



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI

TÍTULO

Frecuencia de los genotipos del receptor de hormona del crecimiento (*GHR* fl/fl, fl/d3, d3/d3) en pacientes con obesidad mórbida y su asociación con el síndrome metabólico

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA:

PATTSY ETUAL ESPINOSA CÁRDENAS

TUTOR PRINCIPAL:
DR. MOISÉS MERCADO ATRI
Centro Médico Nacional Siglo XXI IMSS

CO-TUTORES:
DRA. CLAUDIA RAMÍREZ RENTERÍA
Centro Médico Nacional Siglo XXI IMSS

COMITÉ TUTOR:
DR. MOISÉS MERCADO ATRI
Centro Médico Nacional Siglo XXI IMSS
DR. CARLOS ALBERTO AGUILAR SALINAS
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"
DR. MAURICIO SALCEDO VARGAS
Centro Médico Nacional Siglo XXI IMSS
DRA. LESLY AMINTA PORTOCARRERO ORTIZ
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía
DR. DANIEL CUEVAS RAMOS
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"

México , D.F.

Mayo 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



"2013, Año de la Lealtad Institucional y Centenario del Ejército Mexicano"

Dictamen de Autorizado

Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud 3601
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES DR. BERNARDO SEPULVEDA GUTIERREZ, CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI,
D.F. SUR

FECHA 29/11/2013

DR. MOISÉS MERCADO ATRI

P R E S E N T E

Tengo el agrado de notificarle, que el protocolo de investigación con título:

PREVALENCIA DE LAS DIFERENTES ISOFORMAS (GHR+3, GHR-3 Y GHR+3/GHR-3) DEL RECEPTOR DE HORMONA DE CRECIMIENTO EN UNA POBLACIÓN DE OBESOS MÓRBIDOS Y SU RELACIÓN CON LAS CARACTERÍSTICAS DEL SÍNDROME METABÓLICO.

que usted sometió a consideración de este Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud, de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores, cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de ética y de investigación, por lo que el dictamen es **A U T O R I Z A D O**, con el número de registro institucional:

Núm. de Registro
R-2013-3601-227

ATENTAMENTE

DR. CARLOS FREDY CUEVAS GARCÍA

Presidente del Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud No. 3601

IMSS

SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL



Dirección de Prestaciones Médicas
Unidad de Educación, Investigación y Políticas de Salud
Coordinación de Investigación en Salud



"2014, Año de Octavio Paz".

Dictamen de Modificación Autorizada

COMITÉ LOCAL DE INVESTIGACIÓN Y ÉTICA EN INVESTIGACIÓN EN SALUD 3601
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES DR. BERNARDO SEPULVEDA GUTIERREZ, CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI,
D.F. SUR

FECHA **09/05/2014**

DR.(A). MOISÉS MERCADO ATRI

P R E S E N T E

Tengo el agrado de notificarle, que la modificación al protocolo de investigación en salud con título: **PREVALENCIA DE LAS DIFERENTES ISOFORMAS (GHR+3, GHR-3 Y GHR+3/GHR-3) DEL RECEPTOR DE HORMONA DE CRECIMIENTO EN UNA POBLACIÓN DE OBESOS MÓRBIDOS Y SU RELACIÓN CON LAS CARACTERÍSTICAS DEL SÍNDROME METABÓLICO.** y con número de registro institucional: **R-2013-3601-227** y que consiste en:

Cambio de título

que sometió a consideración de este Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud, de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores, cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de ética y de investigación, por lo que el dictamen es **MODIFICACION AUTORIZADA.**

ATENTAMENTE

DR.(A). CARLOS FREDY CUEVAS GARCÍA
PRESIDENTE DEL COMITÉ LOCAL DE INVESTIGACIÓN Y ÉTICA EN INVESTIGACIÓN EN SALUD No.3601

IMSS

SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

ÍNDICE

	Pág.
1 Resumen	6
2 Marco Teórico	9
3 Planteamiento del problema	20
4 Justificación	21
5 Preguntas de Investigación	22
6 Hipótesis de estudio	22
7 Objetivos	23
8 Diseño	23
9 Métodos	24
9.1 Tamaño de muestra	25
9.2 Definición de variables	27
9.3 Procedimientos generales	30
9.4 Flujograma	31
9.5 Análisis estadístico	33
10 Aspectos éticos	34
11 Financiamiento	35
12 Resultados	35
Discusión	42
Conclusiones	45
13 Referencias	46
14 Anexos	56

Frecuencia de los genotipos del receptor de hormona del crecimiento (*GHR* fl/fl, fl/d3, d3/d3) en pacientes con obesidad mórbida y su asociación con el síndrome metabólico

RESUMEN:

La obesidad mórbida (OM) ($IMC >40 \text{ kg/m}^2$) es un factor de riesgo consistente para muerte prematura. Entre las anomalías asociadas con la OM, el perfil metabólico resultante del exceso de tejido adiposo, parece estar directamente asociado con el incremento en el riesgo de muerte. Existe un subgrupo de pacientes obesos en quienes estas anomalías metabólicas no se encuentran presentes, conocidos como obesos metabólicamente sanos. El mecanismo fisiopatológico de este patrón metabólico no se conoce en su totalidad, pero existe evidencia experimental que sugiere que puede deberse, entre otros factores, a variaciones en la distribución del tejido adiposo. La hormona del crecimiento (GH) juega un papel importante en la diferenciación de adipocitos y en la distribución del tejido adiposo. Los efectos biológicos de la GH resultan de su interacción con un receptor específico de membrana, el cual se distribuye en todos los tejidos, incluyendo el tejido adiposo. La presencia de un polimorfismo en el gen del receptor de hormona de crecimiento (GHR), que consiste en la ausencia del exón 3, resulta en la síntesis de una isoforma del receptor que aparentemente tiene una mayor actividad biológica. La distribución de este polimorfismo así como su posible asociación con características metabólicas es desconocida en la población de obesos mórbidos.

Objetivo: El objetivo de este estudio fue describir la frecuencia de los genotipos del GHR (fl/fl, fl/d3 y d3/d3) en pacientes con obesidad mórbida y de forma secundaria establecer su relación con la presencia de los componentes del síndrome metabólico (SM) e índices de adiposidad (índice cintura-cadera (ICC), índice cintura talla (ICT) e índice de adiposidad corporal (BAI)).

Material y Métodos: se incluyeron en el estudio pacientes adultos con obesidad mórbida ($IMC >40 \text{ kg/m}^2$) pertenecientes a la Clínica de Obesidad del HE CMN SXXI;

que no hubieran tenido ninguna intervención para disminuir de peso en los 6 meses previos al reclutamiento, que hubieran estado de acuerdo en participar en el estudio y firmaran el consentimiento informado. Se registraron sus características antropométricas y bioquímicas. La determinación del genotipo del GHR fue llevada a cabo mediante PCR múltiple. Se analizó la distribución de los genotipos del GHR y su potencial asociación con medidas antropométricas y metabólicas.

Resultados: Se incluyeron 262 pacientes en el estudio, con una media de edad de 43 ± 10 años, predominancia del género femenino (73%); la mediana de IMC fue de 47 kg/m^2 (RIC 43-53). Se encontró una frecuencia de los tres genotipos fl/fl, fl/d3 y d3/d3 de 27% (71), 53% (139) y 20% (52) respectivamente. Se excluyeron 6 pacientes del análisis por falta de datos bioquímicos completos. La prevalencia de síndrome metabólico de acuerdo a los criterios del consenso 2009 fue del 86% (221). No se encontraron diferencias en la proporción de componentes del síndrome metabólico entre los genotipos; sin embargo se observó una diferencia significativa en peso ($p= 0.01$), siendo mayor en aquellos pacientes homo- o heterocigotos para el alelo d3. Al comparar únicamente a los homocigotos (fl/fl vs d3/d3) también se identificó una diferencia en el IMC ($p=0.05$), el HOMA2-IR ($p=0.04$) y una tendencia a la significancia en el peso máximo ($p= 0.06$) y en los niveles de insulina en ayuno ($p= 0.08$), nuevamente siendo mayores en los pacientes homocigotos para el alelo d3 que en los heterocigotos fl/d3 y homocigotos para el alelo fl. No hubo diferencias significativas en la proporción de pacientes con niveles de IGF-1 por debajo del límite normal entre los grupos.

Conclusiones: Los pacientes con obesidad mórbida presentan una distribución de los diferentes genotipos del *GHR*, diferente a la que se había reportado en otras poblaciones, lo que hace sospechar una posible asociación entre el polimorfismo y la OB mórbida. El polimorfismo del exón 3 del *GHR* no produce una diferencia en la prevalencia de los componentes del síndrome metabólico en esta población. Sin embargo, se encontró que entre mayor cantidad de alelos d3 se tenga en el genotipo se tiene un mayor peso, IMC y HOMA2-IR, contrario a lo que se pensaría de acuerdo a la mayor actividad biológica del GHR conferida por el polimorfismo del exón 3. Múltiples fenómenos afectan la capacidad de señalización del receptor de GHR, por lo

que es posible que el estado proinflamatorio asociado a la obesidad, SM y otras circunstancias provoquen una “resistencia” local o tejido específica al efecto de la GH. Son necesarios más estudios básicos y clínicos para poder explicar estos hallazgos.

MARCO TEÓRICO

EL PROBLEMA DE LA OBESIDAD

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la obesidad como una acumulación anormal o excesiva de tejido adiposo que perjudica la salud. El índice de masa corporal (IMC) es una relación simple entre peso y la estatura definido como el peso de una persona en kg dividido entre su altura en metros al cuadrado (kg/m^2); es comúnmente utilizado para definir sobrepeso y obesidad. La OMS define a la obesidad como un IMC mayor o igual a 30 [1]. De acuerdo a la OMS, la obesidad a nivel mundial se duplicó desde 1980 a la fecha. Para el 2008 el 35% de la población mundial mayor a 20 años, tenía sobrepeso y 11% cursaba con obesidad. El 65% de la población mundial radica en países donde la obesidad mata más personas que el bajo peso [2].

En México, de acuerdo a lo reportado por la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2012, la prevalencia de sobrepeso y obesidad fue de 71.3% (sobrepeso 38.8% y obesidad 32.4%). La prevalencia de obesidad abdominal fue 74.0%, siendo mayor en mujeres (82.8%) que en hombres (64.5%). En los últimos 12 años se ha observado un incremento promedio anualizado de 1.3%, siendo éste mayor en el periodo 2000-2006 (2.1%) que en el periodo 2006-2012 (0.3%) [3].

En cuanto a la obesidad mórbida, definida como un IMC mayor o igual a 40, su prevalencia también ha ido en aumento; la encuesta ENSANUT 2012, reporta un 3% de la población dentro de este grupo [3]. Entre mayor sea el IMC, mayor es el riesgo de padecer comorbilidades, incluyendo diabetes, hipertensión, síndrome de apnea obstructiva del sueño, cáncer, dislipidemia, enfermedades cardiovasculares y muerte por cualquier causa. [4]

En un estudio colaborativo, se evaluó la relación entre el IMC y la mortalidad reportada en 57 estudios prospectivos con un total de 894 576 participantes, la mayoría realizados en Europa occidental y Norteamérica; se encontró que por cada 5 kg/m^2 por arriba de un IMC de 25, la mortalidad por cualquier causa se incrementaba

en un 30% (HR 1.29 [95% CI 1.27-1.32]). En este mismo estudio, el incremento en la mortalidad por enfermedad cardiovascular fue del 40% (HR 1.41 [1.37-1.45]), mientras que los riesgos relativos (HR) de mortalidad por diabetes, insuficiencia renal, insuficiencia hepática y cáncer fueron de 2.16 [1.89-2.46], 1.59 [1.27-1.99], 1.82 [1.59-2.09] y 1.10 [1.06-1.15] respectivamente. Con un IMC 30-35 kg/m² la sobrevida se reduce 2-4 años; con un IMC 40-45 kg/m² se reduce entre 8-10 años [5].

Ahora bien, los sujetos obesos en general son un grupo con mayor comorbilidad comparado con sujetos con IMC normal. Sin embargo ha sorprendido el hecho de que mientras algunos pacientes con obesidad claramente presentan complicaciones asociadas con un exceso en el tejido adiposo corporal, algunos otros, igualmente obesos, no muestran estas anomalías metabólicas a pesar de su exceso significativo de grasa [6]. Se ha descrito en la literatura médica, un subgrupo de individuos obesos al parecer resistente al desarrollo de alteraciones metabólicas asociadas con la obesidad. A estos sujetos se les llama obesos metabólicamente sanos ya que a pesar de tener un exceso de tejido adiposo, muestran un perfil metabólico favorable, caracterizado por altos niveles de sensibilidad a la insulina, sin desarrollo de hipertensión, perfil de lípidos no aterogénico, sin incremento en citocinas proinflamatorias y pruebas de función hepática normales [7,8].

Los mecanismos que pudieran explicar estas variaciones metabólicas entre individuos obesos, no están bien entendidos. Evidencia preliminar sugiere que están asociadas al peso al nacimiento, tamaño del adipocito, patrones de expresión de genes que tienen que ver con la diferenciación del adipocito y sobretodo diferencias en la distribución corporal del tejido adiposo, siendo de mayor importancia la acumulación de tejido adiposo visceral [8,9].

Dado que la hormona de crecimiento (GH) juega un papel importante en la distribución de tejido adiposo, se especula que podría participar en el desarrollo de estas diferencias metabólicas entre individuos obesos.

EL SÍNDROME METABÓLICO Y LA OBESIDAD

A pesar del conflicto que ha habido sobre el concepto del síndrome metabólico y la inexistencia de una definición universal, esta entidad describe una constelación de

anormalidades metabólicas, incluyendo la obesidad abdominal, que originalmente fueron descritas para caracterizar a los individuos con alto riesgo cardiovascular [10].

Varios grupos han propuesto diferentes definiciones de síndrome metabólico, entre ellos, la Organización Mundial de la Salud (OMS), el Programa Nacional de Educación sobre Colesterol- Tratamiento para adultos Panel III (NCEP-ATP III), así como La Federación Internacional de Diabetes (IDF) [11,12,13].

Para este estudio se considerarán los criterios consenso establecidos por la International Diabetes Federation; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity en el 2009; creados con el objetivo de establecer una herramienta diagnóstica que pudiera ser utilizada a nivel mundial tanto para la práctica clínica como en investigación [14]. La diferencia fundamental con los criterios establecidos por el ATP III y los últimos criterios de la IDF del 2005, es que no considera ninguno de los 5 criterios como obligatorio y que subraya la necesidad de adoptar diferentes puntos de corte de circunferencia de cintura dependiendo del grupo étnico al que pertenezcan los pacientes [14].

Las cinco variables de escrutinio establecidas por la IDF – CONSENSO 2009 para identificar a aquellos con síndrome metabólico son:

1. Circunferencia de cintura incrementada. De acuerdo a etnia. Centro y sudamericanos Hombres >90 cm y mujeres > 80 cm.
2. Niveles circulantes de triglicéridos > 150 mg/dl. O en tratamiento para triglicéridos elevados.
3. Niveles de colesterol de alta densidad (HDL) <40 mg/dl en caso de hombres y < 50 mg/dl en el caso de mujeres.
4. Presión arterial sistólica mayor de 130 mmHg, presión arterial diastólica > 85 mmHg o bajo tratamiento antihipertensivo.
5. Glucosa en ayunas mayor o igual a 100 mg/dl o bajo tratamiento con un agente hipoglicemiante.

El diagnóstico se establece cuando se cumplen 3 o más de los criterios [14].

La IDF utiliza dentro de sus criterios el índice cintura cadera (circunferencia cintura/ circunferencia de cadera), pues en varios estudios retrospectivos se ha

encontrado una asociación significativa con el desarrollo de eventos cardiovasculares [15]. El incremento en el tejido adiposo visceral se ha asociado a un incremento en el riesgo cardiovascular, cuando el índice cintura cadera es mayor de 0.90 en hombres y de 0.80 en mujeres [15]. Por otra parte el índice cintura-talla también se ha identificado como un marcador de riesgo cardiovascular. En un metaanálisis de 22 estudios prospectivos, que incluyó participantes caucásicos, asiáticos y centroamericanos, se encontró que un índice cintura-talla mayor a 0.5 era un mejor predictor que el IMC y la circunferencia de cintura, para desarrollo de diabetes y enfermedades cardiovasculares [16, 17].

LA HORMONA DE CRECIMIENTO

La hormona del crecimiento (GH) es una hormona fundamentalmente anabólica producida por las células somatotrópicas de la hipófisis anterior [18]. La isoforma predominante de 22 kD se secreta en forma pulsátil, bajo el control positivo de la hormona liberadora de GH (GHRH) y negativo de la somatostatina, ambas producidas en el hipotálamo [18-20]. La glucosa regula la secreción de GH mediante el aumento (hiperglucemia) o disminución (hipoglucemia) del tono somatostatinérgico [19]; de hecho, la GH es una de las principales hormonas contrareguladoras del efecto de la insulina [19]. Aminoácidos como la L-dopa y la arginina y el ejercicio estimulan la secreción de GH [19]. Aproximadamente la mitad de la GH circulante se encuentra unida a una proteína ligadora de alta afinidad (GHBP), la cual cumple la función de amortiguar los pulsos secretores [18,21]. La GH interactúa con receptores específicos localizados en todos los tejidos, generando factor de crecimiento insulinoide tipo 1 (IGF-1), que además de ser el responsable de los efectos somáticos de esta hormona, participa en asas de retroalimentación negativa tanto a nivel hipofisario como hipotalámico [22-23]. El IGF-1 es un péptido relacionado a la insulina, que circula en plasma unido a seis proteínas transportadoras, producidas en el hígado conocidas como proteínas fijadoras de factor de crecimiento insulinoide (IGFBP) [23-24]. La IGFBP3 es la más importante de éstas y forma un compuesto heterotrimérico formado por el IGF-1, la IGFBP3 y una unidad ácido-lábil; su función es regular la acción del IGF-1 en sus tejidos blanco [23-24]. Los niveles de IGF-1 se incrementan durante la pubertad, lo cual coincide con la aceleración del crecimiento somático y declinan con

el envejecimiento [23-24]. La desnutrición, la diabetes tipo 1 descontrolada, el hipotiroidismo, la insuficiencia renal y hepática, resultan en una disminución en las concentraciones de IGF-1 [23].

EL RECEPTOR DE HORMONA DEL CRECIMIENTO

El receptor de GH (GHR) es una glicoproteína de 620 aminoácidos, de aproximadamente 130 kDa, pertenece a la superfamilia de receptores de citocinas de clase I [18,25]. Estos son receptores de una sola cadena, que contienen una porción extracelular, una región transmembrana hidrofóbica única y un dominio intracelular [18, 25]. El gen del GHR se localiza en el brazo corto del cromosoma 5 (p13.1-p12) y está constituido por 9 exones; el exón 2 codifica para el péptido señal, los exones 3-7 codifican la porción extracelular, donde se une el ligando (la GH), el exón 8 codifica la porción transmembrana y los exones 9-10 el dominio intracelular, responsable de la señalización [18,26-28]. El GHR se encuentra formando dímeros en la membrana celular [22]. La GH posee dos diferentes sitios de unión específicos, que interactúan con el dímero del GHR, lo cual produce cambios conformacionales que a su vez dan lugar al reclutamiento de dos moléculas de la cinasa JAK2 (del inglés, Janus associated kinase), con lo que se induce la fosforilación de STAT5b (del inglés signal transducers and activators of transcription o transductores de señal y activadores de la transcripción) [22,29-30]. STAT5b fosforilado activa la transcripción de varios genes, entre ellos, el del IGF-1, pero también de diversas enzimas involucradas en el metabolismo intermedio y de los lípidos [31]. La distribución tisular de GHR es ubicua, si bien el hígado es el órgano con la mayor densidad [32,33].

ACCIONES METABÓLICAS DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO

La GH funciona como una hormona metabólica importante en el adulto al optimizar la composición corporal, función física, regular la energía y los sustratos del metabolismo. Las acciones metabólicas de la GH interactúan con las de la insulina en el control del tejido adiposo, la glucosa y las proteínas durante el estado de ayuno y posprandial [34].

La GH promueve la lipólisis y previene la lipogénesis; junto con el IGF-1 juegan un papel importante en la proliferación de los preadipocitos, su diferenciación y senescencia [35]. Efectos indirectos de la GH incrementan la oxidación de lípidos, reducen el tejido adiposo visceral y posiblemente incrementan la actividad física voluntaria [35].

La GH es un importante regulador del metabolismo hepático de lípidos, aumenta la expresión del receptor hepático de lipoproteínas de baja densidad (LDL) e incrementa la síntesis de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), disminuyendo los niveles circulantes de LDL [35]. La señalización del GHR es importante para prevenir la esteatosis hepática, ya que se ha visto un incremento de esteatohepatitis no alcohólica en pacientes con deficiencia de GH [36].

Los efectos sobre el metabolismo de la glucosa están balanceados entre efectos directos y efectos indirectos. De forma directa produce un efecto inhibitorio sobre la señalización de la insulina, reduciendo la sensibilidad a la misma; además incrementa la producción hepática de glucosa [35]. Sin embargo, de forma indirecta mejora la captación de glucosa mediada por insulina en el músculo, incrementa la masa muscular e incrementa la secreción de IGF-1 por el hígado [35]. La GH incrementa la secreción de insulina por las células pancreáticas beta. La insulina liberada directamente sobre el sistema porta regula la respuesta hepática a la GH al regular la cantidad de receptores de GH; hay un incremento de receptores con niveles bajos de insulina y una disminución con niveles altos [35].

POLIMORFISMOS E ISOFORMAS DEL RECEPTOR DE HORMONA DE CRECIMIENTO

Diferentes versiones de una secuencia particular de DNA en una localización cromosómica particular (locus) son llamadas alelos. Cuando estos alelos son tan comunes que pueden encontrarse en más del 1% de los cromosomas de la población general, constituyen lo que se conoce como polimorfismo genético [37].

Una isoforma, es una de las distintas formas que puede adoptar una proteína, éstas pueden ser generadas por genes relacionados, por el empalme alternativo de un mismo gen y por polimorfismos [37]. Se han identificado varias isoformas del GHR, una de éstas carece de una secuencia de 22 aminoácidos codificados por el exon 3

[32,38,39]. Hasta hace algunos años, se pensaba que la presencia de isoformas de GHR con y sin exón 3 (GHR-fl -full length-, GHR-d3 -deleted 3) era el resultado de empalme alternativo del RNAm inmaduro y que la expresión de una u otra dependía de factores metabólicos locales o que ocurría de manera tejido-específica [32,38,39]. Sin embargo, se ha demostrado que la existencia de estas dos isoformas es la consecuencia de una deleción dentro del marco de lectura derivada de un evento recombinatorio intracromosómico entre dos retroelementos (secuencias de DNA derivadas de retrovirus) que flanquean el exón 3 ocurrido tardíamente en la evolución de los primates [40]. La recombinación de estos retroelementos durante la división celular resulta en una deleción genómica de 2.7 kb que abarca al exón, dando origen al polimorfismo del exón 3 del *GHR* [41]. En general, alrededor del 50% de la población mundial es homocigota para el genotipo que contiene al exón 3 (fl/fl), el 10-20% es homocigota para el genotipo que no lo contiene (d3/d3) y un 30-40% son heterocigotos (fl/d3) [40]. La descripción de esta distribución de las variantes del genotipo se ha reportado en distintas poblaciones, con ligeras variaciones. Mercado [42], reportó en 175 adultos sanos mexicanos utilizados como grupo control, la proporción de los 3 diferentes genotipos fue 53% para fl/fl, 17% d3/d3 y 30% fl/d3. Este grupo de sujetos estaba constituido por donadores de sangre, por lo que sus edades oscilaban entre 18 y 65 años, con un peso mayor a 50 kg, sanos, sin consumo de medicamento alguno, sin antecedentes de tatuajes o perforaciones. De forma específica no pueden ser donadores aquellos pacientes con hipertensión arterial, diabetes mellitus descontrolada, epilepsia, dislipidemia o enfermedades del corazón [43].

SIGNIFICADO FUNCIONAL DE LA DELECIÓN DEL EXÓN 3

El significado funcional de la deleción del exón 3 no se conoce con claridad. A través de un estudio experimental que consistió en la transfección de células COS-7 con el cDNA del GHR-d3 a través de un vector de expresión eucariótica. Se demostró que la isoforma generada por un gen con deleción del exón 3, tiene la misma capacidad de expresarse en la membrana celular, que aquellos receptores completos. De la misma forma demostró tener la misma afinidad hacia ligandos conocidos del GHR (GH 22K, GH20 K, GHV, lactógeno placentario, PRL ovina), por lo que no pareciera existir una

diferencia, por lo menos en términos de expresión o afinidad, con respecto al receptor nativo [39].

En cuanto a la señalización, mediante estudios de transfección, Dos Santos et al [44] , demostró que la transducción de la señal de la GH a través de un receptor GHR-d3 (sin los aa codificados por el exón 3), ya sea formando homo o heterodímeros, fue 30% mayor que la señalización a través de un receptor nativo (GHR-fl), esto al medir las concentraciones de STAT5b fosforilada generadas con cada uno de los receptores al exponerlos a GH. Lo que hace pensar en una señalización más eficaz a través del GHR-d3. Los mecanismos moleculares que explican la mayor bioactividad de la isoforma GHR-d3 aún no se conocen.

IMPACTO CLÍNICO DE LA DELECIÓN DEL EXÓN 3

Se ha reportado que pacientes con deficiencia de GH, con talla baja diagnosticados inicialmente como pequeños para edad gestacional, con diagnóstico de talla baja idiopática y con síndrome de Turner; que han sido tratados con GH recombinante humana exógena; aquellos que son homo- o heterocigotos para el alelo d3, presentan una mejor respuesta en términos del incremento en la velocidad de crecimiento y de talla final [44-47], lo que sugiere una mayor bioactividad de la isoforma GHR-d3. Sin embargo, no todos han podido confirmar estos hallazgos en pacientes con deficiencia de GH o pequeños para edad gestacional [48-50].

A pesar de haberse llevado a cabo varios estudios con el objetivo de dilucidar el papel de este polimorfismo del GHR en el crecimiento y respuesta a la administración de hormona de crecimiento, los resultados aún son controversiales. Wassenaar et al, llevaron a cabo un metaanálisis, donde incluyeron 16 estudios, concluyendo que la presencia de al menos un alelo d3, resultaba asociado a una mayor altura basal en pacientes con deficiencia de GH; así como una mejor respuesta a la administración de GH recombinante en términos de talla final y velocidad de crecimiento [51].

El efecto del polimorfismo del exón 3 del GHR también se ha estudiado en adultos con deficiencia de hormona de crecimiento que han sido tratados con GH recombinante. Se ha visto que aquellos con por lo menos un alelo d3, tienen una mejor

respuesta a la administración de rhGH, manifestada por lograr niveles más altos de IGF-1 y un perfil de lípidos menos aterogénico (disminución de LDL, incremento HDL), en comparación de aquellos con genotipo fl/fl [52-54]. Sin embargo estas observaciones no fueron confirmadas en todos los estudios [55-56].

Por otra parte, en estados de exceso de GH como la acromegalia, los pacientes con el genotipo que carece del exón 3 (fl/d3 y d3/d3) presentan cuadros clínicos más severos, con mayor prevalencia de diabetes y artropatía y son más resistentes al tratamiento médico [42, 57].

Estos ejemplos hacen pensar que la delección del exón 3 a nivel genómico, produce una diferencia funcional o biológica entre las 2 isoformas que genera. Al parecer no produce un cambio en la afinidad del receptor, por lo que esta diferencia puede provenir de alteraciones producidas en la dimerización mediada por ligando, transducción de la señal o reciclaje del receptor. Lo anterior finalmente conlleva a un mayor efecto biológico de la GH en aquellos que poseen por lo menos un alelo d3 en el genotipo del *GHR* [42].

OBESIDAD Y EJE SOMATOTROPO (GH)

Tanto la secreción como la acción de GH se encuentran alteradas en los pacientes con obesidad; incluso, la interpretación de las pruebas de estimulación o supresión de GH en personas con sobrepeso u obesidad requiere de criterios diferentes a los usados en las personas no obesas [35]. Los pulsos secretorios espontáneos de GH se encuentran disminuidos en amplitud [35], así como la respuesta a distintos secretagogos [35]. A pesar de que los niveles de GH están disminuidos en los pacientes con obesidad idiopática, las concentraciones de IGF-1 son normales, probablemente como consecuencia de un aumento en la liberación hepática de IGF-1 [35]. La GH juega un papel primordial en la biología del tejido adiposo en mamíferos [35].

El GHR se expresa en abundancia tanto en la grasa subcutánea como visceral y la acción de la GH es fundamental en la adipogénesis, lipogénesis y lipólisis [32]. Los ratones transgénicos en los cuales se ha inactivado el gen del GHR (GHRKO) son obesos y tienen un incremento importante de la masa adiposa, particularmente la

subcutánea, así como niveles elevados de resistina, leptina y adiponectina [58-59]. Por otra parte, los ratones transgénicos en los que el gen de GHR es inactivado específicamente sólo en el tejido adiposo (FaGHRKO), son también obesos con un incremento importante en la cantidad y tamaño de adipocitos tanto en la grasa visceral como la subcutánea y también tienen niveles elevados de leptina [58-59]. Investigaciones recientes han demostrado que el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), los glucocorticoides y el factor inducible por hipoxia (HIF-1 α) modifican la transcripción del gen del GHR en adipocitos humanos mediante su interacción con diferentes elementos de respuesta en el genoma [60, 61, 62]. Mientras que el TNF- α y los glucocorticoides disminuyen significativamente la transcripción del gen del GHR, el HIF-1 α la incrementa [60, 61, 62]. De acuerdo a estos estudios, citocinas pro-inflamatorias como el TNF- α , que generalmente se encuentran elevadas tanto en la obesidad como en el síndrome metabólico, disminuyen la disponibilidad del GHR en el tejido adiposo, lo cual explica el hecho de que en estas condiciones la lipólisis se encuentre disminuida [63].

Los estados de deficiencia de GH se caracterizan por un aumento en la grasa visceral, que se ha relacionado con el aumento en el riesgo cardiovascular de los pacientes que la padecen [64]; el tratamiento con GH recombinante humana es eficaz en reducir la masa adiposa en estos casos particulares [65]. Sin embargo, en la obesidad idiopática, el tratamiento con GH exógena es incapaz de reducir la masa del tejido adiposo, lo cual sugiere un estado de resistencia tisular selectiva a la acción de esta hormona [66]. Estudios recientes han documentado que el RNAm del GHR se encuentra drásticamente disminuido en sujetos con obesidad mórbida en comparación con personas no obesas [67]. Una posible explicación fisiopatológica de este fenómeno es el efecto de citocinas inflamatorias como el TNF- α en reducir la tasa de transcripción del gen de GHR en el tejido adiposo [63]. En la obesidad idiopática no solamente se encuentra disminuida la expresión de GHR sino que existe una mayor expresión de la isoforma truncada del receptor (trGHR), que funciona de manera dominante negativa en lo que respecta a la acción biológica de la GH en este tejido [67].

OBESIDAD Y EL POLIMORFISMO DEL EXÓN 3 DEL GHR

El impacto metabólico de las isoformas (GHR-fl y GHR-d3) generadas por las variantes del genotipo del *GHR* (fl/fl, fl/d3 y d3/d3) no se ha estudiado sistemáticamente. Sabemos que los individuos que tienen GHR-d3 pueden ser relativamente más sensibles a la GH administrada exógenamente y que los que padecen acromegalia parecen tener una evolución más mórbida [42, 44-47, 51,57].

En un esfuerzo por descifrar el papel que juega en el metabolismo las isoformas del GHR, se han llevado a cabo varios estudios; Strawbridge et al [68], investigó la frecuencia de los genotipos del *GHR* fl/fl, d3/d3 y fl/d3 en pacientes con curvas de tolerancia a la glucosa normales, alteradas y con diabetes mellitus tipo 2 (DM2), encontró una menor frecuencia del alelo d3/d3 y fl/d3 en los pacientes con DM2; curiosamente en aquellos pacientes con DM2 que fueron heterocigotos (fl/d3) u homocigotos (d3/d3) para la delección del exón 3, presentaban un IMC mayor y niveles más elevados de proteína C reactiva, que aquellos diabéticos homocigotos (fl/fl).

La presencia de por lo menos un alelo d3 se ha asociado con una mayor secreción de insulina para un grado dado de sensibilidad a la insulina, con un índice de disposición más alto y niveles más altos de triglicéridos en niños y adolescentes sanos durante la pubertad. Por lo tanto las variantes del genotipo del GHR que incluyan un alelo d3, pueden jugar un papel importante en incrementar la secreción de insulina ante un reto de glucosa, por lo menos en estados de alta secreción de insulina endógena como es la pubertad [69].

De forma contraria a lo reportado en pacientes con diabetes mellitus tipo 2, se encontró que en una población de niños obesos, la presencia de por lo menos un alelo d3 se asociaba a un IMC menor. Además se encontró que los niños obesos con por lo menos un alelo d3 en su genotipo, tenían niveles de insulina en ayuno, HOMA, índices de sensibilidad a la insulina, colesterol y triglicéridos menores a los reportados para niños homocigotos para el alelo fl (fl/fl) [69]. Se ha reportado una mayor prevalencia de por lo menos un alelo d3 en niños con obesidad que en niños con IMC normal (35.2% vs 22.3%) [70].

La presencia del genotipo GHR-d3 también se ha asociado con una mayor prevalencia de hipertensión, en pacientes que han tenido un evento vascular cerebral,

sobretos en mujeres [71]. Aunque también se le ha asociado con niveles más altos de HDL en población india [72].

Recientemente, Martins y colaboradores [73] llevaron a cabo la genotipificación del polimorfismo del *GHR* exón 3 de 385 adultos jóvenes y no encontraron una asociación significativa entre el genotipo y la prevalencia de hipertensión, obesidad, diabetes, hipercolesterolemia o trombosis. De la misma manera Audi, et al [74], en pacientes que fueron pequeños para edad gestacional, no encontró asociación entre el genotipo del *GHR-fl/d3* y marcadores de sensibilidad a la insulina.

Por otra parte Glad y colaboradores [75], genotipificaron miembros de 2 poblaciones Suizas, integrando un total de 1135 sujetos. Al contrario de lo que esperaban, encontraron que los homocigotos para d3 (*GHR d3/d3*) tenían un mayor índice cintura-cadera, mayor circunferencia de cintura, mayor peso corporal y mayor IMC; siendo los primeros en reportar una asociación del genotipo *GHR-d3* con marcadores de mayor riesgo metabólico. Lo que refleja la complejidad de la relación entre la sensibilidad a GH, secreción de GH y otras adaptaciones metabólicas que ocurren en individuos con un eje GH-IGF-1 normal.

Lo anterior proporciona evidencia de una diferencia funcional o biológica entre aquellos sujetos con genotipo *fl/fl*, es decir ambos alelos contienen el exón 3; y aquellos cuyo genotipo contiene al menos un alelo d3 (ausencia de exón 3 en el gen). Al parecer estos genotipos presentan diferencias metabólicas, sobretodo en el metabolismo de la glucosa y en el de los lípidos, que los hacen más propensos o no a desarrollar componentes del síndrome metabólico. Esta propensión aún no está bien definida, puesto que los hallazgos entre los estudios son discordantes.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La obesidad es un problema de salud de proporciones pandémicas. En México, de acuerdo a lo reportado por la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2012, la prevalencia de obesidad fue de 32.4% [3]. La prevalencia e incidencia de la obesidad y morbilidades asociadas como diabetes, hipertensión, dislipidemia y el síndrome metabólico en conjunto, van en aumento tanto en hombres como en

mujeres y en todos los grupos de edad. Un mayor índice de masa corporal se ha asociado con mayor morbilidad y mortalidad.

Dentro del grupo de pacientes con obesidad, existen algunos de ellos que a pesar de tener un incremento en el tejido adiposo, no presentan las anormalidades metabólicas (hipertensión, resistencia a la insulina, perfil de lípidos aterogénico) que clásicamente se han asociado con la obesidad. La razón de estas diferencias es poco comprendida, sin embargo se cree que la distribución del tejido adiposo juega un papel importante en el establecimiento de estas diferencias metabólicas.

La GH participa de forma activa en el metabolismo de lípidos, carbohidratos y proteínas. De igual forma participa en la diferenciación y distribución del tejido adiposo. Existen isoformas del GHR en las que se incluyen o excluyen 22 aminoácidos codificados por el exón 3 (GHR_{fl} y GHR_{d3}). Se cuenta con evidencia experimental de que la señalización del GHR a través de la isoforma GHR_{d3}, es más eficaz. Hasta ahora la información no es uniforme, sin embargo, es claro que hay una diferencia metabólica entre aquellos individuos con el genotipo *fl/fl* y aquellos con *fl/d3* o *d3/d3*.

El papel del polimorfismo del exón 3 del *GHR* no ha sido estudiado en adultos con obesidad mórbida. Es probable que existan efectos biológicos diferentes mediados por las isoformas del GHR codificadas por los genotipos *fl/fl*, *fl/d3* o *d3/d3* que puedan explicar, por lo menos parcialmente, la participación de la GH en esta patología y las diferencias metabólicas entre los mismos pacientes obesos.

JUSTIFICACIÓN

Siendo un problema de salud a nivel mundial, entender parte de la fisiopatología de la obesidad resulta importante. Hasta ahora la frecuencia y el papel del polimorfismo del exón 3 del *GHR* en el perfil metabólico de pacientes adultos con obesidad mórbida no se ha estudiado.

Los pacientes con obesidad mórbida pueden presentar patrones metabólicos muy diferentes y no existe una razón conocida para este fenómeno. En este protocolo se explora una posible explicación: los polimorfismos del *GHR* que carecen del exón 3 producen receptores que señalizan de una manera más eficiente y probablemente confieran patrones metabólicos menos alterados. Este conocimiento contribuiría a un mejor entendimiento de las características y los eventos fisiopatológicos que ocurren en la obesidad mórbida y podría resultar eventualmente, en la capacidad de identificar de manera temprana a los pacientes con obesidad mórbida que presenten un patrón metabólico de mayor riesgo.

PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

Pregunta Principal

En los pacientes con obesidad mórbida de la Clínica de Obesidad del HE CMN Siglo XXI:

1. ¿Cuál es la frecuencia de los genotipos del *GHR* (fl/fl, fl/d3, d3/d3)?

Preguntas Secundarias

En los pacientes con obesidad mórbida de la Clínica de Obesidad del HE CMN Siglo XXI:

1. ¿Existe asociación entre el polimorfismo del exón 3 del *GHR* y la frecuencia de síndrome metabólico o la frecuencia de sus componentes?
2. ¿Existe asociación entre el polimorfismo del exón 3 del *GHR* y algunos índices de adiposidad (IMC, circunferencia de cintura, ICC, BAI)?

HIPÓTESIS

Hipótesis principal

En los pacientes con obesidad mórbida de la Clínica de Obesidad del HE CMN siglo XXI:

1. La frecuencia del genotipo con al menos un alelo d3 será mayor al 47% [42].

Hipótesis secundarias

1. Existe una asociación entre el polimorfismo del exón 3 del *GHR* y una **menor** frecuencia del síndrome metabólico y sus componentes.
2. Existe una asociación entre el polimorfismo del exón 3 del *GHR* y **menores** índices de adiposidad (IMC, circunferencia de cintura, ICC, BAI).

NOTA: Se realizó una revisión de la literatura en busca de información que nos permitiera establecer una magnitud de la asociación, sin embargo, este polimorfismo del *GHR* no se ha estudiado específicamente en pacientes con obesidad mórbida. La mayor aproximación constituye el estudio llevado a cabo por Gao et al. [70] en niños obesos chinos, sin embargo, las variables de desenlace analizadas son diferentes. Se decidió no establecer magnitud, por falta de información en la literatura.

OBJETIVOS DEL ESTUDIO

Objetivo Principal

En los pacientes con obesidad mórbida de la Clínica de Obesidad del HE CMN Siglo XXI:

1. Determinar la frecuencia de los genotipos del *GHR* (fl/fl, fl/d3, d3/d3) mediante genotipificación por PCR punto final.

Objetivos Secundarios

1. Describir y comparar la frecuencia de síndrome metabólico* y cada uno de sus componentes entre los genotipos del *GHR*.
2. Describir y comparar los índices de adiposidad (IMC, circunferencia de cintura, ICC, BAI)* entre los diferentes genotipos.

*Referirse a definición de variables, para una definición operacional más detallada de éstas variables.

DISEÑO DEL ESTUDIO

- a. Por la maniobra del investigador: observacional
- b. Por el número de mediciones: transversal
- c. Por la recolección de datos: prolectivo
- d. Por la dirección: sin dirección

- e. Por el diseño: Transversal comparativo

MÉTODOS

Población y lugar de estudio

Casos consecutivos de pacientes mayores de 18 años, mexicanos, con diagnóstico de obesidad mórbida, que pertenezcan a la preconsulta de la Clínica de Obesidad del servicio de Endocrinología del Hospital de Especialidades de CMN Siglo XXI.

Elegibilidad de los pacientes

Criterios de inclusión:

- Hombres o mujeres mayores de 18 años.
- Con un Índice de masa corporal $> 40 \text{ kg/m}^2$.
- Mexicanos (definido como aquellos individuos nacidos en territorio mexicano, con apellido derivado del español, con al menos 3 generaciones de ascendientes nacidos en México [76], información obtenida en interrogatorio inicial para considerarse candidato a ingreso al estudio).
- Pertenecientes a la preconsulta de la clínica de obesidad del Hospital de Especialidades de CMN siglo XXI.
- Que no hubieran estado bajo tratamiento para pérdida de peso en los últimos 6 meses.
- Que acepten participar en el estudio.

Criterios de no inclusión:

- Pacientes que estén recibiendo tratamientos que puedan afectar al sistema somatotropo: agonistas de somatostatina, agonistas dopaminérgicos, GH humana recombinante
- Pacientes con cirugía hipofisaria en los últimos 6 meses o radiación hipofisaria en los 10 años previos.

Criterios de eliminación:

- Aquellos que retiren el consentimiento informado.

- En los que no se puedan obtener muestras por dificultad técnica.
- Cuyas muestras no puedan ser analizadas correctamente o que se dañen durante su obtención, almacenamiento o manipulación.
- Valores de TSH > 3.5 $\mu\text{UI/L}$.

Tamaño de muestra

Tomando en consideración lo reportado por Mercado [42] en un grupo de 175 pacientes mexicanos, sanos, tomados como grupo de referencia en su estudio, se encontraron las siguientes frecuencias genotípicas:

$$f(\text{fl fl}) = 93/175 = 53\%$$

$$f(\text{fl/d3}) = 52/175 = 30\%$$

$$f(\text{d3/d3}) = 30/175 = 17\%$$

Se realizó el cálculo con la fórmula de prevalencia para una población finita:

$$n = \frac{N * Z_{\alpha}^2 * p * q}{d^2 * (N - 1) + Z_{\alpha}^2 * p * q}$$

Donde:

N= 400 pacientes (correspondientes a los 350 pacientes de la clínica de obesidad y un cálculo de 50 pacientes nuevos en 1 año, ya que ingresan a la clínica alrededor de 4 pacientes al mes).

Z α = 1.96 (IC 95%)

p= 0.47 contengan alelo d3

q= 1-p = 0.53

d= 0.05

Se calculó un tamaño de muestra de 196 sujetos, añadiendo 20% de pérdidas se estimó una muestra total de 235 sujetos.

NOTA: Debido a que no contamos con la distribución de los genotipos (fl/fl, fl/d3 y d3/d3) en sujetos mexicanos con obesidad mórbida, se propone este ejercicio de cálculo de tamaño muestral para lograr una distribución de los genotipos parecida a la reportada en sujetos mexicanos sanos [42]. Se decidió utilizar este cálculo de tamaño de muestra para lograr una muestra representativa de los 3 grupos (fl/fl, fl/d3, d3/d3).

Por otro lado, no existe información reportada que permita estimar el tamaño de la muestra necesario para identificar diferencias en la presencia de síndrome metabólico (y sus componentes) o de los índices de adiposidad entre los genotipos de *GHR* para calcular tamaño de muestra para los objetivos secundarios.

Muestreo

- Tipo de muestreo: no probabilístico de casos consecutivos de abril 2014-
Noviembre 2015.

Definición de variables

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Escala de Medición
Variable Independiente				
Genotipo del GHR	Par de alelos que conforman la constitución genética de un individuo para el locus correspondiente al gen del receptor de hormona de crecimiento [37].	Par de alelos correspondientes al locus del gen del receptor de hormona de crecimiento, obtenido por PCR punto final a partir de DNA extraído de leucocitos de sangre periférica. Para la primera pregunta de investigación se considerará cada uno de los genotipos (fl/fl, fl/d3 y d3/d3).	Cualitativa	Politómica: 1: fl/fl 2: fl/d3 3: d3/d3
VARIABLES DEPENDIENTES				
Síndrome metabólico	Se trata de una constelación de factores fisiológicos, bioquímicos, clínicos y metabólicos que directamente incrementan el riesgo de enfermedad cardiovascular aterosclerótica, diabetes mellitus tipo 2 y la mortalidad por cualquier causa [77].	El diagnóstico de síndrome metabólico se realiza cuando están presentes en un individuo tres o más de los siguientes determinantes de riesgo → circunferencia de cintura mayor de 90 cm en hombres y >80 cm en mujeres. Triglicéridos > 150 mg/dl. Colesterol HDL < 40 mg/dl en hombres y < 50 mg/dl en mujeres. Presión arterial sistólica mayor de 130 mmHg, presión arterial diastólica > 85 mmHg o bajo tratamiento antihipertensivo. Glucosa en ayunas > o igual a 100 mg/dl o bajo tratamiento hipoglucemiante [14].	Cualitativa	Nominal dicotómica 0: Ausente 1: Presente
Hipertrigliceridemia	Condición en la cual los niveles de triglicéridos se encuentran incrementados, representando un incremento del riesgo cardiovascular. Se define hipertrigliceridemia a un nivel de triglicéridos mayor o igual a 150 mg/dl o el uso de tratamiento farmacológico utilizado para disminuir los niveles de triglicéridos [78].	Presencia de un nivel de triglicéridos mayor o igual a 150 mg/dl O el uso de tratamiento farmacológico utilizado para disminuir los niveles de triglicéridos (fibratos, ácido nicotínico) [14].	Cualitativa	Nominal dicotómica: 0 Ausente 1 Presente
Hipoalfalipoproteinaemia	Disminución de los niveles de lipoproteínas de alta densidad. Definido como niveles de colesterol HDL menores a 40 mg/dl para hombres y menores a 50 mg/dl para mujeres [79].	Presencia niveles de colesterol HDL menores a 40 mg/dl para hombres y menores a 50 mg/dl para mujeres [14].	Cualitativa	Nominal dicotómica: 0 Ausente 1 Presente
Hipertensión arterial sistémica	Enfermedad crónica caracterizada por un incremento continuo en las presión que la sangre ejerce sobre las paredes de las arterias.	Tensión arterial sistólica mayor o igual a 130 o tensión arterial diastólica mayor a 85 o encontrarse bajo tratamiento antihipertensivo. [14]. Al momento de llevar a cabo valoración inicial para ingreso a protocolo. En caso de tener una tensión arterial sistólica >130 pero	Cualitativa	Nominal Dicotómica 0 Ausente 1 Presente

		<150 mmHg y una TAD >85 pero < 100 mmHg, se revisará el expediente o carnet de citas en busca de otras mediciones de TA para confirmar o descartar diagnóstico.		
Alteración en el metabolismo de los carbohidratos	Categorías de riesgo incrementado para diabetes o diagnóstico de diabetes.	Presencia de niveles de glucosa en ayuno mayores a 100 mg/dl o estar recibiendo tratamiento para intolerancia a carbohidratos o diabetes [14].	Cualitativa	Nominal dicotómica: 0 Ausente 1 Presente
Índice de Masa corporal	Medida de asociación entre el peso y la talla de un individuo.	IMC= peso/(talla) ² . Peso medido en kilogramos y talla en metros. Ambas mediciones se evaluarán el día en que se lleve a cabo la obtención de datos generales.	Cuantitativa	continua (Kg/m ²)
Índice cintura cadera	Razón entre la circunferencia de la cintura entre la circunferencia de la cadera (definición conceptual obtenida de términos MeSH, disponible en www.ncbi.nlm.gov/mesh)	Razón entre la circunferencia de cintura entre la circunferencia de cadera, medidas por el personal de enfermería el día del llenado de la hoja de datos.	Cuantitativa	Continua
Índice cintura Talla	Razón entre la circunferencia de cintura y la altura (definición conceptual obtenida de términos MeSH, disponible en www.ncbi.nlm.gov/mesh/)	Razón entre la circunferencia de cintura medida en centímetros entre la altura medida en cm, determinadas por el personal de enfermería el día del llenado de la hoja de datos.	Cuantitativa	Continua
Índice de adiposidad corporal (BAI)	Parámetro alternativo al IMC utilizado para la estimación del % de grasa corporal en hombres y mujeres adultos sin utilizar corrección numérica.	BAI= (cadera / altura ^{1.5})-18 [80]	Cuantitativa	Continua
VARIABLES DESCRIPTORAS				
Peso	Medida de la fuerza gravitatoria que actúa sobre un objeto [81].	Medida obtenida al pesar al paciente en báscula Toledo 250 kg O.S., posterior a haberse retirado los zapatos y sólo con ropa ligera.	Cuantitativa continua	Continua (kg)
Talla	Distancia vertical de un cuerpo respecto a la tierra o a cualquier otra superficie tomada como referencia [82].	Distancia medida de los pies al vertex con estadímetro.	Cuantitativa continua	Continua (m)
Circunferencia de cintura	Perímetro alrededor del abdomen medido a la altura de la cicatriz umbilical.	Distancia alrededor del abdomen medido en sujeto de pie a la altura de la cicatriz umbilical, el día en que se lleve a cabo el llenado de hoja de recolección de datos. Medición llevada a cabo con cinta métrica de fibra de vidrio, inextensible, graduada	Cuantitativa continua	Continua (cm)

		en cm y sensible en mm, Hergom.		
Circunferencia de cadera	Perímetro medido a la altura del trocánter mayor del fémur.	Perímetro medido a la altura del trocánter mayor del fémur, el día en que se lleve a cabo el llenado de hoja de recolección de datos. Medición llevada a cabo por personal de enfermería, con cinta métrica de fibra de vidrio, inextensible, graduada en cm y sensible en mm, Hergom.	Cuantitativa continua	Continua (cm)
Nivel de Triglicéridos	Determinación de triglicéridos tras por lo menos 8h de ayuno.	Determinación de triglicéridos en ayuno por muestra venosa en laboratorio, tras por lo menos 8h de ayuno. Mediante test enzimático colorimétrico, realizado en analizador Roche/Hitachi 912/MODULAR.	Cuantitativa continua	Continua (mg/dl)
Nivel de colesterol HDL	Determinación de los niveles de colesterol de alta densidad, tras ayuno de 8 horas en muestra de sangre venosa.	Determinación de los niveles de colesterol de alta densidad, tras ayuno de 8 horas en muestra de sangre venosa. Mediante test enzimático colorimétrico, realizado en analizador Roche/Hitachi 912/MODULAR.	Cuantitativa	Continua (mg/dl)
Tensión arterial sistólica	Presión ejercida por la sangre sobre las arterias al momento de la sístole.	Presión registrada por esfigmomanómetro al momento de la percepción del primer ruido de Korotkoff sobre arteria braquial. Realizada con esfigmomanómetro aneroide con brazaletes especiales para pacientes con obesidad Tycos Welch-Allyn. Realizada por personal de enfermería, siguiendo las recomendaciones de la sociedad europea de hipertensión (ver manual de procedimientos).	Cuantitativa continua	Continua (mmHg)
Tensión arterial diastólica	Presión ejercida por la sangre sobre las arterias al momento de la diástole.	Presión registrada por esfigmomanómetro al momento de la percepción del último ruido de Korotkoff sobre arteria braquial. Realizada con esfigmomanómetro aneroide con brazaletes especiales para pacientes con obesidad Tycos Welch-Allyn. Realizada por personal de enfermería, siguiendo las recomendaciones de la sociedad europea de hipertensión (ver manual de procedimientos).	Cuantitativa continua	Continua (mmHg)
Glucosa plasmática en ayuno	Nivel de glucosa en sangre venosa, determinado por estudio de laboratorio llevado a cabo tras por lo menos 8h	Nivel de glucosa en sangre venosa, determinado en el tiempo 0 de la curva de tolerancia oral a la glucosa. Mediante test enzimático	Cuantitativa continua	Continua (mg/dl)

	de ayuno.	colorimétrico, realizado en analizador Roche/Hitachi 912/MODULAR		
HOMA2-IR Homeostasis model assessment 2	Estimación de la función de la célula beta y la sensibilidad a la insulina en un estado basal, expresado como porcentaje del valor normal en una población de referencia.	Se utilizó el modelo computacional para determinación de HOMA2, desarrollado por Levy y colaboradores [1], disponible en la página de la universidad de Oxford de forma gratuita (https://www.dtu.ox.ac.uk/homacalculator/download.php). El modelo requiere la determinación de glucosa e insulina en ayuno.	Cuantitativa	Continua
Potenciales confusoras				
Edad	Tiempo que ha vivido una persona desde su fecha de nacimiento.	Edad consignada en el expediente u hoja de datos al momento del diagnóstico.	Cuantitativa	Continua (años)
Género	Taxón que agrupa a especies que comparten ciertos caracteres	Género consignado en hoja de datos o expediente clínico.	Cualitativa	Nominal dicotómica 0 Masculino 1 Femenino
NOTA: Para mayor información sobre la medición de las variables, referirse al manual de procedimientos.				

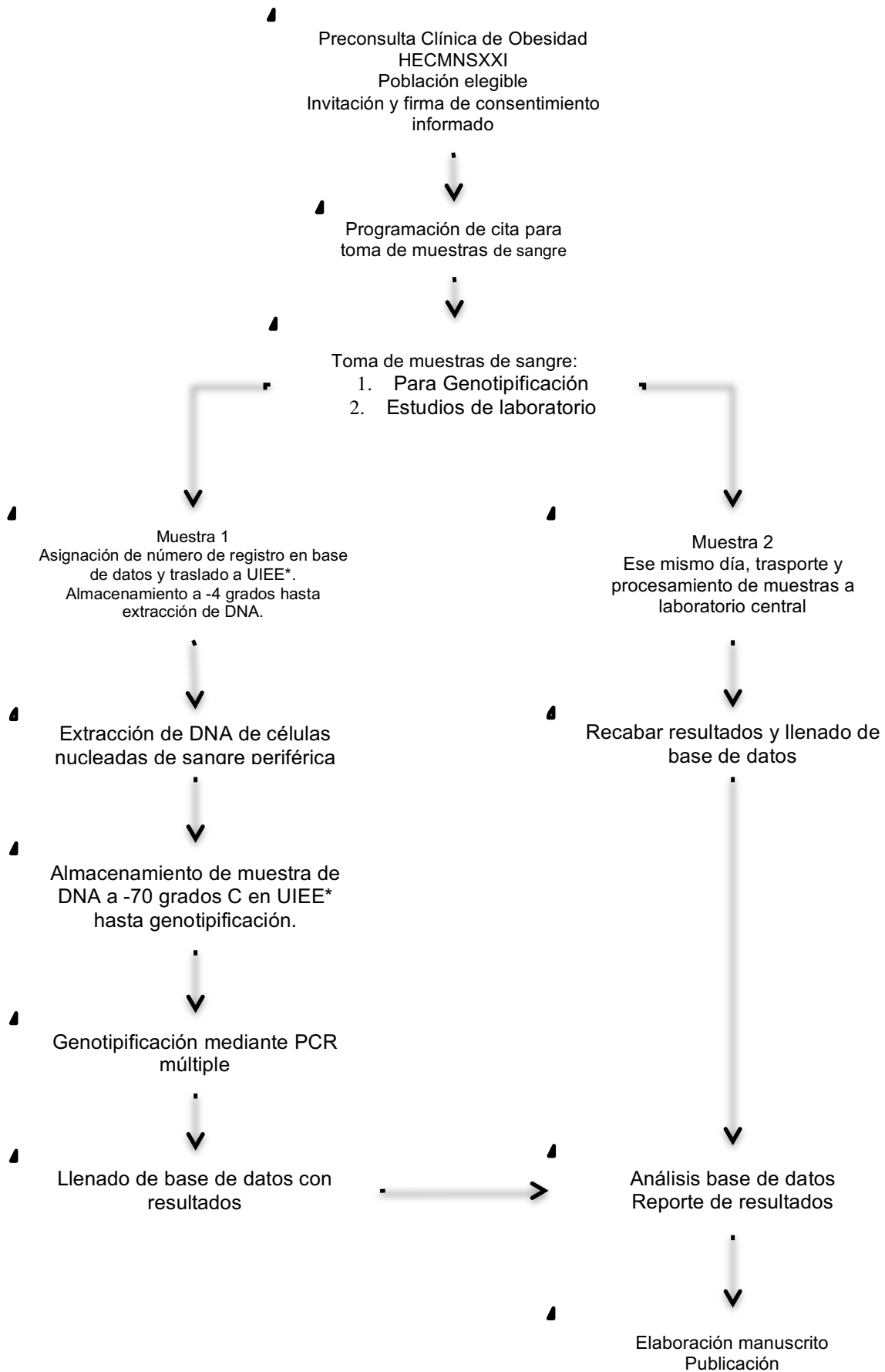
Procedimientos Generales

Reclutamiento de pacientes

- 1) Se identificaron aquellos pacientes de la preconsulta de la clínica de Obesidad del HE CMN SXXI que cumplieran criterios de selección.
- 2) Al concluir la consulta, de forma privada se invitó a los pacientes que reunían criterios de selección a participar en el estudio, incluyendo explicación y firma de consentimiento informado (ANEXO 1).
- 3) Se registraron datos clínicos y parámetros antropométricos en hoja de recolección de datos (ANEXO 2).
- 4) En caso de que el paciente se encontrara en ayuno de al menos 8h, en ese mismo momento se tomaron muestras de sangre venosa para determinación de parámetros bioquímicos y genotipificación. En caso de no estar en ayuno, se programó una cita para toma de muestras dentro de los siguientes 5 días.
- 5) La muestra de sangre venosa destinada a determinación de parámetros bioquímicos fue procesada después de su obtención ese mismo día en el laboratorio central del HE CMN SXXI (ANEXO 3).

- 6) La muestra destinada a genotipificación se almacenó a 4 grados centígrados y se llevó a cabo extracción de DNA en los siguientes 5 días.
- 7) El proceso de extracción de DNA se llevó a cabo con kit QIAamp DNA Mini Kit de QIAGEN, siguiendo las especificaciones del fabricante (ANEXO 3).
- 8) Se determinó la pureza del DNA mediante espectrofotometría (Nanodrop 2000 Thermo Scientific) así como su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.
- 9) El DNA extraído se almacenó a -20 grados hasta realización de PCR múltiple para genotipificación. Llevada a cabo en los siguientes 10-20 días tras su obtención.
- 10) Para la genotipificación, cada alelo del gen del GHR fue amplificado por separado de DNA genómico utilizando los primers G1, G2 y G3 desarrollados por Pantel [40], con número de acceso GenBank AF155912 y AF210633; mediante PCR múltiple utilizando PCR Master Mix (Promega). Parámetros de termociclaje: desnaturalización inicial 94°C por 5 min; 35 ciclos de 94°C por 1 min, posteriormente 58°C por 30s, 72°C por 1.5 min y extensión final a 72°C por 10 min. El tamaño del DNA amplificado se confirmó por electroforesis en gel de agarosa 2% (ANEXO 3).
- 11) Los procedimientos de biología molecular se realizaron con la colaboración del Dr. Daniel Castelán Martínez (Doctor en ciencias de la salud- Farmacología) y el QFB. Andy Romero Nieves en la Unidad de investigación médica en endocrinología experimental CMN SXXI.
- 12) Se llevó a cabo recolección de datos y análisis de los mismos.

Flujograma:



* Unidad de Investigación en Endocrinología Experimental.

Análisis de resultados

El análisis estadístico de resultados se llevó a cabo con el paquete estadístico SPSS v 21.

- Análisis exploratorio: posterior a vaciamiento de los datos se realizó análisis general de las variables de estudio, de datos faltantes y datos incorrectos.
- Análisis descriptivo: para las variables cualitativas se estimaron las frecuencias absolutas y proporciones. Para las variables cuantitativas se estimaron medidas de tendencia central y de dispersión (media y desviación estándar o mediana y rangos intercuartílicos 25-75) de acuerdo a su distribución, determinada mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov.
- Equilibrio de Hardy-Weinberg: Se analizó el equilibrio de Hardy –Weinberg del genotipo del GHR (fl/d3) en la población de obesos mórbidos. Para evaluar diferencias de la frecuencia de genotipos con respecto a lo anteriormente reportado en población mexicana [42] se utilizó una Chi-cuadrada de Pearson.
- Análisis de asociaciones: Para determinar la diferencia de los componentes del síndrome metabólico, parámetros antropométricos y bioquímicos entre los diferentes genotipos se utilizó Chi cuadrada para las variables cualitativas y ANOVA o Kruskal Wallis para las variables cuantitativas, de acuerdo a su distribución. Para llevar a cabo la comparación de las variables únicamente entre los homocigotos, se utilizó Chi cuadrada para variables cualitativas y t Student o U Mann-Whitney para variables cuantitativas dependiendo de su distribución.
- Análisis multivariado: Para el análisis ajustado se llevó a cabo regresión logística para las variables desenlace cualitativas y regresión lineal múltiple para las variables desenlace cuantitativas. Se ajustó por edad, género e IMC.

CÁLCULO DEL PODER ESTADÍSTICO

Se realizó cálculo del poder estadístico por comparación de medias, considerando el peso (variable antropométrica que presentó diferencias significativas)

en los pacientes genotipos homocigotos (fl/fl o d3/d3). Asumiendo que:

$$\alpha = 0.05$$

$$\mu_1 = 123.14$$

$$\mu_2 = 136.11$$

$$s_1 = 22.15$$

$$s_2 = 24.54$$

$$n_2/n_1 = 0.85$$

Se estimó un poder (β) de 0.91

ASPECTOS ÉTICOS

El estudio se apegó a lineamientos establecidos en la Declaración mundial de Helsinki y en el reglamento de la Ley general de salud en materia de investigación para la salud.

Riesgo de la Investigación: de acuerdo a lo establecido en el reglamento de la Ley general de salud en materia de investigación para la salud, título segundo, capítulo I, artículo 17; este estudio se considera como investigación con riesgo mínimo, puesto que implica procedimientos rutinarios (extracción de sangre por punción venosa en adultos, de aproximadamente 8 ml en total).

Posibles beneficios: Ningún paciente obtuvo beneficio directo de la realización de este estudio.

Confidencialidad: los datos recabados en este estudio se manejaron por medio de clave numérica, sin posibilidad de identificar a quien corresponden los resultados de cada estudio. La base de datos que contenía información confidencial, únicamente fue manejada por el alumno, el cotutor y tutor. Una vez realizada la genotipificación, las muestras se desecharon de acuerdo al protocolo de manejo de desechos biológicos del HECMNSXXI.

Consentimiento informado: debido a que esta investigación se clasificó como de riesgo mínimo, requirió de la obtención de consentimiento informado. El cual se obtuvo de manera privada por parte del alumno de maestría.

Selección de participantes: dado que se trató de un muestreo no probabilístico de casos consecutivos; se siguió el principio fundamental de justicia, pues no hubo discriminación para distribuir los recursos asistenciales, ni la oportunidad de participar.

Conflicto de intereses: no existe conflicto de interés dentro del equipo de colaboradores.

FINANCIAMIENTO

Se contó con apoyo financiero del fondo para el desarrollo de protocolos de investigación y desarrollo tecnológico sobre temas específicos de los temas prioritarios de investigación en salud en el IMSS con número de control interno asignado por el Fondo de Investigación en Salud: (FIS/IMSS/PROT/G14/1305). Que se utilizó para compra de equipo y material para procedimientos de biología molecular. La institución contó con los recursos humanos y materiales para llevar a cabo el proyecto.

RESULTADOS

Se genotipificaron 262 pacientes con obesidad mórbida ($IMC > 40 \text{ kg/m}^2$) pertenecientes a la Clínica de Obesidad del Hospital de Especialidades CMN SXXI. Se encontró una frecuencia de los tres genotipos fl/fl, fl/d3 y d3/d3 de 27% (71), 53% (139) y 20% (52) respectivamente (Tabla 1). No se encontraron desviaciones del equilibrio de Hardy Weinberg (Tabla 2).

Tabla1. Distribución de los genotipos n= 262

fl/fl	71 (27%)
fl/d3	139 (53%)
d3/d3	52 (20%)

Tabla 2. Frecuencias alélicas y genotípicas de *GHRd3* (n = 262)

	n	Frecuencia observada	IC 95%	Frecuencia esperada*
Genotipos				
fl/fl	71	0.271	0.221-0.328	0.288
fl/d3	139	0.531	0.470-0.590	0.497
d3/d3	52	0.198	0.155-0.251	0.215
Alelos				
fl	281	0.536	0.494-0.579	
d3	243	0.464	0.422-0.520	

*Calculadas a partir del equilibrio de Hardy-Weinberg; sin desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg. Hardy-Weinberg Equilibrium Testing of Biological Ascertainment for Mendelian Randomization Studies. OEGE - Online Encyclopedia for Genetic Epidemiology studies (<http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml>)

Se excluyeron del análisis estadístico a 6 pacientes, por no contar con la totalidad de parámetros antropométricos y bioquímicos evaluados, analizándose un total de 256 pacientes. La tabla 3, muestra las características generales, antropométricas, bioquímicas y componentes del síndrome metabólico de los pacientes con obesidad mórbida. La media de edad fue de 43 ± 10 años, con predominancia del género femenino (73%); la mediana de IMC fue de 47 kg/m^2 y la de la circunferencia de cintura de 144 (134-158) cm para los hombres y de 130 (121-139) cm para las mujeres. Se encontró una mediana para HbA1c de 6.2% (5.9-6.7), por arriba de los niveles normales, sin llegar a niveles diagnósticos de diabetes; en concordancia con esto la mediana de glucosa en ayunas fue de 100 mg/dl (91-117) y la mediana de HOMA2-IR se encontró en 3.2. La mediana de HDL para hombres y mujeres, se encontró por debajo de los niveles recomendados 39 mg/dl (35-43) y 43 mg/dl (38-50) respectivamente. La mediana de triglicéridos, se encontró ligeramente por arriba de lo normal 153 mg/dl (119-189).

El 86% (221) de los pacientes reunieron criterios para el diagnóstico de síndrome metabólico de acuerdo a los criterios CONCENSO 2009 [14]; el componente con mayor prevalencia fue la alteración en el metabolismo de los carbohidratos (88%),

siendo importante mencionar que cada uno del resto de los componentes del síndrome metabólico tuvo una prevalencia mayor al 50% (hipertrigliceridemia 55%, hipoalfalipoproteínemia 60.5% e hipertensión 65%) (Tabla 3).

Se cuantificaron los niveles de IGF-1 en 194 pacientes, el 30.5% de ellos presentó cifras por debajo del límite normal inferior (Tabla 3).

Tabla 3. Características generales de la población de pacientes con OM

Edad (años)	43 ± 10
Mujeres (%)	188 (73%)
Componentes del síndrome metabólico	
Alteración en el metabolismo de los CHO	225 (88%)
Hipertrigliceridemia	141 (55%)
Hipoalfalipoproteínemia	155 (60.5%)
Hipertensión	166 (65%)
Síndrome Metabólico	221 (86%)
Características Antropométricas	
IMC (kg/m ²)	47 (43-53)
Peso (kg)	125 (111-141)
Peso Máximo (kg)	133.5 (118-150)
Circunferencia de cintura	
Hombres (cm)	144 (134-158)
Mujeres (cm)	130 (121-139)
ICC	0.92 (0.87-1)
ICT	0.83 ±0.09
Características bioquímicas	
Glucosa en ayunas (mg/dl)	100 (91-117)
Hb A1c (%)	6.2 (5.9-6.7)
HOMA2-IR (n= 234)	3.2 (2.3-4.5)
CT (mg/dl)	182.5 (160-202)
HDL	
Hombres (mg/dl)	39 (35-43)
Mujeres (mg/dl)	43 (38-50)
LDL (mg/dl)	107 ± 29
Triglicéridos (mg/dl)	153 (119-189)
TAS (mmHg)	130 (120-140)
TAD (mmHg)	90 (80-90)
Niveles de IGF-1 disminuidos (n= 194)	78 (30.5%)
CHO: carbohidratos. ICC: índice cintura cadera. ICT: índice cintura talla.	

No hubo una diferencia en el promedio de edad entre los genotipos. Al compararse la proporción de pacientes con diagnóstico de síndrome metabólico, así como sus diferentes componentes (alteración en el metabolismo de los carbohidratos, hipertrigliceridemia, hipoalfalipoproteinemia e hipertensión) entre los tres genotipos no se encontraron diferencias entre los grupos (Tabla 4).

Dentro de las características antropométricas se evaluó el peso de los pacientes, encontrando que la mediana de peso se incrementaba al contar con mayor cantidad de aleos d3 en el genotipo, siendo la mediana de peso de 118.5 kg (106-136) para los homocigotos fl/fl, de 124 kg (113-140) para los heterocigotos (fl/d3) y de 134 kg (117-159) para los homocigotos d3/d3; existiendo una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos ($p= 0.01$). En relación a este hallazgo también se encontró que la mediana de IMC fue más alta en los homocigotos d3/d3 (50 kg/m^2 RIC 44-57), en comparación con los heterocigotos (48 kg/m^2 RIC 43-52) y con los homocigotos fl/fl (47 kg/m^2 RIC 42-53); esta diferencia con tendencia a la significancia estadística ($p= 0.07$) (Tabla 4).

El peso máximo, la circunferencia de cintura, el índice cintura cadera, el índice cintura talla y el índice de adiposidad corporal (BAI), fueron el resto de características antropométricas e índices evaluados, sin encontrarse diferencia alguna entre los grupos (Tabla 4).

En cuanto a los parámetros bioquímicos, se compararon las medianas de glucosa en ayuno así como de hemoglobina A1C, sin encontrarse diferencias entre los grupos. Para evaluar la diferencia entre los niveles de insulina en ayuno, así como la resistencia a la insulina calculada por medio del HOMA2; se excluyeron del análisis a los pacientes que se encontraban en tratamiento con insulina. Se encontró una diferencia con tendencia a la significancia estadística en las medianas de HOMA2 –IR entre los grupos, nuevamente con niveles mayores entre los pacientes homocigotos d3/d3 (HOMA2 –IR 4.0 RIC 2.5-4.8), comparados con los heterocigotos fl/d3 (HOMA2-IR 3.36 RIC 2.44-4.43) y los homocigotos fl/fl (HOMA-IR 2.8 RIC 2.0-4.4) (Tabla 4).

Ninguno de los componentes del perfil de lípidos (colesterol total CT, HDL, LDL y triglicéridos), presentó diferencia al compararse entre los genotipos. Tampoco hubo diferencia en los niveles de tensión arterial sistólica ni diastólica.

Al compararse las proporciones de niveles de IGF-1 por debajo del límite inferior normal, no hubo diferencia entre los genotipos (dato disponible en 194 pacientes).

Tabla 4. Comparación de características entre genotipos

	fl/fl n= 69	fl/d3 n= 137	d3/d3 n= 50	P
Edad (años)	44 ±11	42.5 ±10	41 ±11	0.33 [^]
Mujeres (%)	59 (85.5%)	94 (69%)	35 (70%)	0.03 ⁺
Componentes del síndrome metabólico				
Alteración en el metabolismo de los CHO	59 (85.5%)	120 (88%)	46 (92%)	0.29 ⁺
Hipertrigliceridemia	40 (58%)	72 (53%)	29 (58%)	0.92 ⁺
Hipoalfalipoproteinemia	39 (56.5%)	83 (61%)	33 (66%)	0.30 ⁺
Hipertensión	47 (68%)	84 (61%)	35 (70%)	0.95 ⁺
Síndrome Metabólico	62 (90%)	116 (85%)	43 (86%)	0.48 ⁺
Características Antropométricas				
IMC (kg/m ²)	47 (42-53)	48 (43-52)	50 (44-57)	0.09 [*]
Peso (kg)	118.5 (106-136)	124 (113-140)	134 (117-159)	0.01 [*]
Peso Máximo (kg)	131 (115.5-145)	133.5 (121-149)	138 (120-166)	0.13 [*]
Circunferencia de cintura (cm)	133 (121-144)	133 (124-144)	133.5 (125-149)	0.60 [*]
ICC	0.91 (0.85-0.99)	0.92 (0.88-1)	0.91 (0.87-1.02)	0.71 [*]
ICT	0.83 ± 0.09	0.82± 0.09	0.83 ±0.09	0.86 [*]
BAI (%)	53 ± 7	51 ± 9	51 ± 9	0.45 [^]
Características bioquímicas				
Glucosa en ayunas	102 (91-125)	100 (90.5-117)	100 (90.5-113)	0.66 [*]
Hb A1c (%)	6.3 (5.8-7.2)	6.2 (5.9-6.7)	6.2 (5.8-6.6)	0.92 [*]
Insulina en ayuno μU/ml (n=234)	22 (15-35)	25.5 (18-35)	30.5 (19-38)	0.08 [*]
HOMA 2-IR (n=234)	2.8 (2.0-4.4)	3.36 (2.44-4.43)	4.0 (2.5-4.8)	0.07 [*]
CT (mg/dl)	183 (165-205)	182.5 (155-202)	182 (162-200)	0.58 [*]
HDL				
Hombres (mg/dl)	39.5 (33-43.5)	39 (35-42)	39 (35-50)	0.91 [*]
Mujeres (mg/dl)	44 (37-51)	42 (38-49)	42 (36-49)	0.62 [*]
LDL (mg/dl)	108 ±28	106 ± 29	108 ± 28	0.81 [^]
Triglicéridos (mg/dl)	153 (123-186.5)	149 (117.5-184)	158 (117.5-205)	0.72 [*]
TAS (mmHg)	130 (120-140)	130 (120-140)	130 (120-140)	0.12 [*]
TAD (mmHg)	80 (80-90)	90 (80-90)	90 (80-90)	0.24 [*]
Niveles de IGF-1 disminuidos (n= 194)	19 (35%)	40 (42%)	19 (42%)	0.45 ⁺

CHO: carbohidratos. ICC: índice cintura cadera. ICT: índice cintura talla. BAI: índice de adiposidad corporal.

[^] ANOVA + Chi cuadrada *Kruskal Wallis

Para las variables sin distribución normal se reportaron medianas y rangos intercuartílicos 25-75.

En la Tabla 5 se muestra la comparación entre las características de los pacientes homocigotos para los polimorfismos de GHR. Se encontró que el IMC, el peso y el

HOMA2-IR presentan diferencia estadísticamente significativa entre los grupos, la cual se conserva para el IMC y el peso después de ajustar por edad y género.

Tabla 5. Comparación de características entre pacientes homocigotos

	fl/fl n= 69	d3/d3 n= 50	P
Edad (años)	44 ±11	41 ±11	0.16 [^]
Mujeres (%)	59 (85.5%)	35 (70%)	0.04 ⁺
Componentes del síndrome metabólico			
Alteración en el metabolismo de los CHO	59 (85.5%)	46 (92%)	0.27 ⁺
Hipertrigliceridemia	40 (58%)	29 (58%)	0.99 ⁺
Hipoalfalipoproteinemia	39 (56.5%)	33 (66%)	0.29 ⁺
Hipertensión	47 (68%)	35 (70%)	0.82 ⁺
Síndrome Metabólico	62 (90%)	43 (86%)	0.51 ⁺
Características Antropométricas			
IMC (kg/m ²)	47 (42-53)	50 (44-57)	0.05*
Peso (kg)	118.5 (106-136)	134 (117-159)	0.004*
Peso Máximo (kg)	131 (115.5-145)	138 (120-166)	0.06*
Circunferencia de cintura (cm)	133 (121-144)	133.5 (125-149)	0.33*
ICC	0.91 (0.85-0.99)	0.91 (0.87-1.02)	0.53*
ICT	0.83 ± 0.09	0.83 ±0.09	0.92 [^]
BAI (%)	53 ± 7	51 ± 9	0.33 [^]
Características bioquímicas			
Glucosa en ayuno (mg/dl)	102 (91-125)	100 (90.5-113)	0.42*
Hb A1c (%)	6.3 (5.8-7.2)	6.2 (5.8-6.6)	0.76*
Insulina en ayuno μU/ml (n=109)	22 (15-35)	30.5 (19-38)	0.08
HOMA2-IR (n = 109)	2.8 (2.0-4.4)	4.0 (2.5-4.8)	0.04*
CT (mg/dl)	183 (165-205)	182 (162-200)	0.80*
HDL			
Hombres (mg/dl)	39.5 (33-43.5)	39 (35-50)	0.13*
Mujeres (mg/dl)	44 (37-51)	42 (36-49)	0.68*
LDL (mg/dl)	108 ±28	108 ± 28	0.93 [^]
Triglicéridos (mg/dl)	153 (123-186.5)	158 (117.5-205)	0.72*
TAS (mmHg)	130 (120-140)	130 (120-140)	0.87*
TAD (mmHg)	80 (80-90)	90 (80-90)	0.13*
Niveles de IGF-1 disminuidos (n=194)	19 (35%)	19 (42%)	0.47 ⁺

CHO: carbohidratos. ICC: índice cintura cadera. ICT: índice cintura talla.

^ t de student + Chi cuadrada * U de Mann-Whitney

Para las variables sin distribución normal se reportaron medianas y rangos intercuartílicos 25-75.

En cuanto al HOMA2-IR se llevó a cabo regresión lineal ajustando por genotipo y peso. Estos dos predictores sólo explicaron el 8.7% (R^2 0.087, F 5.14, P= 0.007) de la varianza del HOMA2-IR; el peso fue la única variable predictora que resultó tener un efecto significativo en el HOMA2-IR (β 0.018, P= 0.02, IC 95% [-0.004-0.03]); el genotipo no resultó significativo (β 0.21, P= 0.22, IC 95% [-0.13-0.55]) (Tabla 6). El mismo ajuste se llevó a cabo para los niveles de insulina en ayuno, que tuvo una diferencia con tendencia a la significancia en el análisis bivariado, sin embargo, no se encontró asociación significativa del genotipo con la variación de HOMA2-IR (β 2-15, P= 0.16, IC 95% [-0.88- 5.18])(Tabla 7).

Tabla 6 . HOMA2-IR ajustado por genotipo y peso

	β	p	IC 95%
Genotipo (d3/d3)	0.21	0.22	-0.13-0.55
Peso	0.02	0.01	0.44-0.33

R^2 0.087, F 5.14, p= 0.007

Tabla 7. Insulina en ayuno ajustada por genotipo y peso

	β	p	IC 95%
Genotipo (d3/d3)	2.15	0.16	-0.88-5.18
Peso	0.18	0.005	0.05-0.30

R^2 0.32, F 6.51, p= 0.002

Tomando en consideración el efecto que pudieran tener la edad, género e IMC en la frecuencia de síndrome metabólico o cada uno de sus componentes, se llevó a cabo un análisis multivariado ajustando por dichas variables. Al igual que en el análisis bivariado, no se encontró una asociación significativa entre el genotipo y la frecuencia del síndrome metabólico o sus componentes (Tabla 8).

Tabla 8. Asociación entre genotipo d3/d3 y los componentes del SM

	OR	IC 95%
Sx Metabólico	0.69	0.27-2.33
Hipertrigliceridemia	1.15	0.52-2.51
Hipoalfalipoproteinemia	1.43	0.64-3.19
HAS	1.18	0.45-3.06

Ajustado por edad, género e IMC.

Finalmente se llevaron a cabo análisis de correlación entre el peso y los niveles de HOMA2-IR, así como entre el peso y los niveles de insulina en ayuno en cada uno de los genotipos, buscando una correlación mayor en los homocigotos d3. Se encontró una pobre correlación entre el peso y el HOMA2-IR en todos los genotipos (fl/fl $r = 0.15$, $p = 0.23$; fl/d3 $r = 0.24$, $p = 0.006$; d3/d3 $r = 0.38$, $p = 0.007$) (Fig. 1); al igual que una pobre correlación entre el peso y los niveles de insulina en ayuno (fl/fl $r = 0.15$, $p = 0.24$; fl/d3 $r = 0.24$, $p = 0.005$; d3/d3 $r = 0.40$, $p = 0.005$) (Fig. 2).

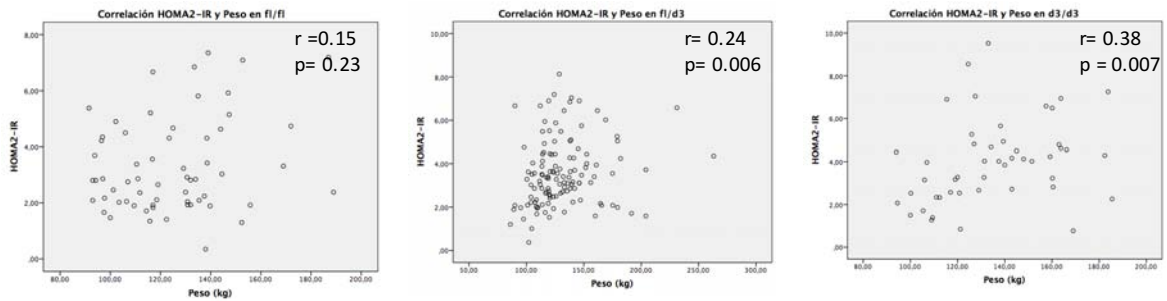


Fig 1. Correlaciones entre peso y HOMA2-IR en cada uno de los genotipos

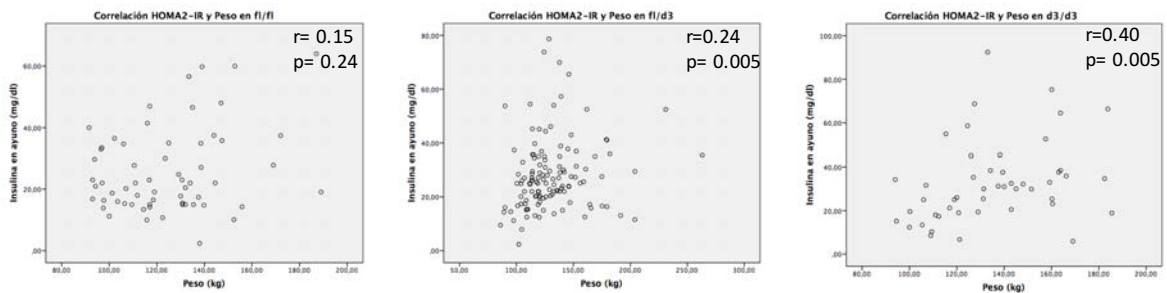


Fig 2. Correlaciones entre peso y insulina en ayuno en cada uno de los genotipos

DISCUSIÓN

La GH juega un papel importante en la promoción del crecimiento y la coordinación del metabolismo. La regulación del eje somatotropo es compleja, ya que además de los mecanismos clásicos de regulación hipotalámica por GHRH y somatostatina y la retroalimentación negativa ejercida por la misma GH e IGF-1, varios otros factores afectan tanto la secreción como las acciones biológicas de GH e IGF-1. Estos factores incluyen al ejercicio, al ayuno, a la obesidad, al sueño, y al efecto de diversos neuropéptidos [83]. En el caso particular del GHR, múltiples factores regulan tanto su disponibilidad en la membrana celular, como su reciclaje y capacidad de señalización [84].

La GH promueve la lipólisis y tiene un efecto anabólico en las vías metabólicas de los carbohidratos y las proteínas, lo cual trae como consecuencia cambios importantes sobre el gasto de energía, la composición corporal y el sistema cardiovascular [35]. En los pacientes con obesidad se ha identificado una disminución en la secreción espontánea y estimulada de GH, así como una aceleración en su depuración de la sangre, lo cual altera su concentración y efecto [35].

Las consecuencias biológicas del polimorfismo del exón 3 del gen del GHR, aún son controversiales, sin embargo existe evidencia de que aquellos sujetos con por lo menos un alelo d3 producen isoformas del GHR con una respuesta biológica más eficiente en términos de efecto metabólico [54,69,70] y de crecimiento [51]. Por lo anterior, resulta atractiva la idea de que en pacientes con obesidad mórbida, la presencia del polimorfismo d3 esté asociada con un menores índices de adiposidad y la ausencia o menor gravedad de los componentes del síndrome metabólico.

En esta población de pacientes con OM el 73% tienen por lo menos un alelo d3 (20% en forma homocigota), lo que difiere marcadamente de lo reportado en otras poblaciones [52,54-55,68,73,75,85-89,96]. Esta incrementada frecuencia del alelo d3 sólo había sido reportada por Bas y colaboradores en una población de 477 controles sanos de origen Turco [90]. Más aún, en un estudio previo de nuestro grupo que incluyó la genotipificación del *GHR* en sujetos sanos mexicanos, la frecuencia de los

genotipos fl/fl, fl/d3 y d3/d3 fue de 53%, 30% y 17%, respectivamente [42], similar a lo reportado por otros autores [40,44,52,54-55,68,73,75,85-89,96]. Si bien el significado biológico de este hallazgo es incierto, existe evidencia experimental que demuestra que las distintas isoformas del GHR difieren en su capacidad de señalización por lo que se podría especular que la presencia del genotipo d3 pudiera estar involucrada en la fisiopatología de la obesidad mórbida. Por ejemplo, habría que explorar la posibilidad de que este genotipo hace al adipocito más susceptible a los efectos deletéreos de los distintos mediadores inflamatorios de la obesidad. Sin duda, existe también la posibilidad de que solamente constituya un epifenómeno sin mayor significado biológico. De cualquier forma, nuestros hallazgos justifican la realización de estudios in vitro orientados a aclarar esta situación

El 86% de la población evaluada reunió criterios para el diagnóstico de SM, sin embargo, no se identificó ninguna diferencia en cuanto a la prevalencia o gravedad de los diferentes componentes al comparar los tres genotipos. Dado que los heterocigotos tienen la capacidad de expresar ambas isoformas del GHR, es más complicado establecer el papel que juega en el metabolismo de estos pacientes, por lo que se decidió excluir esta circunstancia al comparar únicamente a los homocigotos. Este análisis mostró una diferencia en el IMC y el peso que se conservó después de ajustar para edad y género, sorprendentemente siendo mayor ambos en el grupo homocigoto d3, contrario a la hipótesis planteada inicialmente.

Dado que las diferencias en edad, peso y género pueden afectar la presencia del síndrome metabólico o de alguno de sus componentes y diluir el efecto del polimorfismo; se realizó un análisis multivariado ajustado por edad, género e IMC, sin embargo el resultado no mostró influencia significativa del polimorfismo del exón 3 en la presencia de síndrome metabólico o alguno de sus componentes.

El HOMA2- IR también mostró diferencia al comparar únicamente los homocigotos, siendo mayor para los homocigotos d3; sin embargo, dado que el HOMA2-IR puede verse influido por el peso, se llevó a cabo un análisis multivariado ajustando por peso, donde la asociación perdió significancia.

No se encontraron diferencias en las concentraciones de IGF-1 ajustadas para edad y género ni en la proporción de pacientes con IGF-1 por debajo de lo normal.

Ante la imposibilidad de encontrar diferencias cuando se comparan los tres genotipos, pero sí cuando se analizan únicamente los homocigotos y que estas diferencias desfavorezcan metabólicamente al grupo con mayor cantidad de alelos d3 en su genotipo; surge la interrogante de si el mayor efecto biológico del GHR de los sujetos que portan por lo menos un alelo d3, se ve afectado en pacientes con obesidad mórbida. Se llevaron a cabo dos análisis más además de los presentados, uno donde se agrupaban a los portadores de una alelo d3 (fl/d3 y d3/d3) vs los homocigotos fl/fl; y otro análisis en el que se compararon los genotipos fl/fl y d3/fl en un grupo y d3/d3 en el otro. El primer análisis no arrojó diferencias significativas; por el contrario al agrupar a los fl/fl y fl/d3 vs d3/d3 se identificaron las mismas diferencias que al comparar los homocigotos (IMC y peso). Además de que las concentraciones de insulina fueron significativamente mayores en el grupo d3/d3, aún después de ajustar para edad y género y el índice HOMA2-IR mostró una tendencia a ser mayor en el mismo grupo ($p=0.07$). Lo que sugiere que los pacientes con obesidad mórbida heterocigotos se comportan de forma más parecida a los homocigotos fl que a los homocigotos d3.

En una muestra de 1135 sujetos de nacionalidad sueca con IMC en rangos de normalidad y sobrepeso, Glad y colaboradores [75] reportaron una asociación significativa entre la presencia del alelo d3 y un mayor índice cintura/cadera, circunferencia de la cintura, peso corporal e IMC. Éste constituyó el primer trabajo en el que la asociación entre estas variables ocurría en sentido diferente al esperado. Nuestros resultados otorgan consistencia a ese trabajo y nos obligan a intentar entender esta circunstancia. El metaanálisis publicado por Wassenaar et al. [51], es uno de los estudios principales que apoya la suposición de que el polimorfismo del exón 3 confiere una mayor actividad biológica al GHR, puesto que establece que aquellos pacientes portadores de un genotipo que incluya el alelo d3 responden mejor al tratamiento farmacológico de sustitución con GH recombinante; sin embargo, es importante mencionar que esta diferencia significativa sólo se vio en pacientes que eran deficientes de GH; condición que no cumplen los pacientes estudiados por Glad

et al. [75] ni los incluidos en este estudio. Esta respuesta diferencial hace notar la complejidad de la relación que existe entre la secreción, sensibilidad y adaptabilidad del eje GH/IGF-1 normal.

Es importante considerar que el objetivo principal de este estudio fue determinar la frecuencia de los diferentes genotipos del GHR; el diseño transversal, tiene la limitación de que las asociaciones o diferencias encontradas, no puedan integrarse a una cadena causal; por lo tanto la diferencia encontrada en la distribución de los genotipos y las características somatométricas y metabólicas esperan por subsecuentes estudios con diseño diferente para ser confirmados.

El cálculo del poder de la muestra para identificar diferencias en el peso entre los genotipos fue superior al 80%, sin embargo es probable que la diferencia existente entre la presencia del SM y sus componentes es tan pequeña, que la muestra haya sido insuficiente.

CONCLUSIONES

Este es el primer trabajo en el que se reporta la proporción de los genotipos del GHR en pacientes con obesidad mórbida. La proporción más alta que la esperada en este subgrupo de pacientes hace sospechar que existe una asociación entre la presencia del polimorfismo d3 del *GHR* y la obesidad mórbida. A diferencia de lo esperado, algunas variables antropométricas (peso e IMC) y metabólicas (HOMA2-IR) fueron mayores en el grupo de sujetos obesos mórbidos que presentaron el polimorfismo d3 del *GHR*. Hasta el momento no existe una explicación para estos hallazgos, sin embargo, se plantean diferentes hipótesis que podrían ser estudiadas en trabajos posteriores, incluyendo análisis de la señalización mediada por los receptores que presenten o no, la porción codificada por el exón 3 del *GHR*. Múltiples fenómenos afectan la capacidad de señalización del receptor de GHR, por lo que es posible que el estado proinflamatorio asociado a la obesidad, SM y otras circunstancias provoquen una “resistencia” local o tejida específica al efecto de la GH.

REFERENCIAS

1. WHO. Obesity: Preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. Ginebra: WHO (Technical Report Series No.894), 2000.
2. Obesity and Overweight [en línea] . World Health Organization. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/> up date march 2013.
3. Barquera S, Campos-Nonato I, Hernández-Barrera L, Pedroza-Tobías A, Rivera-Dommarco JA. Prevalencia de obesidad en adultos mexicanos, ENSANUT 2012. Salud Publica Mex 2013;55 supl 2:S151-S160
4. Hensrud D, Klein S. Extreme obesity a new medical crisis in the United States. Mayo Clin Proc_ 2006;81(10 Suppl):S5-10.
5. Prospectives Studies Collaboration, Whitlock G, Lewington S, Sherliker P, Clarke R, Emberson J, Halsey J, Qizilbash N, Collins R, Peto R. Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. Lancet. 2009; 373(9669): 1083–1096.
6. Wildman RP, Muntner P, Reynolds K, et al. The obese without cardiometabolic risk factor clustering and the normal wieght with cardiometabolic risk factor clustering: prevalence and correlates of 2 phenotypes amos the US population (NAHNES 1999-2004). Arch Intern Med. 2008; 168: 1617-1624.
7. Karelis AD, St-Pierre DH, Conus F, et al. Metabolic and body composition factors in subgroups of obesity: what do we know?. J Clin Endocrinol. 2004; 89: 2569-2575.
8. Primeau V, Coderre L, Karelis AD, et al. Characterizing the profile of obese patients who are metabolically healthy. Int J Obes (Lond). 2011; 35: 971-981.
9. Tchernof A, Després JP. Pathophysiology of human visceral obesity: an update. Physiol Rev. 2013; 93: 359-404.
10. Phillips LK, Prins JB. The link between abdominal obesity and the metabolic síndrome. Curr Hypertens Rep. 2008; 10: 156-64.
11. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classificaction of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. Diabet Med. 1998; 15:539-553.
12. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert

- Panel on detection, evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *Circulation*. 2002; 106: 3143.
13. Alberti KG, Zimmet PZ, Shaw J. The metabolic syndrome—a new world wide definition. *Lancet*. 2005; 366: 1059-1062.
 14. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, et al. 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 Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*. 2009 Oct 20;120(16):1640-5.
 15. De Koning L, Merchant AT, Poque J, Anand SS. Waist circumference and waist-to-hip ratio as predictors of cardiovascular events: meta-regression analysis of prospective studies. *Eur Heart J*. 2007 Apr;28(7):850-6.
 16. Browning LM, Hsieh SD, Ashwell M. A systematic review of waist-to-height ratio as a screening tool for the prediction of cardiovascular disease and diabetes: 0.5 could be a suitable global boundary value. *Nutr Res Rev*. 2010 Dec;23(2):247-69.
 17. Ho SY, Lam TH, Janus ED. Waist to stature ratio is more strongly associated with cardiovascular risk factors than other simple anthropometric indices. *Ann Epidemiol*. 2003 Nov;13(10):683-91.
 18. Baumann G. Growth hormone heterogeneity: genes, isohormones, variants, and binding proteins. *Endocr Rev* 1991; 12:424-49.
 19. Vottero A, Guzzetti C, Loche S. New aspects of the physiology of the GH-IGF-1 axis. *Endocr Dev* 2013;24:96-105.
 20. De Vriese C, Delporte C. Ghrelin: a new peptide regulating growth hormone release and food intake *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40:1420-4.
 21. Baumann G, Mercado M. Growth hormone-binding proteins in plasma *Nutrition* 1993;9:546-53.
 22. Kopchick J, Parkinson C, Stevens E, Trainer P. Growth hormone receptor antagonists: discovery, development, and use in patients with acromegaly. *Endocr Rev* 2002;23:623-46.
 23. LeRoith D, Bondy C, Yakar S, Liu J, Butler A. The somatomedin hypothesis:

- 2001 *Endocr Rev* 2001;22:53-74.
24. Solomon. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:4529
 25. Kelly P, Djiane J, Postel-Vinay M, Edery M. The prolactin/growth hormone receptor family. *Endocr Rev* 1991;12:235
 26. Leung D, Spencer S, Hammonds R, Collins C, Henzel W et al. Growth hormone receptor and serum binding protein: purification, cloning and expression. *Nature* 1987;330:537
 27. Godowsky. *Proc Natl Acad Sci* 1989;86:8083
 28. De Vos A, Ultsch M, Kpssiakoff A. Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. *Science* 1992;255:306
 29. Feigerlova E, Hwa V, Derr M, Rosenfield R. Current issues on molecular diagnosis of GH signaling defects. *Endocr Dev* 2013;24:118
 30. David A, Hwa V, Metherell L, Netchine I, Camacho-Hübner C, Clark A, Rosenfield R, Savage M. Evidence for a continuum of genetic, phenotypic, and biochemical abnormalities in children with growth hormone insensitivity *Endocr Rev* 2011;32:472
 31. Moller N, Jorgensen J. Effects of growth hormone on glucose, lipid, and protein metabolism in human subjects. *Endocr Rev* 2009;30:152
 32. Mercado M, DáVila N, McLeod J, Baumann G. Distribution of growth hormone receptor messenger ribonucleic acid containing and lacking exon 3 in human tissues.. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:731
 33. Ballesteros M, Leung KC, Ross RJ, Iismaa TP, Ho KK. Distribution and abundance of Messenger ribonucleic acid for growth hormone receptor isoforms in human tissues. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85:2865-71.
 34. Melmed S, Polonsky K, Larsen P, Kronenberg H. *Williams Textbook of Endocrinology*. 12th ed. 2011. USA: Elsevier.
 35. Berryman D, Glad C, List E, Johannsson G. The GH/IGF-1 axis in obesity: pathophysiology and therapeutic considerations. *Nat Rev Endocrinol* 2013;9:346
 36. Angelin B, Rudling M. Growth hormone and hepatic lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol*. 1994; 5: 160-165.
 37. Nussbaum R, McInnes R, Huntington, F. (2004). *Thompson & Thompson Genetics in medicine*. USA: Saunders.

38. Urbanek M, MacLeod J, Cooke N, Liebhaber S. Expression of a human growth hormone (hGH) receptor isoform is predicted by tissue-specific alternative splicing of exon 3 of the hGH receptor gene transcript. *Mol Endocrinol* 1992;6:279
39. Sobrier M, Duquesnoy P, Duriez B, Amselem S, Goossens M. Expression and binding properties of two isoforms of the human growth hormone receptor. *FEBS Lett* 1993;319:16
40. Pantel J, Machinis K, Sobrier M, Duquesnoy P, Goossens M, Amselem S. Species-specific alternative splice mimicry at the growth hormone receptor locus revealed by the lineage of retroelements during primate evolution. *J Biol Chem* 2000;275:18664
41. Ross R, Esposito N, Shen X, Von Laue S, Chew S, Dobson P, Postel-Vinay M, Finidori J. A short isoform of the human growth hormone receptor functions as a dominant negative inhibitor of the full-length receptor and generates large amounts of binding protein. *Mol Endocrinol* 1997;11:265
42. Mercado M, González B, Sandoval C, Esquenazi Y, Mier F, Vargas G, De los Monteros A, Sosa E. Clinical and biochemical impact of the d3 growth hormone receptor genotype in acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:3411
43. Norma Oficial Mexicana NOM-253-SSA1-2012, Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos.
44. Dos Santos C, Essioux L, Teinturier C, Tauber M, Goffin V, Bougnères P. A common polymorphism of the growth hormone receptor is associated with increased responsiveness to growth hormone. *Nature Genetics* 2004;36:720
45. Jorge A, Marchisotti F, Montenegro L, Carvalho L, Mendonca B, Arnhold I. Growth hormone (GH) pharmacokinetics: influence of GH receptor exon 3 retention or deletion on first year growth response and final height in patients with severe GH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:1076-1080.
46. Binder G, Baur F, Schweizer R, Ranke M. The d3-growth hormone (GH) receptor polymorphism is associated with increased responsiveness to GH in Turner syndrome and short small-for-gestational-age children *J Clin Endocrinol* 2006;c91:659-664.
47. Meyer S, Schaefer S, Stolk L, Arp P, Uitterlinden A, Plöckinger U, Stalla G, Tuschy U et al. Association of the exon 3 deleted/full-length GHR polymorphism

- with recombinant growth hormone dose in growth hormone-deficient adults. *Pharmacogenomics* 2009;10:1599
48. Carrascosa A, Esteban C, Espadero R, Fernández-Cansio M, Andaluz P, Clemente M, Audí L, Wollman H, Fryklund L, Parodi L . The d3/fl-growth hormone (GH) receptor polymorphism does not influence the effect of GH treatment (66mcg/kg/d) or the spontaneous growth in short non-GH- deficient small- for-gestational-age children: results from a two year controlled prospective study in 170 Spanish patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 3281-3286.
 49. Blum W, Machinas K, Shavrikova E, Keller A, Stobbe H, Pfaeffle R, Amselem S. The growth response to growth hormone (GH) treatment in children with isolated GH deficiency is independent of the presence of the exón 3- minus isoform of the GH receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 4171-4174.
 50. Carrascosa A, Audi L, Esteban C, Fernández-Cansio M, Andaluz M, Gussinye M, Clemente M, Yeste D, Albisu M. Growth hormone (GH) dose, but not exón 3 –deleted/full length GH receptor polymorphism genotypes, influences growth hormone response to two year GH therapy in short small-for-gestational-age children. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 147-153.
 51. Wassenaar M, Dkkers O, Pereira A, Wit J, Biermasz N, Romijn J. Impact of the exon 3-deleted growth hormone (GH) receptor polymorphism on baseline height and the growth response to recombinant human GH therapy in GH-deficient (GHD) and non-GHD children with short stature: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:3721
 52. Van der Klaauw AA, van der Straaten T, Baak-Pablo R, et al. Influence of the d3-growth hormone (GH) receptor isoform on short-term and long-term treatment response to GH replacement in GH-deficient adults. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008; 93: 2828-2834.
 53. Meyer S, Schaefer S, Stolk L, et al. Association of the exon 3 deleted/full-length GHR polymorphism with recombinant growth hormone dose in growth hormone-deficient adults. *Pharmacogenomics*. 2009 Oct;10(10):1599-608.
 54. Giavoli C, Ferrante E, Profka E, et al. Influence of the d3GH receptor polymorphism on the metabolic and biochemical phenotype of GH-deficient adults at baseline and during short- and long-term recombinant human GH

- replacement therapy. *Eur J Endocrinol*. 2010 Sep;163(3):361-8.
55. Barbosa EJ, Palming J, Glad CA, et al. Influence of the exon 3-deleted/full-length growth hormone (GH) receptor polymorphism on the response to GH replacement therapy in adults with severe GH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009 Feb;94(2):639-44.
56. Adetunji OR, MacFarlane IA, Javadpour M, et al. The d3/fl-GH receptor gene polymorphism does not influence quality of life and body composition in GH-deficient adults receiving GH replacement therapy. *Eur J Endocrinol*. 2009 Oct;161(4):541-6.
57. Kohler. *Gen Comp Endocrinol* 2013;published ahead of print
58. List E, Sackmann-Sala L, Berryman D, Funk K, Kelder B, Gosner E, Okada S, Ding J et al. Endocrine parameters and phenotypes of the growth hormone receptor gene disrupted (GHR^{-/-}) mouse *Endocr Rev* 2011;32:356
59. List. *Mol Endocrinol* 2013; published ahead of print
60. Canello R, Henegar C, Viguerie N, Taleb S, Rauault C, Coupaye M, Pelloux V, Hugol D et al. Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes* 2005;54:2277
61. Hotamisligli G, Arner P, Caro J, Atkinson R, Pielgelman B. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 1995;95:2409
62. Rask E, Olsson T, Söderberg S, Andrew R, Livingstone D, Jhonson O, Walker B. Tissue-specific dysregulation of cortisol metabolism in human obesity *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:1418
63. Erman A, Wabitsch M, Gooyer C. Human growth hormone receptor (GHR) expression in obesity: II. Regulation of the human GHR gene by obesity-related factors. *Int J Obes* 2011;35:1520
64. Hoffman D, O'Sullivan A, Freund J, Ho K. Adults with growth hormone deficiency have abnormal body composition but normal energy metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:72
65. Beauregard C, Utz A, Schaub A, Nachtigall L, Biller B, Miller K, Klibanski A. Growth hormone decreases visceral fat and improves cardiovascular risk markers in women with hypopituitarism: a randomized, placebo-controlled

- study. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:2063
66. Mekala K, Tritos N. Effects of recombinant human growth hormone therapy in obesity in adults: a meta analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:130
 67. Erman A, Veilleux A, Tchernof A, Goodyer C. Human growth hormone receptor (GHR) expression in obesity: I. GHR mRNA expression in omental and subcutaneous adipose tissues of obese women. *Int J Obes* 2011;35:1511
 68. Strawbridge R, Kärvestedt L, Efendic S, Östenson H, Brismar K. GHR exón 3 polymorphism: Association with type 2 diabetes mellitus and metabolic disorder. *Growth Horm IGF Res* 2007; 17: 392-8.
 69. Sorensen K, AKsglaede L, Munch-Andersen T, Aachmann-Andersen N, Leffers H, Wulff Helge J, Hilsted L, Juul A. Impact of the Growth Hormone Receptor exón 3 deletion gene polymorphism on glucose metabolism, lipids, and insulin-like growth factor-I levels during puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 2966-29-69.
 70. Gao L, Zheng Z, Cao L, Shen S, Yang Y, Zhao Z, Zhi D, Cheng R, Pei Z, Yongfu Y, Luo F. The Gowth hormone receptor (GHR) exón 3 polymorphism and its correlation with metabolic profiles in obese chinese children. *Pediatr Diabetes* 2011; 12: 429-34.
 71. Horan M, Nwsay V, Yasmin, Lewis MD, Easter TE, Rees DA, et al. Genetic variation at the growth hormone (GH1) and growth hormone receptor (GHR) loci as a risk factor for hypertension and stroke. *Hum Genet.* 2006 Jun;119(5):527-40.
 72. Maitra A, Shanker J, Dash D, Sannappa PR, John S, Siwach P, et al. Polymorphisms in the pituitary growth hormone gene and its receptor associated with coronary artery disease in a predisposed cohort from India. *J Genet.* 2010 Dec;89(4):437-47.
 73. Martins CS, Fernandes-Rosa FL, Espineira AR, de Souza RM, de Castro M, Barbieri MA, et al. The growth hormone receptor exon 3 polymorphism is not associated with height or metabolic traits in healthy young adults. *Growth Horm IGF Res.* 2014 Aug;24(4):123-9.
 74. Audí L, Carrascosa A, Esteban C, Fernández-Cancio M, Andaluz P, Yeste D, et al. The exon 3-deleted/full-length growth hormone receptor polymorphism does not influence the effect of puberty or growth hormone therapy on glucose

- homeostasis in short non-growth hormone-deficient small-for-gestational-age children: results from a two-year controlled prospective study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 Jul;93(7):2709-15.
75. Glad CA, Carlsson LM, Melander O, Almgren P2, Sjöström L, Nilsson S, et al. The GH receptor exon 3 deleted/full-length polymorphism is associated with central adiposity in the general population. *Eur J Endocrinol.* 2015 Feb;172(2):123-8.
76. Salazar-Flores J, Dondiego-Aldape R, Rubi-Castellanos R, et al. Population structure and paternal admixture landscape on present-day Mexican-Mestizos revealed by Y-STR haplotypes. *Am J Hum Biol.* 2010; 22: 401-9.
77. Jaspinder K. A Comprehensive Review on Metabolic Syndrome. *Cardiol Res Pract.* 2014; 2014:943162. Epub 2014 Mar 11.
78. Berglund L, Brunzell J, Goldberg A, Goldberg I, Sacks F, Hassan Murad M et al. Evaluation and treatment of hypertriglyceridemia : An endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012; 97: 2969-2989.
79. Aguilar Salinas A, Gómez Díaz R, Gómez Pérez F. (2008) *Dislipidemias de lo clínico a lo molecular.* México: Sistemas Inter editores.
80. Bergman RN. A better index of body adiposity. *Obesity (Silver Spring).* 2012 Jun;20(6):1135.
81. Tipler, Paul A. (2000). *Física para la ciencia y la tecnología.* Barcelona: Ed. Reverté.
82. Diccionario de la Real Academia Española de la Lengua (s.f.) recuperado el 24 mayo 2014, de [http:// lema.rae.es/drae/?val=estatura](http://lema.rae.es/drae/?val=estatura)
83. Muller EE, Locatelli V, Cocchi D. Neuroendocrine control of growth hormone secretion. *Physiol Rev.* 1999;79:511-607.
84. Frank SJ. Growth hormone signalling and its regulation: preventing too much of a good thing. *Growth Horm IGF Res.* 2001 Aug;11(4):201-12.
85. Shen Y, Wang L, Zhao Y, You L, Geng L, Gu HF, et al. Evaluation of the association between GHR exon 3 polymorphism and polycystic ovary syndrome among Han Chinese women. *Growth Horm IGF Res.* 2011; 21: 248-51.
86. Cinar N, Dagdelen S, Yorgun H, Canpolat U, Kabakçi G, Erabas T. The clinical and cardiometabolic effects of d3-growth hormone receptor polymorphism in acromegaly. *Pituitary.* 2015;18: 116-25.

87. Andujar-Plata P, Fernandez-Rodriguez E, Quinteiro C, Casanueva FF, Bernabeu I. Influence of the exon 3 deletion of GH receptor and IGF-1 level at diagnosis on the efficacy and safety of treatment with somatotropin in adults with GH deficiency. *Pituitary*. 2015;18:101-7.
88. Padidela R, Bryan SM, Abu-Amero S, Hudson-Davies RE, Achermann JC, Moore GE, Hindmarsh PC. The growth hormone receptor gene deleted for exon three (GHRd3) polymorphism is associated with birth and placental weight. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2012;76(2):236-40.
89. Turgut S, Akin F, Ayada C, Topsakal S, Yerlikaya E, Turgut G. The growth hormone receptor polymorphism in patients with acromegaly: relationship to BMI and glucose metabolism. *Pituitary* 2012; 15:374-9.
90. Baş F, Darendeliler F, Aycan Z, Çetinkaya E, Berberoğlu M, et al. The exon 3-deleted/full-length growth hormone receptor polymorphism and response to growth hormone therapy in growth hormone deficiency and Turner syndrome: a multicenter study. *Horm Res Paediatr*. 2012;77(2):85-93.
91. Centers for disease control (US) Nutrition Division. (1981) A guide to pediatric Weighing and measuring. USA: US Department of Health and Human Services.
92. Guzman Padilla S. (2009) Manual de procedimiento para la medición de circunferencia abdominal. Costa Rica: INCIENSA.
93. O'Brien E, Mangden T, Myers M, Padfield P, Palatini P, Gianfranco P, et al. European Society of Hypertension recommendations for conventional, ambulatory and home blood pressure measurement *Journal of Hypertension* 2003, 21:821–848
94. Levy JC, Matthews DR, Hermans MP. Correct homeostasis model assessment (HOMA) evaluation uses the computer program. *Diabetes Care*. 1998; 21:2191-2192.
95. Wallace TM, Levy JC, Matthees DR. Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care*. 2004 Jun;27(6):1487-95.
96. Adetunji OR, MacFarlane IA, Javadpour M, Alfirevic A, Pirmohamed M, Blair JC. The d3/fl-GH receptor gene polymorphism does not influence quality of life and body composition in GH deficient adults receiving GH replacement therapy. *Eur J Endocrinol*. 2009;161(4):541-6.

ANEXOS

Anexo 1

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN
Y POLÍTICAS DE SALUD
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD
CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO
(ADULTOS)



“Frecuencia de los genotipos del *GHR* (fl/fl, fl/d3, d3/d3) en pacientes con obesidad mórbida y su asociación con el síndrome metabólico”

Número de registro: R-2013-3601-227

Mexico, DF a: _____

Esta investigación tiene como propósito identificar las características de uno de los genes que pueden tener relación con el metabolismo de los azúcares y las grasas en su sangre, así como la distribución de la grasa en su cuerpo. Las variaciones en los genes no significan como tal una enfermedad, simplemente podrían tener relación con las características físicas y metabólicas de las personas.

Su participación en la investigación consiste en autorizar que se realicen análisis en su sangre para identificar algunas características del gen del Receptor de Hormona de Crecimiento. Para ello se obtendrán muestras de sangre y con los resultados obtenidos se formará un banco de datos que podría usarse para investigaciones relacionadas con este estudio.

Este estudio no implica ningún riesgo extra para su salud. Únicamente las molestias relacionadas con el procedimiento para la toma de muestra de sangre, lo cual puede implicar dolor al introducir la aguja y la aparición posterior de un moretón que desaparece a los 7 días aproximadamente.

Su participación en este estudio no significará ninguna ganancia económica o de algún otro tipo, tampoco le causará ningún gasto. No hay un beneficio personal inmediato al participar en este estudio. Sin embargo, su participación ayudaría a incrementar el conocimiento que se tiene sobre los mecanismos que pueden explicar las diferencias entre los pacientes con obesidad.

Los resultados de estos estudios aún no pueden ser asociados con ninguna enfermedad específica en usted o en su familia, por lo cual, los resultados de estos estudios no modificarán de ninguna manera su tratamiento o su pronóstico. El resultado del estudio genético no será entregado de forma rutinaria, sin embargo si usted desea conocerlo, puede ponerse en contacto con los investigadores responsables para que lo pongan a su disposición.

Su participación en este estudio (o su negativa a hacerlo) no modificará de ninguna forma la atención que recibirá por parte del IMSS ni de su personal.

Su identidad y su información personal permanecerán confidenciales por su seguridad, a través de un código numérico. Una vez realizado el análisis en su sangre, las muestras se desecharán, no serán conservadas para otros estudios.

La información genética que se obtendrá es específica de las células que se han estudiado, por lo que no se obtendrá mayor información genética de su persona.

Una vez que haya tenido todas sus preguntas contestadas y que se sienta seguro con su participación en este estudio, firme por favor aquí abajo:

Nombre y firma del paciente

Nombre y firma de quien obtiene consentimiento

Nombre y firma de Testigo 1

Nombre y firma de Testigo 2

En caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podrá dirigirse a:

Investigador Responsable: Dr. Moisés Mercado Atri Tel 56272900 Ext 551 mmercado@yahoo.com

Investigadores asociados: Dra. Patsy Etual Espinosa Cárdenas espinosaetual@gmail.com. Dra. Claudia Ramírez Rentería clau_ramirez@hotmail.com.

En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante podrá dirigirse a: Comisión de Ética de Investigación de la CNIC del IMSS: Avenida Cuauhtémoc 330 4° piso Bloque "B" de la Unidad de Congresos, Colonia Doctores. México, D.F., CP 06720. Teléfono (55) 56 27 69 00 extensión 21230, Correo electrónico: comision.etica@imss.gob.mx

Anexo 2. Hoja de recolección de datos

HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Protocolo: Frecuencia de los genotipos del *GHR* (fl/fl, fl/d3, d3/d3) en pacientes con obesidad mórbida y su asociación con el síndrome metabólico.

Fecha de captura inicial: _____

NOMBRE:		AFILIACIÓN:	
TELÉFONO:		EDAD:	GÉNERO: M F
LUGAR DE ORIGEN:			

AHF
Obesidad:
Cáncer:
Cardiopatía isquémica:
Enf. Tiroideas

APP
Tabaquismo:
Consumo OH:
DM2:
HAS:
Dislipidemia:
Trombosis:
Cardiopatía isq:
SAHOS:
Otros:

EXP FÍS
Talla:
Peso:
IMC:
Cintura:
Cadera:
TA:
Peso Mín:
Peso Máx:

ESTUDIOS DE LABORATORIO:

QS	
Glc	
U	
Cr	
Na	
K	
Cl	
P	
Ca	
Mg	

Perfil lípidos	
CT	
HDL	
LDL	
Trig	
PFH	
BT	
AST	
ALT	
FA	

Otros
TSH
T4L
IGF-1
Insulina

MEDICAMENTOS

OBSERVACIONES

GENOTIPO: fl/fl fl/d3 d3/d3

Anexo 3

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS

Procedimientos:

- Antropometría: fue realizada por la enfermera asignada a la clínica de Obesidad del HECMNSXXI, capacitada por las nutriólogas de la clínica de Obesidad se encargó de realizar las siguientes medidas:
 - **Peso**: antes de subirse a la báscula los pacientes se retiraron zapatos y todo exceso de ropa, así como llaves, bolsa, o algún otro objeto que pudiera sobreestimar su peso. Se colocó al paciente en el centro de la plataforma; de frente al medidor, erguido, con hombros abajo, los talones juntos y las puntas separadas. Los brazos a los costados y holgados, sin ejercer presión. Se evitó que el paciente se moviera para evitar oscilaciones en la lectura del peso. Se registró peso indicado por la báscula [].
 - Se utilizó báscula Toledo de 200 kg O.S.
 - La calibración de la báscula se llevó a cabo cada 3 meses a petición de la Jefatura de Endocrinología por personal de servicios básicos del HECMNSXXI.
 - **Talla**: se midió con el paciente de pie, sin zapatos ni adornos en la cabeza que modificaran o dificultaran la medición. Al colocar al paciente para realizar la medición, se verificó que la cabeza, hombros, caderas y talones juntos se encontraran pegados a la pared bajo la línea de la cinta del estadímetro. Los brazos colgando libre y naturalmente a los costados del cuerpo. Se mantuvo la cabeza del paciente firme y con la vista al frente en un punto fijo. Se deslizó la escuadra del estadímetro de arriba hacia abajo hasta topar con la cabeza del paciente. Se registró la medición []

- Se realizó con estadímetro Seca, instalado en clínica de Obesidad del HECMNSXXI.
 - **Circunferencia de cintura:** se midió al paciente de pie, con los talones juntos y las puntas de los pies ligeramente abiertas en un ángulo de 60 grados. Se realizó la medición sobre ropa ligera, de lo contrario se solicitó que se levantara la ropa. Se localizó la cresta iliaca y el borde de la última costilla, se localizó la mitad de la distancia entre estos dos puntos, se colocó el extremo de la cinta en esta posición y se rodeó el abdomen, se verificó que siempre quedara a la misma altura. Se tomaron las mediciones de frente [102].
 - Se realizó con cinta métrica de fibra de vidrio, inextensible, graduada en cm y sensible en mm, Hergom
 - **Circunferencia de cadera:** se midió al paciente de pie, con los talones juntos y las puntas de los pies ligeramente abiertas en un ángulo de 60 grados. Se realizó la medición sobre ropa ligera, de lo contrario se solicitó que se levantara la ropa. Se localizó el trocánter mayor de la cabeza del fémur, se colocó el extremo de la cinta en esta posición y se rodeó la cadera, se verificó que siempre quedara a la misma altura. Se tomó la medición de frente [103].
 - Se realizó con cinta métrica de fibra de vidrio, inextensible, graduada en cm y sensible en mm, Hergom
- Toma de tensión arterial: el paciente debió haber estado en reposo durante 10 minutos previos, se tomó la medición sentado con el brazo recargado a la altura del corazón, en una posición cómoda. El manguito se colocó alrededor del brazo del paciente, asegurándose que las dimensiones del manguito sean adecuadas (se utilizó un manguito para pacientes con obesidad de 18 cm de ancho). Se revisó que las mangueras estuvieran orientadas hacia la porción inferior del manguito y se mantuviera la fosa antecubital accesible para la auscultación. Se verificó que el borde inferior del manguito se encontrara 2-3 cm sobre el punto de pulsación de la arteria braquial; y que la campana del

estetoscopio se colocara gentilmente sobre el punto de máxima pulsación de la arteria braquial; sosteniéndose firmemente, pero sin ejercer mucha presión, revisando que no estuviera en contacto con la ropa, el manguito o las mangueras, para evitar sonidos de fricción.

El manguito se infló rápidamente hasta 30 mmHg por arriba de la presión sistólica palpada y se desinfló a una razón de 2-3 mmHg por latido (o por segundo).

Se registró la presión sistólica como el primer sonido en aparecer incrementado en intensidad en por lo menos 2 latidos consecutivos . Y el punto en el cual todos los sonidos desaparecieron completamente como la presión diastólica.

Después de que todos los sonidos hubieron desaparecido, el manguito se desinfló inmediata y rápidamente.

Si existió duda en la toma de TA, el procedimiento se repitió habiendo transcurrido un minuto [].

NOTA: Se solicitó que no se cambiara a la enfermera de la clínica de obesidad por el tiempo que durara el protocolo, de manera que todas las mediciones fueron realizadas por un solo observador.

Durante el periodo de estandarización de las mediciones antropométricas la enfermera de la clínica de obesidad fue capacitada y supervisada para la correcta medición del peso, talla y circunferencias de cadera y cintura, por la alumna. Cada una de estas variables se midió y registró al inicio y al final de la evaluación médica de 35 pacientes. La tensión arterial se midió en dos ocasiones con una diferencia temporal de 5 minutos. Los coeficientes de variación intraobservador para las mediciones antropométricas fluctuaron entre 0.90 y 0.95 mientras que para la tensión arterial fue de 0.89.

- Toma de muestra de sangre periférica: Procedimiento realizado por el técnico en laboratorio Gilberto Lino. Tras la realización de asepsia de las manos y colocación de guantes, se realizó punción venosa en la región antecubital, en la parte anterior del brazo, frente y bajo el codo, donde se localiza un gran

número de venas, siendo la vena cubital, mediana y cefálica las utilizadas con mayor frecuencia. Se extrajeron un total de 11 ml en tubos BD vacutainer, distribuidos de la siguiente forma: 2 tubos con EDTA (3 ml cada uno), y un tubo sin anticoagulante tapa roja (5 ml). Los tubos con EDTA fueron destinados para extracción de DNA y genotipificación y determinación de HbA1c. Inmediatamente después de ser tomadas las muestras se les etiquetó con la clave alfanumérica asignada a ese paciente. Un tubo con EDTA trasladado a la UIMEE para extracción de DNA y genotipificación, el otro tubo con EDTA y el suero obtenido del tubo sin anticoagulante se trasladaron al laboratorio central del HE CMN SXXI para su procesamiento.

Procedimientos de Laboratorio

- Determinación de glucosa y perfil de lípidos: Se llevaron a cabo en el laboratorio central del HECMNSXXI, mediante test enzimático colorimétrico, realizado en analizador Roche/Hitachi 912/MODULAR.
 - El analizador para llevar a cabo estas mediciones se calibra todos los días de forma rutinaria.
 - Se lleva a cabo mantenimiento preventivo de este equipo de laboratorio cada 6 meses.

Procedimientos de Biología Molecular

- Extracción de DNA de células nucleadas de sangre periférica. La estandarización de la técnica se llevó a cabo por el Dr. Daniel Castelán Martínez y el QFB Andy Romero Nieves. Se utilizó Kit de extracción de DNA QIAamp DNA mini kit de QIAGEN.
 - Procedimiento:
 1. Pipetear 20 μ L de proteasa QIAGEN en el fondo de un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml.
 2. Añadir 200 μ L de la muestra (capa de leucocitos separada previamente).

3. Añadir 200 μ L de buffer AL a la muestra. Mezclar utilizando vortex durante 15s.
 4. Incubar a 56 grados centígrados por 10 min.
 5. Centrifugar brevemente el tubo de microcentrífuga para eliminar las gotas en el interior de la pared.
 6. Añadir 200 μ L etanol (96-100%) a la muestra, y mezclar con vortex durante 15s. Después de mezclar centrifugar brevemente para eliminar las gotas en la pared del tubo.
 7. Cuidadosamente agregar la mezcla obtenida en el paso 6 a una columna giratoria QIAamo (en un tubo colector de 2 ml) sin mojar el borde, cerrar la tapa y dentrifugar a 8000 rpm por 1 min. Colocar la columna en un tubo de colección nuevo y desechar el tubo colector que contiene el filtrado.
 8. Cuidadosamente abrir la columna QIAamp y agregar 500 μ L del buffer AW1 sin mojar el borde. Cerrar la tapa y centrifugar a 8000 rpm por un minuto. Colocar la columna QIAamp en un tubo colector limpio y desechar el tubo colector que contiene el filtrado.
 9. Cuidadosamente abrir la columna QIAamp y agregar 500 μ L de buffer AW2 sin mojar el borde. Cerrar la tapa y centrifugar a velocidad máxima (14 000 rpm) por 3 min.
 10. Colocar la columna QIAamp en un tubo eppendorf limpio de 1.5 ml y desechar el tubo colector con el filtrado. Cuidadosamente abrir la columna QIAamp y agregar 200 μ L de buffer AE o agua destilada. Incubar a temperatura ambiente por 1 min y centrifugar a 8000 rpm por 1 min.
 11. Para almacenamiento por periodos prolongados del DNA, diluir en buffer AE y conservar a -20 grados centígrados.
- Genotipificación (PCR- punto final): Cada alelo del gen del GHR fue amplificado por separado de DNA genómico utilizando los primers G1, G2 y G3 desarrollados por Pantel [40], con número de acceso GenBank AF155912, AF210633; mediante PCR múltiple.

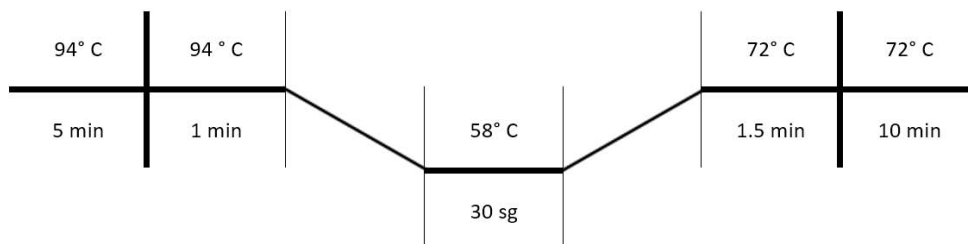
GENOTIPO	OLIGONUCLEÓTIDO SENTIDO	OLIGONUCLEÓTIDO ANTISENTIDO	PRODUCTO
GHR+3	(G1) TGTGCTGGTCTGTTGGT CTG	(G3) CCTGGATTAACACTTTG CAGACTC	935 pb
GHR-3	(G1) TGTGCTGGTCTGTTGGT CTG	(G2) AGTCGTTCTGGGACAG AGA	532 pb

Reactivos: Para preparar la mezcla de reacción de una sola muestra, se utilizaron los siguientes volúmenes:

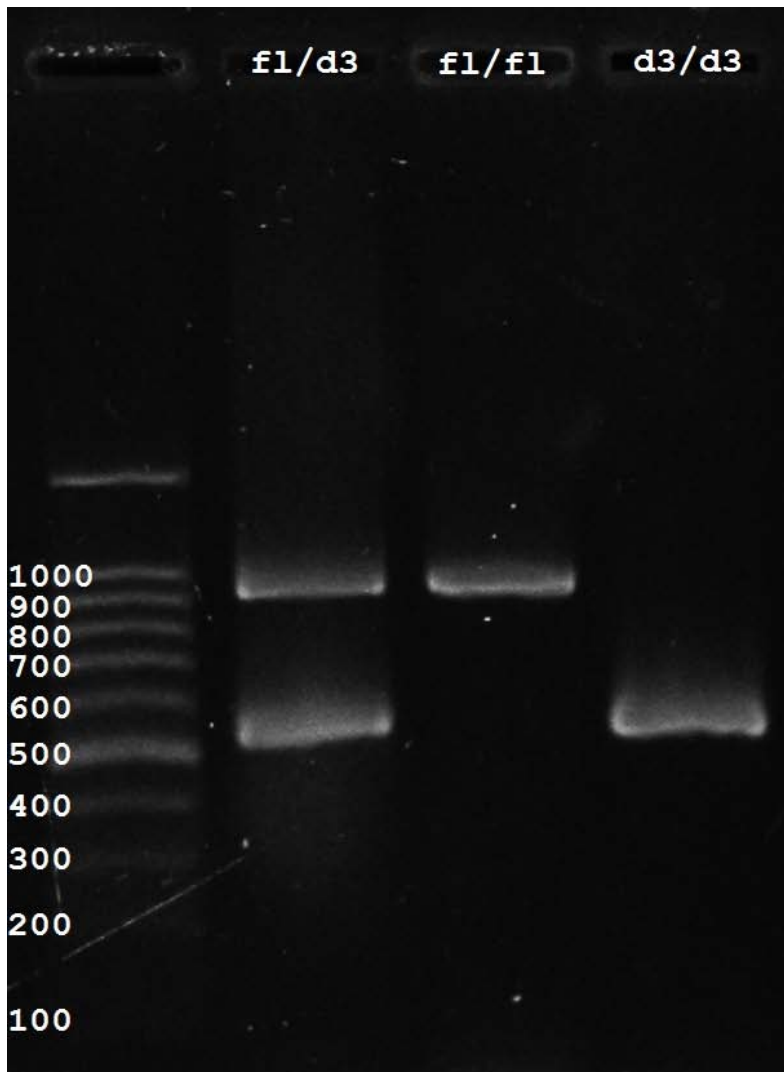
- 12.5 µL de Master mix PCR (Promega).
- 1.2 µL de primers (0.6 µL de G1, 0.3 µL de G2 y 0.3 µL de G3). Primers manufacturados en Integrated DNA Technologies.
- 5 µL de DNA genómico
- 6.3 µL de Agua libre de nucleasas (QIAGEN).

Para la preparación, todo se trabajó en frío o en un contenedor con hielo, se vertió primero el agua, después la master mix, los primers y finalmente el DNA. Lista la mezcla, se llevó a vortex por 5 segundos y un spin.

Parámetros de termociclaje: desnaturalización inicial 94°C por 5 min; 35 ciclos de 94°C por 1 min, posteriormente 58°C por 30s, 72°C por 1.5 min y extensión final a 72°C por 10 min.



El tamaño del DNA amplificado se confirmó por electroforesis en gel de agarosa 2%.



RED FRÍA

- El refrigerador del cubículo de toma de muestras del servicio de Endocrinología se mantiene a una temperatura de 4°C, se verifica esta temperatura por el Técnico encargado de la toma de muestras diariamente.
- El refrigerador de la Unidad de investigación en Endocrinología Experimental se mantiene a 4°C, se verifica la temperatura diariamente por el QFB Andy Romero Nieves.

- El ultracongelador –REVCO de la Unidad de Investigación en Endocrinología Experimental se mantiene a -20°C , se verifica la temperatura diariamente por el QFB Andy Romero Nieves.
- Las muestras se trasladaron en hielera con geles congelados hacia sus diferentes destinos.