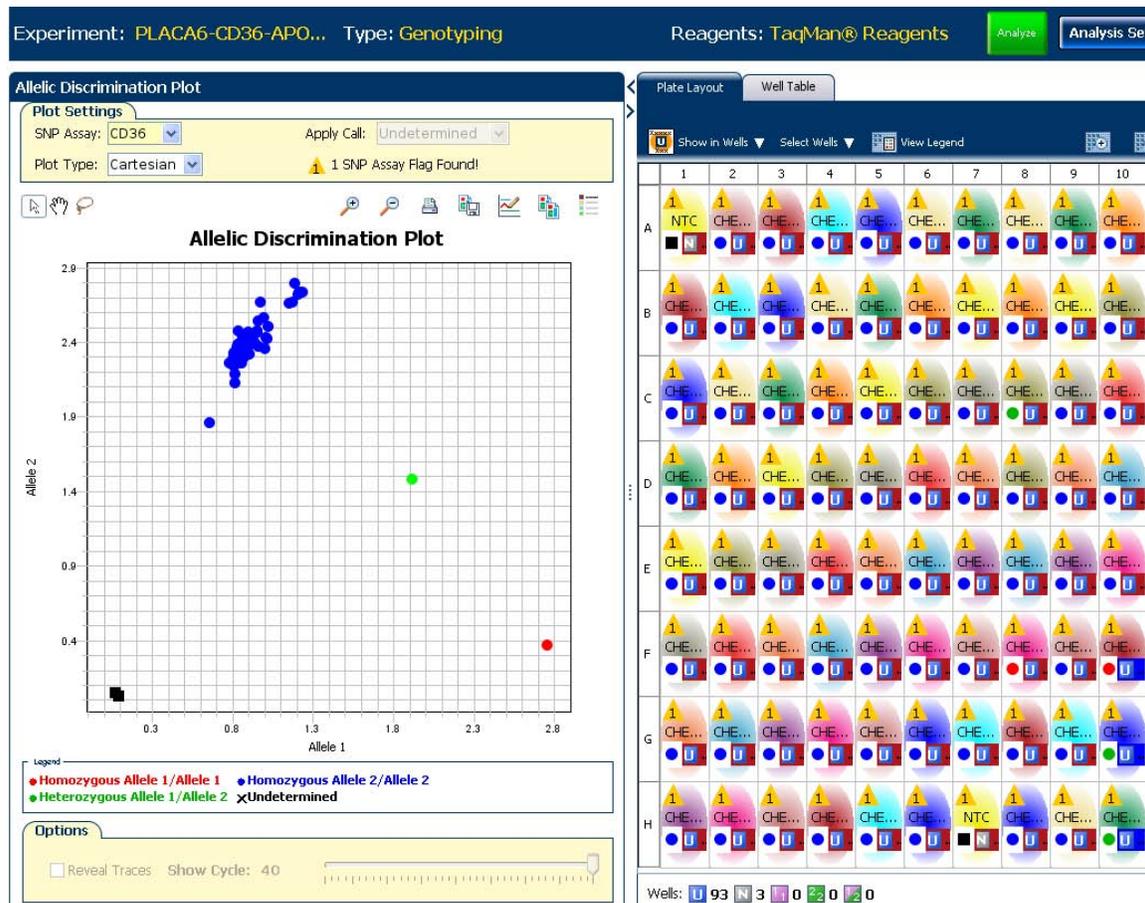


Figura 6. Gráfico obtenido de la discriminación alélica realizada a 93 muestras para CD36 con la PCR-TR

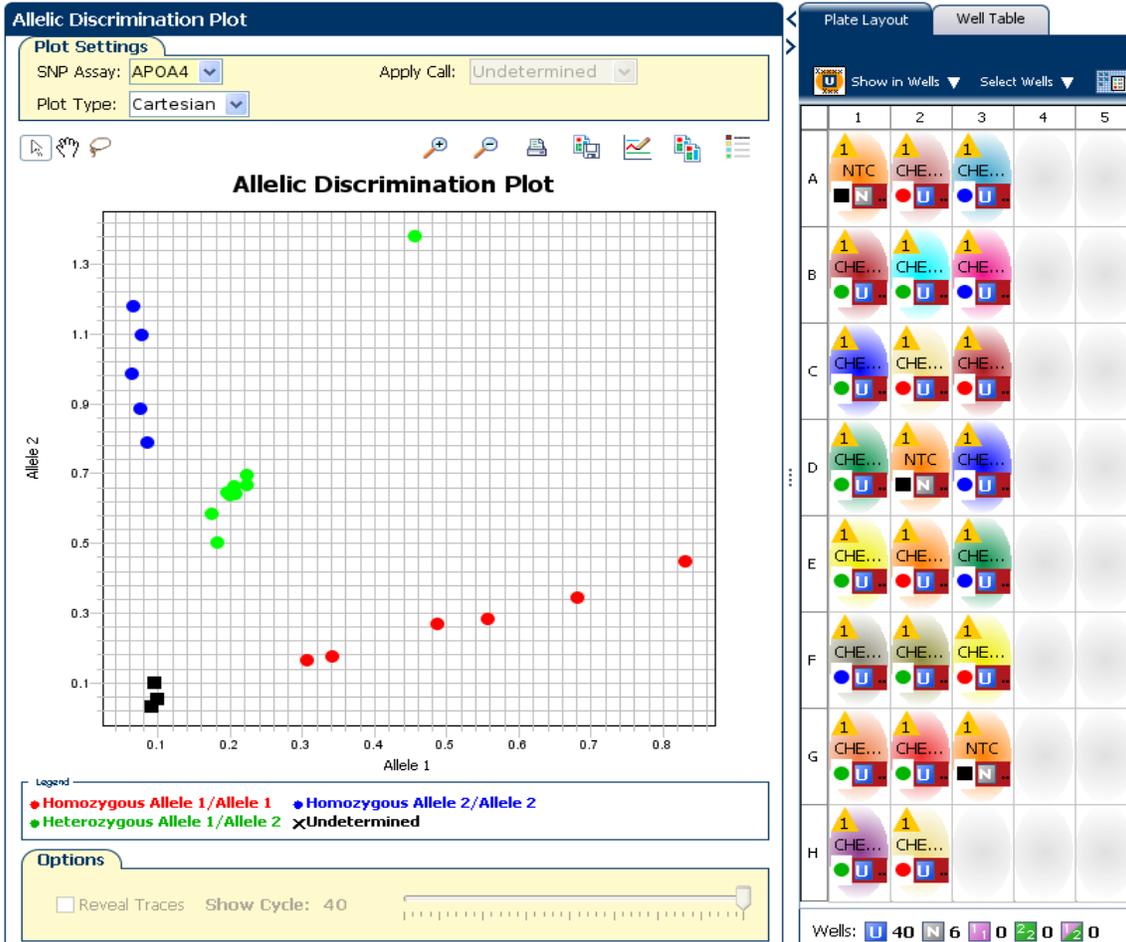


Figura 7. Gráfico obtenido de la discriminación alélica realizada para 20 muestras para APOA4 con la PCR-TR

6.4 Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos

Con respecto a las frecuencias genotípicas encontradas para el rs1527479 en el gen *CD36*, se observa en el Gráfico 2 que la mayor frecuencia fue para el genotipo heterocigoto con 51.98%, seguido del genotipo silvestre con 28.17% (TT) y en menor medida el homocigoto para el alelo de riesgo en un 19.84% (CC).

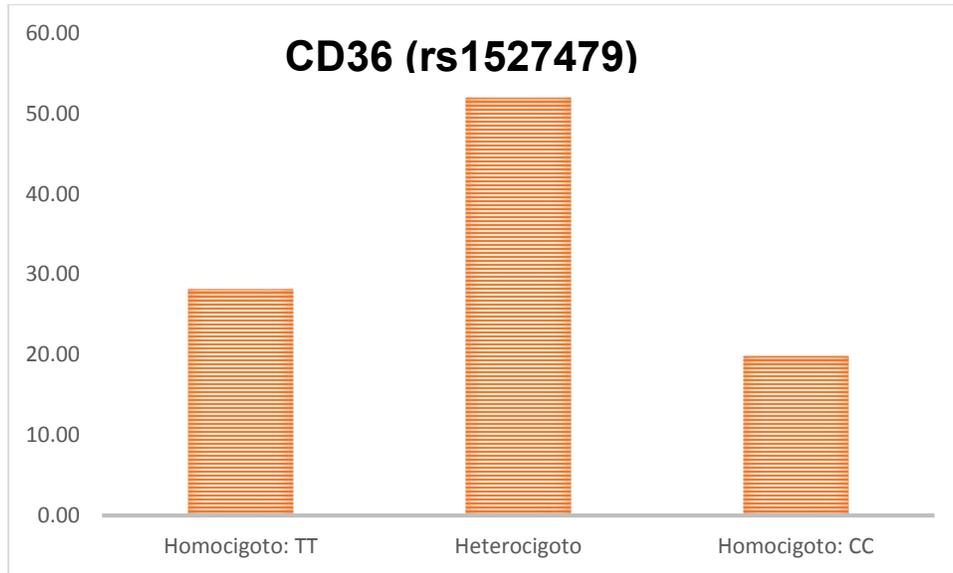


Gráfico 2. Frecuencias para el polimorfismo en CD36

En el caso de las frecuencias genotípicas encontradas para el rs675 en el gen *APOA4*, se observa en el **Gráfico 3** que la mayor frecuencia fue para el genotipo silvestre con 63.89% (TT), seguido del heterocigoto con 29.37% y en menor medida el homocigoto para el alelo de riesgo con 6.75% (AA).

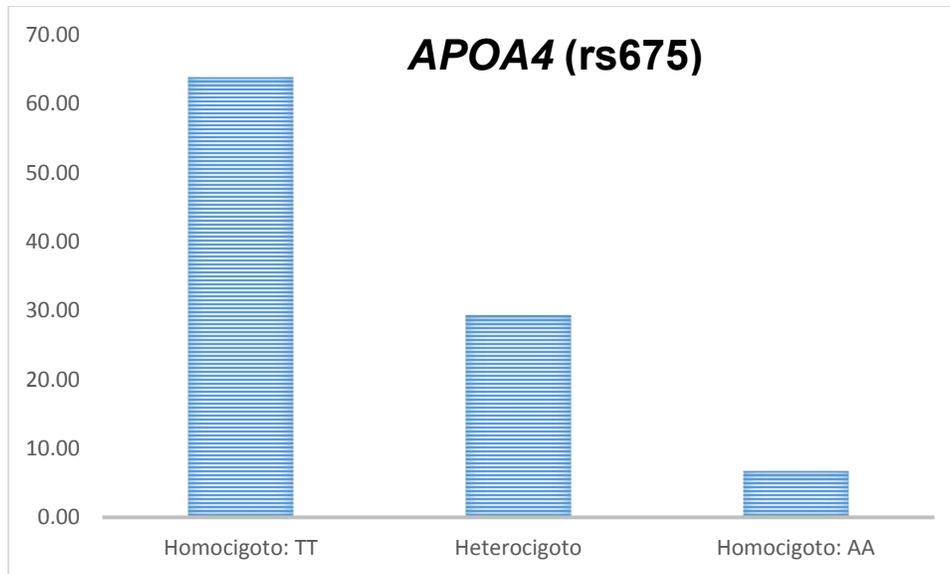


Gráfico 3. Frecuencias para el polimorfismo en APOA4

A su vez se determinaron las frecuencias alélicas para cada uno de los polimorfismos, los resultados se muestran en la tabla 6, para el gen *CD36* (rs1527478) se obtuvo una frecuencia de 54.17% para el alelo silvestre (T) y 45.83% para el alelo de riesgo (C); para el gen *APOA4* (rs675) una frecuencia de 78.57% del alelo silvestre (T) y 21.43% para el alelo de riesgo (A).

Tabla 6. Frecuencias alélicas para los polimorfismos en CD36 y APOA4

Gen: <i>CD36</i> (rs1527479)		Gen: <i>APOA4</i> (rs675)	
Alelo	Frecuencia alélica (%)	Alelo	Frecuencia alélica (%)
T (Silvestre)	54.17	T (Silvestre)	78.57
C (Riesgo)	45.83	A (Riesgo)	21.43

Para el rs1527479 existen reportados en el Hap-Map para población mexicana (estudio realizado en mexicanos residentes de Los Ángeles California, EUA) una frecuencia de 42% para el alelo T y 58% para el alelo C; para el rs657 no existen frecuencia reportadas en mexicanos, solo existen para el caso de población maya en las cuales se encontró 86.7% para T y 13.3% para A.

Los polimorfismos estudiados se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2 < 3.84$) (Tabla 7).

Tabla 7. Determinación del equilibrio de Hardy-Weinberg por medio de la prueba Chi cuadrada.

CD36 (rs1527479)		
Genotipo	N	Frecuencias alélicas
TT	71	p= 0.54
TC	131	q= 0.46
CC	50	Chi= 0.56*
Total	252	
APOA4 (rs675)		
Genotipo	N	Frecuencias alélicas
TT	162	p= 0.21
TA	74	q= 0.79
AA	16	Chi= 3.39*
Total	252	

*Chi < 3.84

6.5 Correlación entre los polimorfismos y las concentraciones séricas de vitamina E y el perfil de lípidos.

En la **Tabla 6** se presentan los resultados del análisis estadístico para evaluar si existe relación entre el polimorfismo rs1527479 del gen *CD36* con respecto a las concentraciones de vitamina E, HDL, triglicéridos y colesterol, observándose que hay una diferencia significativa entre los portadores de la variante con respecto a los que no la portan ($p < 0.050$) en las concentraciones de HDL con los modelos de herencia dominante ($p = 0.003$) y aditivo ($p = 0.006$); los estadísticos descriptivos muestran que los portadores de la variante de riesgo presentan una menor concentración de colesterol HDL.

Tabla 6. Relación de las concentraciones séricas de Vitamina E, HDL, triglicéridos y colesterol con el rs1527479 (CD36), de acuerdo a los modelos de herencia.

CD36 (rs1527479)											
Modelo de herencia	Genotipo	N= 95	Vit E/L (mg/g)		N= 252	HDL (mg/dL)		Triglicéridos (mg/dL)		Colesterol (mg/dL)	
			Media	p		Media	p	Media	p	Media	p
Dominante	TT	29	1.10 ± 0.36	0.23	71	50.37 ± 10.27	0.003*	98.62 ± 35.65	0.87	158.21 ± 24.70	0.29
	TC/CC	66	1.23 ± 0.59		181	44.62 ± 10.34		100.11 ± 50.96		151.74 ± 24.15	
Recesivo	TT/TC	77	1.21 ± 0.56	0.78	202	47.00 ± 10.97	0.06	99.31 ± 45.17	0.27	154.22 ± 25.61	0.97
	CC	18	1.11 ± 0.40		50	43.69 ± 8.67		101.11 ± 53.85		151.56 ± 18.58	
Aditivo	TT	29	1.10 ± 0.36	0.48	71	50.37 ± 10.28	0.006*	98.62 ± 35.65	0.48	158.21 ± 24.70	0.56
	TC	48	1.28 ± 0.65		131	44.97 ± 10.97		99.73 ± 50.42		151.81 ± 26.11	
	CC	18	1.11 ± 0.40		50	43.69 ± 8.67		101.11 ± 53.85		151.56 ± 18.58	

*Diferencia significativa p<0.050

En la

Tabla 7 se muestran los resultados del análisis estadístico para evaluar la relación de las concentraciones séricas de Vitamina E solo en los individuos deficientes a ésta, esto debido a que el 21.0% de la población analizada presentó deficiencia de la vitamina, por lo que se trató de encontrar si la disminución sérica se debe a la influencia del factor genético o a un factor externo tal como una ingesta disminuida; se observa que no se encontró diferencia significativa con ninguno de los modelos de herencia.

Tabla 7. Relación de las concentraciones séricas de Vitamina E en los individuos donde se encontro deficiencia, con el rs1527479 (CD36).

CD36 (rs1527479)				
Modelo de herencia	Genotipo	N = 20	Vit. E/L (mg/g)	
			Media	p
Dominante	TT	4	0.59 ± 0.12	0.56
	TC/CC	16	0.63 ± 0.11	
Recesivo	TT/TC	16	0.64 ± 0.12	0.37
	CC	4	0.59 ± 0.09	
Aditivo	TT	4	0.59 ± 0.12	0.47
	TC	12	0.65 ± 0.12	
	CC	4	0.58 ± 0.09	

*Diferencia significativa $p < 0.05$

En la

Tabla 8 se presentan los resultados del análisis estadístico para evaluar la relación entre el polimorfismo rs675 del gen *APOA4* con respecto a las concentraciones de HDL, LDL, VLDL, triglicéridos y colesterol; de acuerdo a los modelos de herencia evaluados no se encontró diferencia significativa en ninguno de los parámetros

Tabla 8. Relación de las concentraciones séricas de HDL, triglicéridos y colesterol total con el rs675 (APOA4), de acuerdo a los modelos de herencia.

APOA4 (rs675)												
Modelo de herencia	Genotipo	N	HDL (mg/dL)		LDL (mg/dL)		Triglicéridos (mg/dL)		Colesterol (mg/dL)		VLDL (mg/dL)	
			Media	p	Media	p	Media	p	Media	p	Media	p
Dominante	TT	161	46.49 ± 10.46	0.62	90.64 ± 21.63	0.15	103.82 ± 46.82	0.79	152.22 ± 24.97	0.16	20.75 ± 9.35	0.85
	TA/AA	91	48.40 ± 10.09		93.52 ± 22.07		96.37 ± 42.51		156.03 ± 24.57		19.32 ± 8.48	
Recesivo	TT/TA	233	46.95 ± 10.30	0.30	91.14 ± 21.82	0.12	101.67 ± 45.99	0.82	152.91 ± 25.11	0.10	20.34 ± 9.17	0.33
	AA	19	49.98 ± 10.74		98.28 ± 20.82		94.53 ± 37.24		162.05 ± 19.99		18.95 ± 7.49	
Aditivo	TT	161	46.49 ± 10.46	0.59	90.64 ± 21.63	0.19	103.82 ± 46.82	0.96	152.22 ± 24.97	0.18	20.75 ± 9.35	0.97
	TA	72	47.99 ± 9.94		92.27 ± 22.35		96.86 ± 44.02		154.44 ± 25.52		19.42 ± 8.77	
	AA	19	49.98 ± 10.75		98.28 ± 20.79		94.53 ± 37.24		162.05 ± 19.99		18.95 ± 9.05	

* Significancia estadística p<0.05

En la **Tabla 9** se presentan los resultados del análisis estadístico para evaluar la relación entre el polimorfismo rs675 con respecto a la relación sérica de HDL/LDL y vitamina E; siendo el valor de referencia para este cociente entre 0.4-0.6; no se encontró diferencia significativa con ninguno de los modelos de herencia.

Tabla 9. Relación del cociente HDL/LDL y vitamina E con el rs675 (APOA4), de acuerdo a los modelos de herencia.

Modelo de herencia	APOA4 (rs675)						
	Genotipo	N =252	HDL/LDL		Vit. E/L (mg/g)		
			Media	p	N = 95	Media	p
Dominante	TT	161	0.54 ± 0.19	0.77	53	1.20 ± 0.57	0.77
	TC/CC	91	0.55 ± 0.20		42	1.19 ± 0.49	
Recesivo	TT/TC	233	0.55 ± 0.19	0.85	88	1.19 ± 0.54	0.90
	CC	19	0.54 ± 0.20		7	1.22 ± 0.44	
Aditivo	TT	161	0.54 ± 0.19	0.91	53	1.20 ± 0.57	0.93
	TC	72	0.56 ± 0.21		35	1.18 ± 0.51	
	CC	19	0.54 ± 0.20		7	1.22 0.44	

* Significancia estadística p<0.05

7.0 Discusión

La malnutrición en la población sobre todo en la infantil genera importantes pérdidas económicas al sector salud, y disminuye la calidad de vida de las personas que la padecen. En la búsqueda por determinar la relación de dos variantes genéticas con parámetros bioquímicos y nutricionales previamente relacionados en otras poblaciones, se planteó el presente proyecto con la finalidad de que en un futuro se puedan mejorar las condiciones nutrimentales en población infantil mexicana.

En este trabajo se buscó la relación de dos SNP (rs1527479 y rs675) con las concentraciones séricas de vitamina E, HDL, LDL, VLDL, triglicéridos y colesterol total en una población infantil mestiza mexicana.

Se determinaron los parámetros bioquímicos en el laboratorio central del Hospital Juárez de México para las 252 muestras, con lo que se obtuvo la demografía de la población en estudio (**Tabla 5**), observándose que a pesar de su edad se encontraron niños con parámetros alterados (respecto a los valores de referencia), lo que nos habla de un desequilibrio nutricional en su entorno; a su vez en el **Gráfico 1** se presenta el porcentaje de niños de acuerdo al género, observando un equilibrio respecto a esta variable.

Las frecuencias genotípicas encontradas en el caso del rs1527479, fueron de 0.28 para el homocigoto silvestre, 0.52 para el heterocigoto y 0.20 para el homocigoto con el alelo de riesgo; estas frecuencias resultaron parecidas a lo reportado en el HAPMAP para población mexicana residente de Los Ángeles, California, que son de 0.20, 0.44 y 0.36, respectivamente; esto al comparar con otras poblaciones como la Africana, cuyas frecuencias son 0.70, 0.27 y 0.03, respectivamente.

Para el caso de las frecuencias genotípicas encontradas para la variante rs675, se encontró para el homocigoto silvestre 0.64, el heterocigoto 0.29 y para el homocigoto del alelo de riesgo 0.07; al comparar con otras poblaciones, se encuentran frecuencias parecidas a las reportadas para la población del norte de Europa, las cuales son de 0.70, 0.23 y 0.03, respectivamente.

De acuerdo a las frecuencias alélicas reportadas en el HAPMAP, en el caso del polimorfismo en *CD36* (rs1527479), existe para población mestiza mexicana residente en Los Ángeles, California, una frecuencia de 42% para el alelo **T** y 58% para el alelo **C**, para población caucásica 46% y 54%, para la africana-americana 73% y 27%, y para orientales 74% y 26% de los alelos **T** y **C** respectivamente en cada población; al determinar la frecuencia de este polimorfismo en los niños mestizos mexicanos se encontró una frecuencia de 54% para **T** y 46% para **C** (**Tabla**) muy parecido a lo reportado previamente para las poblaciones mexicana y caucásica.

Para la variante rs675 se reporta en el NCBI una frecuencia del 100% para el alelo **T** y 0% para el alelo **A** en población japonesa, de 80% y 20% para población europea y de 92% y 8% para población africana de **T** y **A** respectivamente. En este estudio se encontró una frecuencia de 79% para **T** y 21% para **A** en la población de niños mestizos mexicanos (Tabla 6).

Los polimorfismos estudiados se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg, lo que nos indica la heterogeneidad genética de la población (Tabla 7).

El gen *CD36* codifica para un transportador de ácidos grasos de cadena larga, relacionado con la absorción y transporte de vitamina E, estudios realizados por Borel y cols. (2011), indican que los portadores del alelo de riesgo presentan deficiencia de esta vitamina, así mismo, encontraron un aumento significativo en la concentración de triglicéridos ($p=0.006$), estos estudios fueron realizados en población europea. Por otro lado Kawase y cols. (2012), reportaron que el fenotipo encontrado en pacientes con una deficiencia en el transportador *CD36*, presentaban concentraciones altas de triglicéridos y bajas de HDL. En este estudio se evaluó en niños mexicanos la influencia del alelo de riesgo del rs1527479 con las concentraciones de vitamina E, HDL, triglicéridos y colesterol, encontrando una disminución significativa del HDL (dominante $p=0.003$ y aditivo $p=0.006$) en los portadores coincidiendo con lo reportado por Kawase y cols. (2012). No se encontró diferencia significativa para las concentraciones de vitamina E con ninguno de los modelos de herencia evaluados. Sin embargo, es importante destacar que este

análisis se realizó solo con 95 determinaciones de vitamina E, por lo que sería importante aumentar el tamaño de muestra en este caso; es de gran relevancia puntualizar que se encontró una deficiencia de esta vitamina en el 21% de los niños de esta población, considerando que una deficiencia de vitamina E es rara en humanos, debido a que se presenta casi exclusivamente de manera hereditaria, o la presencia de raros desórdenes en su metabolismo; se podría pensar entonces que la deficiencia de vitamina E se puede deber a una disminución en la ingesta de este micronutriente y no a la presencia del polimorfismo, por lo que en un siguiente estudio podría evaluarse la ingesta de vitamina E en esta población.

En otros estudios aun no publicados realizados en nuestro grupo de trabajo, relacionados con esta población, se encontró una alta prevalencia de síndrome metabólico, por lo que son de gran importancia los hallazgos relacionados con este gen, ya que los resultados de este estudio relacionan este polimorfismo con bajas concentraciones de HDL, un elemento del síndrome metabólico, CD36 al ser un transportador de ácidos grasos de cadena larga (colesterol, vitamina E, provitamina A, entre otros), involucrado en diferentes procesos biológicos como angiogénesis, inflamación, metabolismo de lípidos, activación de plaquetas, así como unión a lipoproteínas nativas, da como resultado de sus múltiples ligandos y funciones, que este polimorfismo en *CD36* pueda impactar en una variedad de condiciones ligadas al síndrome metabólico, incluida la diabetes, resistencia a la insulina, inflamación y aterosclerosis.

LA APOA4 es sintetizada principalmente en el intestino como componente de los quilomicrones y del HDL en respuesta a los lípidos provenientes de la dieta, además de ser un activador de la LCAT y de participar, en la hidrólisis de los triglicéridos contenidos en los quilomicrones. Así la *APOA4* regula la depuración de las lipoproteínas ricas en triglicéridos de origen intestinal y está relacionada con una disminución de HDL y elevación del colesterol total (Kiyomi, 2011). Estudios realizados por Kamboh y cols.(1997), reportaron que los portadores homocigotos del alelo de riesgo presentan un aumento significativo en el nivel de colesterol total ($p=0.04$) y de LDL ($p=0.03$), sin embargo, es necesario mencionar que existe

controversia en los resultados encontrados por diversos investigadores en cuanto al fenotipo encontrado en los portadores de este polimorfismo. Por otra parte Kiyomi y cols.(2011), reportaron igualmente un aumento en la concentración de triglicéridos y una reducción del cociente de lipoproteínas de alta/baja densidad (HDL/LDL), el cual se relaciona con una alta susceptibilidad de aterosclerosis y riesgo cardiovascular, esto en población sudamericana. En el presente estudio motivo de la tesis, las concentraciones en el perfil de lípidos y vitamina E no fueron afectadas por la presencia del polimorfismo rs675, así como tampoco el cociente HDL/LDL, pero si se encontró que el 25.1% de la población tiene una disminución en la concentración de HDL y 31.7% presentó un aumento del LDL, esto debido tal vez a factores dietéticos o a otros SNP aún no identificados.

El rs675 (Thr347Ser) en *APOA4* al relacionarse principalmente con concentraciones elevadas de triglicéridos en plasma y una reducción del cociente de lipoproteínas de alta/baja densidad (HDL/LDL), tiene una implicación clínica importante con un incremento del riesgo cardiovascular relacionado con la aterosclerosis (Kiyomi, 2011); además, en un estudio realizado por Ostos y cols. (2014) , encontraron que los individuos portadores del polimorfismo Thr347Ser, poseen una menor respuesta lipémica postprandial de las lipoproteínas ricas en triglicéridos de origen intestinal posterior a la ingesta de alimentos, repercutiendo en la absorción de las grasas, dando como resultado un aumento de colesterol total y LDL. Sin embargo, los individuos portadores del alelo de riesgo tienen una mayor susceptibilidad a modificaciones en el perfil de lípidos en respuesta al tipo de dieta, esto es relevante ya que esta información se puede usar para diseñar medidas de intervención específicas en los portadores de la mutación para prevenir o disminuir los efectos negativos de las dislipidemias.

En este trabajo no se encontró relación de la variante rs675, con ninguno de los parámetros bioquímicos evaluados, esto podría deberse a la baja frecuencia del alelo de riesgo en comparación con el silvestre.

Todas las determinaciones realizadas con un modelo lineal univariante, acerca de la relación de los polimorfismos genéticos respecto a los parámetros bioquímicos evaluados, fueron corregidos de acuerdo a la edad, IMC y género.

La determinación de las frecuencias de los polimorfismos que modifican la absorción de nutrientes o el metabolismo de moléculas clave como lo son los lípidos, serán de gran importancia dada la frecuencia en la población; podrían sentar las bases para diseñar estudios de intervención que tengan como objetivo desarrollar dietas y/o suplementos que proporcionen a la población los nutrimentos que puedan ser aprovechados al máximo de acuerdo a los genotipos presentes, y que a partir del conocimiento de la frecuencia de estos polimorfismos en la población infantil mexicana, como la ofrecida en este estudio, se puedan establecer medidas nutricionales para evitar los efectos patológicos resultantes.

8.0 Conclusiones

Se determinaron las frecuencias alélicas y genotípicas en una población de niños mestizo mexicanos, para el rs1527479 en *CD36* y el rs675 en *APOA4*. No hubo desviación al equilibrio de Hardy-Winberg en ninguno de los casos.

El desarrollo del presente trabajo permitió relacionar el rs1527479 con una reducción significativa de la concentración de HDL ($p < 0.050$) en los modelos de herencia aditivo y dominante.

Para el alelo de riesgo del rs675 del gen *APOA4* no se encontró relación con las concentraciones de HDL, LDL, VLDL, colesterol, triglicéridos y el cociente HDL/LDL.

La disminución de la concentración de vitamina E no fue relacionada con ninguno de los dos polimorfismos en estudio, a pesar de encontrarse que el 21% de la población presentará deficiencia de la vitamina, por lo que se puede deber a factores ambientales como una ingesta disminuida.

Dada la frecuencia encontrada de los alelos de riesgo en esta población, y que se conoce que éstos tienen una relación con la absorción o metabolismo de vitamina E y el perfil de lípidos, es necesario tomarlos en cuenta para estudios prospectivos.

9.0 Bibliografía

A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells [Publicación periódica] / aut. Miller S.A. // Nucleic Acids Research. - 1988. - 3 : Vol. 16. - pág. 1215.

Antioxidants and immune response in aged persons; overview of present evidence [Publicación periódica] / aut. Hayek Santos, Wu, Meydani // Aim Journal of Clinical Nutrition. - 1995. - Vol. 62. - págs. 1462-1476.

APOA4 Polymorphism as a Risk Factor for Unfavorable Lipid [Publicación periódica] / aut. Kiyomi Flank, Furuya // The American Federation for Medical Research. - 2011. - 6 : Vol. 59. - págs. 966-970.

Association of CD36 gene variants rs1761667 (G > A) and rs1527483 (C > T) [Publicación periódica] / aut. Agrawai Kumar Bid, Saxena, Gautam, Banerjee // International Journal of Diabetes Mellitus. - 2010. - págs. 179-183.

Avances en nutrición molecular: nutrigenómica y/o nutrigenética [Publicación periódica] / aut. Martínez J. A. // Nutrición hospitalaria. - 2005. - 3 : Vol. 20. - págs. 157-164.

B vitamins relates to homocysteine metabolism in adults celiac disease patients: a cross-sectional study [Publicación periódica] / aut. Valente Fx y cols.. - South Korea : BMB pulmonary medicine, 2015. - 1 : Vol. 15.

Bioquímica [Libro] / aut. Devlin Thomas. - [s.l.] : Reverte, 2011. - Cuarta.

Bioquímica [Libro] / aut. Voet Donald. - [s.l.] : Médica Panamericana, 2006. - Tercera.

Bioquímica: Las bases moleculares de la estructura y función celular [Libro] / aut. Lehninger Albert L.. - Barcelona : Omega, S.A., 2005. - Cuarta.

CD36 binds oxidized low density [Publicación periódica] / aut. Jay AG y cols. // The journal of biological chemistry. - Boston, Massachusetts : [s.n.], 2015. - 8 : Vol. 290.

Circulating CD36 and oxLDL Levels are associated with cardiovascular risk factors in young subjects [Publicación periódica] / aut. Parra-Rojas Natividad Castro-Alarcón, Aralia B Salgado-Bernabé, Ulises Delacruz-Mosso, José F Muñoz-Valle, Luz E Ramos-Arellano // BMC Cardiovascular Disorders. - 2014. - 54 : Vol. 14. - págs. 1471-1478.

Clasificación y evaluación de la desnutrición en el paciente pediátrico [Publicación periódica] / aut. Villa-Romero Márquez-Flores, García-Villegas, Caltenco-Serrano, García-Sámamo, Márquez-González // El residente. - 2012. - 2 : Vol. 7. - págs. 59-69.

Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios [En línea] / aut. Cofepris. - 26 de Junio de 1996. - 17 de Marzo de 2014. - <http://www.cofepris.gob.mx/MJ/Paginas/NormasPorTema/Alimentos.aspx>.

Correlation between neurological dysfunction with vitamin E deficiency and gastrectomy [Publicación periódica] / aut. Kuroiwa Yoshinori Takanashi, Toshio Imada, Tatsuya Takahashi, Yasushi Rino, Yume Suzuki, Naohisa Ueda // Journal of the Neurological Sciences. - 2009. - Vol. 287. - págs. 216-220.

Fat and carbohydrate intake modify the associaton between genetic variation in the FTO genotype and obesity [Publicación periódica] / aut. Sonestedt E.. - [s.l.] : The American Journal of Clinical Nutrition, 2009. - 1418-1425 : Vol. 90.

Génética Médica [Publicación periódica] / aut. Fragoso José Manuel. - México : Genética Médica de México, 2013. - 220-228 : Vol. 149.

Glucose metabolism in adult survivors of severe acute malnutrition [Publicación periódica] / aut. Boyne Michael Forrester Terrence, Gluckman Peter, Hanson Mark // The journal of clinical Endocrinology & Metabolism. - 2014. - 6 : Vol. 99.

Gobierno de Chimalhúacan [En línea] / aut. Chimalhúacan Gobierno de. - 2015. - 3 de Marzo de 2015. - www.chimalhuacan.gob.mx.

Incidence and molecular basis of CD36 deficiency in Shanghai population. [Publicación periódica] / aut. Li R y cols // Transfusion. - Shanghai, China : [s.n.], 2015. - 3 : Vol. 55. - págs. 666-673.

Influence of two apo A4 polymorphisms al codons 347 and 360 on non-fasting plasma lipoprotein-lipids and apolipoproteins in asian Indians [Publicación periódica] / aut. Kamboh Vasisht, Wang, Saha // Atherosclerosis. - 1997. - 2 : Vol. 131. - págs. 249-255.

Intestinal synthesis, secretion, and transport of lipoproteins [Publicación periódica] / aut. Bisgaier CL Glickman RM // Annual review of physiology. - 1983. - Vol. 45. - págs. 625-636.

Is high-density lipoprotein cholesterol beneficial for premature coronary heart disease? A meta-analysis [Publicación periódica] / aut. Shahid M y cols. // European journal of preventive cardiology. - China : [s.n.], 2015.

Lehninger: Principios de Bioquímica [Libro] / aut. Nelson David L.. - [s.l.] : OMEGA, 2007. - Quinta.

National Center for Biotechnology Information [En línea] / aut. NCBI. - 2015. - 21 de Febrero de 2015. - http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1527479.

Natural forms of vitamin E: metabolism, antioxidant, and anti-inflammatory activities and their role in disease prevention and therapy [Publicación periódica] / aut. Jiang Qing // Free Radical Biology and Medicine. - 2014. - Vol. 72. - págs. 76-90.

Nutrigenómica y nutrigenética [Libro] / aut. Lorenzo David de. - Barcelona : Libbooks, 2011. - 1era .

Organización mundial de la salud OMS "Abordando los desafíos de salud mundial a través de una Nutrición Mejorada" [En línea] / aut. OMS. - 2013. - 04 de 11 de 2014. - <http://ensanut.insp.mx/doctos/analiticos/Desnutricion.pdf>.

Patients with CD36 deficiency Are Associated with Enhanced Atherosclerotic Cardiovascular Diseases [Publicación periódica] / aut. Kawase Masuda, Yamashita, Naokaoka // Journal of Atherosclerosis and Thrombosis. - 2012. - 3 : Vol. 19. - págs. 263-275.

Polymorphisms in the CD36/FAT gene are associated with plasma vitamin E concentrations in humans. [Publicación periódica] / aut. Borel Meirhaeghe, Dallongeville, Breidenassel, Spinneker // The American journal of clinical nutrition. - 2011. - 3 : Vol. 93. - págs. 644-651.

Prevalence of dyslipidemias in Iranian children and adolescents: A systematic review [Publicación periódica] / aut. Hovsepian S y cols. // Journal of research in medical sciences. - Iran : [s.n.], 2015. - 5 : Vol. 20. - págs. 503-521.

Structure, evolution, and polymorphisms of the human apolipoprotein A4 gene (APOA4) [Publicación periódica] / aut. Antonarakis Haddad, Oettgen, Karathanasis // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. - 1986. - Vol. 83. - págs. 8457-8461.

Textbook of Veterinary Physiological Chemistry [Libro] / aut. Engerlking Larry R.. - [s.l.] : Academic Press, 2014. - Tercera.

The Role of Vitamin E in Human Health and Some Diseases [Publicación periódica] / aut. Mahdi Shania Abbas, Absar Ahmad, Faizal Ahmed, Syed T. Raza, Saliha Rizvi // Sultan Qaboos University Medical Journal. - 2014. - 2 : Vol. 14. - págs. 157-165.

UNICEF MEXICO- Salud y nutrición- [En línea] / aut. UNICEF. - 2015. - 23 de Febrero de 2015. - <http://www.unicef.org/mexico/spanish/17047.htm>.

Vitamin C and E supplementation prevents some of the cellular adaptations to endurance-training in humans [Publicación periódica] / aut. Morrison D y cols. // Free radical biology & medicine. - Australia : [s.n.], 2015. - 412 : Vol. 10.

Vitamin E and vitamin C supplement use and risk of all cause and coronary heart disease mortality in older persons: the established populations for

epidemiologic studies of the elderly [Publicación periódica] / aut. Havlik Harris, Losonczy // *Aim Journal of Clinical Nutrition*. - 1996. - 2 : Vol. 64. - págs. 190-195.

Anexo 1



HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA
ACEPTACION DE PROTOCOLO/TESIS DE INVESTIGACION



México D. F., a 11 de MARZO de 2014

M. EN C. GUADALUPE ORTIZ LOPEZ
LAB. ENDOCRINOLOGIA MOLECULAR
PRESENTE

Por medio de este conducto le informo que los Comités de ÉTICA,
INVESTIGACION y BIOSEGURIDAD evaluaron su Protocolo/Tesis:

EVALUACION DEL ESTADO NUTRICIONAL EN NIÑOS DE CHIMALHUACAN: ABORDAJE ANTROPOMETRICO, BIOQUIMICO Y MOLECULAR.

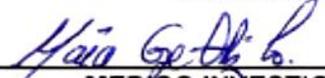
y de acuerdo a los investigadores revisores dictaminaron **Aceptarlo**, asignándole el número de registro: HJM 2315/14-C.

Por lo tanto se autoriza su realización y deberá renovarse su vigencia en 2015.

ATENTAMENTE
DIRECTOR DE INVESTIGACION


DR. EN C. GUSTAVO ACOSTA ALTAMIRANO

ENTERADO


MEDICO INVESTIGADOR
INVESTIGADOR RESPONSABLE/TUTOR

Notas:

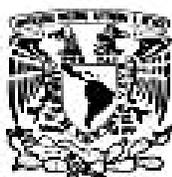
- 1.- Esto me comprometo a informar trimestralmente del avance del proyecto en el Área de Registro de Protocolos y Seguimiento de la Dirección de Investigación y Enseñanza.
- 2.- A partir de la fecha de aprobación del protocolo los investigadores tienen dos años para publicar resultados en revistas de nivel III.

c.c.p. _____

GAA/RMN

HJM-DIE-FOR-014-AP

Anexo 2



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO
LABORATORIO DE ENDOCRINOLOGÍA MOLECULAR

CARTA CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN LA INVESTIGACIÓN:

"Evaluación del estado de salud y nutrición en escolares de Chimalhuacán"

Chimalhuacán, Estado de México., a _____

A QUIEN CORRESPONDA:

El (la) que suscribe _____ de _____ años, acepto la participación en forma libre y voluntaria que mi hijo (a) _____ participe en el estudio "Evaluación del estado de salud y nutrición en escolares de Chimalhuacán", cuyo propósito es conocer el estado de salud y nutrición de los escolares del municipio de Chimalhuacán, para lo cual se tomará la presión arterial, talla, peso, circunferencia de cintura y cadera, así como una muestra de sangre (5 mL) para evaluar sus concentraciones de colesterol, colesterol-HDL, triglicéridos, glucosa, insulina y hemoglobina. También responderé un cuestionario por escrito sobre los hábitos alimenticios de mi hijo.

Tengo conocimiento que este estudio se lleva a cabo por parte de una colaboración entre la Facultad de Química de la UNAM, el Hospital Juárez de México y los servicios de Salud del Municipio de Chimalhuacán, Estado de México.

Se me ha informado de la importancia del estudio, así como de los objetivos del mismo y de la forma en que se tomará la muestra de sangre. Dándome la oportunidad para hacer preguntas libremente y estando satisfecho (a) de la información y respuestas.

Firma de los padres del participante

Dirección: _____

Firma del investigador: _____

Testigo 1: _____

Testigo 2: _____



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Y EL HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO**

La Universidad Nacional Autónoma de México en colaboración con el Hospital Juárez de México está realizando un estudio de síndrome metabólico que incluye la evaluación de factores de riesgo como el estado nutricional, obesidad y herencia en niños de primaria del Estado de México.

DATOS GENERALES DEL ALUMNO					
Nombre					
Lugar de nacimiento				Fecha de nacimiento	
Peso al nacer			Grado escolar		
ANTECEDENTES FAMILIARES					
Padece o padeció de: (marcar SÍ con √; NO con X)					
Familiar	Lugar de nacimiento*	DIABETES	OBESIDAD	DISLIPIDEMIA*	HTA*
Padre					
Madre					
Abuelo materno					
Abuela materna					
Abuelo paterno					
Abuela materna					

*Especificar el municipio o ciudad y estado de nacimiento. Dislipidemia = niveles elevados de colesterol o triglicéridos, bajos niveles de colesterol-HDL. HTA = hipertensión arterial

1.- ¿Tienes hermanos en tu escuela?

SÍ / NO

Sí: nombre del hermano (a) _____

2.- ¿Tú o tus padres hablan otra lengua que no sea el español? ¿Cuál?

SOMATOMETRÍA

Peso (Kg)	
Talla (cm)	
Circunferencia abdominal (cm)	
Presión arterial 1 mmHg	
Presión arterial 2 mmHg	

FRECUENCIA DE ALIMENTOS

Instrucciones: marque con una X el espacio donde indique la frecuencia con que come cada alimento de la lista.

ALIMENTO	MENOS DE UNA VEZ A LA SEMANA	DOS A CUATRO VECES A LA SEMANA	DIARIO (cantidad)
Aceite			
Aderezos (como mayonesa)			
Cacahuates			
Café			
Dulces, chocolates			
Carne roja			
Frutas			
Galletas			
Guisados			
Jugos de fruta			
Helado			
Huevo			
Leche o yogur			
Leguminosas			
Manteca			
Margarina			
Pan dulce			
Pan blanco o cereal			
Papa, pasta o arroz			
Pescado, atún, sardina			
Pavo o pollo			
Queso			
Refresco			
Tacos o tortas			
Tamales			

