



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
FACULTAD DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
INVESTIGACIÓN CLÍNICA EXPERIMENTAL EN SALUD  
BIOQUÍMICA CLÍNICA

**METILACIÓN DE *FABP3* EN LEUCOCITOS ASOCIADA A RESISTENCIA A LA  
INSULINA EN PACIENTES CON SÍNDROME METABÓLICO**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

BRIANDA ARELI HERNÁNDEZ MORÁN

TUTOR PRINCIPAL:

DRA. MARÍA ELIZABETH TEJERO BARRERA  
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

COMITÉ TUTOR:

DRA. GLORIA EUGENIA QUEIPO GARCÍA  
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO

DRA. MARTA ALICIA MENJÍVAR IRAHETA  
FACULTAD DE QUÍMICA (UNAM)

DR. JOSELÍN HERNÁNDEZ RUÍZ  
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO

DR. FAUSTO SÁNCHEZ MUÑOZ  
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA

MÉXICO., D.F.

OCTUBRE 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# Contenido

Abreviaturas .....	6
Resumen.....	8
Síndrome Metabólico .....	10
Epidemiología del Síndrome Metabólico .....	15
Fisiopatología .....	17
Resistencia la Insulina .....	18
Ácidos grasos y desarrollo de resistencia la insulina .....	20
Determinación de resistencia a la insulina .....	21
Factores dietéticos en el Síndrome Metabólico.....	23
FABP .....	24
HFABP y <i>FABP3</i> .....	24
Metilación del ADN.....	27
Estudio de la metilación del ADN en leucocitos .....	29
Metilación del ADN asociada a enfermedades.....	30
Problema de investigación.....	33
Justificación .....	34
Hipótesis .....	35
Objetivos del estudio.....	36
Metodología.....	37
Determinación del tamaño de la muestra.....	37
Diseño metodológico .....	39
Criterios de inclusión y exclusión.....	40
Técnicas e instrumentos de evaluación y recolección de datos.....	40
Análisis de metilación del ADN en promotor y primer exón de <i>FABP3</i> .....	43
Análisis de expresión de <i>FABP3</i> .....	48
Análisis de ácidos grasos en plasma .....	48
Herramientas para el análisis estadístico .....	50
Aspectos éticos y confidencialidad .....	50

Resultados.....	51
Fase 1.....	51
Metilación Isla CpG 1.....	52
Metilación Isla CpG 2.....	53
Fase 2.....	56
Metilación Isla CpG 2.....	58
Resultados de expresión de <i>FABP3</i> .....	61
Composición de ácidos grasos en plasma.....	62
Cálculo de tamaño muestral.....	64
Discusión .....	65
Fase 1.....	65
Comparación de la metilación entre casos y controles .....	66
Fase 2.....	67
Comparación de la metilación entre casos y controles .....	67
Asociación de la metilación con insulina y parámetros metabólicos.....	69
Asociación entre el porcentaje de metilación y la expresión de <i>FABP3</i> .....	69
Asociación entre la metilación de <i>FABP3</i> y la concentración de ácidos grasos en el plasma.....	70
Limitaciones del estudio.....	72
Conclusiones.....	73
Literatura citada .....	74
Apéndices .....	84

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Criterios para las definiciones del SM en adultos. ....	11
<b>Tabla 2.</b> Definición consenso del SM.....	14
<b>Tabla 3.</b> Datos descriptivos fase 1 .....	51
<b>Tabla 4.</b> Datos descriptivos fase 2 .....	56
<b>Tabla 5.</b> Composición media (%) de ácidos grasos en plasma.....	62

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Producción de insulina por las células $\beta$ -pancreáticas.....	18
<b>Figura 2.</b> Acción de la insulina en tejidos periféricos .....	19
<b>Figura 3.</b> Frecuencia y distribución de sitios CpG en <i>FABP3</i> .....	25
<b>Figura 4.</b> Metilación de sitios CpG en <i>FABP3</i> y su asociación con fenotipos del SM .....	26
<b>Figura 5.</b> Distribución genómica de CGI en humanos.....	28
<b>Figura 6.</b> Análisis de la metilación de <i>FABP3</i> .....	43
<b>Figura 7.</b> Predicción de Isla CpG 1 e Isla CpG 2 de <i>FABP3</i> . ....	44
<b>Figura 8.</b> Proceso de transformación con bisulfito y reacción de amplificación por PCR..	45
<b>Figura 9.</b> Gráfico de amplificación de <i>FABP3</i> con respecto al control interno (GAPDH)...	48

## Índice de Gráficos

<b>Gráfico 1.</b> Comparación patrones de metilación entre casos y controles Isla CpG 1 .....	52
<b>Gráfico 2.</b> Comparación de metilación (%) isla CpG 1 .....	53
<b>Gráfico 3.</b> Comparación patrones de metilación entre casos y controles Isla CpG 2. ....	54
<b>Gráfico 4.</b> Comparación de metilación (%) isla CpG 2.....	55
<b>Gráfico 5.</b> Comparación de índice HOMA entre casos y controles.....	57
<b>Gráfico 6.</b> Patrones de metilación Isla CpG 2.....	58
<b>Gráfico 7.</b> Comparación de metilación (%) isla CpG 2.....	59
<b>Gráfico 8.</b> Metilación global (%) de casos y controles fase 2.....	60
<b>Gráfico 9.</b> Expresión de <i>FABP3</i> .....	61
<b>Gráfico 10.</b> Concentración de ácidos grasos en plasma (%) .....	63
<b>Gráfico 11.</b> Ácidos grasos provenientes de la dieta (%) .....	64

## Abreviaturas

OMS. Organización Mundial de la Salud

EGIR. Grupo Europeo para el Estudio de Resistencia a la Insulina\*

NCEP. Programa Nacional de Educación sobre Colesterol\*

ATPIII. Panel de Expertos sobre Detección, Evaluación y Tratamiento de la Hipercolesterolemia en Adultos III\*

AACE. Asociación Americana de Endocrinología Clínica\*

IDF. Federación Internacional de Diabetes\*

AHA/NHLBI. Asociación Americana del Corazón e Instituto Nacional del Corazón, Pulmón y Sangre\*

ADA. Asociación Americana de Diabetes\*

c-HDL. Colesterol asociado a lipoproteínas de densidad alta

RCV. Riesgo cardiovascular

IMC. Índice de Masa Corporal

ENSANUT. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición

IRS. Síndrome de resistencia a la insulina\*

HOMA. Evaluación del Modelo Homeostático\*

NEFA. Ácidos grasos no esterificados

MTP. Proteína microsomal transportadora de triglicéridos

kDA. Kilo Daltons

---

\* por sus siglas en inglés

FABP. Proteína de unión a ácidos grasos\*

ADN. Ácido desoxirribonucleico\*

H3k4me3. Trimetilación en el residuo de lisina 4 de la histona 3

5mec. 5-metilcitosina

CpG. Dinucleótido CG unido por un enlace fosfato

CGI. Isla CpG\*

TSS. Sitio de inicio de la transcripción\*

MBD. Proteínas de unión al ADN metilado\*

DNMTs. ADN metil transferasas\*

mmHg. Milímetros de Mercurio

---

\*por sus siglas en inglés



## Resumen

**Antecedentes:** Se ha sugerido que la metilación en la región reguladora y parte del primer exón de *FABP3* modula su expresión, provocando cambios en los niveles de HFABP. Dicha proteína participa de manera importante en el desarrollo de Síndrome Metabólico (SM) ya que se ha observado que contribuye a la sensibilidad a la insulina. El objetivo principal de éste estudio piloto fue analizar la metilación de *FABP3* en leucocitos y evaluar su asociación con resistencia a la insulina y fenotipos relacionados, en pacientes con SM.

**Metodología:** Los análisis de metilación de *FABP3* se hicieron por clonación, con el propósito de obtener información por cada sitio CpG. El estudio se llevó a cabo en dos fases, en la primera (n=20, 10 casos y 10 controles) los análisis tuvieron como finalidad describir la metilación de dos islas CpG en la región reguladora y parte del primer exón del gen. En la segunda, se llevó a cabo el análisis de la metilación de *FABP3* (n=10, 5 casos y 5 controles) y su correlación con la expresión del gen, el índice HOMA y la concentración plasmática de ácidos grasos.

**Resultados:** En la fase uno, la metilación de la isla CpG 1 fue igual en casos y controles, sin embargo, en la isla CpG 2 la metilación del sitio CpG 17 fue significativamente mayor en los casos ( $z=2.64$ ). Resultados similares se encontraron en una muestra independiente, que aunque no alcanzó una significancia estadística, la metilación en dicho sitio CpG 17 fue similar. Además, en el sitio CpG 18, localizado en el primer exón de *FABP3*, y la metilación global de la isla CpG 2 fue estadísticamente más alta en los controles ( $z=3.98$  y  $2.79$  respectivamente). Estos resultados no mostraron correlación con la expresión del gen, el índice HOMA ni con la concentración plasmática de ácidos grasos.

**Conclusiones:** Los hallazgos en éste estudio mostraron que la metilación en la región reguladora de *FABP3* es más abundante cerca del sitio de inicio de la transcripción y estadísticamente diferente en los sitios CpG 17 y 18 entre casos y controles. A pesar de que no se observó una correlación entre la metilación de *FABP3*, la expresión del gen, el índice HOMA o las concentraciones plasmáticas de ácidos grasos, éste estudio generó información relevante para analizar la variación de la metilación en dicha región, y para el cálculo de un tamaño de muestra con suficiente poder estadístico que permita analizar asociaciones con fenotipos de importancia clínica.

**Palabras clave:** metilación, *FABP3*, resistencia a la insulina, Síndrome Metabólico.

## **Introducción**

Actualmente, las enfermedades no transmisibles también consideradas como enfermedades crónicas se encuentran entre las principales causas de muerte alrededor del mundo en personas menores de 70 años en países de bajo y mediano ingreso (World Health Organization 2015).

En México, las enfermedades crónicas se han convertido en un problema de salud que va en aumento, considerando a las enfermedades coronarias y la diabetes como primera y tercera causa de muerte, estimando el 77% del total de las muertes en todos los grupos de edad por éstas causas (World Health Organization 2014). Dentro de los problemas más graves de salud pública en nuestro país, se encuentra el SM del cual, según datos de la ENSANUT más actual realizada en el año 2012, la prevalencia en adultos mayores de 20 años fue de ~45% (Salas, del Mar Bibiloni, et al. 2014). Además, como parte de los componentes del SM, las anormalidades lipídicas tales como la hipoalfalipoproteinemia (bajos niveles de c-HDL) e hipertrigliceridemia son los factores de riesgo más comunes para enfermedad cardiovascular (ECV) entre adultos mexicanos ( $\geq 20$  años) (Aguilar-Salinas et al. 2010).

En la etiología de las enfermedades crónicas, una dieta alta en grasas saturadas e hidratos de carbono simples; el estilo de vida que incluye hábitos de tabaquismo y un elevado consumo de alcohol; además de una vida sedentaria contribuyen de manera importante (Reininger et al. 2015; Epping-Jordan et al. 2005; Aguilar-Salinas et al. 2001), debido a que estos factores incrementan el riesgo para obesidad y dislipidemia que, además de tener factores genéticos subyacentes, la influencia del medio ambiente es considerable (Velázquez-Monroy, et al. 2003). De aquí la importancia de la prevención, el desarrollo de herramientas pronósticas y la creación de modelos terapéuticos (Córdova-villalobos et al. 2008).

## **Marco teórico**

### **Síndrome Metabólico**

El SM es un conjunto de factores que combinados incrementan el riesgo de enfermedades crónicas. Dichos factores son: dislipidemia (triglicéridos elevados, lipoproteínas asociadas a apolipoproteína B y niveles bajos de lipoproteínas de baja densidad (HDL)), elevación de la presión sanguínea arterial y alteración de la homeostasis de glucosa, además de obesidad y resistencia a la insulina que han generado atención especial como manifestaciones centrales del síndrome (Pedroza-Tobias et al. 2014; Kassi et al. 2011; Grundy et al. 2004). La combinación de estos factores de riesgo pueden culminar en eventos adversos como la diabetes tipo 2, ECV y con ello, un incremento en la mortalidad (Luna-Luna et al. 2015; Pedroza-Tobias et al. 2014). Diversos estudios han mostrado cómo es que los factores ambientales contribuyen al desarrollo de obesidad central y resistencia a la insulina, conllevando al desarrollo de SM (Deedwania & Gupta 2006).

Numerosas organizaciones internacionales y grupos de expertos, tales como la OMS, el EGIR, NCEP: ATP III, AACE, IDF y la AHA/NHLBI han presentado varias definiciones incorporando los diferentes componentes del SM **Tabla 1**.

**Tabla 1.** Criterios para las definiciones del SM en adultos.

<p><b>OMS (1998)</b> (Alberti &amp; Zimmet 1998)</p>
<p>La resistencia a la insulina definida como diabetes mellitus tipo 2, glucosa en ayuno alterada (&gt;100mg/dl) o tolerancia a la glucosa alterada, además de dos de los siguientes criterios:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- Obesidad abdominal (índice cintura-cadera &gt;0.9 en hombres y &gt;0.85 en mujeres), o IMC &gt;30 Kg/m<sup>2</sup>.</li><li>- Triglicéridos ≥150 mg/dl, y/o colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad (c-HDL) &lt;40 mg/dl en hombres y &lt;50 mg/dl en mujeres.</li><li>- Presión sanguínea ≥140/90 mmHg.</li><li>- Microalbuminuria (tasa de secreción de albúmina urinaria ≥20 ug/min o proporción albúmina/creatinina ≥30 mg/g).</li></ul>
<p><b>EGIR (1999)</b> (Balkau &amp; Charles 1999)</p>
<p>Resistencia a la insulina definida como niveles de insulina &gt; percentil 75 en pacientes no diabéticos, más dos de los siguientes criterios:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- Circunferencia de cintura ≥94 cm en hombres, ≥80 cm en mujeres.</li><li>- Triglicéridos ≥150 mg/dl y/o c-HDL &lt;39 mg/dl en hombres o mujeres.</li><li>- Presión sanguínea ≥140/90 mmHg o ingerir medicamentos antihipertensivos.</li><li>- Glucosa en ayuno ≥110 mg/dl.</li></ul>

**NCEP:ATPIII (2001)** (Communication 2001)

Tres o más de los siguientes criterios:

- Obesidad abdominal dada por circunferencia de cintura.  
Circunferencia de cintura >102 cm en hombres, >88 cm en mujeres.
- Triglicéridos  $\geq 150$  mg/dl.
- Colesterol-HDL <40 mg/dl en hombres y <50 mg/dl en mujeres.
- Presión sanguínea  $\geq 130/85$ .
- Glucosa en ayuno  $\geq 100$  mg/dl\*.

\* En 2003, la Asociación Americana de Diabetes (ADA) cambió el criterio para la tolerancia a la glucosa en ayuno alterada, de 110 mg/dl a 100 mg/dl.

**AACE (2003)** (Einhorn et al. 2003)

Tolerancia a la glucosa alterada más dos de los siguientes criterios:

- IMC  $\geq 25$  Kg/m<sup>2</sup>.
- Triglicéridos  $\geq 150$  mg/dl y/o c-HDL <40 mg/dl en hombres y <50 mg/dl en mujeres.
- Presión sanguínea  $\geq 130/85$  mmHg.

**Federación Internacional de Diabetes (2005)** (Eckel et al. 2010b)

Obesidad central (definida como circunferencia de cintura o como IMC >30 Kg/m<sup>2</sup>) con valores específicos por etnicidad\*, más dos de los siguientes:

- Triglicéridos  $\geq 150$  mg/dl.

- c-HDL <40 mg/dl en hombres y <50 mg/dl en mujeres.
- Presión sanguínea  $\geq$ 130/85 mmHg.
- Glucosa en ayuno  $\geq$ 100 mg/dl.

\*Circunferencia de cintura para Europeos, Africanos y del Mediterráneo Este, >94 cm en hombres y >80 cm en mujeres; y para Sur Asiáticos, Chinos, Japoneses, Sur y Centro América >90 cm en hombres y >80 cm en mujeres.

**AHA/NHLBI (2004)** (Grundy et al. 2004)

Tres de los siguientes:

- Circunferencia de cintura  $\geq$ 102 cm en hombres,  $\geq$ 88 cm en mujeres.
- Triglicéridos  $\geq$ 150 mg/dl.
- c-HDL <40 mg/dl en hombres y <50 mg/dl en mujeres.
- Presión sanguínea  $\geq$ 130/85 mmHg.
- Glucosa en ayunas  $\geq$ 100 mg/dl.

Aunque el incremento de riesgo para diabetes tipo 2 y ECV es reconocido por dichas organizaciones, la definición precisa y la contribución de los diversos componentes del SM aún es controversial (O'Neill & O'Driscoll 2015). La principal causa de debate para el SM ha sido el tener múltiples definiciones, lo cual contribuye a que haya una carencia de claridad sobre su aplicación en la práctica clínica. (Eckel et al. 2010a). Sin embargo, en el año 2009 se publicó una definición conjunta por la IDF y la AHA/NHLBI. Dicha definición declara que tres de los cinco componentes pueden ser suficientes para su diagnóstico, con los puntos de corte para la medición de circunferencia de cintura basados en el grupo étnico **Tabla 2** (Alberti et al. 2009).

**Tabla 2.** Definición consenso del SM (incorporando las definiciones de la IDF y de AHA/NHLBI) (Alberti et al. 2009).

Tres de los siguientes componentes:

- Circunferencia de cintura elevada (de acuerdo a la población y a las definiciones específicas por región).
- Triglicéridos  $\geq$  150 mg/dl.
- c-HDL  $<$ 40 mg/dl en hombres y  $<$ 50 mg/dl en mujeres.
- Presión sanguínea  $\geq$ 130/85 mmHg.
- Glucosa en ayuno  $\geq$ 100 mg/dl.

Con base en la clasificación SM, dichos criterios conllevan a 16 posibles combinaciones que implican diferente riesgo metabólico. Se ha observado que niveles bajos de c-HDL y niveles de triglicéridos elevados son un buen marcador de riesgo cardiovascular y resistencia a la insulina (Pedroza-Tobias et al. 2014). Las cuales son alteraciones muy prevalentes en población mexicana (Lopez-Alvarenga et al. 2008).

## **Epidemiología del Síndrome Metabólico**

El SM es un desorden complejo que representa altos costos socioeconómicos y es considerado una epidemia mundial (Kassi et al. 2011) afectando al 25% de la población en países desarrollados (Salas, del Mar Bibiloni, et al. 2014). Como ya se mencionó, la existencia de diversas definiciones para el SM, las cuales difieren sólo en pequeños detalles, impide señalar un valor específico que determine la prevalencia a nivel mundial (Surveys 2009). Cabe mencionar, que la prevalencia de SM varía y depende de los criterios diagnóstico utilizados en las diferentes definiciones, así como de las características de la población estudiada (sexo, edad y grupo étnico) (Cornier et al. 2008). Sin embargo, se sabe que para todos los grupos, la prevalencia va en aumento de manera importante con respecto al incremento de IMC y edad (Kassi et al. 2011; Surveys 2009).

En México, se observa una prevalencia de SM considerablemente más alta que los países colindantes como: El Salvador (28.8%), Guatemala (22.7% en hombres y 41.1% en mujeres) y Costa Rica (29.2%). Utilizando la definición para SM del ATP III, en 1993 la prevalencia en adultos mexicanos fue de 26.6%, en 2006 con base en los datos de la ENSANUT la prevalencia incrementó a un 36.8% y para 2012 fue de 45% (Salas, del Mar Bibiloni, et al. 2014). Cabe mencionar que se ha observado una asociación entre el incremento en la prevalencia con respecto a la edad, tomando en cuenta que durante el envejecimiento suelen presentarse condiciones patológicas como el incremento de la lipoperoxidación, incremento de radicales libres y fenómenos epigenéticos alterados (Kim & Choi 2015).

En 2014 Pedroza-Tobías y colaboradores reportaron la prevalencia de las diferentes combinaciones del SM en población mexicana. Dichos resultados mostraron que el grupo con hipoalfalipoproteinemia fue el más prevalente en el total de la población (46%), siendo la combinación más frecuente: bajo c-HDL + hipertensión arterial + obesidad abdominal (20%) en mujeres. Por otro lado, el grupo de SM con dislipidemia mixta fue el más prevalente en hombres (43.5%), siendo la combinación más frecuente: hipertrigliceridemia (HTG) + bajo c-HDL +



obesidad abdominal. Con base en los resultados de la ENSANUT 2006, de 31.5% de los adultos mexicanos que presentaron hipertrigliceridemia, sólo el 3.8% de la población había diagnosticada previamente, siendo este uno de los principales desafíos para la salud pública nacional (Pedroza-Tobias et al. 2014).

Por otra parte, con respecto a la prevalencia de obesidad, el número de personas afectadas alrededor del mundo ha incrementado dramáticamente durante los últimos años, lo cual lo convierte en un tema de gran importancia ya que predispone al desarrollo de resistencia a la insulina, diabetes tipo 2 y ECV (Snel et al. 2012). Dado el incremento en la prevalencia de obesidad se resalta la influencia de los factores ambientales (Barnes & Ozanne 2011), haciendo especial énfasis en los hábitos dietéticos. Algunas de las causas más evidentes de la obesidad incluyen una mayor ingestión de energía que la utilizada con el subsecuente almacenamiento del exceso de energía en forma de grasa (Chang & Neu 2015).

El cambio en los hábitos dietéticos en los últimos años junto con un estilo de vida sedentario ha favorecido el incremento de la predisposición para obesidad relacionada con enfermedades crónicas principalmente en países en desarrollo incluyendo a México, Brasil, India y Argentina (Gupta et al. 2012).

## **Fisiopatología**

El SM agrupa diversos factores de riesgo cardiovascular. Como ya se mencionó previamente, la resistencia a la insulina es considerada un factor central. Sin embargo, en la fisiopatología del SM, la obesidad parece ser uno de los factores desencadenantes más importantes, entre otras alteraciones metabólicas que lo caracterizan: intolerancia a la glucosa, dislipidemia e hipertensión arterial (García E, De-la-Llata M, Kaufer M, Tusié M, Calzada R 2008).

### **Dislipidemia**

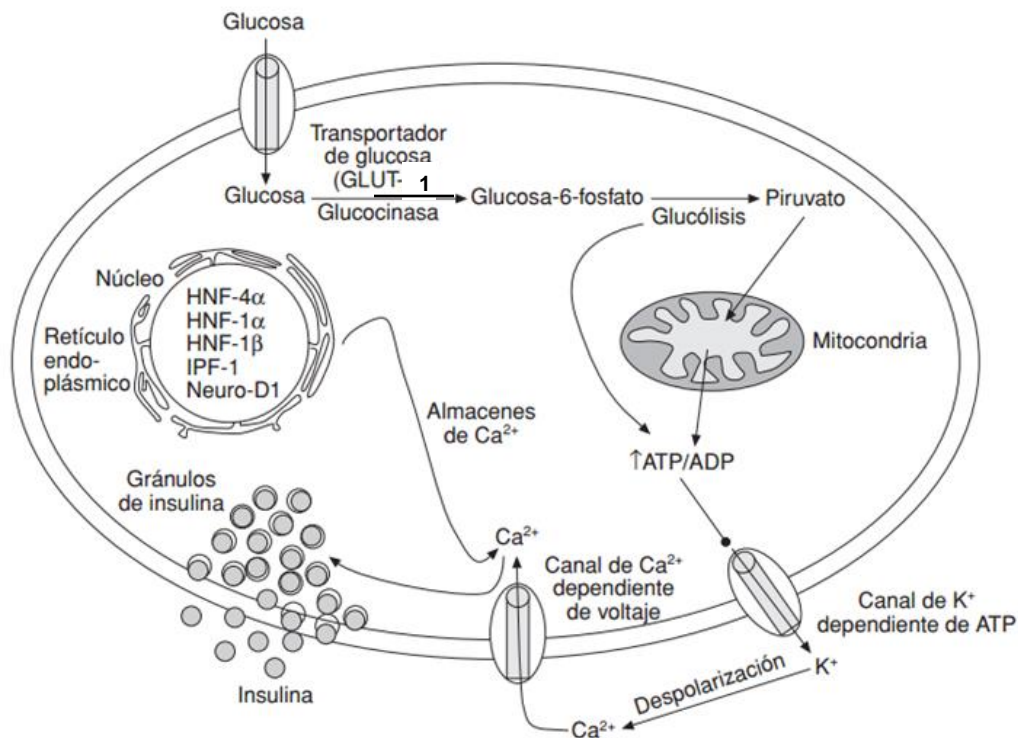
La dislipidemia forma parte de las alteraciones que componen al SM, dentro de las cuales se incluyen diversas anormalidades lipídicas que implican mayor riesgo para diabetes tipo 2 y ECV (Ruotolo & Howard 2002); sin embargo, las tres más importantes asociadas al SM son el incremento de lipoproteínas ricas en triglicéridos, disminución de lipoproteínas de alta densidad (HDL) e incremento de lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Mooradian 2009).

El incremento de lipoproteínas ricas en triglicéridos (quilomicrones, VLDL, IDL, LDL) en pacientes con SM se debe tanto a la sobreproducción intestinal como hepática en estado de ayuno y posprandial. Además, una deficiencia funcional de la lipoproteína lipasa parece contribuir de manera importante a esta alteración (Raal 2009).

Diversos estudios y resultados de encuestas realizadas en población mexicana han mostrado que los niveles bajos de c-HDL y niveles altos de triglicéridos ya sea de forma independiente o en combinación, son los fenotipos más prevalentes en adultos mayores de 20 años. En el año 2010 Aguilar-Salinas y colaboradores reportaron una alta prevalencia en México de hipoalfalipoproteinemia e hipertrigliceridemia de 60.5 y 31.5%, respectivamente (Aguilar-Salinas et al. 2010).

## Resistencia la Insulina

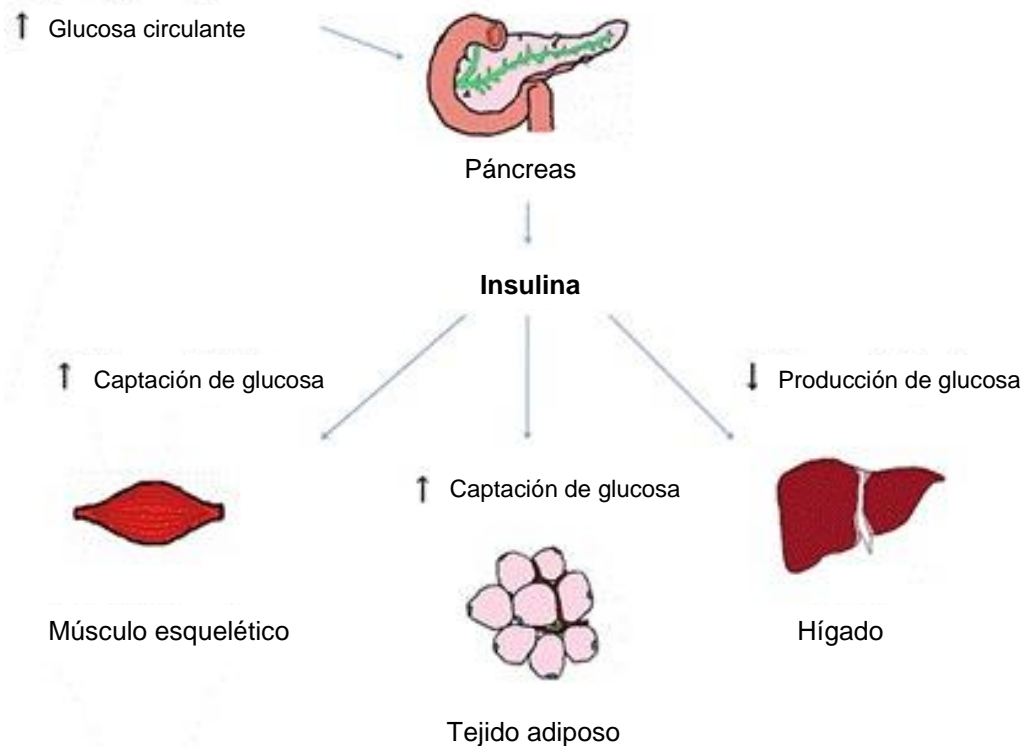
La resistencia a la insulina se define como la disminución de la habilidad de la insulina para estimular la captación de glucosa por los tejidos periféricos (D LeRoith & Cohen 2012). En términos generales, la insulina se encarga de mantener la homeostasis de glucosa en la sangre regulando su captación por los tejidos insulino-dependientes. Durante éste proceso, la glucosa es translocada al interior de las células- $\beta$ , por medio de los transportadores de glucosa y es fosforilada por la glucocinasa, en donde es metabolizada en la glucólisis y en el ciclo de Krebs, resultando en el incremento de la proporción citoplasmática ATP/ADP. Esto provoca el cierre de los canales de K sensibles al ATP y despolariza la membrana celular provocando la abertura de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje. Esto resulta en el incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el plasma promoviendo la secreción de insulina (Leibiger et al. 2008) **Figura 1**.



**Figura 1.** Producción de insulina por las células  $\beta$ -pancreáticas.

HNF: factor nuclear hepático; IPF-1: factor 1 promotor de la insulina; Neuro-D1: factor 1 de la diferenciación neurogénica (Cuesta 2004).

En individuos con una sensibilidad a la insulina normal, las células  $\beta$ -pancreáticas liberan insulina en respuesta al incremento de los niveles circulantes de glucosa, como se ve en el estado posprandial. Subsecuentemente, las concentraciones de glucosa en plasma disminuyen por una supresión coordinada de la producción hepática de glucosa a partir de aminoácidos y otros intermediarios del metabolismo (gluconeogénesis) y glucógeno (glucogenólisis), además del incremento de la captación de glucosa por el músculo y el tejido adiposo **Figura 2**. En estos tejidos, la insulina incrementa la movilización del transportador de glucosa regulado por la insulina 4 (GLUT4) desde las vesículas de almacenamiento intracelular a la superficie de la célula y de ésta manera favorecer la captación de glucosa (Derek LeRoith & Cohen 2012).



**Figura 2.** Acción de la insulina en tejidos periféricos (Derek LeRoith & Cohen 2012).

La unión específica de la insulina a su receptor que se encuentra en la superficie de la célula, inicia la activación de las redes de transducción de señales regulando diversas funciones celulares. El receptor de insulina, una tirosina quinasa activada por ligando, fosforila substratos intracelulares incluyendo los substratos del receptor de la insulina (IRS) (White 2002). Por el contrario, cuando ocurre resistencia a la insulina, la respuesta biológica a la insulina se encuentra atenuada, lo cual trae como consecuencia una disminución en la captación de glucosa por las células del músculo y del tejido adiposo, una disminución en la producción hepática de glucógeno y un aumento en la producción hepática de glucosa. Posteriormente, ocurre un aumento en la secreción de insulina como compensación a la elevación progresiva de los niveles de glucosa circulante, denominado hiperinsulinismo compensatorio (Wilcox 2005).

La resistencia a la insulina está estrechamente asociada a importantes problemas de salud pública incluyendo a la obesidad, hipertensión, enfermedad arterial coronaria, dislipidemias y un grupo de anomalías metabólicas y cardiovasculares que definen al SM (Muniyappa et al. 2008). Es considerada como un defecto celular primario en el desarrollo de la diabetes tipo 2 (Keane et al. 2015), ya que la combinación de resistencia a la insulina y la subsecuente hipersinsulinemia, seguida por hipoinsulinemia, conlleva al desarrollo de hiperglucemia y el desarrollo de complicaciones asociadas con SM y diabetes tipo 2 (Park et al. 2015; Qatanani & Lazar 2007).

### **Ácidos grasos y desarrollo de resistencia la insulina**

Existe evidencia sobre los efectos metabólicos de los ácidos grasos libres en la resistencia a la insulina. Durante este estado patológico la lipólisis se encuentra aumentada, llevando a un incremento de los ácidos grasos libres lo cual no sólo es considerado como un resultado de resistencia a la insulina, sino también como una causa. Éstos ácidos grasos libres pueden llevar a la resistencia la insulina a través de diversos mecanismos incluyendo la acumulación de lípidos intracelulares como diacilglicerol y ceramidas, señalización inflamatoria, estrés oxidativo y disfunción mitocondrial (Derek LeRoith & Cohen 2012).

Cuando los niveles de ácidos grasos libres incrementan, la capacidad del tejido adiposo para capturarlos y almacenarlos es excedida. Cuando esto ocurre, los ácidos grasos libres se acumulan en tejidos con una capacidad limitada para el almacenamiento de lípidos, como el hígado y el músculo esquelético. Dicho fenómeno es conocido como acumulación ectópica de grasa y está estrechamente asociada con la resistencia a la insulina (Snel et al. 2012).

### **Determinación de resistencia a la insulina**

Comúnmente se utiliza una prueba de tolerancia a la glucosa como herramienta de diagnóstico para la diabetes tipo 2. Algunas prácticas clínicas tales como el *clamp* hiperinsulinémico euglicémico, considerado el “estándar de oro” para la determinación de resistencia a la insulina, permite conocer tanto la sensibilidad a la insulina (hepática y muscular) como la respuesta de la célula  $\beta$  a la glucosa (Tam et al. 2012). Dado que el *clamp* hiperinsulinémico euglicémico es un método muy complicado para llevarse a cabo en la práctica clínica, existen otras alternativas para la determinación de resistencia a la insulina a partir de la concentración de insulina y glucosa en ayuno, entre algunos podemos mencionar la evaluación del modelo homeostático o índice HOMA (Matthews et al. 1985) que se deriva de la interacción entre la función celular  $\beta$  y la sensibilidad a la insulina en un modelo matemático donde se utilizan las concentraciones de glucosa e insulina en ayuno (DeFronzo et al. 1979), el cual por su naturaleza poco invasiva es más fácil de aplicar en la práctica clínica (Park et al. 2015). Éste método ha sido correlacionado con el *clamp* y se han reportado coeficientes que van desde -0.53 a -0.91 (Martínez Basila et al. 2011).

## Obesidad

Durante la obesidad existe una alteración en la habilidad de la insulina para inhibir la producción de glucosa por el hígado y promover la captación de glucosa en tejido adiposo y músculo (Qatanani & Lazar 2007). En presencia de resistencia a la insulina, el proceso de movilización de ácidos grasos libres a partir de los triglicéridos almacenados en el tejido adiposo se encuentra acelerado (Xu 2013). Diversas investigaciones han reportado que el incremento del tejido adiposo visceral, más que el tejido adiposo subcutáneo está asociado con resistencia a la insulina (Osborn & Olefsky 2012) como consecuencia de la secreción de adipocitosinas como leptina, resistina, factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ), interleucina-6 (IL-6), y angiotensina II (Kassi et al. 2011). Además, durante la obesidad el tejido adiposo libera citosinas proinflamatorias que activan cascadas de inflamación y moléculas tales como IKK $\beta$  y JNK que participan en el mecanismo que atenúa la fosforilación de la tirosina en el receptor de insulina, contribuyendo también al desarrollo de resistencia a la insulina (Xu 2013).

Diversos mecanismos han sido considerados importantes en el desarrollo de obesidad tales como la sobre y subregulación de intermediarios metabólicos, transportadores de nutrimentos, factores de transcripción, y el control de cambios epigenéticos como la metilación del ADN (Chang & Neu 2015); lo cual destaca que el desarrollo de la obesidad se debe tanto a factores genéticos como a la influencia de factores externos, como los nutrimentos provenientes de la dieta. Cabe hacer notar que entre las diversas causas que contribuyen a la obesidad, la más evidente consiste en un mayor consumo de energía del que se utiliza conllevando al almacenamiento del exceso de energía en forma de grasa (Chang & Neu 2015).

## **Factores dietéticos en el Síndrome Metabólico**

La asociación entre la adiposidad y el SM ha sido ampliamente descrita, y la dieta contribuye de manera importante en el desarrollo de ambas patologías (Klein-platat et al. 2005). Aunque son limitados, existen resultados de estudios que han confirmado la relación que existe entre una dieta poco saludable (alta en ácidos grasos saturados y baja en ácidos grasos omega-3) y el desarrollo de obesidad y SM, mientras que con patrones dietéticos saludables el riesgo disminuye (Suliga et al. 2015; Wirfält et al. 2001; Kim et al. 2001). En un estudio realizado por Fung T y colaboradores hallaron que un patrón de alimentación con alto contenido en frutas, vegetales, pescado, granos enteros y leguminosas se asocia con perfiles metabólicos favorables como baja insulina en ayuno, baja homocisteína y altas concentraciones de folato. En contraste, un patrón de alimentación abundante en carnes rojas y carne procesada, alimentos altos en grasas saturadas, bebidas azucaradas y postres correlaciona con alto IMC, alta homocisteína, niveles bajos de c-HDL y niveles bajos de folatos (Fung et al. 2001).

## **Ácidos grasos en plasma provenientes de la dieta**

La determinación de ácidos grasos en el plasma y en el tejido adiposo puede ser utilizada como un estimador de la proporción y el tipo de grasa contenida en la dieta de un individuo. La composición de ácidos grasos en el tejido adiposo puede proporcionar información sobre la dieta de periodos relativamente largos (Lagstrom et al. 1998), mientras que la composición de los ácidos grasos en el plasma refleja la ingestión de grasa a corto plazo (días o semanas). Cabe mencionar que los ácidos grasos en plasma, como una medición de la integración de la ingestión dietética y la respuesta biológica, es más sensible que una encuesta dietética cuando se pretende evaluar el efecto de la dieta en procesos metabólicos (Ma et al. 1995).

Múltiples estudios han mostrado que la modificación de las concentraciones de lípidos en plasma es de gran utilidad en la disminución de la mortalidad por eventos cardiovasculares (Aguilar-Salinas et al. 2001). Se ha observado que la



composición de la grasa en la dieta y de ácidos grasos en el plasma, está relacionada con la sensibilidad a la insulina (Pagotto 2009; Klein-platat et al. 2005) y con diversas características del SM, como presión arterial, perfil lipídico en plasma e inflamación (Klein-platat et al. 2005).

## **FABP**

Las proteínas intracelulares de unión a ácidos grasos (FABP) pertenecen a una familia multigénica, dividida en al menos cuatro tipos distintos: hepáticas, intestinales, cardíacas y del tejido adiposo. Su peso molecular va de 14 a 15 kDa y participan en la captación, metabolismo intracelular y transporte de ácidos grasos de cadena larga. Además, también son responsables en la modulación del crecimiento y proliferación celular (Gene 2015). Las diferentes FABPs muestran una variabilidad en su secuencia de 22-73%, pero sus estructuras tridimensionales son altamente conservadas (Kakoti & Goswami 2013).

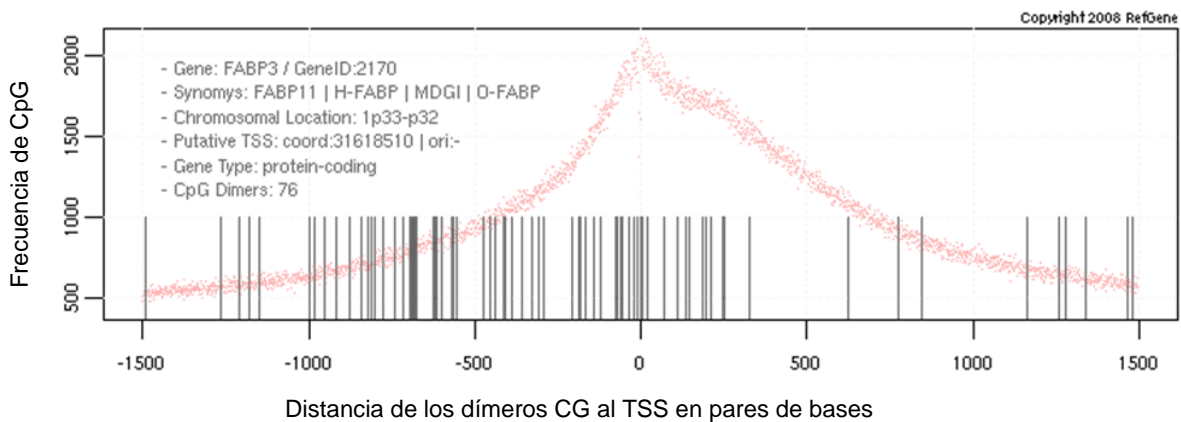
### **HFABP y *FABP3***

La proteína de unión a ácidos grasos H (HFABP) participa en la captación; transporte de ácidos grasos de cadena larga y metabolismo de ácidos grasos, interactuando con el factor de transcripción PPAR $\alpha$  (Kakoti & Goswami 2013); y además es un potencial regulador del sistema mitocondrial  $\beta$ -oxidativo (Fournier & Richard 1990). Ésta proteína es codificada por el gen *FABP3* y se expresa en tejidos como el corazón, músculo esquelético, cerebro, riñones, intestino, glándulas adrenales y linfocitos (Zhang et al. 2013). Su tamaño molecular y localización determina su liberación en circulación. Dado que es una molécula citoplasmática de pequeño tamaño (15kD) se libera antes (2-4 h) que aquellas moléculas de mayor tamaño. Es por ello que HFABP ha sido utilizada como marcador diagnóstico para síndromes agudos coronarios. Existe evidencia que indica que los niveles de HFABP son detectables en muestras de suero de pacientes con SM, siendo éstos más elevados en aquellos que además presentan diabetes (Akbal et al. 2009). En un estudio reportado en el año 2012 se observó

una correlación positiva entre los niveles de HFABP y parámetros metabólicos como el índice HOMA, triglicéridos y c-LDL en mujeres con alto riesgo cardiovascular (Cakir et al. 2012).

HFABP es codificada por *FABP3*, un gen que se localiza en el brazo corto del cromosoma 1 (1p33-p32) y contiene cuatro exones (Gene 2015). Dicho gen es considerado un regulador clave en la homeostasis lipídica, y su estado metilado ha sido asociado con alteración en los niveles de colesterol, glucosa sanguínea, adiponectina, presión arterial y sensibilidad a la insulina; hallazgos que sugieren que las marcas epigenéticas en sangre pueden ser un predictor de riesgo de SM (Kim & Choi 2015).

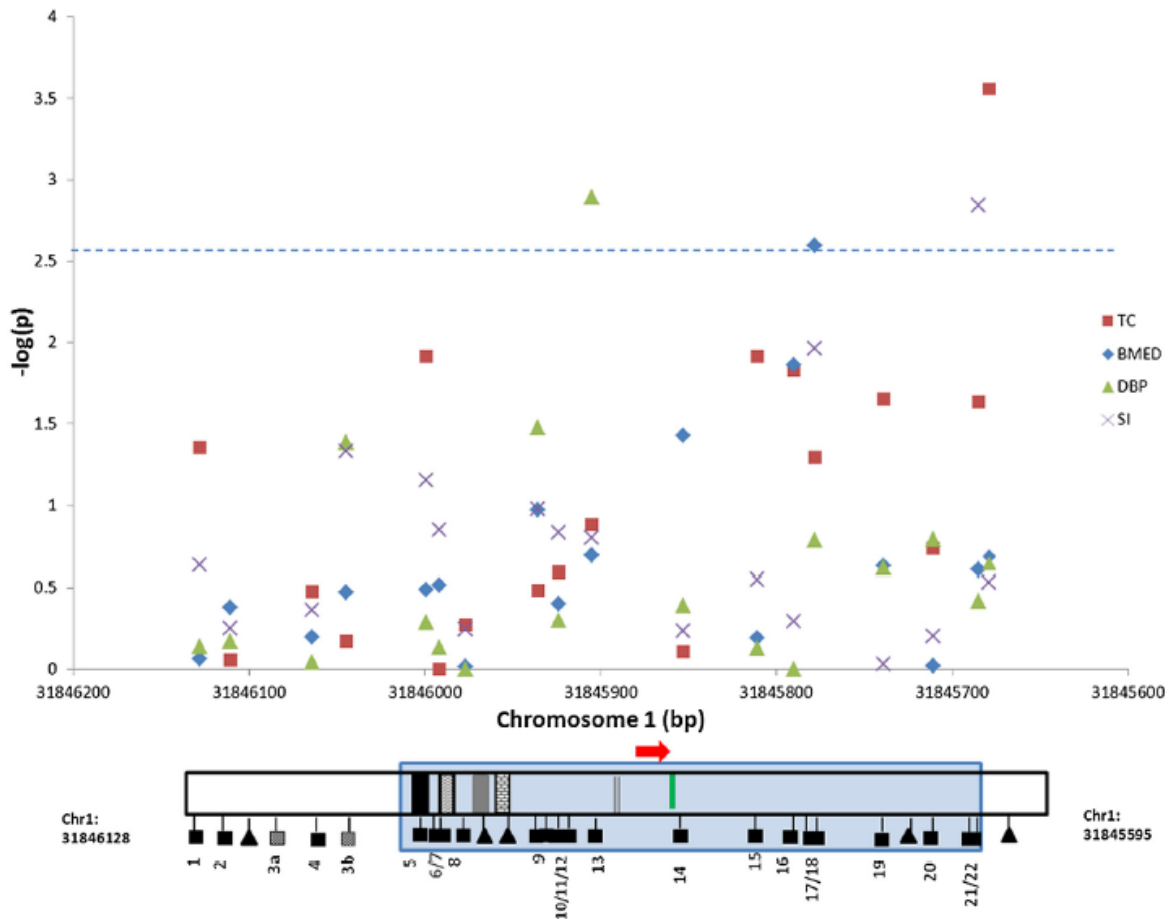
En la **Figura 3** se presenta la distribución de los dinucleótidos CpG en *FABP3*, 1500 pares de bases río arriba y río abajo del sitio de inicio de la transcripción (TSS). Dichos sitios CpG se encuentran en mayor proporción en la parte del promotor y del primer exón cerca del sitio del TSS (NCBI 2015).



**Figura 3.** Frecuencia y distribución de sitios CpG en *FABP3*

Un estudio reportado en el año 2013 por Zhang y colaboradores en el cual se estudió la heredabilidad de la metilación de *FABP3* en familias Europeas (n=517) y su asociación con fenotipos del SM, mostró que el estado de metilación derivado de células circulantes en sitios CpG de dicho gen tiene una alta heredabilidad y además, se encontraron correlaciones significativas con niveles de colesterol total,

apoB asociada a VLDL, ILDL y LDL; presión arterial diastólica y sensibilidad a la insulina (**Figura 4**) (Zhang et al. 2013).



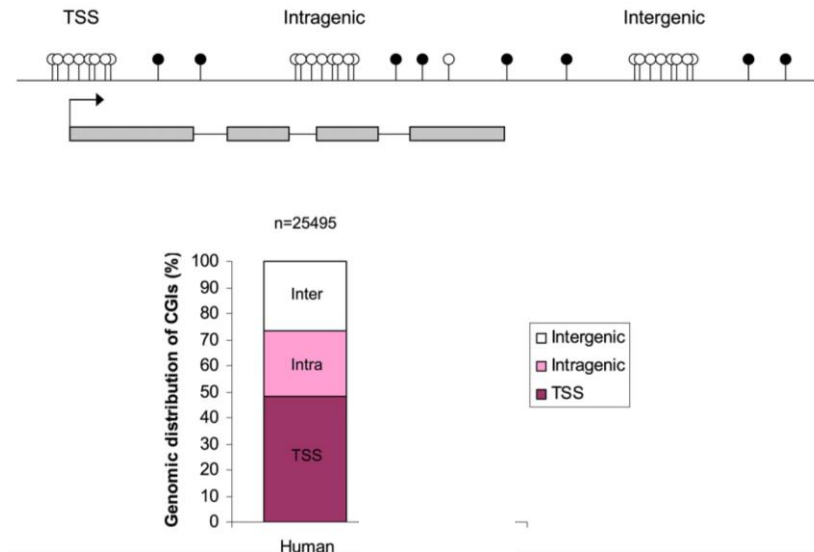
**Figura 4.** Metilación de sitios CpG en *FABP3* y su asociación con fenotipos del SM. Las figuras representan características del SM (lado derecho: colesterol total, Lipoproteínas asociadas a apoB, presión arterial diastólica y sensibilidad a la insulina) asociadas con sitios CpG ( $-\log(p)$  en el eje y). La línea punteada azul representa el threshold ( $\alpha=0.05$ ) después de la corrección por múltiples pruebas (Zhang et al. 2013).

## **Metilación del ADN**

La epigenética es el estudio de las modificaciones en el ADN que promueve cambios en la expresión génica sin que implique cambios en la secuencia del ADN (Babraham 2015).

La metilación es una marca epigenética esencial involucrada en el desarrollo, regulación génica, impronta y preservación de la integridad del genoma (Bock et al. 2006; Jones & Takai 2001). Consiste en la adición de un grupo metilo, proveniente del S-adenosilmetionina (SAM) (Zwingerman 2012) al carbono 5 de las citosinas del ADN (Zhang et al. 2009; Bock et al. 2006). Esta reacción ocurre generalmente en citosinas localizadas en dinucleótidos CG cuya frecuencia es mayor en las islas CpG (Gardiner-Garden & Frommer 1987). Las modificaciones epigenéticas se caracterizan por ser reversibles bajo determinadas condiciones (Kangaspeska et al. 2008), y existen mecanismos de desmetilación activa que son independientes de la división celular (Branco, Ficz et al. 2012).

Se han identificado aproximadamente 38000 CGI en el genoma humano (McCabe et al. 2009), de las cuales cerca del 50% se encuentran cerca del sitio de inicio de la transcripción (TSS) y el resto están distribuidas en regiones intra e intergénicas (**Figura 5**) (Deaton & Bird 2011a).



**Figura 5.** Distribución genómica de CGI en humanos. Las CGI están localizadas en sitios TSS, en regiones intra e intergénicas (Deaton & Bird 2011b).

Las CGI se definen de acuerdo a tres condiciones: (i) contenido de CG mayor que 50%, (ii) proporción de dinucleótidos observados vs esperados mayor que 0.6, y (iii) de 200 a 1000 pares de bases de longitud; raramente exceden las 5000 pares de bases y generalmente están asociadas con elementos funcionales (Bock et al. 2006). La mayor parte de las CGI se encuentran traslapadas con el sitio de inicio de la transcripción y están involucradas en la regulación de la expresión génica. Sin embargo, la función de las CGI y la regulación transcripcional del gen que modula puede variar dependiendo de sus características como longitud y contenido de CpG (Weber et al. 2007).

La reacción de la metilación del ADN en mamíferos es catalizada por las ADN metiltransferasas (DNMT1, DNMT3A, DNMT3B y DNMT2) las cuales se clasifican en enzimas de mantenimiento y enzimas *de novo* con base en su funcionamiento (Turek-Plewa & Jagodziński 2005; Shukla et al. 2011).

La represión transcripcional génica mediada por la metilación del ADN puede ocurrir por diversos mecanismos: 1) el grupo metilo de la 5meC impide la unión de factores de transcripción a sus respectivos sitios de reconocimiento, 2) reclutamiento de proteínas de unión a sitios metilados (MBD), las cuales tienen un

dominio que se une específicamente a las CGI metiladas evitando el acceso de los factores de transcripción, 3) las proteínas MBD reclutan enzimas cuya función es la modificación covalente de histonas (HMT) así como enzimas remodeladoras de la cromatina dependientes de ATP, llevando a cabo modificaciones en el complejo de histonas y como resultado la estructura de la cromatina se compacta silenciando la transcripción de los genes (Bogdanovic and Veenstra 2009).

### **Establecimiento de los patrones de metilación**

A lo largo del genoma, los patrones de metilación del ADN son establecidos durante el desarrollo embrionario y esencialmente mantenidos durante la diferenciación celular. No todos los dinucleótidos CpG de las células se encuentran metilados; de hecho, los sitios CpG en las regiones promotoras de las islas CpG generalmente se encuentran desmetiladas, mientras que en las regiones codificantes y no codificantes del gen, regiones promotoras de los genes improntados, genes sujetos a la inactivación del cromosoma X y transposones comúnmente se encuentran metiladas (Clark et al. 2006). Dichos patrones pueden ser alterados durante un proceso patológico, en donde la metilación aberrante de los promotores en las islas CpG está asociada con el silenciamiento génico, en contraste con la desmetilación, asociada a la activación génica (Jones 2005).

Los patrones de metilación específicos de célula ocurren en aproximadamente 60 a 90% de los sitios CpG de las células somáticas, los cuáles son mantenidos durante la replicación celular, predominantemente por la acción de la DNMT1 (Kangaspeska et al. 2008).

### **Estudio de la metilación del ADN en leucocitos**

El estudio de la metilación del ADN a nivel tisular es muy amplio, sin embargo, el conocimiento sobre los cambios en la metilación del ADN en células circulantes es escaso, pero va en aumento dado que su investigación permitirá determinar la factibilidad para considerarlo como un posible biomarcador (Terry et al. 2011).

Además, la sangre periférica es una fuente común de ADN en adultos, facilitando dicho análisis (Armstrong et al. 2014).

Aunque en la mayoría de los estudios en los que han determinado que la metilación del ADN en células de sangre periférica es útil como biomarcador es en cáncer (Kuchiba et al. 2014), en otros estudios como el reportado en 2010 por Wang y colaboradores, observaron diferencias en la metilación del ADN en leucocitos entre personas con y sin obesidad, en el que además sugirieron que la resistencia a la insulina podría tener una participación importante en estas diferencias (Wang et al. 2010). De igual manera, en otro estudio publicado este año observaron diferencias en la metilación del ADN, en un sitio CpG ubicado en el promotor del gen *FTO* entre personas con y sin diabetes tipo 2 (Toperoff et al. 2015).

Por otra parte, estudios epidemiológicos han investigado la asociación entre factores demográficos y la metilación del ADN global y gen-específica en células blancas; resultados que han mostrado que existe correlación entre la metilación y la edad (Terry et al. 2011).

### **Metilación del ADN asociada a enfermedades**

El desarrollo del individuo durante el ciclo de vida está ligado a cambios en los patrones de metilación del genoma. Las alteraciones en la nutrición pueden modificar la metilación del ADN desde la vida intrauterina, promoviendo una alteración de la expresión génica (Ho & Tang 2007), hiperinsulinemia, intolerancia a la glucosa, hipertensión arterial, disfunción endotelial, hipertrofia de adipocitos, estrés oxidativo, hiperfagia, efectos cardiovasculares y disfunción mitocondrial, además de incremento de la lipogénesis llevando a la progresión de hígado graso no alcohólico (NAFLD) (Bruce & Cagampang 2011).

La identificación de genes y proteínas que modulan estos efectos ha proporcionado una visión detallada de este complejo proceso y de enfermedades

que se producen cuando se alteran mecanismos de regulación epigenética (Fraga, Ballestar et al. 2005).

### **Evidencia sobre la metilación del ADN y su influencia en el desarrollo de SM**

Se sabe que la susceptibilidad para el desarrollo de SM puede ser heredada, sugiriendo la presencia de un importante componente genético. Sin embargo, muy pocos polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) han sido asociados con el incremento del riesgo de SM (Bruce & Cagampang 2011), lo cual suma importancia a los factores epigenéticos.

Un ambiente limitado durante el desarrollo, como una nutrición deficiente, está asociada con un incremento en el riesgo de enfermedades no transmisibles durante la edad adulta, tales como el SM y enfermedad cardiovascular (Hoile et al. 2011). Una desregulación metabólica inducida por intervención nutricional u hormonal durante el periodo de gestación en la generación F0 en modelos animales puede ser transmitida a más de una generación en la prole. Por ejemplo, en ratas preñadas alimentadas con una dieta restringida en proteína en la generación F0 indujo presión sanguínea elevada, disfunción endotelial (Torrens, Poston et al. 2008) y resistencia a la insulina en las generaciones F1 y F2 en la prole, a pesar de haber tenido una nutrición adecuada *in utero* y después del nacimiento en la generación F1 (Hoile et al. 2011), lo cual corrobora que los mecanismos epigenéticos son un mecanismo clave que sustenta el origen del desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles (Gluckman, Hanson et al. 2009). En roedores, se ha demostrado que la sobrealimentación postnatal temprana, induce exceso de adiposidad y susceptibilidad al SM, posiblemente debido a mecanismos epigenéticos dado a que se identificaron cambios importantes en la metilación del ADN (Li, Kohorst et al. 2013).



## **Aplicación clínica de la metilación del ADN**

Avances recientes en el estudio de la metilación del ADN asociada a enfermedades complejas, permite el considerar la posible aplicación clínica del conocimiento mediante el desarrollo de marcadores moleculares para la detección y prevención de enfermedades (McCabe et al. 2009).

El campo de la epigenética actualmente está en pleno desarrollo y puede llevar a generar nuevas estrategias terapéuticas. La metilación del ADN podría ser incluso utilizada como potencial biomarcador de predicción y riesgo en diversas enfermedades, aunque aún falta mucho por descubrir para entender la complejidad de los mecanismos epigenéticos y sus efectos. Los nuevos abordajes tecnológicos para el estudio de la epigenética, conllevan a incrementar el conocimiento de nuevos mecanismos y como consecuencia, establecer mejores estrategias de diagnóstico, pronóstico y tratamiento de enfermedades (Ptak & Petronis 2008).

## **Problema de investigación**

El SM es un padecimiento multifactorial complejo que tiene una importante contribución genética, la cual es influenciada por factores ambientales.

El incremento potencial en la frecuencia de las alteraciones que constituyen al SM es un fenómeno que afecta a la población a nivel mundial y en México con una prevalencia en adultos de ~45% de acuerdo a los últimos datos reportados por la ENSANUT realizada en el año 2012 (Salas, Bibiloni, et al. 2014). Hay más de 17 millones de personas con hipertensión arterial, más de 14 millones con dislipidemia, más de 6 millones con diabetes y más de 35 millones de adultos con sobrepeso u obesidad. Sin embargo, en la actualidad no existen suficientes estrategias de prevención, diagnóstico y tratamiento eficaces para el manejo de éstas enfermedades lo cual las convierte en un importante problema de salud pública (García E, De-la-Llata M, Kaufer M, Tusié M, Calzada R 2008).

La metilación del ADN es una modificación epigenética que controla la expresión génica en estados fisiológicos y patológicos por lo cual cumple una parte importante en el desarrollo de enfermedades metabólicas. Cabe reiterar que dichas enfermedades están asociadas con alteraciones en la expresión de múltiples genes en las que están implicados tanto factores genéticos como ambientales (Barres & Zierath 2011). Dada la relevancia de la prevalencia de enfermedades crónicas y su implicación en la salud de la población se requiere encontrar estrategias científicas para adquirir conocimiento oportuno que permita diseñar modelos de prevención y tratamiento factibles en la práctica clínica cotidiana. Ésta necesidad de conocimiento radica en identificar los mecanismos celulares y moleculares implicados en la morbilidad y mortalidad del paciente con SM (García E, De-la-Llata M, Kaufer M, Tusié M, Calzada R 2008).

## Justificación

El incremento y la letalidad de las enfermedades crónicas y degenerativas justifican el hecho de que actualmente estos padecimientos sean una prioridad en materia de salud pública. El efecto social de estas anomalías va en incremento, afectando a individuos en edades productivas y representan costos elevados para el sector salud. Por ello, es de gran interés llevar a cabo acciones para confrontar las enfermedades crónicas no transmisibles (Córdova-villalobos et al. 2008). Considerando la influencia de los factores ambientales en las enfermedades metabólicas, el estudio de la metilación del ADN contribuye al conocimiento de los mecanismos por los cuales dichos factores tales como la dieta y el ejercicio pueden modificar la predisposición a múltiples enfermedades. Diversos estudios han demostrado la influencia de los factores no genéticos en el desarrollo de anormalidades metabólicas como la resistencia a la insulina indicando que, los factores epigenéticos, en parte debido a la metilación del ADN, participan de manera importante en la patogénesis de enfermedades metabólicas, regulando la expresión génica mediante la hiper o hipometilación en los sitios que regulan la transcripción de dichos genes (Barres & Zierath 2011).

De igual forma, el incremento de los niveles de ácidos grasos circulantes está asociado con anormalidades metabólicas como obesidad, resistencia a la insulina e hipertensión, por lo tanto su determinación es clave para conocer el estado de la homeostasis energética y lipídica. Asimismo, las proteínas transportadoras de ácidos grasos (FABPs) tienen una contribución importante en el desarrollo de SM. Una de ellas es HFABP, proteína codificada por *FABP3*, del cual se ha sugerido que sea regulado por factores epigenéticos (Zhang et al. 2013). Sin embargo, los estudios en éste gen son escasos, lo cual conlleva a la necesidad de obtener datos que permitan delimitar su participación en el desarrollo del SM.

## **Hipótesis**

Si la metilación del promotor y parte del primer exón de *FABP3* en leucocitos está asociada con el desarrollo de resistencia a la insulina y composición de ácidos grasos en plasma en pacientes con Síndrome Metabólico; entonces al determinar la metilación de *FABP3*, su asociación con el índice HOMA y composición de ácidos grasos en plasma, se observará que la metilación en dicha región promotora de *FABP3* es mayor en personas afectadas por el SM en comparación con personas no afectadas.

## **Objetivos del estudio**

### **Objetivo general**

Evaluar la asociación la metilación de *FABP3* en leucocitos y resistencia a la insulina en pacientes con síndrome metabólico.

### **Objetivos específicos**

1. Comparar el porcentaje de metilación del promotor y primer exón de *FABP3* entre personas afectadas y no afectadas por el síndrome metabólico.
2. Analizar la asociación entre la metilación de *FABP3* y el índice HOMA entre casos y controles.
3. Evaluar la asociación entre el porcentaje de metilación y la expresión de *FABP3*.
4. Analizar la asociación entre el porcentaje de metilación de *FABP3* y la composición plasmática de ácidos grasos.

## Metodología

### Diseño del estudio

El presente es un estudio piloto de corte transversal con un alcance descriptivo. Por naturaleza, al ser un estudio piloto es de tipo exploratorio. Enfocado a generar información y datos que permitan definir la viabilidad y factibilidad de realizar el estudio a gran escala (Leon et al. 2011).

Fue dividido en dos fases (**Diseño metodológico pág. 39**): la primera fue enfocada a describir la metilación en dos regiones CpG halladas en el promotor y primer exón de *FABP3*. La segunda fase tuvo como fin evaluar la asociación entre la metilación de *FABP3* y variables de interés como el Índice HOMA, la expresión relativa del gen y la concentración de ácidos grasos en plasma.

### Determinación del tamaño de la muestra

La naturaleza exploratoria del estudio y debido a que no se cuenta con información previa sobre la metilación de *FABP3* que permita realizar un cálculo de tamaño de muestra, el número de sujetos involucrados (n=30) fue basado en las necesidades de examinar la viabilidad de la investigación, los cuales se eligieron con base en las características que se pretenden medir en la población objetivo (Leon et al. 2011).

Los datos generados en éste estudio permitieron realizar un cálculo del tamaño de muestra, tomando en cuenta un poder estadístico del 80% con el fin de identificar asociaciones clínicamente significativas en estudios posteriores (Leon et al. 2011). Para esto se utilizó la siguiente fórmula que se basa en la diferencia de proporciones independientes:

$$n_c = n_e = \frac{\left[ Z_{\alpha} * \sqrt{2 * P * Q} + Z_{\beta} * \sqrt{P_c * Q_c + P_e * Q_e} \right]^2}{(P_e - P_c)^2}$$

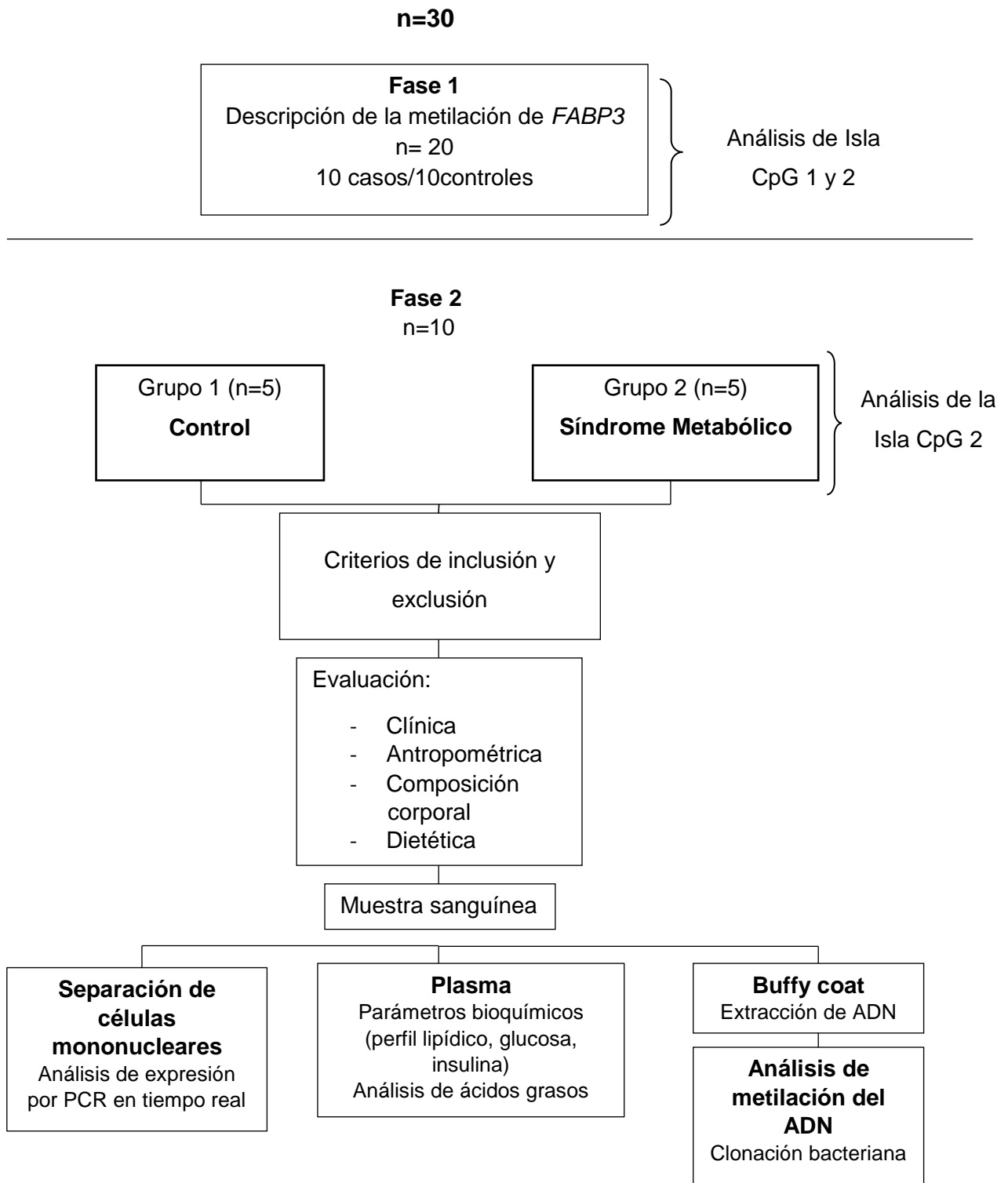
Donde:

$P$  es la proporción media de la proporción de eventos de interés del grupo control (c) y en el grupo en tratamiento (e),  $Q_c=1-P_c$ ,  $P_c$  es la proporción de eventos de interés en el grupo control,  $Q_e=1-P_e$ ,  $P_e$  es la proporción de eventos de interés en el grupo expuesto o en tratamiento,  $Q_e=1-P_e$ , y  $(P_e - P_c)$  es la diferencia de las proporciones entre el grupo control y la proporción de grupos expuestos.

### **Delimitación cualitativa de la muestra**

La muestra está constituida por sujetos mexicanos con características de personas clínicamente sanas y con fenotipos de Síndrome Metabólico con base en los criterios del ATP III como se observa en el diseño metodológico del estudio.

## Diseño metodológico





## **Criterios de inclusión y exclusión**

### **a. Criterios de inclusión**

- Hombres y mujeres clínicamente sanos dentro de un rango de edad entre 20 y 40 años.
- Aquellos con al menos tres fenotipos de Síndrome Metabólico con base en los criterios del ATPIII:

- 1) Glucosa en ayuno alterada:  $\geq 100$  mg/dl
- 2) Triglicéridos elevados:  $\geq 150$  mg/dl
- 3) c-HDL bajo:  $\leq 50$  mujeres,  $\leq 40$  hombres
- 4) Circunferencia de cintura: 80 cm mujeres, 90 cm hombres (ajustada por grupo étnico)
- 5) Índice de masa corporal (IMC) entre 18.5 y 35 Kg/m<sup>2</sup>.

### **b. Criterios de exclusión**

- Fumadores o personas que abusen en el consumo de alcohol.
- Diagnóstico previo de alguna enfermedad metabólica diferente al SM.
- Consumo de algún medicamento o suplemento dietético.

## **Técnicas e instrumentos de evaluación y recolección de datos**

### **Datos clínicos**

Para la recolección de los datos generales de cada participante se recurrió a la elaboración de una historia clínica utilizando un formato para el acopio de la información diseñado para cubrir los requerimientos del estudio (Apéndice 1) con el fin de obtener un panorama general del estado de salud de cada uno de ellos, se recolectaron datos demográficos, así como antecedentes patológicos familiares y personales, información sobre consumo de medicamentos, presencia de

alergias, aspectos ginecológicos (en el caso de las mujeres) y algunas preguntas sobre estilo de vida (hábitos de alcoholismo y tabaquismo).

### **Datos Antropométricos**

Se realizó una evaluación antropométrica mediante técnicas previamente estandarizadas con el fin de reducir la variabilidad inter e intrasujeto. Todas las medidas antropométricas fueron determinadas en estado de ayuno:

**Peso:** se utilizó el analizador de composición corporal InBody720®.

**Talla:** se determinó utilizando un estadímetro convencional tomando en cuenta el plano de Frankfort (SPPS 2002) para una correcta medición.

**Índice de masa corporal ( $\text{Kg/m}^2$ ):** se calculó a partir de las medidas de peso y talla con base en la fórmula propuesta por Quetelet Keys y colaboradores (Keys et al. 1972).

Una vez obtenido el IMC se tomaron en cuenta los puntos de corte de la FAO/OMS (WHO 1995) para determinar el grado de sobrepeso u obesidad de los individuos:

- **Normal:** 18.5-24.99
- **Sobrepeso:** 25-29.9
- **Obesidad grado I:** 30-34.99

### **Composición corporal**

La composición corporal fue determinada por impedancia bioeléctrica con InBody 720® el cual nos permitió obtener: el porcentaje de grasa corporal y área de grasa visceral.

## **Dieta**

Para la recolección de los datos dietéticos, se utilizó el cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos elaborado y avalado por el Instituto Nacional de Salud Pública (Apéndice 2). Dicha herramienta nos permitió adquirir datos cualitativos y semicuantitativos de la dieta habitual de cada uno de los sujetos de estudio.

## **Muestra sanguínea**

Se tomaron dos muestras sanguíneas (~5ml), recolectadas en tubos con anticoagulante EDTA bajo condiciones de ayuno (8 horas). Fueron sometidas a centrifugación con el fin de obtener los componentes de interés para los análisis posteriores (plasma, buffy coat, células mononucleares).

## **Datos bioquímicos**

A partir del plasma sanguíneo se determinaron los niveles de glucosa e insulina en ayuno, triglicéridos, colesterol total y c-HDL mediante métodos enzimáticos estandarizados. Dichos análisis fueron realizados en un laboratorio especializado independiente.

## **Extracción de ADN**

El ADN fue extraído a partir de la capa leucoplaquetaria (buffy-coat) obtenida de aproximadamente 5 ml de sangre total, utilizando el QIAamp DNA blood mini kit® de QIAGEN. Durante éste procedimiento el ADN se une de manera específica a una membrana de sílica-gel mientras que los contaminantes pasan a través de ella. Inhibidores de PCR, como cationes divalentes y proteínas son removidos a partir de lavados con buffers (QIAGEN 2013). Una vez obtenido el ADN, fue eluido en agua libre de nucleasas.

**Integridad del ADN.** Previo al análisis de metilación, se evaluó la integridad del ADN genómico por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 1 %, utilizando SYBR Green como agente intercalante en ácidos nucleicos.

### **Análisis de metilación del ADN en promotor y primer exón de *FABP3***

Posterior a la extracción del ADN se realizó el análisis de metilación por medio de transformación con bisulfito, clonación y secuenciación. En la **Figura 6** se muestra un esquema general del proceso.



**Figura 6.** Análisis de la metilación de *FABP3*

#### **Predicción de regiones ricas en dinucleótidos CG y diseño de primers.**

Tomando la secuencia de referencia (chr1:31961670-31962719) de la base de datos CCDS (Pruitt et al. 2009), se realizó la exploración de *FABP3* 2000 pb río arriba y 2000 pb río abajo del sitio de inicio de la transcripción para identificar los sitios CpG localizados en el promotor y primer exón (**Figura 7**).

De esta manera, se identificaron 2 islas CpG con 14 y 18 sitios CpG respectivamente. Datos que fueron utilizados para el diseño de los primers utilizando el software MethPrimer (Li & Dahiya 2002).

```

31962719 gaagagc tgaccgaattggcagaattt ctgcaggaggggagctgggaa cg
acctgagctaaagct cggagctgtgccaagaaac cggaaaagcccagagc
acttgacagggg cgggtggggagctagatggtggggggtgggggga cgga
ggagggccagcaggagacattc cgcagggaggggcaagca cgtgtgaggc
ggg cggggcgcaaggggtcaggcttttgctcaaaacaggcagaggacaag
gtcagctcagc cgcagac cgagc cgctgggtgactgtctc cgccaccaggc
agtgagagtgaagggagag cgcgagctctgaagcc cgctagactaagctt
gcaatctgagct ccattcaccacctcctattt cttgagacctgtcagtt
ccctgtgagcctcggactcctcacttgtaaaacgaggacagatgcccg
gccagaagtcaaccagagctttccccggcggtgggcaccagcccaagggcg
ttttgcttttctagtctcatctctgctctgacgctaagctcaaagagggga
ctgggggacgggaagatatccaccatggcatgcccctagctctcgggct
ggtgttggctgcttccttctc agattccagagtgcctagaggccaggaaa
gggagaaggtcctaccagcctggggtagggact cgggggccaggcactgg
cgctga cgcaggctagcaggg cgccactggctgggtcccaccaccct cgg
tgggttgggggatggg cgcaccagcccctcctgggtgagccctagcctgg
ggcttctattt cgggagc cggggg cgtgggcca cgtctctcatgtgat
g cgagggctattttaag cggcagcc cgggcagggagc cgc cgt cggagcc
cttgca cgcctgctctcttgtagcttctctcagcctagcccagcatcact
ATGGTGGACGCTTTCCTGGGCACC TGGAAGCTAGTGGACAGCAA GAATTT
31961670 CGATGACTACATGAAGTCACTCGgtgagcaagccgcggggctcaggatgt

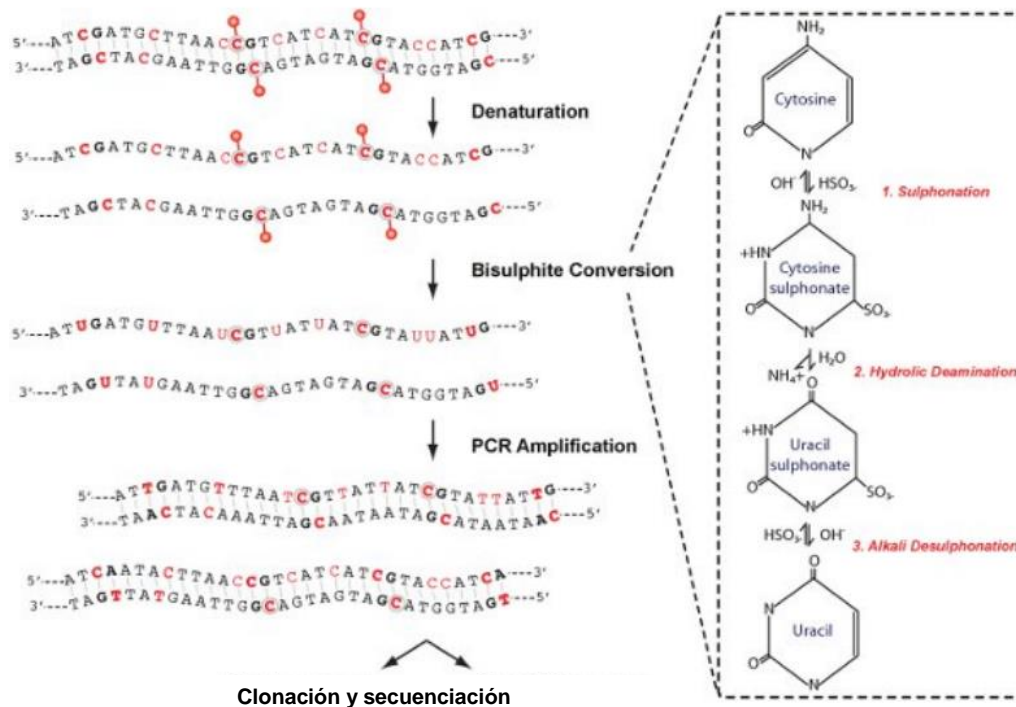
```

**Figura 7.** Predicción de Isla CpG 1 e Isla CpG 2 de *FABP3*.

Sitios CpG (rojo) en Isla CpG 1 localizada en el promotor e Isla CpG 2 localizada en el promotor y parte del primer exón (azul), primers utilizados (amarillo) para el análisis.

**Tratamiento con bisulfito de sodio a ADN genómico.** Para la transformación del ADN se utilizó el EZ DNA Methylation-Gold™ Kit. Éste método se basa en la desaminación selectiva de los residuos de citosina mediante el tratamiento con bisulfito de sodio, sin actuar en las 5-metilcitosinas, lo cual permite que las citosinas no metiladas sean químicamente convertidas a uracilo (**Figura 8**) (Zhang et al. 2009).

**Amplificación.** Posterior al tratamiento con bisulfito, el fragmento de interés fue amplificado a partir de una cadena de ADN previamente convertida, dicha amplificación se hizo por PCR. Durante éste proceso, el uracilo se amplifica como timina. En contraste, si la citosina en los sitios CG está metilada, entonces ésta no reaccionará con el bisulfito, dichas 5-metilcitosinas permanecen intactas y son amplificadas como citosinas (Zhang et al. 2009).



**Figura 8.** Proceso de transformación con bisulfito y reacción de amplificación por PCR

**Clonación.** Durante la clonación molecular se prepara una molécula de ADN recombinante: un ADN circular extracromosómico que se puede replicar de manera autónoma dentro de un huésped microbiano (BioLabs 2015b). La secuenciación de clonas individuales de fragmentos de ADN tratado con bisulfito es considerado el “estándar de oro” para el análisis de metilación del ADN, debido a que la secuenciación de moléculas individuales de ADN subclonadas proporciona información más exacta y detallada de patrones de metilación por

cada sitio CpG en secuencias de 300 a 500 pb de longitud (Zhang et al. 2009). El número de clonas utilizadas para dicho análisis es variable, puede ir desde cinco hasta diez o más (Asimakopoulos et al. 1999) dependiendo el tipo de muestras que se utilicen y la variabilidad que se espere encontrar.

**1. Ligación.** Se llevó a cabo la ligación del fragmento de interés (promotor y primer exón de *FABP3*) con el plásmido (pGEM®-T), utilizando una T4 DNA ligasa. Esto sucede debido a la formación de un enlace fosfodiéster entre el grupo monofosfato del extremo 5' en el ADN del plásmido recombinante y el OH en el extremo 3' del ADN target. Formando así una molécula circular.

**2. Transformación.** Se introdujo la molécula de ADN recombinado en una célula huésped (*E.coli*) mediante choque térmico, en donde las células de *E. coli* son sometidas a un incremento de temperatura lo cual provoca la formación de poros en la membrana, permitiendo la entrada de la molécula de ADN externo al citosol de la bacteria (BioLabs 2015a).

**3. Cultivo.** Dado que el plásmido pGEM®-T presenta un genotipo que le confiere resistencia a antibióticos, las células competentes fueron cultivadas en un medio de agar adicionado con ampicilina, además de XGAL e IPTG que permiten realizar una selección de colonias por color (azul/blanco) dependiendo de la expresión del gen  $\beta$ -galactosidasa (Promega 2014).

**4. Validación.** Una vez obtenidas las colonias, fueron seleccionadas 5 por cada uno de los individuos. Posteriormente, se realizó una validación por PCR.

**5. Purificación.** Se extrajo el plásmido de la célula hospedadora. Para ello, se utilizó un mini-prep a base de lisis alcalina. Dicha solución contiene duodecil sulfato de sodio (SDS), compuesto que provoca la lisis de la membrana y la desnaturalización de proteínas, mientras que las condiciones alcalinas permiten la desnaturalización del ADN plasmídico y genómico. Después de la lisis, mediante una solución neutralizante se obtuvo el ADN genómico (Promega 2014).

## **Secuenciación**

Las reacciones de secuenciación fueron realizadas en una institución independiente utilizando el kit ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing y la DNA polimerasa AmpliTaq®. Se utilizó un primer universal SP6. Los fragmentos fueron purificados y las muestras fueron resuspendidas en agua destilada y sujetas a electroforesis en el secuenciador ABI PRISM® 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems).

## **Análisis de datos de metilación del ADN**

Los datos obtenidos de la secuenciación fueron analizados con el software BISMA y BiQ Analyzer diseñado por el Instituto Max Planck especial para la visualización y control de calidad de datos obtenidos a partir de ADN transformado con bisulfito. El programa permite realizar un alineamiento múltiple de secuencias clonales para el subsecuente análisis de sitios CpG individuales de manera manual o automática (Bock et al. 2005).

## **Extracción de RNA**

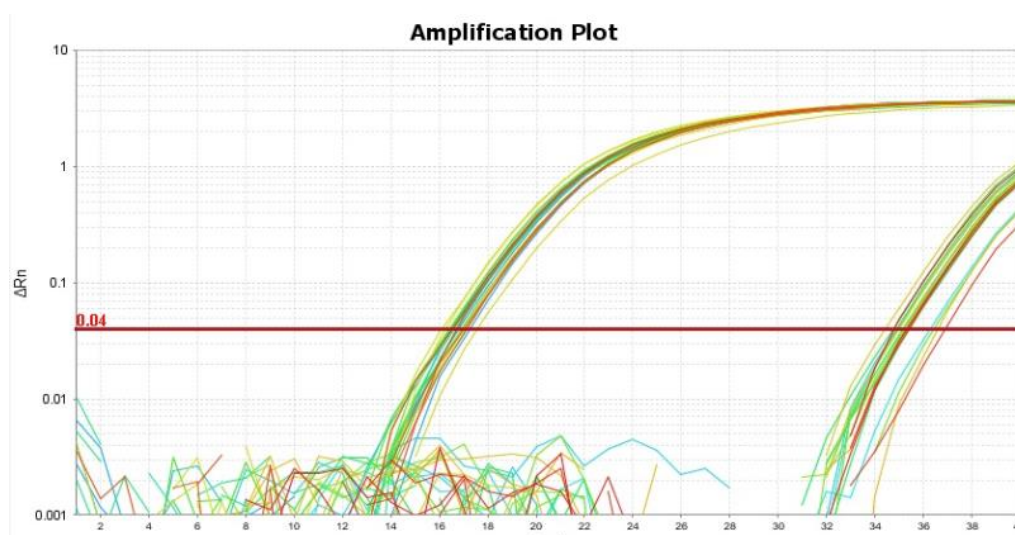
El RNA se extrajo de células mononucleares, aisladas de sangre total mediante gradiente de densidad con Ficoll-Paque™. La extracción de RNA se hizo por el método de TRIzol® siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. Precipitándolo en 200 ul de isopropanol y resuspendido en 50 ul de agua libre de RNAasas. Una vez extraído fue cuantificado en un espectrómetro NanoDrop® 1000 y la integridad determinada por un bioanalizador Agilent®.



## Análisis de expresión de *FABP3*

Una vez obtenido el RNA, éste fue transformado a cDNA por rtPCR con el kit High-Capacity cDNA reverse transcription ® utilizando 2ug de RNA.

La expresión de *FABP3* fue cuantificada relativamente por PCR en tiempo real, mediante el método  $C_T$  (método  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ). Como control interno se utilizó el gen de la gliceraldehído-3-fostato deshidrogenasa (*GAPDH*) debido a la consistencia en su expresión (**Figura 9**).



**Figura 9.** Gráfico de amplificación de *FABP3* con respecto al control interno (*GAPDH*). Derecha: *FABP3*, izquierda: *GAPDH*.

## Análisis de ácidos grasos en plasma

El análisis de ácidos grasos presentes en plasma consistió en tres etapas: 1) extracción de lípidos totales, 2) transformación de dichos lípidos en derivados volátiles (ésteres metílicos de ácidos grasos (EMAG)), 3) análisis de los derivados volátiles por cromatografía de gases, para finalmente, obtener el perfil de ácidos grasos. Los lípidos extraídos requieren ser convertidos en EMAG (metilación) antes de ser analizados por cromatografía de gases (Ratnayake & Galli 2009).

## **Análisis por cromatografía de gases**

La cromatografía de gases se compone de una fase móvil (gas) y una fase estacionaria (líquido). Consistió en la inyección de una muestra en la fase gaseosa, ésta se volatilizó y pasó a la fase líquida, la cual se retuvo por una columna. Los componentes de la muestra permanecieron en la fase móvil y la fase estacionaria, dependiendo de la afinidad que tuvieron por ésta última. De esta manera, conforme la muestra pasó por la columna, las moléculas de cada componente se distribuyeron entre las fases líquida y gaseosa de acuerdo con su coeficiente de distribución. Finalmente, los compuestos obtenidos emergieron del extremo final de la columna, representados como picos de concentración. Dichos picos fueron detectados por un medio que convirtió la concentración de cada componente en una señal eléctrica, la cual se amplificó y registró, permitiendo así su monitoreo y cuantificación (William W. 1989).

## **Herramientas para el análisis estadístico**

El análisis de los datos fue realizado con el paquete estadístico SPSS versión 22 y con Prism versión 6.07.

Las variables continuas fueron presentadas como medias  $\pm$  desviación estándar (DE) y las nominales como porcentajes y frecuencias.

Se utilizó la prueba t de Student o U de Mann-Whitney para determinar diferencias de medias entre grupos y la prueba de  $X^2$  para la diferencia de proporciones. Para evaluar la asociación entre los patrones de metilación, índice HOMA, concentración de ácidos grasos en plasma y otros parámetros metabólicos de interés, se recurrió a una prueba de correlación de Pearson. Para todas las pruebas estadísticas, se tomó en cuenta un valor de  $p < 0.05$

El cálculo del tamaño de muestra para proporciones independientes fue calculado con la fórmula previamente descrita (página 37) y validado con el programa GPOWER, tomando en cuenta un poder estadístico de 80%.

## **Aspectos éticos y confidencialidad**

El estudio fue aprobado por la comisión de ética del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN).

A cada participante se le otorgó una carta de consentimiento informado en donde se explica todo lo relacionado al estudio. La cuál debió ser leída y firmada por cada uno de ellos. Toda la información recolectada fue codificada y los identificadores personales no se incluyeron en la base de datos.

## Resultados

Para determinar la factibilidad del análisis de metilación en ambas Islas CpG localizadas en el promotor y primer exón de *FABP3* se llevó a cabo la primera fase del análisis en una muestra de 20 sujetos, 10 personas clínicamente sanas y 10 pacientes con SM de acuerdo a los criterios del ATP III.

### Fase 1

De éste primer análisis, 55% fueron hombres y 45% mujeres. El promedio de edad fue de 32 años en los casos y de 30 años en los controles ( $\pm 6$  en ambos grupos). Los datos descriptivos se muestran en la **Tabla 3**, en la cual se puede observar que ambos grupos presentan diferencias en los fenotipos por los cuales fueron clasificados con y sin SM, estos son: circunferencia de cintura, glucosa en ayuno, triglicéridos y c-HDL; además de peso e IMC.

**Tabla 3.** Datos descriptivos fase 1

n=20 (11H/9M)	Media (DE)		t	Sig.
	Caso	Control		
Sexo (H/M)	(6/4)	(5/5)		
Edad (años)	32.6 (6)	30 (6)	1.04	0.312
Talla (m)	1.78 (0.2)	1.63 (0.06)	2.05	0.067
Peso (Kg)	76 (13.2)	60 (8.9)	3.10	0.006*
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	28.3 (2.8)	22.5 (2.3)	5.03	0.001*
CCintura (cm)	95 (12)	74 (7)	4.80	0.001*
Glucosa ayuno (mg/dL) <sup>1</sup>	108 (3.4)	84.6 (4.4)		0.001*
Col Total (mg/dL) <sup>1</sup>	230 (80)	182 (19)		0.121
Triglicéridos (mg/dL)	234 (87)	90.6 (23.5)	5.02	0.001*
c-HDL (mg/dL)	36 (4.7)	53.6 (7.3)	6.52	0.001*
PAS (mmHg)	111 (13)	111 (19)	0.054	0.958
PAD (mmHg)	73(13)	71 (14)	0.417	0.681

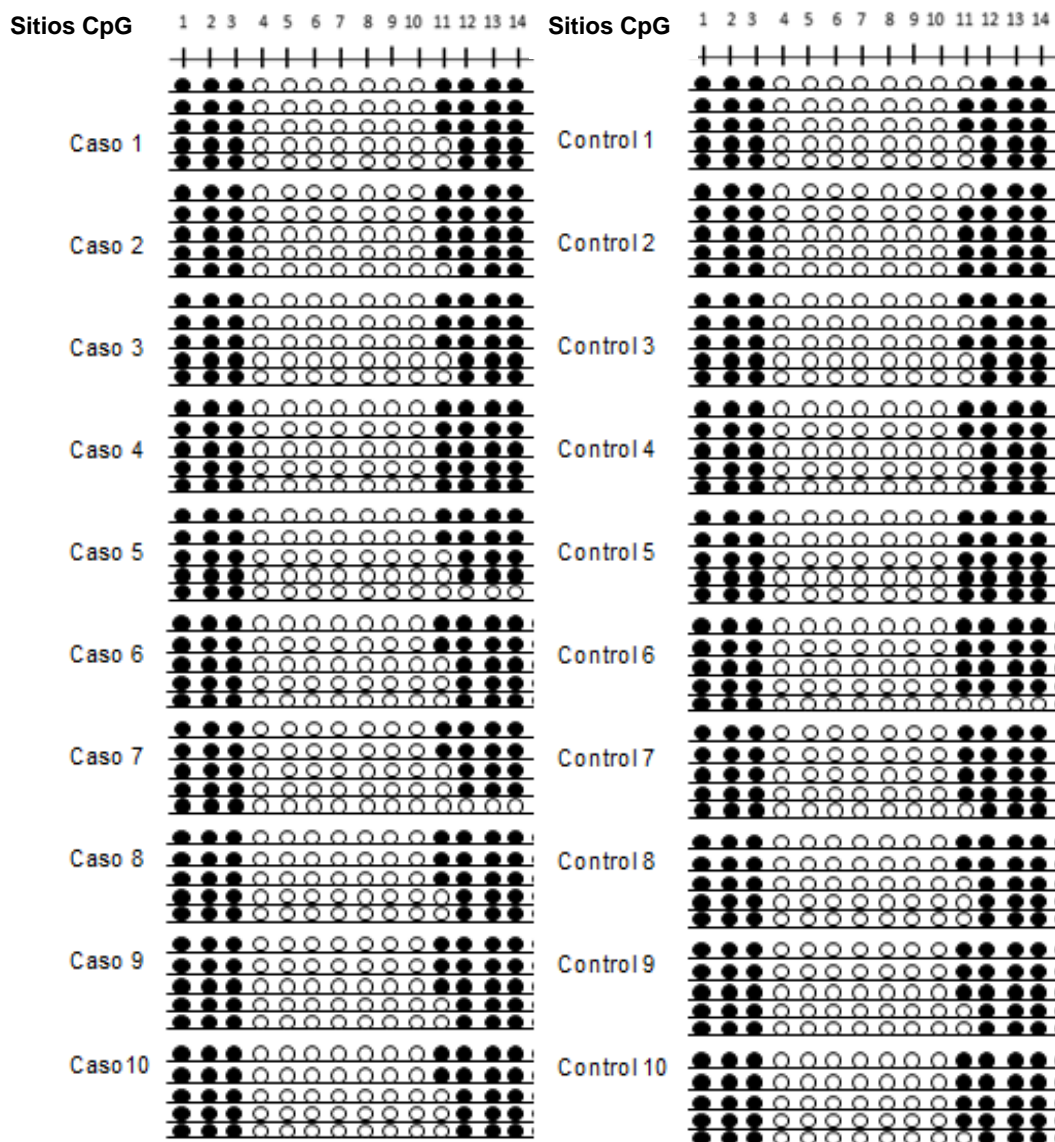
Prueba estadística: t de Student para muestras independientes,  $t > 2.10$ ,  $*p < 0.05$

<sup>1</sup>Prueba estadística: U de Mann-Whitney

## Metilación Isla CpG 1

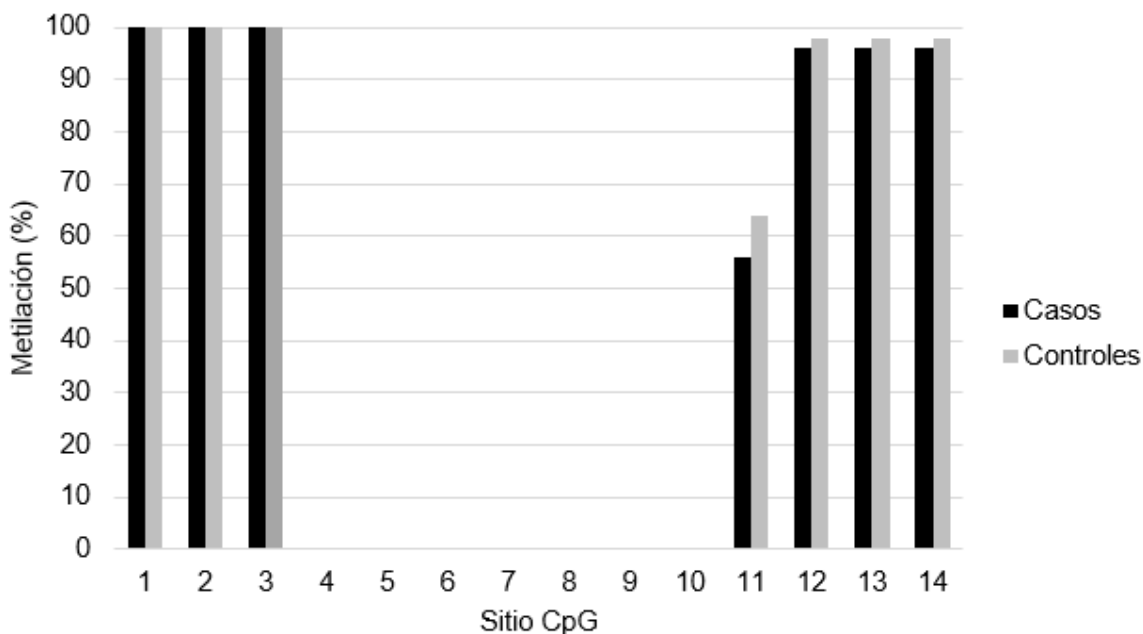
Se analizó la metilación de cada uno de los sitios en la isla CpG 1. Los resultados se muestran en el **Gráfico 1** en el cual se puede apreciar que la metilación en prácticamente todos los sitios analizados es igual en ambos grupos, con excepción del sitio CpG 11, presentando ligeras diferencias que no alcanzan una significancia estadística.

**Gráfico 1.** Comparación de los patrones de metilación entre casos y controles de la Isla CpG 1. Cada una de las líneas horizontales representa una secuencia de la isla CpG que forma parte del promotor de *FABP3* con 14 sitios; en negro cada uno de los sitios CpG metilados y en blanco los sitios no metilados.



A partir de los patrones de metilación de cada uno de los sujetos se obtuvo el porcentaje de metilación por sitio CpG en casos y controles. Después de realizar una prueba para diferencia de proporciones no se obtuvieron resultados significativos **Gráfico 2**.

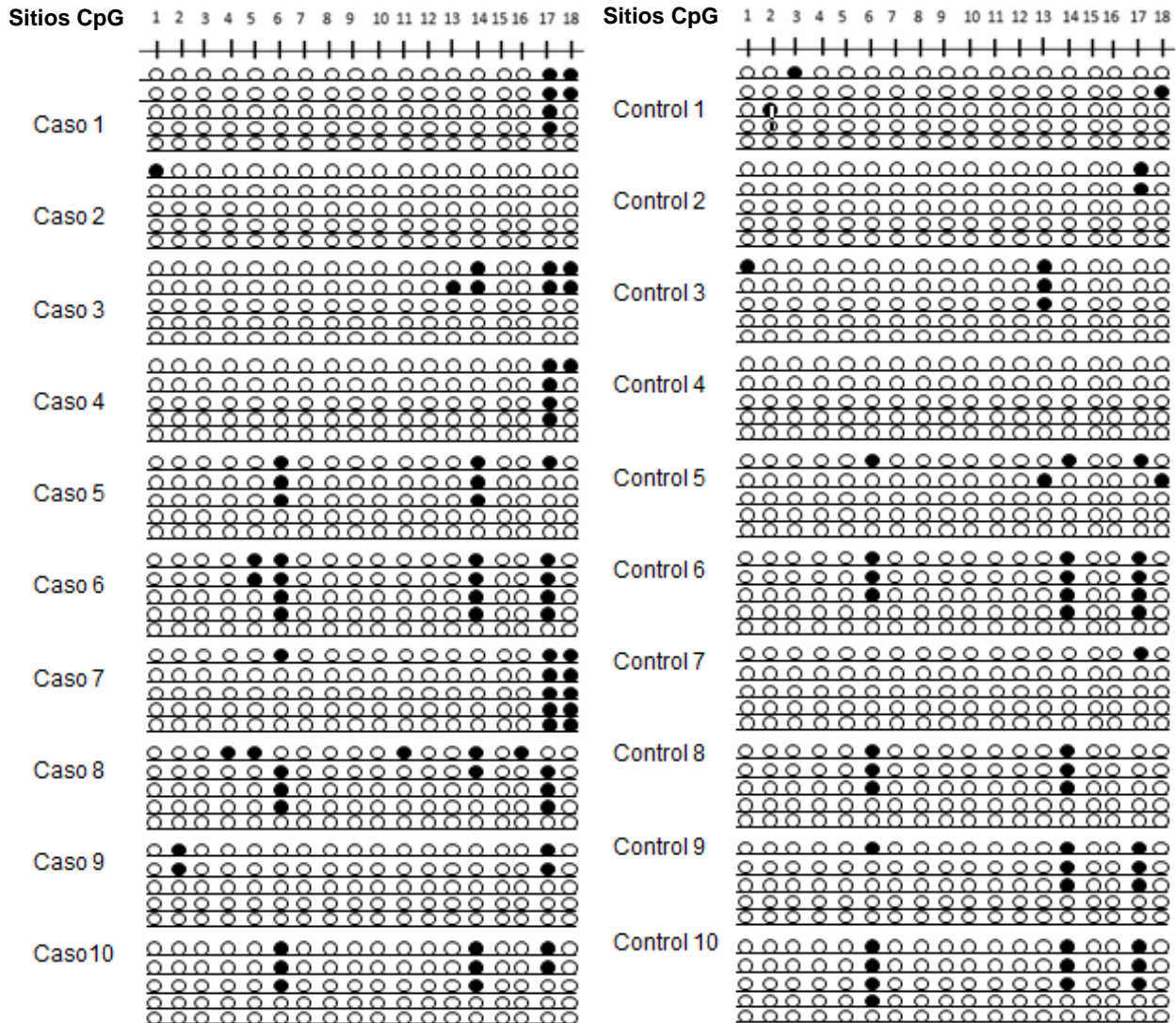
**Gráfico 2.** Comparación de metilación (%) isla CpG 1



### Metilación Isla CpG 2

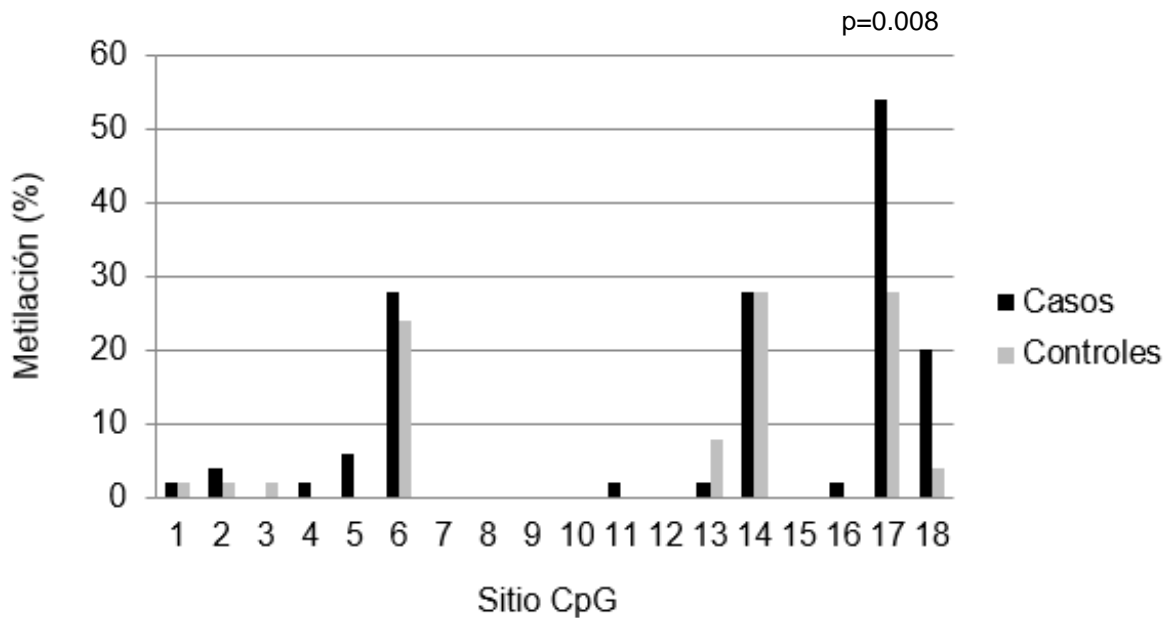
Por el contrario de la isla 1, en la Isla CpG 2 se observaron diferencias en un número mayor de sitios CpG específicos, tal como se muestra en el **Gráfico 3**. Con base en estos resultados, se calculó el porcentaje de metilación por cada uno de los sitios CpG en casos y controles (**Gráfico 4**).

**Gráfico 3.** Comparación de patrones de metilación entre casos y controles de la **Isla CpG 2.**



Después de realizar una prueba para diferencia de proporciones entre ambos grupos se obtuvo una diferencia significativa en el sitio CpG 17 con un valor de  $X^2$  de 6.98 y un valor de z de 2.64 ( $\alpha=0.05$ ).

**Gráfico 4.** Comparación de metilación (%) isla CpG 2



Se analizaron las posibles correlaciones entre la metilación por sitio de la isla CpG 2 y los parámetros bioquímicos de glucosa en ayuno, colesterol total, triglicéridos y c-HDL, sin embargo, ningún resultado alcanzó un valor estadísticamente significativo.



## Fase 2

Ésta segunda fase del análisis se conformó de 10 sujetos, 5 casos y 5 controles, con una edad media de 27 y 24 años, respectivamente. Las características descriptivas de ambos grupos se muestran en la **Tabla 4**. Se puede apreciar que los sujetos fueron diferentes en edad, peso e IMC; así como en los fenotipos del SM: circunferencia de cintura, glucosa en ayuno, triglicéridos y una tendencia en c-HDL. Asimismo, en los niveles de insulina en ayuno, índice HOMA, presión arterial diastólica y contenido de grasa visceral. Cabe mencionar que para las variables insulina en ayuno y c-HDL las diferencias entre los grupos fueron calculadas con base en sus rangos debido a su distribución.

**Tabla 4.** Datos descriptivos fase 2

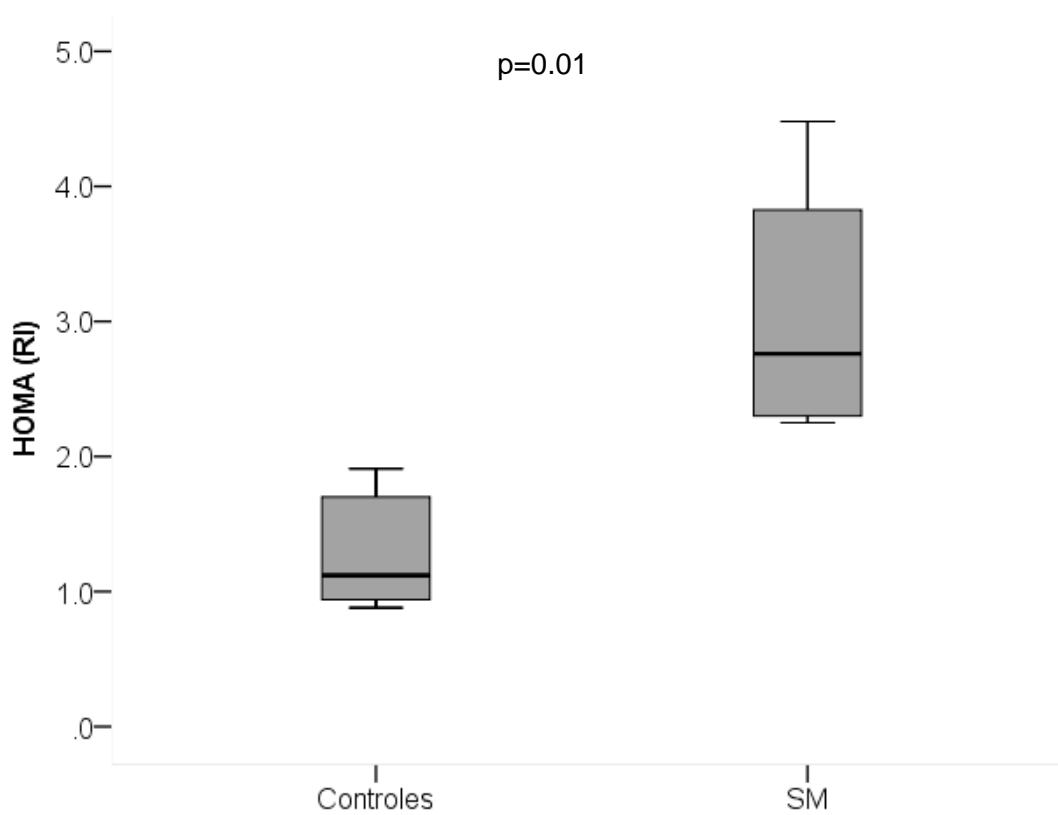
n=10 (4 H/1M por grupo)	Media (DE)		t	Sig.
	Casos	Controles		
Edad (años)	27 (1)	24 (1)	3.11	0.014*
Peso (Kg)	83 (9.2)	64.4 (5.2)	3.86	0.007*
Talla (cm)	169 (6)	166 (1.6)	1.21	0.285
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	28.7 (2)	23.3 (1.7)	4.33	0.002*
C de cintura (cm)	94 (7.4)	78 (7.7)	3.28	0.011*
Glucosa en ayuno (mg/dl)	103 (3.8)	91.5 (6.5)	3.50	0.008*
Insulina en ayuno (UI/ml) <sup>1</sup>	15.7 (8)	5.8 (2)		0.016*
HOMA	4 (2.3)	1.3 (0.5)	2.59	0.056*
Colesterol Total (mg/dl)	204 (35)	155 (36)	2.15	0.063
Triglicéridos (mg/dl)	221 (73)	102 (27)	3.36	0.010*
Colesterol-HDL (mg/dl) <sup>1</sup>	37.5 (3.5)	49.7 (13.5)		0.056
PAS (mmHg)	116 (14)	112 (15)	0.40	0.699
PAD(mmHg)	89 (3)	81 (3)	3.65	0.006*
Grasa Visceral (cm <sup>2</sup> )	115 (11.8)	72.4 (21)	4.03	0.004*

Prueba estadística: t de Student para muestras independientes; t>2.30, \*p<0.05 bilateral

<sup>1</sup>Prueba estadística: U de Mann-Whitney para muestras independientes

Se observó una diferencia significativa en el índice HOMA entre ambos grupos tomando un punto de corte de 2.27 (Gayoso-Diz et al. 2013) con base en la clasificación del ATPIII para SM. En el **Gráfico 5** se muestra la comparación entre casos y controles, con un valor de  $p=0.01$ . Fue excluido uno de los casos por ser considerado un dato atípico.

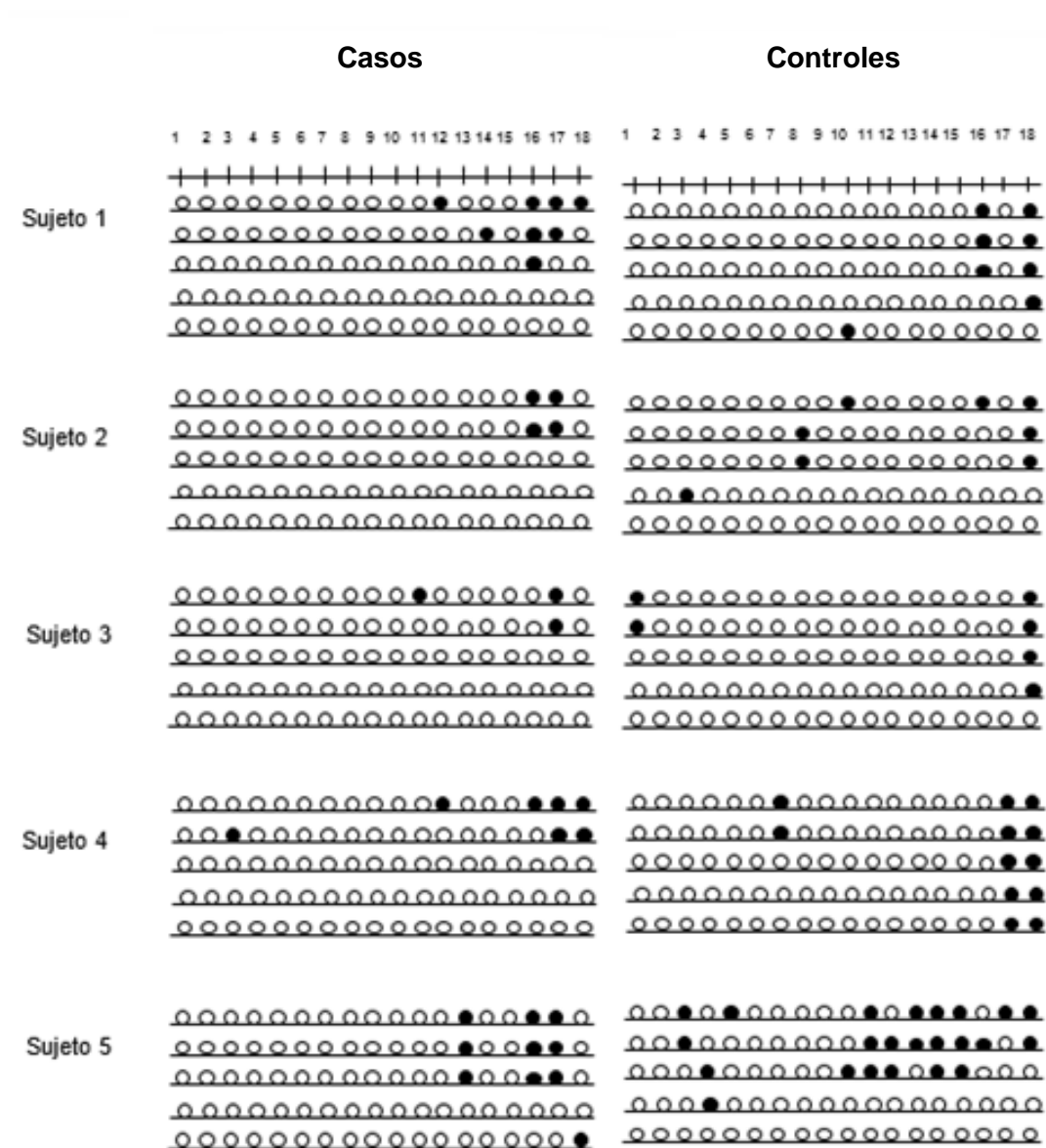
**Gráfico 5.** Comparación de índice HOMA entre casos y controles.



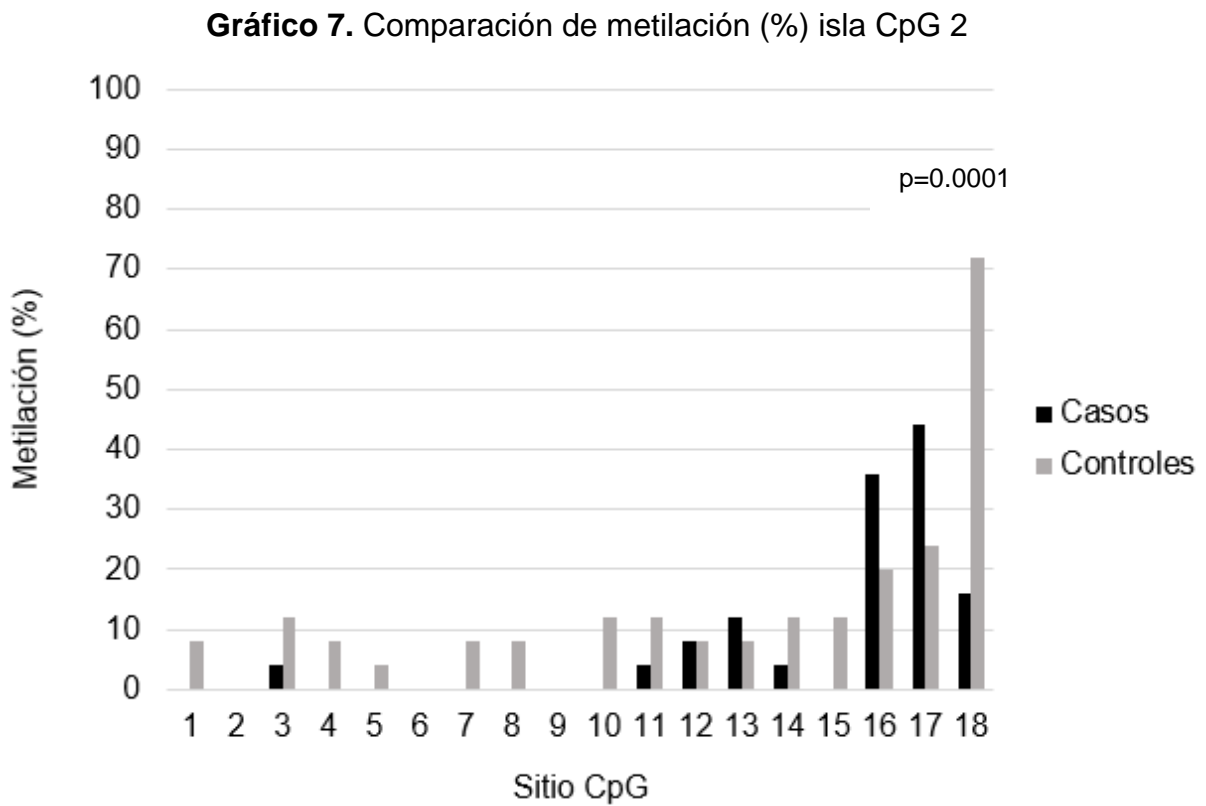
## Metilación Isla CpG 2

En el **Gráfico 6** se muestran los resultados del análisis de metilación de la isla CpG 2 en casos y controles. Tal como se observa, no hay un patrón específico que distinga a ambos grupos, sin embargo, se obtuvo el porcentaje de metilación por sitio CpG para hacer los análisis posteriores.

**Gráfico 6.** Patrones de metilación Isla CpG 2

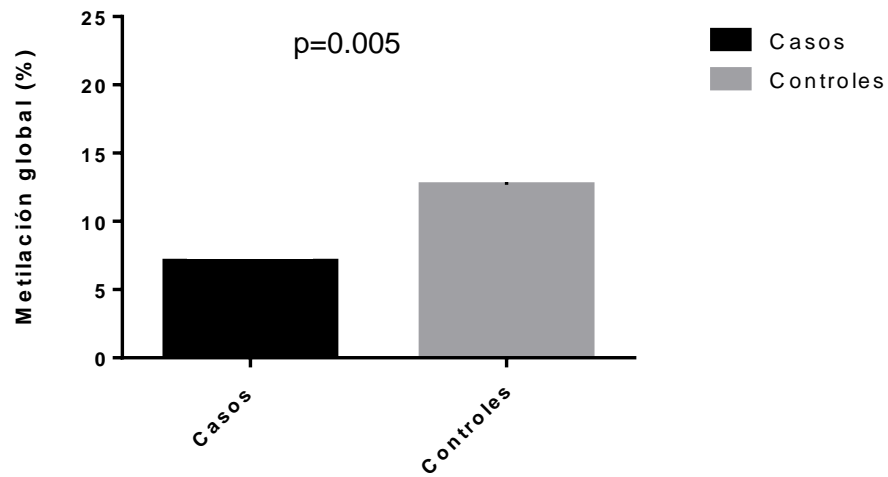


El **Gráfico 7** muestra la comparación de la metilación por cada sitio CpG localizado en la Isla 2, que como ya se ha mencionado es parte del promotor y primer exón de *FABP3*. Después de probar la diferencia de proporciones entre ambos grupos, la metilación del sitio CpG 18 resultó estadísticamente diferente con un valor de  $X^2$  de 15.91 y un valor de  $z$  de 3.98 ( $\alpha=0.05$ ).



Posteriormente se calculó el porcentaje de metilación global de la isla CpG 2 y se analizó la diferencia entre casos y controles. Los resultados mostraron que la metilación global es significativamente diferente entre ambos grupos (**Gráfico 8**), siendo mayor en los controles con un valor de  $X^2$  de 7.79 y un valor de  $z$  de 2.79 ( $\alpha=0.05$ ).

**Gráfico 8.** Metilación global (%) de casos y controles fase 2

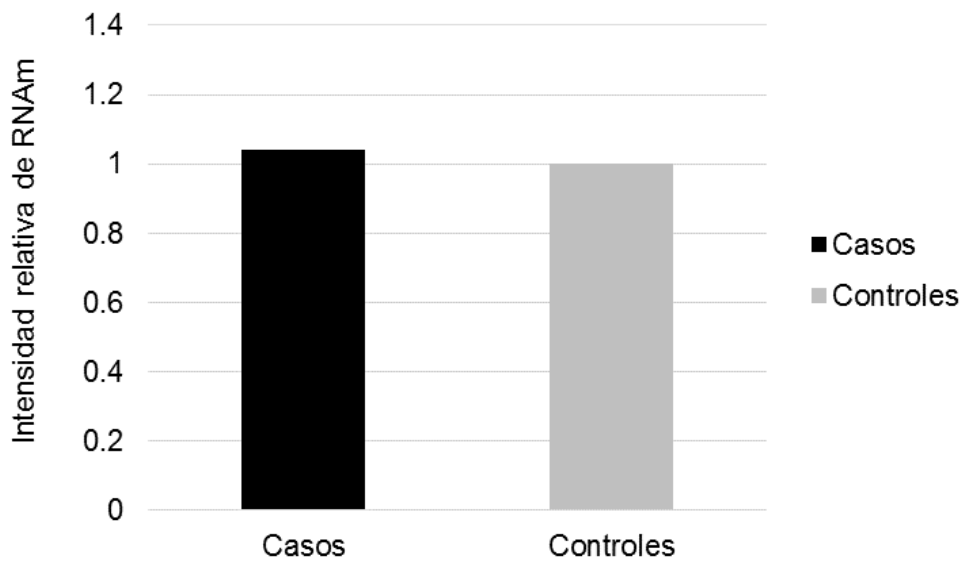


Finalmente, se realizó un análisis de correlación entre la metilación por sitio CpG y global de la isla CpG 2 con el índice HOMA. Sin embargo, ninguno de los resultados fue estadísticamente significativo. De igual forma, no se observaron asociaciones significativas entre la metilación con otros parámetros bioquímicos como glucosa en ayuno, colesterol total, c-HDL, triglicéridos o IMC.

### Resultados de expresión de *FABP3*

Con base en los resultados de expresión relativa de *FABP3* entre casos y controles, se obtuvo un fold change de 1.04 (**Gráfico 9**), lo cual indica que no existe una diferencia significativa en los niveles de expresión de *FABP3* entre ambos grupos.

**Gráfico 9.** Expresión de *FABP3*



Se realizó un análisis de correlación entre la metilación de *FABP3* y los resultados de expresión de *FABP3* considerándola como variable continua, sin embargo, no se obtuvieron resultados que indicaran asociación entre el porcentaje de metilación y la expresión del gen.

## Composición de ácidos grasos en plasma

Se determinaron 11 ácidos grasos en el plasma, los cuales varían en grado de insaturación y número de átomos de carbono. En la **Tabla 5** se muestra la concentración media en casos y controles.

Después de probar las diferencias entre ambos grupos, ninguna resultó estadísticamente significativa (**Gráfico 10**).

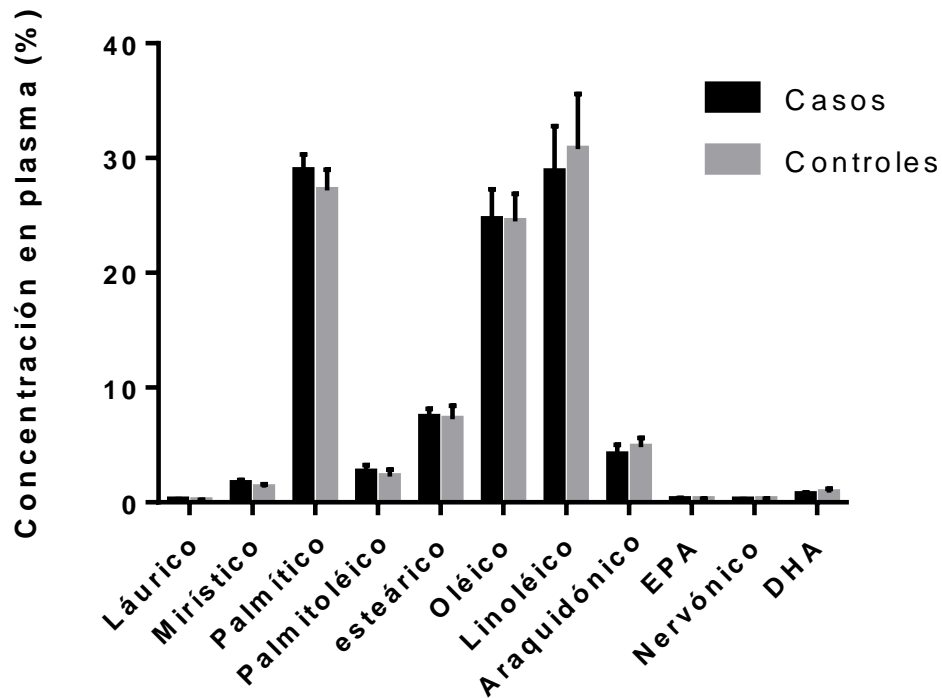
**Tabla 5.** Composición media (%) de ácidos grasos en plasma.

Ácido Graso	Casos Media (DE)	Controles Media (DE)	t	Sig
Láurico	0.20 (0.08)	0.15 (0.07)	1.12	0.294
Mirístico	1.64 (0.32)	1.28 (0.31)	1.80	0.109
Palmítico	28.92 (1.4)	27.18 (1.8)	1.70	0.127
Palmitoléico	2.65 (0.58)	2.25 (0.58)	1.07	0.314
Estearico	7.40 (0.73)	7.26 (1.1)	0.22	0.824
Oléico	24.65 (2.6)	24.48 (2.4)	0.10	0.919
Linoléico	28.82 (3.9)	30.79 (4.7)	0.60	0.500
Araquidónico	4.14 (0.87)	4.81 (0.79)	1.26	0.243
EPA	0.25 (0.14)	0.25 (0.07)	0.02	0.979
Nervónico	0.023 (0.06)	0.25 (0.07)	0.49	0.634
DHA	0.67 (0.19)	0.85 (0.32)	1.06	0.316

Prueba estadística: t de Student para muestras independientes;  $t > 2.30$ ,  $p < 0.05$

Prueba para homogeneidad de varianzas: Levene

**Gráfico 10.** Concentración de ácidos grasos en plasma (%)

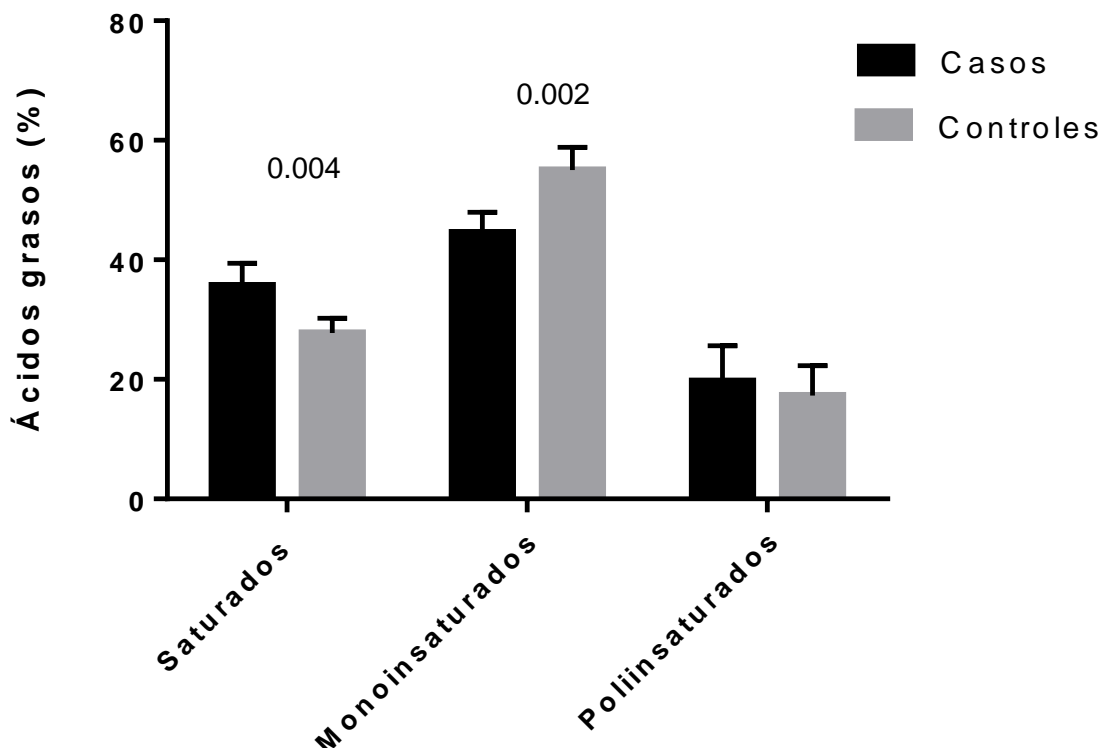


Se analizó la correlación del porcentaje de metilación por sitio CpG y global con la concentración de ácidos grasos en plasma, sin embargo, no se obtuvieron valores que alcanzaran significancia estadística. Por otro lado, aunque tampoco se obtuvieron valores estadísticamente significativos, se observó una tendencia de correlación entre la concentración de ácidos grasos en plasma y el c-HDL e índice HOMA.

Posteriormente, como un análisis complementario se obtuvo el porcentaje de ácidos grasos reportados en la encuesta dietética y se clasificaron con base en su grado de insaturación. En el **Gráfico 11** se puede apreciar que las personas con SM consumen más ácidos grasos saturados y menos ácidos grasos monoinsaturados en comparación con los controles, mostrando diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).



**Gráfico 11.** Ácidos grasos provenientes de la dieta (%)



Finalmente, se analizó la correlación entre la composición de los ácidos grasos del plasma y los ácidos grasos reportados en la dieta. No obstante, ambos valores no resultaron estar correlacionados.

### **Cálculo de tamaño muestral**

Con base en las diferencias de la metilación de *FABP3* observadas en el presente estudio piloto, es posible realizar un cálculo de tamaño de muestra para proporciones independientes que puede ser útil para futuras investigaciones.

Tomando en cuenta un tamaño del efecto esperado de 0.2, un valor de  $\alpha=0.05$  y un poder estadístico de 0.80. Obtuvimos un número de 680 sujetos por grupo para hallar asociaciones que tengan significancia clínica.

## **Discusión**

El objetivo principal de éste estudio piloto fue analizar la metilación de la región reguladora de *FABP3* en leucocitos y su asociación con resistencia a la insulina, como fenotipo del SM.

Nos propusimos evaluar la factibilidad del análisis de la metilación de *FABP3* por clonación, considerado el estándar de oro (Zhang et al. 2009) con el fin de obtener información por cada sitio CpG y determinar su aplicación en un mayor número de sujetos. Para lograr esto, el estudio se llevó a cabo en dos fases, la primera se realizó en 20 sujetos para describir la metilación del promotor y primer exón de *FABP3* y hacer la comparación entre casos y controles. Posteriormente, en la segunda fase se incluyeron 10 sujetos en los cuales se analizó la metilación de *FABP3* y su asociación con la expresión del gen, con el índice HOMA y con la composición de los ácidos grasos en plasma.

Debido a los escasos estudios previos enfocados al estudio de la modulación epigenética de *FABP3* o de algún otro miembro de genes que codifican para ésta familia de proteínas; la determinación del tamaño de muestra necesario para cumplir con los objetivos de este estudio fue considerado a fin de obtener las observaciones esperadas para responder la pregunta de investigación y además, para obtener información que permitiera calcular un número óptimo de sujetos de estudio para futuras investigaciones, como usualmente se lleva a cabo en los estudios piloto (Leon et al. 2011).

### **Fase 1**

Tal como se esperaba, los casos y los controles mostraron diferencias entre sí en peso, IMC, circunferencia de cintura, glucosa en ayuno, triglicéridos y c- HDL, dado que estos fenotipos determinan la presencia o ausencia del SM.

A diferencia de los resultados reportados por Zhang y colaboradores en el 2013 en donde analizaron la metilación del promotor y exón 1 de *FABP3* como una sola región, en el presente estudio fueron identificadas dos regiones, Isla CpG 1 (promotor) e Isla CpG 2 (promotor y parte del primer exón). En dicho estudio previo, los sitios CpG localizados en el primer exón fueron los que resultaron con mayor importancia clínica debido a su asociación con fenotipos del SM (Zhang et al. 2013). Por lo cual, en la primera fase de éste estudio nuestro objetivo principal fue describir la metilación de *FABP3* y de esta manera determinar si el análisis de las dos Islas CpG era necesario para responder a nuestra pregunta de investigación.

### **Comparación de la metilación entre casos y controles**

La metilación de las Islas CpG fue bastante similar en ambos grupos a pesar de las discrepancias en los fenotipos entre casos y controles, especialmente en la Isla CpG 1, en donde las diferencias fueron prácticamente nulas. Ésta carencia de diferencias puede ser atribuída al hecho de que la metilación del ADN por naturaleza es relativamente estable del 70-al 80% del total de los sitios CpG en el genoma (Ziller et al. 2013), lo cual sugiere que la Isla CpG 1 de *FABP3* puede ser parte de éstas regiones altamente estables con respecto a la metilación.

A pesar de la carencia de diferencias halladas en la primer región analizada, en la isla CpG 2 se observaron diferencias en diversos sitios CpG, resultando el sitio 17 significativamente diferente entre ambos grupos, siendo la metilación casi el doble en los casos que en los controles. Cabe mencionar que éste sitio CpG es uno de los más próximos al sitio de inicio de la transcripción lo cual concuerda con resultados previos que mostraron que la metilación de *FABP3* fue más abundante en los sitios CpG más cercanos al sitio de inicio de la transcripción (Zhang et al. 2013).

La escasa significancia estadística en la asociación de la metilación con parámetros metabólicos como glucosa en ayuno, colesterol total, c-HDL y triglicéridos puede deberse a la heterogeneidad de la metilación observada. Por lo

cual, un mayor número de sujetos y un control más estricto de los criterios de inclusión podrían ser de utilidad para percibir diferencias significativas.

## **Fase 2**

En la segunda fase del estudio, se llevó a cabo el análisis de metilación de *FABP3* en un grupo de sujetos que nos permitiera evaluar la asociación de la metilación con la expresión relativa de *FABP3*, con el índice HOMA y con la concentración de ácidos grasos en el plasma. Para esto se incluyeron a 10 sujetos, 5 casos y 5 controles. Ambos grupos presentaron discrepancias en los fenotipos que distinguen la presencia o ausencia del SM tales como la circunferencia de cintura, glucosa en ayuno y triglicéridos; además de los niveles de insulina en ayuno, el índice HOMA, edad, peso, IMC, y grasa visceral. Dichas diferencias nos indican que los grupos tuvieron fenotipos extremos entre sí, los cuál nos permitiría descartar que la ausencia de diferencias en la metilación de *FABP3* en la muestra previamente analizada se debió a la falta de diferencias fenotípicas entre los grupos.

Cabe mencionar, que el índice HOMA como indicador de resistencia a la insulina, de especial interés en el presente estudio, mostró diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles, tal como se esperaba dado que, como ya se ha mencionado anteriormente, es uno de los componentes del SM (Muniyappa et al. 2008). Consideramos un valor de 2.27 como punto de corte para personas sin diabetes, ya que toma en cuenta la edad, el género y los criterios para del ATPIII para el SM (Gayoso-Diz et al. 2013).

## **Comparación de la metilación entre casos y controles**

Los resultados obtenidos a partir de los análisis de metilación en la fase 1 nos permitió determinar que el análisis de la isla CpG 2 era suficiente para fines de éste estudio, dado que en la isla CpG 1 las diferencias fueron nulas a pesar de las diferencias en los fenotipos de los sujetos comparados.

De entre las diferencias observadas en los sitios analizados en la isla 2, el sitio CpG 18 se observó significativamente más metilado en controles. Cabe mencionar que éste sitio CpG forma parte del primer exón de *FABP3*, que como ya se mencionó concuerda con resultados previos, en donde se obtuvo un porcentaje mayor de metilación en aquellos sitios CpG localizados en el primer exón de *FABP3* (Zhang et al. 2013). Sin embargo, no se había hecho una comparación entre personas afectadas y no afectadas por el SM.

Ya que obtuvimos resultados significativos en un solo sitio CpG, realizamos el análisis de la metilación global de la Isla CpG 2 e hicimos la comparación entre los grupos. En general, la metilación presentó una gran variabilidad, con un rango de 0 a 100%, similar a lo que se ha observado anteriormente en la región promotora de otros genes (Armstrong et al. 2014). Así mismo, tomando en cuenta la metilación de toda la región, observamos que la metilación fue mayor en el grupo control, alcanzando una significancia estadística.

Después de esto, analizamos la correlación de la metilación global con el índice HOMA y con el resto de los parámetros bioquímicos analizados, sin embargo, no obtuvimos resultados significativos. Nuestro interés en el análisis de la asociación entre la metilación de *FABP3* y el índice HOMA surgió a partir del conocimiento sobre la contribución de HFABP en la sensibilidad a la insulina mediante la utilización de glucosa y ácidos grasos de cadena larga (AGCL), ya que se ha observado que cuando ésta proteína se expresa de manera abundante, incrementa la solubilidad de los AGCL, facilita su difusión y protege contra su toxicidad (Shearer et al. 2005). De ésta manera, si su regulación está siendo influenciada por factores epigenéticos como la metilación del ADN, entonces el estudio de *FABP3* podría otorgar información clave para el conocimiento del SM. No obstante, en éste estudio no hallamos una asociación significativa entre la metilación de *FABP3* y el índice HOMA, lo cual podría deberse en parte al reducido número de sujetos incluidos en nuestro estudio.

La heterogeneidad en la metilación intrasujeto y la limitada diferencia observada entre los grupos de estudio puede ser explicada por el uso de ADN proveniente de

leucocitos, los cuales se componen de diferentes poblaciones celulares con distintos perfiles epigenéticos, por lo cual cabe la posibilidad de que solamente el cambio en el perfil epigenético de un tipo celular se relacione con el SM. Tal como se observó en un estudio enfocado en evaluar la asociación de la metilación en genes implicados en la obesidad y fenotipos del SM, utilizando células circulantes al igual que en el presente estudio (Wang et al. 2010).

### **Asociación de la metilación con insulina y parámetros metabólicos**

En general, en este estudio no se observaron asociaciones significativas entre la metilación de *FABP3* y los niveles de insulina, incluso con otros parámetros metabólicos como glucosa en ayuno, colesterol total, triglicéridos y c-HDL, lo cual es inconsistente con hallazgos anteriores. Los estudios sobre relación entre la metilación de genes y el desarrollo de SM (Yara et al. 2015), y en especial en la modulación epigenética de *FABP3* son escasos, sin embargo, previamente se observó una fuerte asociación entre la metilación global de *FABP3* y el colesterol total; la metilación de sitios CpG del promotor con la presión diastólica y la sensibilidad a la insulina; y una importante asociación entre un sitio CpG del primer exón y lipoproteínas de baja y muy baja densidad (VLDL, ILDL y LDL). Las discrepancias entre esos hallazgos y el presente estudio pueden deberse a las diferencias en el tamaño de muestra y los métodos de análisis. En dicho estudio previo se utilizó una muestra de mayor tamaño (n=517) compuesta por sujetos relacionados en el cuál el objetivo principal fue evaluar la heredabilidad de la metilación de *FABP3* analizada con EpiTYPER y su asociación con fenotipos del SM (Zhang et al. 2013).

### **Asociación entre el porcentaje de metilación y la expresión de *FABP3***

Debido a que se conoce el efecto de la metilación en la represión transcripcional cuando ésta ocurre en sitios CpG en la región promotora e incluso en regiones intergénicas, nos dimos a la tarea de analizar la expresión relativa de *FABP3* y hacer la comparación entre casos y controles.

Después de realizar los análisis pertinentes, no observamos diferencias en la expresión de *FABP3* en leucocitos entre ambos grupos. Y por consiguiente, tampoco hubo asociación entre la metilación global o específica por sitio CpG y la expresión. En estudios previos realizados en cultivos celulares y estudios *in vivo* se ha demostrado que *FABP3*, al igual que otros miembros de la familia de las FABPs posee una región promotora que es suficiente para dirigir la expresión de dicho gen (Qian et al. 1999). Sin embargo, se ha reportado que la expresión de *FABP3* en células circulantes es relativamente baja (EMBL-EBI 2014).

Por otra parte,

### **Asociación entre la metilación de *FABP3* y la concentración de ácidos grasos en el plasma**

Realizamos una comparación de la concentración de ácidos grasos plasmáticos entre casos y controles. Observamos ligeras diferencias entre ambos grupos, sin embargo, ninguna de ellas alcanzó suficiente significancia estadística. De igual forma, la asociación entre la metilación global o específica por sitio CpG no mostró una correlación significativa con la concentración de ácidos grasos en plasma. Éstos resultados podrían en parte deberse a la insuficiencia de poder estadístico por lo cual, se requiere un mayor número de sujetos de estudio.

Por otro lado, las tendencias de correlación entre los ácidos grasos en plasma y fenotipos del SM tales como c-HDL, e índice HOMA aunque no alcanzan una significancia estadística, concuerdan con resultados reportados previamente en donde observaron que la composición de ácidos grasos en plasma contribuye a la heterogeneidad que existe entre la grasa corporal y fenotipos del SM, como el índice HOMA, niveles de triglicéridos, c-HDL y presión arterial sistólica (Klein-platat et al. 2005).

Finalmente, como una observación complementaria llevamos a cabo un análisis de correlación entre las concentraciones de ácidos grasos en plasma y la ingestión de ácidos grasos reportados la encuentra dietética, pero no obtuvimos una correlación significativa entre ambas variables. Nuestros resultados son opuestos

a estudios previos los cuales han reportado que los niveles de ácidos grasos en plasma sirven como biomarcador para evaluar la calidad de la grasa dietética (Klein-platat et al. 2005; Lagstrom et al. 1998; Ma et al. 1995). Sin embargo, nuestro pequeño tamaño de muestra limita la capacidad para hacer inferencias en esta rama.

### **Cálculo de tamaño de muestra**

La utilidad de nuestro estudio radica principalmente en la generación de conocimiento sobre la metilación de *FABP3* permitiendo llevar a cabo un cálculo de tamaño de muestra que puede ser útil para futuras investigaciones. Esperando un tamaño del efecto de 0.2 con un poder estadístico del 80%, se requiere un tamaño de muestra óptimo de al menos 680 sujetos por grupo, lo cual sugiere la utilización de un método de análisis distinto dada la complejidad del utilizado en ésta investigación.



## Limitaciones del estudio

Existen diversas limitaciones en el presente estudio que deben ser tomadas en cuenta. Una de ellas está basada en el diseño transversal del estudio lo cual no permite establecer una relación causa-efecto. Sin embargo, el diseño del estudio piloto fue apropiado por distintas razones, la primera de ellas radica en la carencia de estudios previos sobre la modulación epigenética de *FABP3* y por lo tanto de la asociación con fenotipos del síndrome metabólico, lo cual conlleva a la necesidad de generar datos que sirvan como base para estudios posteriores.

La disponibilidad de las muestras en la primera fase del presente estudio no permitió hacer análisis de expresión, ni determinación de insulina en la muestra total. El número reducido de los sujetos involucrados hace menos representativos los resultados obtenidos con respecto a la población con síndrome metabólico en general. Sin embargo, la información producida a partir de nuestros resultados, es de gran utilidad para un cálculo de muestra adecuado.

Otra de nuestras limitaciones es el método empleado para el análisis, dada la complejidad de su ejecución, dificulta el análisis de un grupo grande de muestras.

## Conclusiones

Los mecanismos biológicos que asocian la metilación de ADN con el desarrollo del síndrome metabólico aún no están bien descritos. Por lo cual, el objetivo principal de éste estudio consistió en analizar la metilación de *FABP3* en leucocitos y evaluar su asociación con resistencia a la insulina, un componente importante del síndrome metabólico.

A pesar de que no observamos diferencias en la metilación de la isla CpG 1 entre casos y controles, en la isla CpG 2 se observó una diferencia significativa en los sitios CpG 17 y 18 localizados en el promotor y primer exón de *FABP3* respectivamente. Dada la escasa diferencia observada en la expresión del gen, es necesario considerar la ejecución del estudio en un número mayor de sujetos con el fin de determinar si la metilación en el sitio regulador de *FABP3* influye en la modulación de su expresión.

Finalmente, aunque no se observó correlación entre la metilación de *FABP3*, la expresión del gen, el índice HOMA o las concentraciones plasmáticas de ácidos grasos, éste estudio generó información relevante para evaluar la variación de la metilación en esta región, y para el cálculo de un tamaño de muestra con suficiente poder estadístico que permita analizar asociaciones con fenotipos de importancia clínica.

## Literatura citada

- Aguilar-Salinas, C. et al., 2001. High prevalence of low HDL cholesterol concentrations and mixed hyperlipidemia in a Mexican nationwide survey. *Journal of lipid research*, 42(8), pp.1298–1307.
- Aguilar-Salinas, C.A. et al., 2010. Prevalence of dyslipidemias in the Mexican National Health and Nutrition Survey 2006. *Salud Pública de México*, 52(2), pp.S44–S53.
- Akbal, E. et al., 2009. Serum heart type fatty acid binding protein levels in metabolic syndrome. *Endocrine*, 36(3), pp.433–437.
- Alberti, K.G. & Zimmet, P.Z., 1998. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*, 15(7), pp.539–553.
- Alberti, K.G.M.M. et al., 2009. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International . *Circulation*, 120(16), pp.1640–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19805654> [Accessed July 9, 2014].
- Armstrong, D.A. et al., 2014. Global and gene-specific DNA methylation across multiple tissues in early infancy : implications for children ' s health research. *The FASEB Journal*.
- Asimakopoulos, F. a et al., 1999. ABL1 methylation is a distinct molecular event associated with clonal evolution of chronic myeloid leukemia. *Blood*, 94(7), pp.2452–2460.
- Babraham, I., 2015. Life Sciences Research for Lifelong Health. Available at: <http://www.babraham.ac.uk/our-research/epigenetics>.
- Balkau, B. & Charles, M.A., 1999. COMMENT ON THE PROVISIONAL REPORT FROM THE WHO CONSULTATION. *Diabetic medicine*, 16(5), pp.442–443. Available at: <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=10036190> [Accessed August 12, 2015].
- Barnes, S.K. & Ozanne, S.E., 2011. Pathways linking the early environment to long-term health and lifespan. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 106(1), pp.323–336. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2010.12.005>.

- Barres, R. & Zierath, J.R., 2011. DNA methylation in metabolic disorders 1 – 4. *The American Journal of Clinical Nutrition*, (C), pp.4–7.
- BioLabs, N.E., 2015a. Bacterial Transformation. Available at: <https://www.neb.com/applications/cloning-and-synthetic-biology/transformation>.
- BioLabs, N.E., 2015b. Cloning & Synthetic Biology. Available at: <https://www.neb.com/applications/cloning-and-synthetic-biology/dna-ligation/cloning-ligation>.
- Bock, C. et al., 2005. BiQ Analyzer: Visualization and quality control for DNA methylation data from bisulfite sequencing. *Bioinformatics*, 21(21), pp.4067–4068.
- Bock, C. et al., 2006. CpG island methylation in human lymphocytes is highly correlated with DNA sequence, repeats, and predicted DNA structure. *PLoS Genetics*, 2(3), pp.0243–0252.
- Bruce, K.D. & Cagampang, F.R., 2011. Epigenetic priming of the metabolic syndrome. *Toxicology mechanisms and methods*, 21(4), pp.353–361.
- Cakir, E. et al., 2012. Heart type fatty acid binding protein response and subsequent development of atherosclerosis in insulin resistant polycystic ovary syndrome patients. *Journal of ovarian research*, 5(1), p.45. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3574048&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.
- Chang, L. & Neu, J., 2015. Early Factors Leading to Later Obesity : Interactions of the. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*, 45(5), pp.134–142. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cppeds.2015.03.003>.
- Clark, S.J. et al., 2006. DNA methylation: bisulphite modification and analysis. *Nature protocols*, 1(5), pp.2353–2364.
- Communication, S., 2001. Executive Summary of the Third Report ( NCEP ) Expert Panel on Detection , Evaluation , and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults ( Adult Treatment Panel III ). *Journal of American Medical Association*, 285(19), pp.2486–2497.
- Córdova-villalobos, J.Á. et al., 2008. Las enfermedades crónicas no transmisibles en México : sinopsis epidemiológica y prevención integral. , 50(5), pp.419–427.
- Cornier, M.A. et al., 2008. The metabolic syndrome. *Endocrine Reviews*, 29(7), pp.777–822.

- Cuesta, A.L., 2004. Defectos genéticos de la glucocinasa y alteraciones del metabolismo hidrocarbonado. *Endocrinología y Nutrición*, 51(Supl 2), pp.10–15.
- Deaton, A. & Bird, A., 2011a. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes & development*, 25(10), pp.1010–1022. Available at: <http://genesdev.cshlp.org/content/25/10/1010.short>.
- Deaton, A. & Bird, A., 2011b. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes & development*, 25(10), pp.1010–1022.
- Deedwania, P. & Gupta, R., 2006. Management issues in the metabolic syndrome. *JAPI*, pp.797–810. Available at: [http://www.researchgate.net/profile/Rajeev\\_Gupta11/publication/6587711\\_Management\\_issues\\_in\\_the\\_metabolic\\_syndrome/links/546cc8f70cf2193b94c57660.pdf](http://www.researchgate.net/profile/Rajeev_Gupta11/publication/6587711_Management_issues_in_the_metabolic_syndrome/links/546cc8f70cf2193b94c57660.pdf) [Accessed May 27, 2015].
- DeFronzo, R.A., Tobin, J.D. & Andres, R., 1979. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *The American journal of physiology*, 237(3), pp.E214–E223.
- Eckel, R.H. et al., 2010a. SFMV Doc à usage interne Ne pas diffuser. , pp.181–183.
- Eckel, R.H. et al., 2010b. The metabolic syndrome. *Lancet*, 375(9710), pp.181–3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20109902> [Accessed January 11, 2015].
- Einhorn, M., FACP & Face, D., 2003. American College of Endocrinology position statement on the insulin resistance syndrome. *Endocrine Practice*, 9 (Supplem, pp.5–21.
- EMBL-EBI, 2014. Expression Atlas.
- Epping-Jordan, J.E. et al., 2005. Preventing chronic diseases: taking stepwise action. *Lancet*, 366(9497), pp.1667–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16271649> [Accessed June 10, 2015].
- Fournier, N.C. & Richard, M. a, 1990. Role of fatty acid-binding protein in cardiac fatty acid oxidation. *Molecular and cellular biochemistry*, 98(1-2), pp.149–159.
- Fung, T.T. et al., 2001. Association between dietary patterns and plasma biomarkers of obesity and cardiovascular disease risk. *The American journal of clinical nutrition*, 73(1), pp.61–67.

- García E, De-la-Llata M, Kaufer M, Tusié M, Calzada R, V. V, 2008. La obesidad y el síndrome metabólico como problema de salud pública . Una reflexión. *Salud Pública Mex*, 50(6), pp.530–47.
- Gardiner-Garden, M. & Frommer, M., 1987. CpG islands in vertebrate genomes. *Journal of molecular biology*, 196(2), pp.261–282.
- Gayoso-Diz, P. et al., 2013. Insulin resistance ( HOMA-IR ) cut-off values and the metabolic syndrome in a general adult population : effect of gender and age : EPIRCE cross-sectional study. , (Cvd).
- Gene, N., 2015. National Center for Biotechnology Information. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2170>.
- Grundy, S.M. et al., 2004. Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 24(2), pp.e13–e18.
- Gupta, N. et al., 2012. Childhood obesity in developing countries: epidemiology, determinants, and prevention. *Endocrine reviews*, 33(1), pp.48–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22240243> [Accessed June 5, 2015].
- Ho, S.M. & Tang, W.Y., 2007. Techniques used in studies of epigenome dysregulation due to aberrant DNA methylation: An emphasis on fetal-based adult diseases. *Reproductive Toxicology*, 23(3), pp.267–282.
- Hoile, S.P. et al., 2011. Dietary Protein Restriction during F 0 Pregnancy in Rats Induces Transgenerational Changes in the Hepatic Transcriptome in Female Offspring. , 6(7).
- Jones, P. a & Takai, D., 2001. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science (New York, N. Y.)*, 293(5532), pp.1068–1070.
- Jones, P.A., 2005. Overview of cancer epigenetics. *Seminars in Hematology*, 42(SUPPL. 2).
- Kakoti, A. & Goswami, P., 2013. Heart type fatty acid binding protein: structure, function and biosensing applications for early detection of myocardial infarction. *Biosensors & bioelectronics*, 43, pp.400–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23357005>.
- Kangaspeska, S. et al., 2008. Transient cyclical methylation of promoter DNA. *Nature*, 452(7183), pp.112–115.

- Kassi, E. et al., 2011. Metabolic syndrome: definitions and controversies. *BMC medicine*, 9(1), p.48. Available at: <http://www.biomedcentral.com/1741-7015/9/48>.
- Keane, K.N. et al., 2015. Molecular Events Linking Oxidative Stress and Inflammation to Insulin Resistance and  $\beta$ -Cell Dysfunction. , 2015.
- Keys, a et al., 1972. Indexes of Relative Weight and Obesity. *Journal of Chronic Diseases*, 25(6-7), p.329–&. Available at: <Go to ISI>://A1972N286300003.
- Kim, J.A. et al., 2001. Dietary Patterns and the Metabolic 2001 Korean National Health and Nutrition Survey. , pp.1904–1905.
- Kim, K.C. & Choi, S.-W., 2015. Nutritional Epigenetics and Aging. In *Nutrition, Exercise and Epigenetics: Ageing Interventions*. p. 19 y 20. Available at: [https://books.google.com.mx/books?id=GOaeBgAAQBAJ&pg=PA19&lpg=PA19&dq=fabp3+epigenetics&source=bl&ots=efALi1Dnk\\_&sig=-bMMHdsi6\\_m57kkpDdTZXy9J0Uk&hl=en&sa=X&ved=0CCgQ6AEwAmoVChMIqMud9Oa9xwIVRAuSCh14CQeT#v=onepage&q=fabp3+epigenetics&f=true](https://books.google.com.mx/books?id=GOaeBgAAQBAJ&pg=PA19&lpg=PA19&dq=fabp3+epigenetics&source=bl&ots=efALi1Dnk_&sig=-bMMHdsi6_m57kkpDdTZXy9J0Uk&hl=en&sa=X&ved=0CCgQ6AEwAmoVChMIqMud9Oa9xwIVRAuSCh14CQeT#v=onepage&q=fabp3+epigenetics&f=true).
- Klein-platat, C. et al., 2005. Plasma fatty acid composition is associated with the metabolic syndrome and low-grade inflammation in overweight adolescents 1 – 3. , (3), pp.1178–1184.
- Kuchiba, a et al., 2014. Global methylation levels in peripheral blood leukocyte DNA by LUMA and breast cancer: a case-control study in Japanese women. *British journal of cancer*, 110(11), pp.2765–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24786600>.
- Lagstrom, B.H. et al., 1998. Fatty acids in serum lipid fractions as indicators of fat intake in 5-year-old children in the STRIP project. , 42.
- Leibiger, I.B., Leibiger, B. & Berggren, P.-O., 2008. Insulin signaling in the pancreatic beta-cell. *Annual review of nutrition*, 28, pp.233–251.
- Leon, A.C., Davis, L.L. & Kraemer, H.C., 2011. The role and interpretation of pilot studies in clinical research. *Journal of Psychiatric Research*, 45(5), pp.626–629.
- LeRoith, D. & Cohen, D.H., 2012. Metabolic Syndrome. , p.112. Available at: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278936/?report=reader#\\_NBK278936\\_pubdet\\_](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278936/?report=reader#_NBK278936_pubdet_).
- LeRoith, D. & Cohen, D.H., 2012. No Title. , p.106. Available at: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278936/?report=reader#\\_NBK278936\\_pubdet\\_](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278936/?report=reader#_NBK278936_pubdet_).

- Li, L.-C. & Dahiya, R., 2002. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 18(11), pp.1427–1431.
- Lopez-Alvarenga, J.C. et al., 2008. Prevalence and heritability of clusters for diagnostic components of metabolic syndrome: the Oman family study. *Metabolic syndrome and related disorders*, 6(2), pp.129–135.
- Luna-Luna, M. et al., 2015. Adipose Tissue in Metabolic Syndrome: Onset and Progression of Atherosclerosis. *Archives of Medical Research*. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0188440915001253> [Accessed May 25, 2015].
- Ma, J. et al., 1995. Plasma fatty acid composition as an indicator dietary fat intake in middle-aged.
- Martínez Basila, A., Maldonado Hernández, J. & López Alarcón, M., 2011. Métodos diagnósticos de la resistencia a la insulina en la población pediátrica. , 68(5), pp.397–404.
- Matthews, D.R. et al., 1985. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, 28(7), pp.412–419.
- McCabe, M.T., Brandes, J.C. & Vertino, P.M., 2009. Cancer DNA Methylation: Molecular Mechanisms and Clinical Implications. *Clinical Cancer Research*, 15(12), pp.3927–3937.
- Mooradian, A.D., 2009. Dyslipidemia in type 2 diabetes mellitus. , 5(3), pp.150–159.
- Muniyappa, R., Iantorno, M. & Quon, M.J., 2008. An integrated view of insulin resistance and endothelial dysfunction. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 37(3), pp.685–711, ix–x.
- NCBI, E., 2015. National Center for Biotechnology Information. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/epigenomics/>.
- O'Neill, S. & O'Driscoll, L., 2015. Metabolic syndrome: a closer look at the growing epidemic and its associated pathologies. *Obesity Reviews*, 16(1), pp.1–12. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/obr.12229> [Accessed April 9, 2015].
- Osborn, O. & Olefsky, J.M., 2012. The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. *Nature Medicine*, 18(3), pp.363–374. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nm.2627>.



- Pagotto, U., 2009. Where does insulin resistance start? The brain. *Diabetes care*, 32 Suppl 2, pp.S174–7.
- Park, S.E., Park, C.-Y. & Sweeney, G., 2015. Biomarkers of insulin sensitivity and insulin resistance: Past, present and future. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 00(00), pp.1–11. Available at: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/10408363.2015.1023429>.
- Pedroza-Tobias, A. et al., 2014. Classification of metabolic syndrome according to lipid alterations: analysis from the Mexican National Health and Nutrition Survey 2006. *BMC public health*, 14(1), p.1056. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4288637&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> [Accessed May 27, 2015].
- Promega, 2014. E Coli Competent Cells Protocol. *Technical Bulletin*. Available at: [https://www.promega.com/~media/files/resources/protocols/technical-bulletins/0/e\\_coli\\_competent\\_cells\\_protocol.pdf](https://www.promega.com/~media/files/resources/protocols/technical-bulletins/0/e_coli_competent_cells_protocol.pdf).
- Pruitt, K.D. et al., 2009. The consensus coding sequence (CCDS) project: Identifying a common protein-coding gene set for the human and mouse genomes. *Genome Research*, 19(7), pp.1316–1323.
- Ptak, C. & Petronis, A., 2008. Epigenetics and complex disease: from etiology to new therapeutics. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 48, pp.257–276.
- Qatanani, M. & Lazar, M. a., 2007. Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: Many choices on the menu. *Genes and Development*, 21(12), pp.1443–1455.
- QIAGEN, Q., 2013. QIAamp DNA Blood Midi Kit. Available at: <https://www.qiagen.com/mx/shop/sample-technologies/dna-sample-technologies/genomic-dna/qiaamp-dna-blood-midi-kit#productdetails>.
- Qian, Q. et al., 1999. A concise promoter region of the heart fatty acid-binding protein gene dictates tissue-appropriate expression. *Circulation research*, 84(3), pp.276–289.
- Raal, F.J., 2009. Pathogenesis and management of the dyslipidemia of the metabolic syndrome. *Metabolic syndrome and related disorders*, 7(2), pp.83–88.
- Ratnayake, W.M.N. & Galli, C., 2009. Fat and fatty acid terminology, methods of analysis and fat digestion and metabolism: A background review paper. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 55(1-3), pp.8–43.

- Reininger, B.M. et al., 2015. Non-communicable diseases and preventive health behaviors : a comparison of Hispanics nationally and those living along the US-Mexico border. *BMC Public Health*, pp.1–7. Available at: <http://dx.doi.org/10.1186/s12889-015-1850-y>.
- Ruotolo, G. & Howard, B. V., 2002. Dyslipidemia of the metabolic syndrome. *Current Cardiology Reports*, 4(6), pp.494–500.
- Salas, R., del Mar Bibiloni, M., et al., 2014. Metabolic Syndrome Prevalence among Northern Mexican Adult Population. , 9(8).
- Salas, R., Bibiloni, M.D.M., et al., 2014. Metabolic syndrome prevalence among Northern Mexican adult population. *PLoS one*, 9(8), p.e105581. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4139369&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> [Accessed April 25, 2015].
- Shearer, J. et al., 2005. Partial gene deletion of heart type fatty acid binding protein limits the severity of dietary induced insulin resistance. *Diabetes*, 54(11), pp.3133–3139.
- Shukla, S. et al., 2011. CTCF-promoted RNA polymerase II pausing links DNA methylation to splicing. *Nature*, 479(7371), pp.74–79. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nature10442>.
- Snel, M. et al., 2012. Ectopic fat and insulin resistance: pathophysiology and effect of diet and lifestyle interventions. *International journal of endocrinology*, 2012, p.983814. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3366269&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> [Accessed May 6, 2015].
- SPPS, S. de S., 2002. Manual de Procedimientos. Toma de Medidas Clínicas y Antropométricas. En el Adulto y Adulto Mayor. , (132), p.55. Available at: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/documentos/DOCSAL7518.pdf>.
- Suliga, E. et al., 2015. Association between dietary patterns and metabolic syndrome in individuals with normal weight: a cross-sectional study. *Nutrition journal*, 14(1), p.55. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26025375> [Accessed June 1, 2015].
- Surveys, N.E., 2009. Prevalence of Metabolic Syndrome Among Adults 20 Years of Age and Over , by Sex , Age , Race and Ethnicity , and Body Mass Index : United States , 2003 – 2006. , (13), pp.2003–2006.
- Tam, C.S. et al., 2012. Defining insulin resistance from hyperinsulinemic-euglycemic clamps. *Diabetes Care*, 35(7), pp.1605–1610.

- Terry, M.B. et al., 2011. Association with risk factors in epidemiologic studies DNA methylation in white blood cells. , 6(7), pp.828–837.
- Toperoff, G. et al., 2015. Premature aging of leukocyte DNA methylation is associated with type 2 diabetes prevalence. *Clinical Epigenetics*, 7(1), pp.1–7. Available at: <http://www.clinicalepigeneticsjournal.com/content/7/1/35>.
- Turek-Plewa, J. & Jagodziński, P.P., 2005. The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. *Cellular & molecular biology letters*, 10(4), pp.631–647.
- Velázquez-Monroy, O. et al., 2003. *edigraphic.com*. , 73.
- Wang, X. et al., 2010. Obesity related methylation changes in DNA of peripheral blood leukocytes. *BMC medicine*, 8(1), p.87. Available at: <http://www.biomedcentral.com/1741-7015/8/87>.
- Weber, M. et al., 2007. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nature genetics*, 39(4), pp.457–466.
- White, M.F., 2002. IRS proteins and the common path to diabetes. , (23).
- WHO, 1995. Physical Status: the Use and Interpretation of Anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. Technical Report Series No. 854. *Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. Technical Report Series No. 854.*, pp.1–452.
- Wilcox, G., 2005. Insulin and insulin resistance. *The Clinical biochemist. Reviews / Australian Association of Clinical Biochemists*, 26(2), pp.19–39.
- William W., C., 1989. Gas chromatography: Theoretical Aspects and Instrumentation. In *Gas Chromatography and lipids*. Available at: [http://lipidlibrary.aocs.org/gc\\_lipid/gc\\_lip.html](http://lipidlibrary.aocs.org/gc_lipid/gc_lip.html).
- Wirfält, E. et al., 2001. Food Patterns and Components of the Metabolic Syndrome in Men and Women : A Cross-sectional Study within the Malmö Diet and Cancer Cohort. , 154(12), pp.1150–1159.
- World Health Organization, O., 2015. Noncommunicable Diseases. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs355/en/>.
- World Health Organization, O., 2014. *Noncommunicable Diseases (NCD) Country Profiles*, Available at: [http://www.who.int/nmh/countries/mex\\_en.pdf](http://www.who.int/nmh/countries/mex_en.pdf).

- Xu, H., 2013. Obesity and metabolic inflammation. *Drug Discovery Today Disease Mechanisms*, 10, pp.997–1003.
- Yara, S., Lavoie, J.-C. & Levy, E., 2015. Oxidative stress and DNA methylation regulation in the metabolic syndrome. , 7, pp.283–300.
- Zhang, Y. et al., 2009. DNA Methylation Análisis by Bisulfite Conversión, Cloning, and Sequencing of Individual Clones. In *DNA Methylation*. pp. 177–187.
- Zhang, Y. et al., 2013. Fatty acid binding protein 3 ( fabp3 ) is associated with insulin , lipids and cardiovascular phenotypes of the metabolic syndrome through epigenetic modifications in a northern european family population. *BMC Medical Genomics*, 6(1), p.1. Available at: BMC Medical Genomics.
- Ziller, M.J. et al., 2013. Charting a dynamic DNA methylation landscape of the human genome. *Nature*, 500(7463), pp.477–81.
- Zwingerman, N., 2012. THE INFLUENCE OF BODY MASS INDEX ON GLOBAL DNA METHYLATION LEVELS IN BLOOD LEUKOCYTES by.

## Apéndices

### 1. Historia clínica

Fecha \_\_\_\_\_

Código \_\_\_\_\_

#### DATOS PERSONALES

Nombre \_\_\_\_\_

Apellido paterno

Apellido materno

Nombre (s)

Edad \_\_\_\_\_ Sexo  M  F Fecha de Nacimiento \_\_\_\_\_

Días / Mes / Año

Edo. Civil \_\_\_\_\_ Escolaridad \_\_\_\_\_

Ocupación \_\_\_\_\_ Número telefónico \_\_\_\_\_

Dirección \_\_\_\_\_

E-mail \_\_\_\_\_

#### ANTECEDENTES HEREDOFAMILIARES

Por favor, indique si alguno de sus padres o hermanos han padecido estas enfermedades:

Obesidad \_\_\_\_\_ Cardiopatías \_\_\_\_\_ Hipertensión \_\_\_\_\_

Infarto \_\_\_\_\_ Diabetes 1 \_\_\_\_\_ Diabetes 2 \_\_\_\_\_

Hipercolesterolemia \_\_\_\_\_ Hipertrigliceridemia \_\_\_\_\_

Cáncer \_\_\_\_\_ Alcoholismo \_\_\_\_\_ Problemas de tiroides \_\_\_\_\_

Problemas de coagulación \_\_\_\_\_ Otro (especificar) \_\_\_\_\_

#### ANTECEDENTES PERSONALES PATOLÓGICOS

Por favor indique si usted ha padecido o padece cualquiera de los siguientes:

Obesidad \_\_\_\_\_ Cardiopatías \_\_\_\_\_ Hipertensión \_\_\_\_\_

Infarto \_\_\_\_\_ Diabetes 1 \_\_\_\_\_ Diabetes 2 \_\_\_\_\_

Hipercolesterolemia \_\_\_\_\_ Hipertrigliceridemia \_\_\_\_\_

Cáncer \_\_\_\_\_ Alcoholismo \_\_\_\_\_ Problemas de tiroides \_\_\_\_\_

Problemas para coagular \_\_\_\_\_ Otro (especificar) \_\_\_\_\_

MEDICAMENTO	DOSIS	TIEMPO

#### ALERGIAS O REACCIONES A MEDICAMENTOS

MEDICAMENTO	REACCIÓN

#### CIRUGÍAS

OPERACIÓN	FECHA

#### ASPECTOS GINECOLÓGICOS

Número de embarazos \_\_\_\_\_ Fecha de la última menstruación \_\_\_\_\_  
 Día / Mes / Año

#### ESTILO DE VIDA

##### Tabaquismo

Nunca he fumado: \_\_\_\_\_ Lo he dejado (Fecha): \_\_\_\_\_  
 Día / Mes / Año

Fumador ocasional (Número de cigarros): \_\_\_\_\_  
 Semana Mes

Fumador ocasional, nunca fumador diario: Sí No  
 Fumador ocasional, antes fumador diario: Sí No Tiempo: \_\_\_\_\_  
 Meses

Fumador actual:

Número de cigarros / día: \_\_\_\_\_ Número de años: \_\_\_\_\_

##### Alcohol

¿Toma bebidas alcohólicas?    Sí    No    Número de bebidas: \_\_\_\_\_  
Semana                      Mes

**Toxicomanías**

¿Consumes alguna droga?    Sí    No    Especificar: \_\_\_\_\_

**DATOS DEL PACIENTE**

**Antropometría**

	<b>UNIDADES</b>	<b>OBSERVACIONES</b>
Peso		
Talla		
IMC		
CC		
TAS		
TAD		

**Parámetros bioquímicos**

	<b>UNIDADES</b>	<b>OBSERVACIONES</b>
Glucosa		
Insulina		
Colesterol Total		
HDL		
Triglicéridos		

**Dieta**

	UNIDADES	OBSERVACIONES
Energía (Kcal/día)		
Carbohidratos (%E)		
Proteínas (%E)		
Lípidos(%E)		

**Muestras de laboratorio**

Número de alícuotas: \_\_\_\_\_ Observaciones: \_\_\_\_\_



## 2. SNUT. Cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos



Instituto Nacional de Salud Pública

Centro de Salud en Investigación Poblacional

### *Cuestionario de Frecuencia de Consumo*

Nombre del Paciente \_\_\_\_\_  
 Apellido Paterno      Apellido Materno      Nombre(s)

Nombre del Entrevistador \_\_\_\_\_

Nombre del Revisor \_\_\_\_\_

No. de identificación del Paciente \_\_\_\_\_

Fecha           
 Día      Mes      Año

Edad del Paciente (en años cumplidos) \_\_\_\_\_

Durante el año previo a este día ¿Con qué frecuencia consumió usted productos lácteos?  
 Por favor indique con una cruz, en la columna de frecuencia, la opción que considere más cercana a su realidad.

Encuestador: Por favor llene el círculo (no lo tache) y en la columna de la derecha el número correspondiente a la frecuencia de consumo reportada.

FRECUENCIA DE CONSUMO														
ALIMENTO	PRODUCTOS LÁCTEOS	NUNCA (0)	MEN OS DE UNA VEZ AL MES (1)	VEC ES AL MES (2)	VECES A LA SEMANA			VECES AL DIA						
					1	2-4	5-6	1	2-3	4-5	6			
					(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)			
1	UN VASO DE LECHE ENTERA	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
2	UNA REBANADA DE QUESO FRESCO O ½ TAZA COTTAGE	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
3	UNA REBANADA DE QUESO OAXACA	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
4	UNA REBANADA DE QUESO MANCHEGO O CHIHUAHUA	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
5	UNA CUCHARADA DE QUESO CREMA	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
6	UNA TAZA DE YOGURTH O BULGARKUS	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
7	UN BARRILLO CON HELADO DE LECHE	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Durante el año previo a este día. ¿Con qué frecuencia consumió usted frutas?  
 Por favor indique con una cruz, en la columna de frecuencias, la opción que considere más cercana a su realidad, incluya las frutas que estuvieron disponibles sólo en temporada.

FRECUENCIA DE CONSUMO												
	ALIMENTO FRUTAS	NUNCA (0)	MEN OS DE UNA VEZ AL MES (1)	VEC ES AL MES 1-3 (2)	VEC ES A LA SEM ANA			VEC ES AL DIA				
					1 (3)	2-4 (4)	5-6 (5)	1 (6)	2-3 (7)	4-5 (8)	6 (9)	
8	UN PLATANO	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	LL
9	UNA NARANJA	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	LL
10	UN VASO CON JUGO DE NARANJA O TORONJA	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	LL
11	UNA REBANADA DE MELON	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	LL
12	UNA MANZANA FRESCA	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	LL
13	UNA REBANADA DE SANDIA	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	LL
14	UNA REBANADA DE PIÑA	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	LL
15	UNA REBANADA DE PAPAYA	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	LL
16	UNA PERA	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	LL
17	UN MANGO	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	LL
18	UNA MANDARINA	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	LL
19	UNA PORCION DE FRESAS (≈ 10)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	LL
20	UN DURAZNO CHABACANO O NECTARINA	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	LL
21	UNA PORCION DE UVAS (≈ 10-15)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	LL
22	UNA TUNA	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	LL
23	UNA PORCION DE CIRUELAS (≈ 6)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	LL
24	UNA REBANADA DE MAMEY	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	LL
25	UN ZAPOTE	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	LL

¿Cuántas cucharaditas de azúcar le agrega usted a sus alimentos, a lo largo del día? Tome en cuenta lo que le pone al café, licuado, etc.  
\_\_\_\_\_ cucharaditas.

¿Le agrega usted sal a sus alimentos antes de probarlos?

Sí \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_

¿Se come usted el pellejo del pollo?

Sí \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_

¿Se come usted el gordito de la carne?

Sí \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_

¿Cuántos meses del año pasado consumió usted vitaminas?

0	1-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12

¿Cuál o cuáles? \_\_\_\_\_

¿Cuántos meses del año pasado consumió usted suplemento de calcio?

0	1-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12

¿Cuál o cuáles? \_\_\_\_\_

¿Considera usted que su alimentación ha cambiado durante el último año?

Sí \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_ (Si, sí ha cambiado, preguntar:)

¿Porqué? \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Observaciones \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_