2003 A – 2008 A COD. 399364262

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO -493 G/T DEL GEN *MTP* CON PARÁMETROS ANTROPOMÉTRICOS Y BIOQUÍMICOS EN PACIENTES CON SOBREPESO U OBESIDAD.

TRABAJO DE TITULACIÓN EN LA MODALIDAD DE

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

JORGE MARTÍN GONZÁLEZ ÁVALOS

Las Agujas, Zapopan, Jalisco, enero de 2011.

El presente trabajo se realizo en el Laboratorio del Servicio de Biología Molecular en Medicina, O.P.D., del Hospital Civil de Guadalajara "Fray Antonio Alcalde". Esta tesis de Licenciatura se llevo a cabo gracias al apoyo de la **Dra. en C. Erika Martínez López** y el **Dr. Arturo Panduro** director del Servicio, el apoyo incondicional de la **Dra. en C. Montserrat Maldonado González**, con la participación y colaboración de la **Dra. en C. Mónica Ayub Ayala. UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA. AÑO 2011.**

Universidad de Guadalajara

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Coordinación de Carrera de la Licenciatura en Biología

COORD-BIO-172/2010.

C. JORGE MARTÍN GONZÁLEZ AVALOS

PRESENTE

Manifestamos a usted, que con esta fecha, ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de **TESIS E INFORMES** opción **TESIS** con el título: **"Asociación del polimorfismo – 493 G/T del gen *MTP* con parámetros antropométricos y bioquímicos en pacientes con sobrepeso u obesidad."**, para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos, que ha sido aceptado como director de dicho trabajo a la **Dra. Erika Martínez López** y como asesoras a la **Dra. Mónica Ayub Ayala y Dra. Montserrat Maldonado Gonzalez.**

Sin más por el momento, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"
"2010 Bicentenario de la Independencia y Centenario de la Revolución Mexicana"
Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., 30 de noviembre de 2010.

COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA

DRA. TERESA DE JESÚS ACEVES ESQUIVIAS
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

M.C. GLORIA PARADA BARRERA
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

FORMA F

Dra. Teresa de Jesús Aceves Esquivias.
Presidente del Comité de Titulación.
Licenciatura en Biología.
CUCBA.
Presente

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad TESIS E INFORMES, opción TESIS con el título: **"Asociación del polimorfismo -493 G/T del gen *MTP* con parámetros antropométricos y bioquímicos en pacientes con sobrepeso u obesidad"** que realizó el pasante **Jorge Martín González Ávalos** con número de código **399364262** consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente
Las Agujas Zapopan, Jalisco, 30 de noviembre de 2010.

COORDINACION DE LA CARRERA DE LICENCIADO EN BIOLOGIA

Dra. en C. Mónica Ayub Ayala
Asesor Interno

Dra. en C Erika Martínez López
Directora del trabajo

Dra. en C. Montserrat Maldonado González
Asesor Externo

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
M. en C. Margarita Bonilla Moreno		14/01/2011
M. en C. Rosa María Domínguez Arias		14/01/2011
Dr.en C. Jorge Peregrina Sandoval		14/Enero/2011
Supl. Dra. en C. Mónica Ayub Ayala		7/Dic/2010

INDICE

AGRADECIMIENTOS.....ix

RESUMEN.....xi

LISTA DE ABREVIATURAS.....xiv

INDICE DE TABLAS.....xvii

INDICE DE FIGURAS.....xviii

INDICE DE GRÁFICAS.....xviii

ANEXOS.....xviii

1. INTRODUCCIÓN.....1

2. ANTECEDENTES.....2

2.1 Definición de Sobrepeso y obesidad.....2

2.2 Prevalencia de Obesidad.....3

2.3 Prevalencia de Obesidad en México.....3

2.4 Clasificación de Obesidad de acuerdo al IMC.....4

2.5 Distribución de la grasa corporal.....5

2.6 Riesgo patológico en función de la distribución de grasa corporal.....6

2.7 Circunferencia de cintura.....6

3. TEJIDO ADIPOSO.....8

3.1 Tipos de tejido adiposo.....9

4. RESISTENCIA A LA INSULINA.....10

5. ETIOLOGIA DE LA OBESIDAD.....13

5.1 Obesidad monogénica.....14

5.2 Obesidad sindrómica.....14

5.3 Obesidad multifactorial.....15

5.4 Factores ambientales asociados a la obesidad.....15

6. METABOLISMO DE LIPIDOS.....16

6.1 Clasificación y función de lipoproteínas.....17

6.2 Transporte de triglicéridos y colesterol.....18

6.3 Alteraciones en el metabolismo de lípidos.....20

7. PROTEINA TRANSPORTADORA DE TRIGLICERIDOS MICROSOMAL (MTP).....21

7.1 Generalidades de la Proteína transportadora de triglicéridos microsomal (MTP).....21

7.2 Gen *MTP*.....22

7.3 Polimorfismos -493 G/T en el gen *MTP*.....22

8. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....24

9. JUSTIFICACION.....25

10. HIPOTESIS.....26

11. DISEÑO METODOLOGICO.....26

11.1 Objetivo general.....26

11.2 Objetivos particulares.....26

11.3 Tipo de estudio.....27

11.4 Universo de estudio.....27

11.5 Unidad de análisis.....27

11.6 Consideraciones éticas.....27

11.7 Criterios de Inclusión.....27

11.8 Criterios de no Inclusión.....28

11.9 Criterios de exclusión.....28

11.10 Cálculo del tamaño de muestra.....28

11.11 VARIABLES DE ESTUDIO.....29

11.11.1 Variables independientes.....29

11.11.2 Variables dependientes.....30

11.12 CRITERIOS Y ESTRATEGIAS DE TRABAJO 31

11.12.1 Selección de pacientes.....31

11.12.2 Entrevistas personales.....31

11.12.3 Determinaciones bioquímicas.....31

11.12.4 Mediciones clínicas y antropométricas.....32

11.12.5 Aislamiento de DNA en sangre periférica.....32

11.12.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....34

11.12.7 Electroforesis.....35

11.12.8 Análisis de los productos de PCR.....37

11.12.9 Identificación del polimorfismo -493 G/T de MTP.....38

12. ANÁLISIS ESTADISTICO.....38

13. RESULTADOS.....39

13.1 Descripción de la población de estudio.....39

13.2 Estado nutricio.....40

13.3 Características clínicas, antropométricas y bioquímicas.....41

13.4 Identificación de alteraciones metabólicas.....42

13.5 Características dietéticas de los sujetos de estudio.....43

13.6 Identificación del polimorfismo -493 G/T del gen *MTP*.....44

13.7 Características clínicas, antropométricas y bioquímicas de a cuerdo al polimorfismo -493 G/T del gen *MTP*.....47

13.8 Asociación del polimorfismo -493 G/T del gen *MTP* con el perfil de lípidos.....48

13.9 Asociación del polimorfismo -493 G/T del gen *MTP* con alteraciones metabólicas.....49

13.10 Comparación de frecuencias genotípicas del polimorfismo -493 G/T del gen *MTP* a nivel mundial.....51

14. DISCUSION.....52

15. CONCLUSIONES.....55

16. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....56

17. ANEXOS.....63

AGRADECIMIENTOS

Primero y antes que nada, doy **gracias a Dios**, por estar conmigo en cada paso que doy, por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

El primer y principal agradecimiento va dirigido **a mi directora de tesis, Dra. Erika Martínez López** quien a pesar de otras muchas ocupaciones y dificultades se comprometió y trabajó intensamente para sacar esta tesis adelante y que en el camino de la realización de esta tesis he aprendido muchas cosas de ti y quiero que sepas que tienes toda mi admiración y cariño gracias.

Te doy gracias **a ti mamá** por haberme dado la vida y haberme guiado desde que era pequeño y acompañado en los momentos en que más le he necesitado. Por sus consejos por todo el cariño que me brinda por que no existen palabras para agradecerle todo lo que siento, por ser mi motor de superación, por su apoyo, por su amor e incondicionalidad, que no espera nada a cambio. **A mi padre,** que a su manera, siempre ha jugado un papel muy importante en mi vida. Gracias a ti también papá, por ser el proveedor durante todos estos años en qué he estado bajo tu techo; por soportarme por reprenderme cuando lo necesitaba, gracias por los consejos que siempre me diste y por preocuparte en todo momento por mí, por ser un ejemplo de honestidad superación y esfuerzo.

A mis hermanos (Mario, Aurelio, Carmen, Sergio), por darme la estabilidad emocional, sentimental; para poder llegar hasta este logro, que definitivamente no hubiese podido ser realidad sin ustedes. **A mis sobrinos** que espero que con este esfuerzo de lucha sirva para que el día de mañana lleguen a hacer hombres de bien los quiero mucho **(Alejandro, Marco).** GRACIAS por darme la posibilidad de que de mi boca salga esa palabra...**FAMILIA.**

A LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA: Por mi formación académica.

A mis sinodales, M en C Margarita Bonilla Moreno, M en C. Rosa María Domínguez Arias, Dr. Jorge Peregrina Sandoval. A mis asesoras, Dra. Mónica Ayub Ayala Dra. Montserrat González Gracias por el tiempo, apoyo y aportaciones realizadas para la culminación y escritura de de mi tesis.

A mis amigos por su apoyo, por sus consejos por estar cuando los necesitaba por su importante colaboración L.N. Roxana mariza, Dr. José Alfredo, Dr. Iván I Hernández, Dr. Pedro García, Dr. Carlos Ramírez, Dra. Claudia Asenet, Biol. Néstor González, Dra. Zamira Hernández, Dra. Bertha Ruiz Dra. Vianey Zaragoza, Dr. Rodrigo Torres, Dr. Vicente Guerrero, Dr. Oscar Lizárraga MUCHAS GRACIAS, QUISIERA NOMBRARLOS A TODOS PERO ME ES IMPOSIBLE.

Quiero mencionar aparte a unas personas a quien yo quiero mucho primeramente a ti tía **Julieta González** que me conoces desde que era un niño y siempre he recibido cariño y apoyo de su parte porque sin usted no sé si hubiera llegado hasta este momento. A ti, **Q.F.B Daniel Quezada Arellano.** Por ser mi amigo entrañable mi compañero de trabajo, jefe, por darme la oportunidad que quizás nadie me la hubiera dado, por creer en mi aun cuando ni siquiera yo creía en mi, por tus consejos, por todos los buenos y malos momentos que hemos pasado no tengo como pagarte tanto apoyo y cariño gracias.

A las personas que directa o indirectamente me ayudaron y también a las que en su momento obstaculizaron mi camino, ya que gracias a ello me hicieron crecer y he madurado, forjado mi carácter y criterio propio y logrado llegar hasta este momento.

Las grandes obras son hechas no con la fuerza, sino con la perseverancia.

Samuel Johnson 1709-1784. Escritor inglés.

RESUMEN

Introducción: La obesidad es un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades crónico degenerativas como: enfermedad cardiovascular, diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2), hígado graso no alcohólico así como algunos tipos de cáncer relacionados con la obesidad. Se sabe que, en el mundo más de 400 millones de personas padecen obesidad en donde nuestro país no es la excepción ya que, ocupa el segundo lugar a nivel mundial, en la prevalencia de obesidad de la población adulta. Los datos de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (*ENSANUT, 2006*) reportaron un incremento significativo en la prevalencia de sobrepeso (IMC ≥25 kg/m2) así como de obesidad en la población mexicana adulta siendo esta de aproximadamente 70%. Se ha demostrado que, el sobrepeso y la obesidad se asocian a múltiples alteraciones metabólicas entre las que se encuentra resistencia a la insulina (RI), intolerancia a la glucosa, dislipidemias, diabetes *mellitus* tipo 2 e hipertensión arterial entre otras. Uno de los principales factores que contribuyen al desarrollo de la obesidad es la interacción de los genes con el medio ambiente; donde la presencia de mutaciones y/o polimorfismos de moléculas adipogénicas, moléculas así como los genes reguladores del metabolismo de lípidos que juegan un papel importante en esta patología. De los genes que participan en el metabolismo de lípidos, se encuentra el gen que codifica para la proteína MTP, que se localiza en el cromosoma cuatro en el locus 4q23, el cual contiene 18 exones que codifica para una proteína de 894 aminoácidos, con un papel importante en el ensamblaje y la secreción de lipoproteínas como los quilomicrones en el intestino así como VLDL en hígado. Por lo tanto, la importancia de realizar este estudio radica en buscar la asociación entre el polimorfismo -493G/T con parámetros antropométricos, el perfil lipídico de pacientes con sobrepeso u obesidad.

Objetivo: Analizar la asociación del polimorfismo – 493 G/T del gen *MTP* con parámetros antropométricos y bioquímicos en pacientes con sobrepeso u obesidad.

Métodos: Se estudió a una población de 130 sujetos, (102 mujeres y 28 hombres) con sobrepeso u obesidad. A los cuales se les determinaron variables antropométricas, bioquímicas y clínicas. La composición corporal se analizó con un equipo de bioimpedancia eléctrica (InBody 3.0). Los parámetros bioquímicos fueron evaluados mediante química seca, mediante el uso del Analizador Vitros 250. La LDL-c se obtuvo empleando la formula de Friedewald, mientras que, la insulina se determinó por inmunoensayo enzimático. Además la RI se determinó por el HOMA-IR. La genotipificación del polimorfismo -493G/T del gen *MTP* se realizó mediante PCR-RFLP. Finalmente el análisis estadístico se realizó con el software SPSS. Los resultados de las variables cuantitativas se expresaron como medias ± DE y los resultados de variables cualitativas se presentaron en forma de porcentaje. La comparación entre grupos (GG *vs* GT/TT), para variables cuantitativas se realizó mediante la prueba paramétrica "T" Student. Valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativos.

Resultados: El rango de edad (media) de los sujetos estudiados fue de 38.7 ±11 años, el IMC promedio de 32.8±6 kg/m^2, mientras el peso corporal fue de 86.7±18.2 kg. En cuanto a género el 78.5% de los pacientes fueron mujeres (n=102) mientras el 21.5% fueron hombres (n=28). El porcentaje de los sujetos con sobrepeso fue de 39.2% de los cuales el 60.8% presentó obesidad. De acuerdo al grado de obesidad el 28.5% presentó obesidad tipo 1, el 23% obesidad tipo 2 y el 9.3% obesidad tipo 3. Entre las patologías asociadas a la obesidad, se encontró una elevada incidencia de dislipidemias (55.4% hipoalfalipoproteinemia, 48.4% hipertrigliceridemia y 32.3% hipercolesterolemia), resistencia a la insulina (65.3%) y obesidad abdominal (76.2%). La ingesta calórica de los sujetos con sobrepeso u obesidad fue 2307.8± 720 Kcal/día, donde el consumo de grasas fue elevado (37.7±.2%); de los cuales el 11.3 % correspondía a consumo de grasas saturadas. Al realizar la genotipificación del polimorfismo -493 G/T de *MTP* se detectó que, el 54% de los sujetos resultaron ser heterocigotos (n=70); el 39% fueron homocigoto GG (n=51); y el 7% resulto ser homocigoto TT (n=9).

Posteriormente, al realizar la comparación del los genotipos GG *vs* GT/TT; no encontramos diferencias estadísticamente significativas en características clínicas, antropométricas y bioquímicas de acuerdo al genotipo de *MTP*. No existieron diferencias en frecuencias de dislipidemias, resistencia a la insulina y obesidad abdominal por genotipo de *MTP*.

Conclusiones: No existe asociación entre el polimorfismo -493G/T de *MTP* con la ingesta calórica habitual, con consumo de macronutrimentos con parámetros antropométricos y bioquímicos en pacientes con exceso de peso corporal.

LISTA DE ABREVIATURAS COMUNES

AG	Ácidos grasos
ApoA	Apolipoproteína A
ApoB	Apolipoproteína B
Cbp	Cuanto basta para
CC	Circunferencia de cintura
CRP	Proteína C-reactiva
CT	Colesterol total
DM	Diabetes *mellitus*
DM2	Diabetes *mellitus* tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico del inglés "*Deoxyribonucleic acid*"
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
ECD	Enfermedades crónico degenerativas
ENSA	Encuesta Nacional de Salud
HDLc	Colesterol de lipoproteínas de alta densidad
HOMA	Ensayo de modelo homeostático
HOMA-IR	Resistencia a la insulina determinado por HOMA.
HTA	Hipertensión arterial
IAM	Infarto agudo de miocardio
IC	Intervalos de confianza
ICC	Índice de cintura-cadera
IMC	Índice de masa corporal
Kg	Kilogramos

LDLc	Colesterol de lipoproteínas de baja densidad.
LEP	Leptina
MCR4	Receptor de melanocortina 4
$MgCl_2$	Cloruro de Magnesio
min	Minutos
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MTP	Proteína transportadora de triglicéridos microsomal
ng	Nanogramo (s)
nt	Nucleótido(s)
ºC	Grados centígrados
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa del inglés "*Polymerase chain reaction*"
pH	Potencial de hidrogeno
POMC	Pro-opio melanocortina
PPAR-γ	Proliferador de los peroxisomas gamma
QM	Quilomicrones
PA	Presión arterial
RCV	Riesgo cardiovascular

RFLPs	Polimorfismos en longitud de fragmentos de restricción del inglés *"Restriction Fragment Length Polymorphism"*
RI	Resistencia a la insulina
RNA	Acido ribonucleico del inglés *"Ribonucleic acid"*
RNAm	Acido ribonucleico mensajero
rpm	Revoluciones por minuto
seg	Segundos
SM	Síndrome metabólico
SSA	Secretaria de Salud
TBE	Solución amortiguadora: Tris Borato EDTA
TG	Triglicéridos
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
UI	Unidades internacionales
µL	Microlitros
µM	Micromolar
µUI	Microunidades internacionales
µgr	Microgramos

INDICE DE TABLAS

Tabla No.1 Clasificación del estado nutricio de acuerdo al IMC en adultos propuestos por la Organización Mundial de la Salud.....5

Tabla No. 2 Clasificación de la obesidad de acuerdo a la distribución de tejido adiposo.....6

Tabla No.3 Criterios de diagnostico ´para evaluar la obesidad abdominal por circunferencia de cintura.....7

Tabla No.4 Tipo de riesgo a desarrollar enfermedades crónico-degenerativas de acuerdo a la clasificación de IMC y CC.....8

Tabla No.5 Clasificación y composición de las lipoproteínas.....18

Tabla No. 6 Características socio-demográficas y clínicas de los sujetos estudiados.....39

Tabla No. 7 Características generales clínicas y antropométricas de los pacientes.....41

Tabla No. 8 Perfil de lípidos de los pacientes.....42

Tabla No. 9 Frecuencias de dislipidemias, resistencia a la insulina y obesidad abdominal presente en los pacientes.....43

Tabla No. 10 Ingesta dietética habitual de los pacientes.....43

Tabla No. 11 Características clínicas y antropométricas de acuerdo al genotipo del gen *MTP*.....47

Tabla No. 12. Perfil de lípidos de acuerdo al genotipo de *MTP*.....48

Tabla No.13 Frecuencias de dislipidemias de acuerdo al genotipo de *MTP*.....49

Tabla No.14 Ingesta dietética habitual de los sujetos de estudio de acuerdo al genotipo de *MTP* 50

Tabla No.15 Frecuencia relativa de los genotipos del polimorfismo -493G/T de *MTP* reportada a nivel mundial.....51

INDICE DE FIGURAS

Figura No.1 Cascada o vía de señalización de la insulina.....11

Figura No. 2 Mecanismos por los que la obesidad promueve un estado inflamatorio crónico que contribuye al desarrollo de insulino-resistencia, diabetes *Mellitus* tipo 2 y complicaciones vasculares.....13

Figura No. 3 Transporte de triglicéridos y colesterol.....19

Figura No. 4 Estructura de la subunidad M de MTP y homología con lipovitelina.....22

Figura No. 5 Esquema de Extracción de gDNA.....33

Figura No. 6 Etapas de un ciclo de PCR.....34

Figura No. 7 Estructura química de la agarosa.....36

Figura No. 8 Equipo requerido para realizar una electroforesis.....37

Figura No. 9 Fragmentos amplificados y patrones de restricción de los polimorfismos -493G/T del gen *MTP* 44

INDICE DE GRAFICAS

Grafica No.1 Composición corporal de los sujetos estudiados.....40

Grafica No.2 Frecuencia del Polimorfismo -493 G/T del gen de *MTP* en sujetos con sobrepeso u obesidad.....45

Grafica No.3 Frecuencias alélicas del polimorfismo -493 G/T del gen *MTP* en sujetos con sobrepeso u obesidad.....46

ANEXOS

Anexo 1. Consentimiento informado.....63

Anexo 2. Cuestionario aplicado a los participantes.....64

Anexo 3. Formato de PCR.....72

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente existen evidencias donde se demuestra que, la obesidad es un factor de riesgo importante para el desarrollo de enfermedades como la resistencia a la insulina (RI), intolerancia a la glucosa, dislipidemias, diabetes *mellitus* tipo 2, hígado graso no alcohólico, algunos tipos de cáncer así como enfermedades cardiovasculares. Este riesgo aumenta considerablemente en individuos que padecen "síndrome metabólico" el cual se caracteriza por presentar obesidad abdominal, dislipidemias, hipertensión e incremento en la concentración de glucosa plasmática. Se sabe que de los factores causantes de obesidad al menos un 40% son debido a un componente genético ***(Castro-Chávez, 2005).*** Por otra parte la obesidad, es una alteración del balance energético ***(Van der Ploeg 2000)*** que afecta a un gran número de individuos en todo el mundo, en los últimos años los datos demuestran un aumento en la prevalencia e incidencia de obesidad en todos los grupos de edad, razas, grupos étnicos tanto en hombres como en mujeres. México ocupa el segundo lugar a nivel mundial en prevalencia de obesidad en población adulta (mayor a 20 años de edad) de tal manera que, alrededor de 28 millones de personas padecen obesidad ***(WHO 2007).*** Resulta importante que la obesidad no se restringe únicamente a población adulta ya que, nuestro país ocupa el primer lugar a nivel mundial en prevalencia de obesidad infantil (11.3%). Los datos de la encuesta más reciente en México (ENSANUT 2006), reporto un incremento del 12.9% al 21.2 % en la prevalencia de sobrepeso mientras que la obesidad de 4.8% a 11.3%. Por lo tanto, el 32.5% de la población infantil en México tiene un exceso de peso, lo cual repercute en el estado de salud ***(Olaiz-Fernández 2006).***

Por otra parte, los tratamientos actuales se enfocan en la reducción de peso a través de cambios en el estilo de vida (alimentación sana, actividad física diaria, evitar tabaquismo y el exceso en el consumo de alcohol) para reducir los

factores de riesgo de desarrollar enfermedades crónico degenerativas. Sin embargo existen diversos factores fisiológicos, socioculturales, psicológicos asociados al desarrollo de la obesidad, así como factores genéticos que demuestran numerosos estudios ***(Arner 2000; Masson 2003)***. Gracias al avance en biología molecular, se han identificado genes que codifican para proteínas involucradas en la regulación del metabolismo de lípidos. Por lo que se sugiere, que pueden estar asociados al desarrollo de la obesidad. A este tipo de genes corresponde el gen de la proteína de transportadora de triglicéridos microsomal (MTP). La cual participa en el transporte de lípidos, el ensamblaje y la secreción de lipoproteínas en hígado e intestino. Así mismo diversos estudios han mostrado que el polimorfismo -493G/T del gen de *MTP* se asocia con alteraciones plasmáticas de lípidos. Por tal motivo, en el presente trabajo se estudió la asociación del polimorfismo -493 G/T del gen *MTP* con parámetros antropométricos, perfil de lípidos en sujetos con sobrepeso u obesidad, con la finalidad de identificar marcadores que demuestren la susceptibilidad para desarrollar obesidad.

2. ANTECEDENTES

2.1 Definición de sobrepeso y obesidad

El sobrepeso es el estado premórbido de la obesidad, que se caracteriza por la existencia de un índice de masa corporal (IMC) mayor de 25kg/m^2 menor de 27 kg/m^2 en población adulta, siendo en población adulta de talla baja mayor de 23 kg/m^2 y menor de 25 kg/m^2 (***NOM 1998***). Por otra parte la obesidad, es una enfermedad crónico-degenerativa no transmisible con acumulación excesiva de tejido adiposo en el organismo, el cual se genera por un desequilibrio entre la ingesta de alimentos y el gasto energético, siendo la ingesta superior al gasto energético ***(Olaiz-Fernández 2006; NOM-174-SSA1-1998)***.

2.2 Prevalencia de obesidad.

En los últimos años, los datos demuestran un aumento en la prevalencia e incidencia de obesidad en todos los grupos de edad, razas, grupos étnicos, tanto en hombres como en mujeres.

A nivel mundial más de 400 millones de personas padecen obesidad. Estados Unidos de Norteamérica es actualmente el país con mayor prevalencia de obesidad en todo el mundo. Se estima que 1 de cada 3 adultos presenta obesidad ***(Christopher GB 2005)***. La NHANES I (de sus siglas en inglés *National Health and Nutrition Examination Surveys*) reportó que, en el período de 1971 a 1974 había 28.8 millones de adultos obesos. Posteriormente la NHANES II reportó que, de 1976 a 1980 aumentaron los casos de adultos obesos a 34 millones. Para el periodo de 1988 a 1991 la NHANES III reportó que el 33% de la población estadounidense presentaba obesidad, es decir se aumentó a 58 millones personas ***(Eckel 2008)***.

2.3 Prevalencia de Obesidad en México.

México ocupa el segundo lugar a nivel mundial en la prevalencia de obesidad en población adulta (edad mayor a 20 años) de tal manera que alrededor de 28 millones de personas padecen obesidad ***(WHO 2007)***. Por otra parte al igual que la obesidad, la prevalencia de sobrepeso también es elevada siendo mayor en los hombres con un 42.5% a diferencia de las mujeres que es del 37.4%. Por el contrario de acuerdo al género la prevalencia de obesidad es mayor en las mujeres con un 34.5% mientras que, en los hombres es de 24.2%. Por lo tanto, la suma de la prevalencia por género nos permite identificar al peso corporal como un factor de riesgo en las mujeres de 71.9% y de 66.7% en los hombres ***(Olaiz-Fernández 2006)***.

En los últimos años la prevalencia de sobrepeso así como de obesidad en la población adulta en México se ha incrementado. En el año 1993 la Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas (ENEC) reportó una prevalencia de sobrepeso (17.2%) y obesidad (21.5%). Posteriormente los datos de la Encuesta Nacional de Salud mostraron cifras de 38.4% y 24% respectivamente ***(Olaiz G 2003)***; los datos más recientes publicados en la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de 2006 (ENSANUT 2006) reportó una prevalencia sobrepeso (40%) obesidad (29%) ***(Olaiz-Fernández 2006)***.

La obesidad no se restringe únicamente a población adulta. México ocupa el primer lugar a nivel mundial en prevalencia de obesidad infantil con 11.3%. La ENSANUT 2006, reportó un incremento significativo en la prevalencia de sobrepeso siendo de 21.2 % mientras que, la obesidad a 11.3%. Por lo que, en resumen el 32.5% de la población infantil en México aumento de peso, lo cual repercute en el estado de salud de la población ***(Olaiz-Fernández 2006)***.

Por otra parte, es importante mencionar que la circunferencia de cintura (CC) es un indicador de obesidad abdominal que se asocia a riesgo cardiovascular (RCV). De acuerdo a la ENSANUT 2006, la prevalencia de obesidad abdominal determinada por la CC, de acuerdo a los puntos de corte de la Federación Internacional de Diabetes (≥ 80cm mujeres, ≥ 90cm hombres) es de 83.6% para las mujeres y 63.8% para los hombres ***(Sanchez-Castillo 2004; Olaiz-Fernández 2006)***.

2.4 Clasificación de Obesidad de acuerdo al IMC

El método más utilizado para determinar el peso corporal de una persona o el grado de obesidad es el IMC, el cual representa una medida que asocia peso-talla. Sin embargo, aunque el IMC no es una medida directa de adiposidad, tiene utilidad clínica además está reconocida por la Organización mundial de la

salud (OMS). El IMC conocido también como índice de Quetelet, fue acuñado en el año de 1871 por el estadístico J. Quetelet, el cual se calcula de acuerdo a la expresión matemática: peso/talla², donde el peso se expresa en kilogramos y la talla en metros ***(Quetelet 1871).***

La OMS considera peso inferior al normal cuando el IMC está por debajo 18.5kg/m^2 (siendo extrema delgadez cuando es inferior a 16.0 kg/m^2). El sobrepeso se considera para valores comprendidos entre 25 kg/m^2 y 29.9 kg/m^2. Los valores superiores a 30 kg/m^2 se definen como obesidad. Como se puede observar en la tabla 1 se muestran los criterios para clasificar la estructura corporal de un individuo.

Tabla 1. Clasificación del estado nutricio de acuerdo al IMC en adultos propuestos por la Organización Mundial de la Salud

Estado nutricio	IMC (kg/m^2)
Desnutrición	< 18.5
Peso adecuado	18.5 - 24.9
Sobrepeso	25.0 - 29.9
Obesidad I	30 - 34.9
Obesidad II	35 - 39.9
Obesidad III	≥ 40

(Tomado de *OMS, 1998*)

2.5 Distribución de la grasa corporal

La obesidad se puede clasificar de acuerdo a la distribución de tejido adiposo en los distintos depósitos anatómicos. Se ha observado variabilidad en los fenotipos de obesidad debido a los patrones de depósito de grasa, los cuales se controlan genéticamente en hombres y mujeres. De acuerdo a esto, existen cuatro tipos de obesidad en adultos los cuales se muestran en la **Tabla 2.**

Tabla 2. Clasificación de la obesidad de acuerdo a la distribución de tejido adiposo

Tipo de obesidad	Distribución de grasa
Obesidad Androide	Troncal-abdominal
Obesidad Ginecoide	Glúteo-femoral
Obesidad Visceral	Visceral-abdominal
Obesidad Generalizada	Predominancia global de grasa corporal

(Tomado de *Bouchard, 1991*).

2.6 Riesgo patológico en función de la distribución de grasa corporal.

La grasa visceral así como la troncal-abdominal son consideradas de mayor relevancia, debido a que la grasa visceral guarda una relación directa con algunas enfermedades relacionadas con la obesidad como la RI, DM2, enfermedades cardiovasculares, HTA, dislipidemias entre otras. No se conoce con exactitud el mecanismo para dicha asociación; sin embargo se ha propuesto que los adipocitos abdominales tienen una mayor actividad lipolítica.

La obesidad abdominal se puede determinar de manera sencilla a través de la medición de la circunferencia de cintura (CC), la cual es un parámetro antropométrico de gran utilidad que nos permite estimar el riesgo de morbi-mortalidad en el paciente obeso.

2.7 Circunferencia de la cintura. El exceso de grasa abdominal fuera de proporción con respecto al total de la grasa corporal, es un marcador independiente de riesgo para la morbilidad.

La obesidad abdominal se evalúa de manera sencilla mediante la circunferencia de cintura CC, la cual, es una determinación antropométrica práctica y económica que mide el perímetro abdominal en el nivel más estrecho, entre el

borde costal inferior (décima costilla) y la cresta ilíaca, mientras el sujeto asume una posición relajada y abducida al final de una espiración ***(Sanchez-Castillo 2004; Hands 2001)***. Así, diferentes instituciones han establecido puntos de corte para definir obesidad abdominal. En la **Tabla 3** se muestran los puntos de corte para diagnosticar obesidad abdominal a través de la utilización de CC.

Tabla 3. Criterios de diagnóstico para evaluar la obesidad abdominal por Circunferencia de cintura

OMS (2000)	ATP III (2001)	IDF
Hombres ≥ 94 cm	Hombres ≥ 102cm	Hombres ≥ 90 cm
Mujeres ≥ 80 cm	Mujeres ≥ 88 cm	Mujeres ≥ 80 cm

OMS: Organización Mundial de la Salud; **ATP III:** *Adult Treatment Panel*; **IDF:** Federación Internacional de Diabetes.

Debido a que la obesidad abdominal se utiliza como un marcador independiente de riesgo para la comorbilidad de enfermedad cardiovascular, RI, DM2, HTA, dislipidemias, entre otras enfermedades crónico-degenerativas; En la **Tabla 4** se muestran los puntos de corte de IMC, CC así como el nivel de riesgo para desarrollar enfermedad crónica-degenerativa.

Tabla 4. Tipo de riesgo a desarrollar enfermedades crónico-degenerativas de acuerdo a la clasificación de IMC, CC.

Clasificación de sobrepeso u obesidad por IMC, circunferencia de cintura asociados a enfermedades de riesgo.			
		Enfermedades de riesgo relativo de peso normal y circunferencia de cintura	
	IMC(Kg/m^2)	Hombres≤102cm Mujeres≤88cm	> 102 cm > 88 cm
Bajo de peso	<18.5	-	-
Normal	18.5 – 24.9	-	-
Sobrepeso	25.0 – 29.9	Incremento	Alto
Obesidad I	30.0 – 34.9	Alto	Muy Alto
Obesidad II	35.0 – 39.9	Muy Alto	Muy Alto
Obesidad III	≥40	Extremadamente Alto	Extremadamente Alto

3. TEJIDO ADIPOSO

El tejido adiposo es un órgano endocrino, el cual secreta moléculas con actividad endocrina, paracrina y autocrina. Está formado en su mayoría preadipocitos diferenciados durante la adipogénesis, de los cuales del 35-60% se diferencian permaneciendo el resto como preadipocitos. La función normal de los adipocitos es mantener la homeostasis energética en el organismo, almacenando triglicéridos como combustible. A la vez el tejido adiposo puede secretar múltiples moléculas de forma regular, entre ellas: citocinas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), interleucinas 6 y 18 (IL-6, IL-18), proteína C reactiva (CRP de sus siglas en inglés C-Reactive Protein), factores del complemento como el factor D, factor de crecimiento transformante beta (TGF-β), productos protrombóticos como el inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1), adipocitocinas como leptina (LEP), resistina así como un componente del sistema regulador de la presión arterial,

TESIS/CUCBA

el angiotensinógeno. Diversas evidencias, vinculados a obesidad favorecen la manifestación de diversas patologías como DM2, cardiopatías, diversos tipos de cáncer, HTA, osteoartritis entre otras ***(Bender 1998; Flier 2008)***. Por otra parte, algunos estudios sugieren que la obesidad es un desorden inflamatorio donde la inflamación crónica es el vínculo de unión entre la obesidad y sus diversas complicaciones ***(Puchau 2007)***.

La obesidad se caracteriza por el aumento en cantidad (hiperplasia) y tamaño (hipertrofia) de los adipocitos. La diferenciación de los adipocitos está coordinada por diversas moléculas adipogénicas como factores de crecimiento, citocinas, hormonas, y factores de transcripción.

3.1 Tipos de tejido adiposo

Se encuentra distribuido en distintas regiones anatómicas del organismo, sus depósitos se encuentran principalmente a escala dérmica, subcutánea, mediastínica, mesentérica, perigonadal, perirrenal y retroperitoneal. Además se pueden identificar dos tipos de tejido adiposo, el **tejido adiposo blanco** y el **tejido adiposo pardo o marrón**. Ambos tipos de tejido tienen un origen mesenquimático común, vinculados embriológica e histológicamente. El tejido adiposo presenta diferencias de coloración además de características morfológicas, su distribución, expresión de genes y función.

El **tejido adiposo pardo** desde el punto de vista funcional, desempeña una actividad termogénica, que se atribuye a la presencia de adipocitos multiloculares con abundantes mitocondrias las cuales expresan altas cantidades de proteína desacoplante tipo 1 (UCP1). Por el contrario, el **tejido adiposo blanco** está formado por adipocitos uniloculares, que contienen mitocondrias muy diferentes a las encontradas en el tejido adiposo pardo, este tipo de tejido adiposo desempeña un papel importante en varios procesos fisiológicos, como la ingesta de alimentos, la regulación del equilibrio

energético, la acción de la insulina, el metabolismo de la glucosa, la remodelación vascular, la regulación de la presión arterial así como la coagulación. En los últimos años se ha reconocido al tejido adiposo como un órgano endocrino, debido a que secreta varias moléculas conocidas como "adipocitocinas o adipocinas" las cuales provienen principalmente del tejido adiposo blanco.

4. RESISTENCIA A LA INSULINA

La insulina es una hormona sintetizada por las células beta del páncreas bioquímicamente, está formada por dos cadenas de 21 y 30 aminoácidos respectivamente, unidas por dos puentes disúlfuro. Su secreción se realiza en respuesta a la presencia de nutrimentos en la sangre, que utilizan los tejidos para la obtención de energía. En procesos anabólicos, la insulina también induce el almacenamiento del exceso de nutrimentos para su posterior utilización. Entre sus funciones, esta hormona participa en el metabolismo de los hidratos de carbono debido a que favorece la captación, el metabolismo de glucosa en tejidos insulino-sensibles como músculo y tejido adiposo. Este mecanismo se lleva a cabo de la siguiente manera: una vez que se secreta insulina tras la ingestión de alimentos, el 50% de la insulina se degrada en el hígado, el resto llega a los tejidos insulino-sensibles donde se fija a su receptor. El receptor de la insulina es un tetrámero compuesto por dos sub-unidades alfa que se encuentran al exterior de la membrana celular, con dos sub-unidades beta que atraviesan la membrana celular sobresaliendo del interior del citoplasma. Así, la unión de la insulina a las sub-unidades alfa produce una auto-fosforilación de los residuos de tirosina de las cadenas beta del receptor así como la activación de moléculas de señalización intracelulares las cuales, inician una cascada compleja de reacciones de fosforilación y desfosforilación de diferentes proteínas citoplasmáticas que provocan la translocación de los transportadores de glucosa (GLUT, de sus siglas en inglés *Glucose*

Transporters) a la superficie celular, lo cuales transportan la GLU al interior de la célula del tejido específico como se puede observar en la **Figura 1.** ***(Guyton 2002; Bastarrachea 2007).***

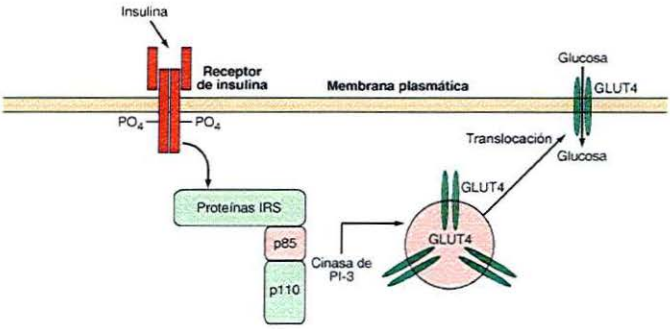


Figura 1. Cascada o vía de señalización de la insulina

(Tomado de Flier, 2008)

La Resistencia a la Insulina (RI) se define como una disminución en la respuesta a la estimulación insulina por los tejidos insulino-sensibles, la cual se caracteriza por una captación anormal de glucosa. La prueba para determinar RI que se considera como el estándar de oro, es el modelo mínimo euglucémico/hiperinsulinémico (de su término en inglés, *clamp),* sin embargo también el HOMA (de sus siglas en inglés *Homeostasis Model Assessment)* se utiliza para estimar la RI; el HOMA-IR se calcula con la fórmula: glucosa (mg/dL) x Insulina (μU/mL) / 405. ***(American Diabetes Association 2001, disponible en línea 7). (Inami S 2007).***

La obesidad se relaciona a RI debido a que en diversos estudios se ha observado que el exceso de tejido adiposo genera una infiltración de gran cantidad de macrófagos, los cuales pueden almacenar lípidos para convertirse en células espumosas ateroescleróticas. Esto a su vez, contribuye a un proceso inflamatorio debido a que los macrófagos junto con los adipocitos, generan la secreción de mediadores pro-inflamatorios como; TNF-α, IL-6, IL-18, MCP1 así como el factor nuclear kappa beta (NF-Kβ), los cuales promueven la RI ***(Tilg H 2006).*** El NF-Kβ es un potente factor de transcripción, que estimula la producción de múltiples mediadores inflamatorios, entre ellos el TNF-α, el cual, puede fosforilar los residuos de serina de las sub-unidades beta del receptor de la insulina, para bloquear la cascada de señalización intracelular de la insulina ***(Flier 2008).***

Además, se ha observado que la obesidad se acompaña de un exceso de ácidos grasos libres en torrente sanguíneo. Esta condición promueve la RI debido a que al llegar la insulina a tejidos insulino-sensibles, el exceso de AG libres compite con la GLU como sustrato celular, lo que genera que, los AG interfieran con la vía de señalización de la insulina. Condición que produce hiperglucemia, debido a que hay deficiencia en la captación de GLU, hiperinsulinemia y RI ***(Keller 1998; Wannamethee 2000; Barreto 2001).*** Finalmente a largo plazo la RI promueve defectos en la secreción de insulina lo que predispone el desarrollo de DM2 ***(Powers 2008).***

La **figura 2**, esquematiza los posibles mecanismos por los que la obesidad promueve un estado inflamatorio crónico que contribuye al desarrollo de insulino-resistencia, diabetes *mellitus* tipo 2 y complicaciones vasculares.

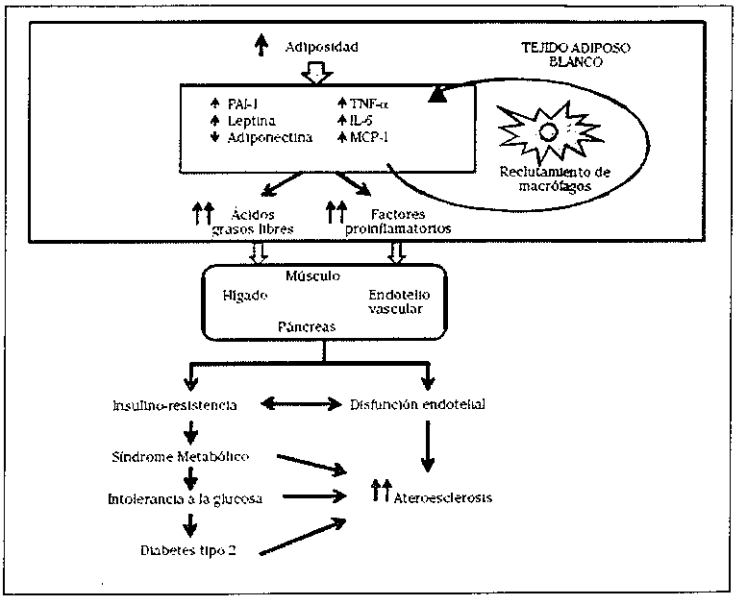


Figura 2. Mecanismos por los cual la obesidad promueve un estado inflamatorio y contribuye al desarrollo de otras enfermedades.
(Tomado de Moreno, 2005)

5. ETIOLOGIA DE LA OBESIDAD

La obesidad es una enfermedad multifactorial crónica caracterizada por un balance energético positivo, donde la genética juega un papel predisponente. De acuerdo a su etiología, la obesidad se clasifica en 3 categorías: obesidad monogénica, obesidad sindrómica y obesidad poligénica.

5.1 Obesidad monogénica

En humanos es el resultado de mutaciones de los genes involucrados con los centros reguladores que controlan el apetito. Sin embargo, los casos son poco comunes, generalmente este tipo de obesidad se reproduce en modelos animales, para el estudio de obesidad. Con la identificación del gen *ob* en el ratón así como su homólogo el gen *Lep* en el humano (***Ichihara S 2008***), se conoce el papel que tiene la proteína llamada leptina en el sistema de señales neuroendocrinas, que regulan el apetito, además del gasto energético, lo que permitió la identificación de genes involucrados en la regulación del apetito vía leptina-melanocortina, donde se incluye al gen de la leptina, al receptor de la leptina, el receptor 4 melanocortina (MC4R), la propiomelanocortina (POMC) y la pro-hormona convertasa (***Christopher GB 2005)***.

5.2 Obesidad sindrómica

Existen cerca de 30 síndromes con obesidad, el cuadro clínico de este tipo de síndromes se acompañan de retraso mental, dismorfias entre otras características. Genéticamente se han asociado a anormalidades cromosómicas o a formas monogénicas con efectos pleiotrópicos.

Entre los síndromes genéticos más frecuentes que originan obesidad, se ha reportado la deleción paterna de la región cromosómica 15q11.2-q12, ya que los genes de esta región del cromosoma materno pueden estar inactivados por impronta genómica. Además de los defectos en el genoma nuclear algunas mutaciones en el genoma mitocondrial se han asociado con desórdenes que incluyen a la obesidad como una manifestación clínica. (***Christopher GB 2005).***

5.3 Obesidad multifactorial.

La gran mayoría de los casos de obesidad forman parte de la obesidad poligénica, es decir se encuentran involucrados varios genes en la aparición de la enfermedad. Actualmente, diversas estrategias han permitido la identificación de este tipo de genes. Dos de las principales estrategias utilizadas son: el estudio de genes candidatos, es decir, genes que previamente se han relacionado con los mecanismos que condicionan el desarrollo de la obesidad. Así como el análisis completo del genoma para detectar regiones cromosómicas ligadas con rasgos cuantitativos (QTL, de sus siglas en inglés, *Quantitative Traits Loci*) asociados a la obesidad. El mapa genético de la obesidad humana resume la existencia de 253 QTLs (obtenidos de 61 escrutinios del genoma completo) y 52 regiones genómicas en las que se ubican QTLs asociados a la obesidad ***(Quinteros 2008)***.

5.4 Factores ambientales asociados a la obesidad

Al considerar a la obesidad como una enfermedad multifactorial, que involucra la presencia de ciertos genes además de los factores ambientales. Dentro de estos los de mayor importancia para su desarrollo son: la excesiva ingesta calórica (alimentación), una disminución del gasto energético, estilos de vida sedentarios, emociones y aspectos culturales.

En relación con la ingesta calórica, se ha comprobado que las dietas ricas en grasas y en carbohidratos simples favorecen el desarrollo de la obesidad, a diferencia del consumo de carbohidratos complejos (***Harrison 2008***).

Por otra parte, la disminución en el gasto energético se encuentra directamente relacionado con el desarrollo de la obesidad, debido a que los sujetos con el paso del tiempo tienden a continuar con su mismo consumo calórico sin embargo disminuye su gasto energético, es decir disminuyen su actividad física lo que favorece, llevar estilos de vida sedentarios. Lo anterior se comprueba

con los datos donde se demuestra una correlación directa entre el grado de sobrepeso con el tiempo utilizado en ver la televisión, en una población infantil. Por otra parte, las emociones juegan un papel en el desarrollo de la obesidad debido a que existe un nexo cada vez más evidente entre el sobrepeso con el malestar psicoemocional. El exceso de peso corporal, suele generar trastornos como la depresión o la ansiedad, altera la autoestima así como la calidad de vida de las personas obesas, las cuales a menudo son discriminadas. Por otra parte, muchas personas ceden habitualmente al impulso de comer desaforadamente, de forma compulsiva en la primera ocasión que se les presenta, cuando se encuentran bajo situaciones de enojo, depresión, ansiedad, estrés o falta de autoestima. **http://www.perderpesoya.info/2009/11/28...**

Por lo anterior, la obesidad se considera como una enfermedad multifactorial compleja, que involucra la interacción de múltiples genes con el medio ambiente. De genes se han identificado los que se relacionan con: la regulación del peso corporal, diferenciación de adipocitos, la ingesta de alimentos y del metabolismo de lípidos, entre otros.

Como parte de los genes que regulan el metabolismo de lípidos, se encuentra el gen *MTP*, por lo tanto resulta importante describir el metabolismo de lípidos así como la acción de la proteína MTP ***(Ichiara 2008; Clement 2003).***

6. METABOLISMO DE LÍPIDOS

Entre las funciones que desempeñan los lípidos, se encuentran el metabolismo energético así como su participación en varios procesos como componentes de membrana, hormonas, vitaminas liposolubles, reguladores biológicos. El principal problema es la digestión, absorción y transporte de lípidos procedentes de la alimentación se debe a la insolubilidad de estas sustancias en los medios

acuosos. La acción de las sales biliares, sustancias detergentes secretadas por la vesícula biliar es esencial para la digestión de los lípidos, su absorción es a través de la mucosa intestinal. **http://www.buenastareas.com**

El problema del transporte de los lípidos o grasas sintetizados por el organismo como, triglicéridos, colesterol, esteres de colesterol, ácidos grasos, fosfolípidos y esfingolípidos por la sangre o linfa se resuelve en parte con la formación de complejos lípidicos con proteínas para formar unos agregados solubles denominados lipoproteínas, que ayudan a trasladar los lípidos desde sus lugares de absorción o síntesis hasta sus lugares de utilización o almacenaje ***(Harry DS 1992)***. Durante el metabolismo de las grasas, el hígado degrada a los ácidos grasos en un proceso llamado β oxidación por lo que convierte el exceso de acetil Coenzima A en cuerpos cetónicos (cetogénesis) ***(Angulo P 2002).***

6.1 Clasificación y función de las lipoproteínas

Se han descrito varias familias de lipoproteínas, cada una de las cuales desempeñan funciones específicas para el transporte de lípidos. Estas lipoproteínas se clasifican de acuerdo a su densidad, tamaño, carga eléctrica y movilidad electroforética. La densidad de las lipoproteínas se determina mediante centrifugación en gradiente de densidad. La clasificación estándar de las lipoproteínas, por orden creciente de densidad son: quilomicrones (Qm), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL),y lipoproteínas de alta densidad (HDL) ***(Redgrave T,1975).*** En la **Tabla 5** se describe la clasificación y composición de las diferentes lipoproteínas.

Tabla 5. Clasificación y composición de las lipoproteínas

	QM	VLDL	IDL	LDL	HDL
Densidad (gm/ml)	< 0-95	0.95 - 1,006	1,006 - 1,019	1,019 – 1,063	1,063 – 1,210
Movilidad electroforética		Pre - beta	Pre - beta	Beta	Alfa
Diámetro (mm)	80 - 1200	30 - 80	26 - 30	18 - 26	6 - 10
Composición (%)					
Proteínas	1 - 2	8 - 10	10 -18	20 - 25	40 -50
Triglicéridos	82 - 83	50 - 52	40 - 50	4 - 6	4 - 6
Colesterol	3 - 5	5	5	5	5
Esteres de colesterol	1	15 - 18	18 - 22	20 - 25	25 - 30
Fosfolípidos	3 - 5	15 - 18	18 - 22	20 - 25	25 - 30
Apolipoproteinas					
AI	+				
AII	+				
B-48	+				
B-100		+	+	+	
E	+	+	+		+
C-I, C-II, C-III.	+	+	+		+

(Tomado de *Ordovás JM, 1999*)

6.2 Transporte de triglicéridos y colesterol

Los quilomicrones son el vehículo para el transporte de los lípidos provenientes de la dieta, desde el intestino hacia el hígado y otros tejidos periféricos. Estas partículas se ensamblan en la mucosa intestinal, transportados a la sangre mediante el sistema linfático. Cuando los quilomicrones llegan a tejido adiposo y/o músculo, su apolipoproteina C-II activa a la lipoproteína lipasa presente en la superficie de los vasos sanguíneos. Debido a la acción de la enzima, los quilomicrones pierden rápidamente triglicéridos. El resto de los quilomicrones formados por la hidrólisis de triglicéridos, son captados por el hígado. Las VLDL, IDL, y LDL, son lipoproteínas estrechamente relacionadas unas con otras. Estas partículas son las encargadas de transportar los triglicéridos,

colesterol y fosfolípidos desde el hígado hacia otros tejidos. Las VLDL se producen en el hígado, se convierten en IDL o LDL por degradación de triglicéridos (como se describió con los quilomicrones). Las LDL suministran el colesterol a los tejidos ***(Diestschy J 1993)***. En contraste, HDL transporta el exceso de colesterol formado en los tejidos y los regresa al hígado para su metabolismo o excreción. Durante el transporte, el colesterol llega a ser acetilado por transferencia de ácidos grasos desde la lecitina. La enzima involucrada es la lecitina colesterol acil-transferasa (LCAT). En la **figura 3** se esquematiza el transporte de triglicéridos y colesterol.

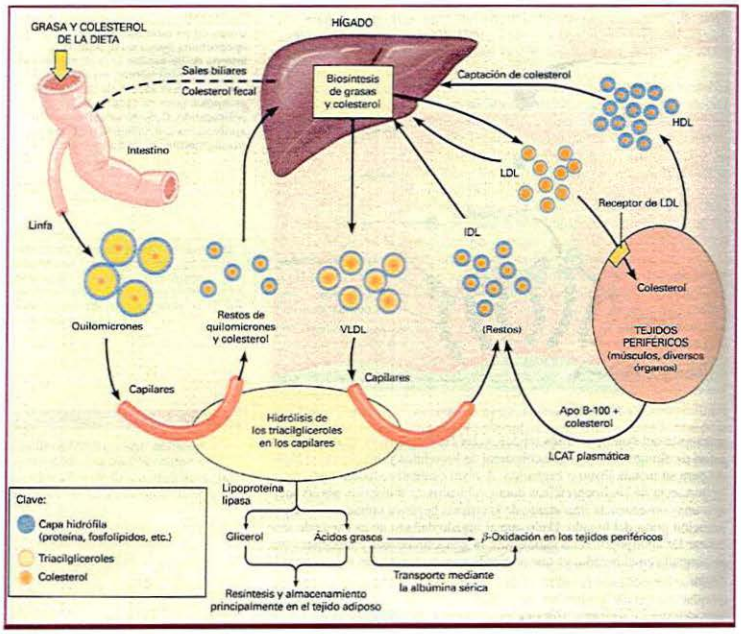


Figura 3. Transporte de triglicéridos y colesterol.

(Tomado de *Mathews, 2005*).

6.3 Alteraciones en el metabolismo de lípidos

La obesidad frecuentemente se vincula con dislipidemias (alteraciones de los niveles de lípidos plasmáticos que incluyen la elevación de CT, LDL, VLDL, TG e hipoalfalipoproteinemia debido a los múltiples efectos que tiene la obesidad sobre el metabolismo de lípidos. El exceso de tejido adiposo así como la RI provocan un incremento en la lipólisis, lo que estimula la liberación de ácidos grasos (AG) a partir de triglicéridos y la oxidación de AG. La hiperinsulinemia que se acompaña de obesidad estimula la síntesis de AG por el hígado lo que, genera una elevación plasmática de AG libres. Por esta razón, cantidades mayores de AG libres, se descargan desde el tejido adiposo hacia el hígado, donde los AG se re-esterifican para formar TG y para ensamblar VLDL, las cuales son enviadas a la circulación y por consiguiente, al incrementarse los niveles de VLDL, se incrementan los de LDL ***(Flier 2008; Brunzell 2007)***. Numerosos estudios han demostrado que las concentraciones plasmáticas de LDL se encuentran relacionadas, de forma directa con el riesgo de enfermedades coronarias, mientras que los valores de HDL-c lo están de manera inversa ***(Carmena 1999)***.

7. PROTEÍNA TRANSPORTADORA DE TRIGLICÉRIDOS MICROSOMAL (MTP)

7.1 Generalidades de la Proteína Transportadora de Triglicéridos Microsomal

La Proteína Transportadora de Triglicéridos Microsomal (MTP), es una proteína que juega un papel muy importante en el transporte de lípidos, necesaria para el ensamblaje y secreción de lipoproteínas de muy baja densidad como las VLDL en el hígado, así como de los quilomicrones en el intestino. La MTP es una proteína heterodimérica que transporta lípidos, formada por una subunidad única de 97-KDa, con una enzima multifuncional (isomerasa disulfuro). La subunidad, le confiere la actividad de transporte de lípidos mientras que, la isomerasa disulfuro realiza la unión al retículo endoplásmico. La presencia de MTP se ha identificado en hepatocitos, enterocitos así como en células de algunos otros tejidos (***Mahmood 2003***). La MTP contiene tres motivos estructurales (β-barril N-terminal, hélice α central y una cavidad lipídica C-terminal) y tres dominios funcionales (transferencia de lípidos, asociación a membranas, sitio de unión a ApoB) (***Harris 1995***).

En la **Figura 4** se muestra el modelo molecular de la subunidad M de MTP en comparación con su homología a la estructura de la lipovitelina.

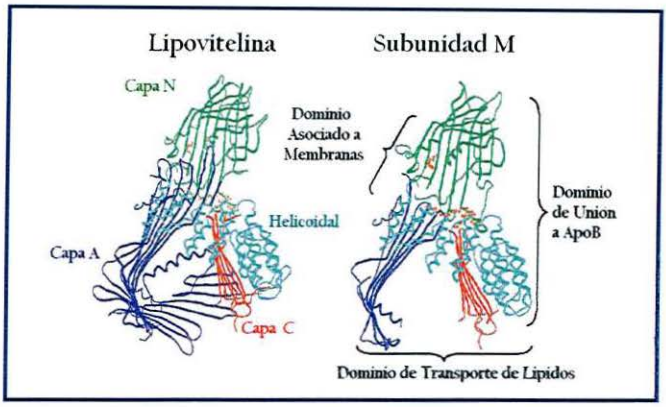


Figura 4. Estructura de la subunidad M de MTP y homología con lipovitelina *(Tomado de Mahmood, 2003).*

7.2 Gen *MTP*

La proteína MTP es codificada por el gen de *MTP*, que se localiza en el cromosoma cuatro en el locus 4q23. El gen contiene 18 exones los cuales codifican para una proteína de 894 aminoácidos. Dicha proteína juega un papel importante en el ensamblaje así como la secreción de lipoproteínas como por ejemplo los quilomicrones en el intestino o las VLDL en hígado. ***(Luevano 2009).***

7.3 Polimorfismos -493 G/T en el gen *MTP*

El gen *MTP* posee distintos polimorfismos entre los que se encuentran -400 A/T, - 164 T / C, -493G/T, I / T 128; los tres polimorfismos ubicados en la región promotora del gen se han estudiado en individuos sanos o con diabetes *mellitus*, dislipidemias primarias, entre otras enfermedades (***Ledmyr H 2002; Rubin 2006; Lundahl 2000***). El polimorfismo -493G/T se ha sido asociado con

diferentes parámetros como el perfil de lípidos, IMC (***Ledmyr H 2002***), insulina, glucosa, presión sanguínea (***Rubin 2006***), obesidad abdominal (***Berthier 2004)*** así como las enfermedades cardiovasculares ***(Ledmyr H 2004).*** La variante T de *MTP* se ha asociado con cambios en los niveles de VLDL y LDL en pacientes diabéticos tipo 2. ***(Carmena 1999; Phillips 2004).*** Existen reportes en los cuales la presencia del alelo -493T se ha asociado con una disminución en suero de colesterol total, VLDL, LDL ***(Ledmyr 2008),*** lo que sugiere la posibilidad de, que niveles bajos de LDL colesterol se asocien al polimorfismo lo cual puede proporcionar protección contra aterosclerosis en pacientes diabéticos tipo 2. Sin embargo, el estudio Framingham no demuestra dicha asociación entre el polimorfismo -493 G/T de *MTP* con concentraciones de lípidos y lipoproteínas. Estudios de pacientes con enfermedades cardiovasculares demuestran que, hombres de raza negra homocigotos para la variante T presentan un aumento en las concentraciones de apo B, LDL colesterol y triglicéridos en plasma. La explicación a estas discrepancias pueden ser debido a que, el fenotipo del polimorfismo -493 G/T de *MTP* está fuertemente regulada por la obesidad visceral. ***(Ledmyr H 2004).*** Algunos reportes demuestran un incremento del mRNA de *MTP* con aumento en el número de quilomicrones, con una potencial alteración aterogénica. Por otra parte, estudios realizados en pacientes con DM2 el polimorfismo -493G/T se ha asociado como marcador de esteatosis hepática no alcohólica ***(Phillips 2004).*** Se ha demostrado que el homocigoto para el alelo G presenta un incremento en la concentración de LDL en pacientes diabéticos tipo 2 de origen chino, pero no había efectos en los sujetos heterocigotos. En sujetos no diabéticos heterocigotos no hay cambios en las VLDL, LDL, triglicéridos o colesterol, mientras que para sujetos homocigotos para el alelo T el número de partículas de VLDL, LDL y colesterol total es significativamente menor. Además en la actualidad se reconoce que estas patologías mencionadas anteriormente están relacionadas con componentes genéticos en estos casos la identificación oportuna es muy importante. La genética de los individuos representa un factor

importante; en la variedad Inter-individual de los niveles séricos de colesterol, triglicéridos y lipoproteínas portadoras de estos lípidos ya que representan un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (***Phillips 2004)***.

8. PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA

La obesidad es una enfermedad crónica degenerativa (ECD), caracterizada por un exceso de tejido adiposo en el organismo, que se origina por un desequilibrio de la ingesta con el gasto calórico, siendo mayor la ingesta. Aproximadamente el 70% de la población adulta en México, presenta sobrepeso u obesidad. En la actualidad la población infantil se está viendo afectada, donde casi un tercio de la población infantil presenta problemas de peso corporal. Por lo tanto, la obesidad representa un problema de salud pública en nuestro país, por su elevada prevalencia así como la morbi-mortalidad la cual se asocia con: resistencia a la insulina, diabetes *mellitus* tipo 2, enfermedades cardiovasculares, cáncer entre otras. El costo de la atención médica, de las enfermedades relacionadas con el sobrepeso u obesidad como las enfermedades cardiovasculares, cerebro-vasculares, hipertensión, algunos tipos de cáncer así como de *diabetes mellitus* tipo 2, se incrementó en un 61% durante el periodo 2000-2008, al pasar de 26,283 millones de pesos a 42,246 millones de pesos. Para el 2017 se estima que, dicho gasto será alrededor de los 77,919 millones (en pesos de 2008). Esto debido a que la aportación financiera que el país destina al tratamiento médico de la obesidad corresponde aproximadamente a $54, 083 millones de pesos, lo cual representa el 10.8% de todo el presupuesto en salud o 0.5% del Producto Interno Bruto ***(Freedman 2001)***. Existen factores fisiológicos, socioculturales, psicológicos que favorecen el desarrollo de obesidad además de los factores genéticos, que se han puesto de manifiesto en numerosos estudios ***(Arner 2000; Masson 2003)***. Hoy en día, el avance en la biología molecular ha permitido la identificación de genes que codifican para proteínas que, regulan el metabolismo de lípidos. Por lo tanto su

relación, en el desarrollo de la obesidad, abre una alternativa de estudio donde genes como el gen de la proteína de transportadora de triglicéridos microsomal (*MTP*), que participa en el transporte de lípidos, ensamblaje y secreción de lipoproteínas como las VLDL en el hígado y los quilomicrones en el intestino puede relacionarse con las manifestaciones así como las características típicas de la obesidad. Diversos estudios han mostrado la relación del polimorfismo -493G/T del gen de *MTP* con las alteraciones de lípidos plasmáticos. Por tal motivo, en el presente estudio se pretende investigar si existe una asociación del polimorfismo -493 G/T de gen *MTP* con parámetros antropométricos y bioquímicos en sujetos con sobrepeso u obesidad con la finalidad de encontrar marcadores de susceptibilidad a la obesidad.

9. JUSTIFICACIÓN

La obesidad es un problema de salud prioritario debido a que esta condición patológica representa ser factor de riesgo para el desarrollo de diversas ECD. La OMS reconoce que, alrededor de 18 millones de personas mueren cada año por patologías asociadas con la obesidad. La OMS estima la existencia de 1 billón de adultos con sobrepeso y al menos 300 millones adultos con obesidad. Sin embargo, la diversidad étnica de cada población requiere ajustar los criterios de diagnóstico del sobrepeso o la obesidad para cada etnia, la prevalencia de sobrepeso en adultos se incrementa a 1.7 billones en todo el mundo. Así, que la prevalencia para el año 2015 será de aproximadamente 2.3 billones de adultos con sobrepeso y más de 700 millones con obesidad ***(Walley 2006; OMS 2007)***.

Actualmente, México ocupa el segundo lugar en prevalencia de obesidad a nivel mundial en población adulta. El padecimiento de esta enfermedad trae como consecuencia el desarrollo ECD, las cuales tienen una elevada morbi-mortalidad en nuestra población. Uno de los principales orígenes para el

desarrollo de la obesidad es la interacción gen-medioambiente además de otros factores como la presencia de mutaciones y/o polimorfismos en moléculas adipogénicas, los genes reguladores del metabolismo de lípidos los cuales son parte importante para su manifestación. Por lo tanto, la importancia de realizar este estudio radica en establecer el papel que juega la presencia del polimorfismo -493G/T en nuestra población con parámetros antropométricos y bioquímicos en pacientes con sobrepeso u obesidad.

10. HIPÓTESIS

Ho: El polimorfismo -493G/T no se asocia a alteraciones en parámetros antropométricos y bioquímicos en pacientes con sobrepeso u obesidad.

Hi: El polimorfismo -493G/T se asocia a alteraciones en parámetros antropométricos y bioquímicos en pacientes con sobrepeso u obesidad.

11. DISEÑO METODOLÓGICO

11.1 Objetivo General

Analizar la asociación del polimorfismo – 493 G/T del gen *MTP* con parámetros antropométricos y bioquímicos en pacientes con sobrepeso u obesidad.

11.2 Objetivos Particulares

1. Evaluar los parámetros antropométricos en sujetos con sobrepeso u obesidad.
2. Identificar las alteraciones metabólicas en sujetos con sobrepeso u obesidad.
3. Determinar la frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo -493 G/T del gen *MTP* en los sujetos de estudio.

4. Analizar la asociación del polimorfismo -493 G/T del gen *MTP* con parámetros antropométricos y bioquímicos.
5. Analizar la asociación del polimorfismo -493 G/T del gen *MTP* con la presencia
   De resistencia a la insulina y obesidad abdominal.

11.3 Tipo de Estudio

Estudio descriptivo, observacional, transversal.

11.4 Universo de Estudio

Sujetos con sobrepeso u obesidad de 18 a 65 años de edad.

11.5 Unidad de análisis

Sujetos con sobrepeso u obesidad con edades de 18 a 65 años portadores del polimorfismo -493G/T del gen *MTP* y residentes de la Zona Metropolitana de Guadalajara

11.6 Consideraciones Éticas

Normas y principios éticos para las investigaciones médicas en humanos Declaración de Helsinki (59ª Asamblea General de la Asociación Médica Mundial, Seúl, Corea, 2008).

11.7 Criterios de inclusión

- Sujetos de ambos géneros que presenten Sobrepeso u Obesidad (IMC ≥ 25 kg/m^2)

- Ser mayor de edad (>18 años)
- Sujetos que firmen la hoja de consentimiento informado (ANEXO 1. Consentimiento Informado)

11.8 Criterios de no inclusión

- Enfermedad crónico degenerativa previamente diagnosticada (DM2, cardiovasculares, HTA)
- Diagnostico previo de enfermedades endocrinas
- Estar bajo algún tratamiento para bajar de peso
- Estado fisiológico de embarazo
- Consumo de bebidas alcohólicas (≥20gr/día)
- Consumo de fármacos hipolipemiantes, hipoglucemiantes
- Consumo de alguna Droga o derivado

11.9 Criterios de exclusión

- Sujetos con IMC ≥ 25 kg/m^2 por exceso de masa muscular
- Muestra insuficiente o degradación del DNA
- No sea posible genotipificar la muestra

11.10 Cálculo de tamaño de muestra

Para determinar el tamaño de la muestra en cada grupo de genotipos (-493GG *y* -493GT/TT), se utilizó la fórmula de Fleis *(**Fleis 1987**, Statistical methods for rates and proportions)*:

$$N= \frac{p1q1+p2q2\ (Z\alpha+Z\beta)^2}{(p1-p2)^2} = \frac{19*81+50*50\ (1.96+0.85)^2}{(19-50)^2} = 33$$

N= tamaño de la muestra

p1= probabilidad del alelo *T*

q1= probabilidad del alelo *G*

Zα= error estándar 1

Zβ= error estándar 2

El tamaño de muestra mínimo requerido fué de 33 sujetos para cada grupo de genotipo (-493GG y -493GT/TT), determinado en base a la frecuencia del alelo *T* ***(Luevano KE 2009)***.

Así, de acuerdo a estos datos, se obtuvo la selección de la muestra mediante un muestreo dirigido (no probabilístico) de sujetos voluntarios, en el que se seleccionaron individuos con las características especificadas previamente en los criterios de inclusión del estudio. De esta manera, la muestra quedó conformada por 130 sujetos de la zona metropolitana de Guadalajara.

11.11 VARIABLES DE ESTUDIO

11.11.1 Variables independientes:

- Genotipos del gen *MTP*
- Género
- Edad

11.11.2 Variables dependientes:

Mediciones antropométricas

- Peso corporal
- IMC
- Circunferencia de cintura (CC)
- Circunferencia de cadera (CCa)
- Índice Cintura-Cadera (ICC)
- % de grasa corporal

Mediciones clínicas

- Presión arterial sistólica
- Presión arterial diastólica

Mediciones bioquímicas

- Triglicéridos (TG)
- Colesterol total (CT)
- LDL
- HDL
- VLDL
- Glucosa
- Insulina
- Proteína C reactiva (CRP)

11.12 CRITERIOS Y ESTRATEGIAS DETRABAJO

11.12.1 Selección de pacientes

La inclusión de pacientes, se realizó mediante una convocatoria en diferentes instituciones del sector salud. A los posibles participantes se les realizó una pre-valoración clínica y antropométrica para determinar, el cumplimiento de los criterios para incluirlos en el estudio. Una vez seleccionados, se les informó sobre la naturaleza de la investigación, una vez aclaradas las dudas se procedió a recabar la firma del consentimiento informado.

11.12.2 Entrevistas personales

Cada sujeto fue entrevistado con el fin de obtener información de aspectos demográficos, antecedentes familiares, patológicos, así como el estilo de vida (actividad física, tabaquismo o consumo de alcohol etc.) Esta información se obtuvo con la utilización de un cuestionario estandarizado (Anexo 2. Formato de Entrevista).

11.12.3 Determinaciones bioquímicas

Las muestras de sangre se obtuvieron por la mañana, previo ayuno de 12 horas. Todas las evaluaciones bioquímicas se determinaron por química seca en un Analizador Vitros 250. Los parámetros bioquímicos evaluados fueron: TG, CT, HDL, LDL y VLDL, Glucosa y CRP. La insulina se determinó mediante un Inmuno ensayo enzimático de micropartículas (MEIA). La resistencia a la insulina fue calculada con base al HOMA; el cual se obtiene mediante la aplicación de la fórmula: glucosa (mg/dL) x Insulina (µU/mL) / 405; y a este índice se le conoce como HOMA-IR (Resistencia a la insulina determinado por HOMA).

11.12.4 Mediciones clínicas y antropométricas

Las mediciones antropométricas también se realizaron en ayuno de 12 horas. Se obtuvo la talla utilizando un estadímetro con precisión de 0.5 cm. La circunferencia de cintura se obtuvo en el nivel más estrecho, entre el borde del costal interior y la cresta iliaca. La circunferencia de cadera se tomó en el nivel posterior máximo de protuberancia de los glúteos. Para determinar la composición corporal se utilizo un equipo In Body 3.0. La presión arterial se obtuvo con un esfigmomanómetro digital. El estado nutricio se efectuó de acuerdo a indicadores antropométricos, bioquímicos, clínicos y dietéticos.

11.12.5 Aislamiento de DNA en sangre periférica

La extracción del DNA genómico (gDNA) se realizó mediante la técnica modificada de Miller (Miller 1998). A partir de 3 ml de sangre periférica se transfiere la sangre a tubos Falcón de 10 ml, se adicionan 3 ml de TTS (tris-tritón-sacarosa), posteriormente se centrifugan a 3500 rpm durante 15 min. Al terminar se decanta el sobrenadante a un vaso con cloro (desechar). Este es un punto muy importante puesto que en el fondo queda un botón que no debe perderse al decantar los tubos. Agregar al botón 1ml de TTS, transferirlo a un tubo Eppendorf de 1.5 ml, homogeneizar fuerte (con la mano o con un vortex con disco agitador para tubos Eppendorf) hasta disolver el botón, centrifugar con una microcentrifuga a 12,000 rpm durante 2 min., decantar el sobrenadante y agregar 1 ml de TTS, otra vez disolver el botón, centrifugar otros 2 min (este paso se tiene que repetir hasta que el botón quede blanco). Una vez que se haya desechado el sobrenadante, al botón blanquecino restante se le agregan 570 uL de NaCl 5mM (solución hipotónica) homogeneizar 2 min (aquí no se decanta) e inmediatamente agregar 30 uL de Solución Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) al 10%, homogeneizar en el vortex 15 minutos, añadir 200 uL de NaCl saturado, homogeneizar 15 min. Centrifugar a 11,500 rpm por 30 min a 4ºC. Finalmente, se decanta la fase acuosa superior que contiene el gDNA a un tubo

con 2 ml de etanol absoluto frío, se almacena el tubo en un congelador a - 20°C durante toda la noche (Para facilitar la precipitación). El gDNA precipitado es capturado con una micropipeta automática de 1 ml y transferido a un tubo eppendorf de 1.5 ml con 500 ml de etanol al 70%, posteriormente el tubo eppendorff se centrifuga a 9,000 rpm durante 10 min a 4°C. Al terminar se vuelve a decantar, se coloca el tubo eppendorff boca abajo en gasa estéril para resuspender el botón con 250 uL de agua destilada desionizada estéril (DDW). En la **figura 5** se esquematiza el protocolo de extracción del gDNA. **NOTA:** Las muestras se conservan en refrigeración a 4°C durante toda la noche para permitir la hidratación de gDNA.

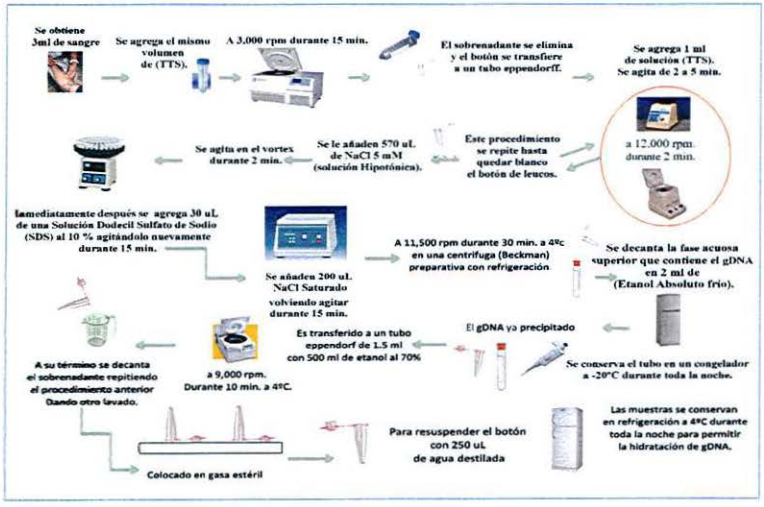


Figura 5. Esquema de la extracción del gDNA

11.12.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

El objetivo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es obtener una gran cantidad de copias de un fragmento de DNA específico.

La técnica de PCR descrita por Kary B. Mullis en 1983, la cual consiste en una amplificación del DNA *in vitro*, donde un segmento de DNA se amplifica mediantela utilización de un par de cebadores o iniciadores, de acuerdo a la especificidad de las secuencias podemos amplificar regiones concretas de DNA.

La PCR consiste en ciclos de los cuales cada uno constan de temperatura de desnaturalización, alineamiento (paso en el cual los cebadores se unen a sus secuencias específicas) y la ultima temperatura es la de extensión en donde la enzima *Taq* polimerasa ("*termophilus aquaticus polimerase*") sintetiza el DNA sólo en la región en la que se han hibridado los cebadores. En la **Figura 6** se esquematiza las etapas de un ciclo de PCR.

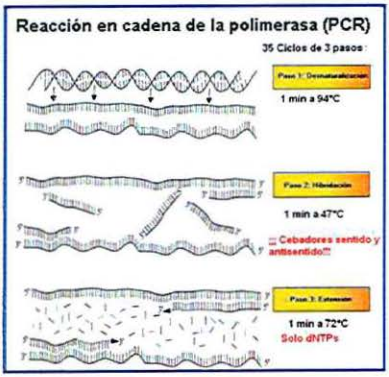


Figura 6. Etapas de un ciclo de PCR

Las condiciones de amplificación del PCR son las siguientes: volumen final de 50 µL, *buffer* 1X para PCR, (Tris-HCl, KCl, $(NH_4)_2SO_4$, pH 8.7), 1.5 mM de $MgCl_2$, 0.2 mM de dNTPs, (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 0.1 µM de cada Iniciador (iniciador sentido: 5´ AGTTTCACACAT**A**AGGACAATCATCTA3´ e iniciador antisentido: 5´GGATTTAAATTTAAACTGTTAATTCATATCAC 3´, y 1.25 U de *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen Life Technologies), y 1 µg de gDNA y se le adiciona H_20 c.p.b 50µL de reacción. La PCR se llevó a cabo en un termociclador Perkin Elmer 2400 con una desnaturalización inicial de 94ºC durante 5 min, seguido de 35 ciclos de PCR constituidos de una desnaturalización de 94ºC por 1min, alineamiento de 47ºC por 1 min y la extensión de 72ºC por 1 min, se considero un ciclo de extensión final de 5 min a 72ºC **(Modificado de *Phillips 2004*)**.

El tamaño del amplicon es de 109pb (Anexo 3. Formato de PCR). El diseño y análisis de la secuencia de los iniciadores se obtuvo con ayuda del programa Oligo 7 (http://www.pitt.edu/~rsup/OligoCalc.html), y la genoespecificidad se evaluó mediante el programa Blast, (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

11.12.7 Electroforesis

La agarosa es el soporte sólido más utilizado para electroforesis horizontal, es un polisacárido formado por unidades de agarobiosa (β-D-Galactosa-3,6 anhidrido-α-L-Galactosa). En la **figura 7** se esquematiza la estructura química de la agarosa.

El principio básico de la electroforesis consiste en la migración de moléculas, eléctricamente cargadas, por acción de un campo eléctrico, a través de un soporte o matriz de naturaleza porosa; por lo tanto la separación de las moléculas depende del tamaño o peso molecular y la forma de las mismas.

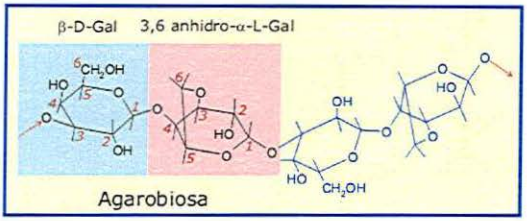


Figura 7. Estructura química de la agarosa

La migración del DNA se ve afectada tanto por la composición como por la fuerza iónica del amortiguador empleado de manera que se debe establecer un balance de iones que genere una fuerza iónica suficiente para lograr la conductividad eléctrica, sin excederse ni ocasionar en el peor de los casos un calentamiento excesivo con función de la agarosa y desnaturalización del DNA.

Entre los amortiguadores más usados se encuentran Tris – acetato – EDTA (TAE), -Tris borato- EDTA (TBE) y Tris- Fosfato- EDTA (TPE).Para que la electroforesis se pueda llevar a cabo, es necesario el empleo de una solución amortiguadora que proporcione la fuerza iónica y sirva como conductor de la corriente eléctrica.

Otro buffer de suma importancia en la electroforesis es el de carga del gel, formado por los colorantes azul de bromofenol y xilencianol; esta mezcla tiene como propósito simplificar la carga del gel al proporcionar color a la muestra e incrementar la densidad de la misma.

Para detectar los productos de PCR, es necesario teñir el gel de agarosa con bromuro de etidio, esta sustancia se intercala entre las bases del DNA y emitir fluorescencia en presencia de la luz ultravioleta (UV), de manera que el colorante unido al mismo presenta una mayor fluorescencia (***Sambrook 2001***).

En la **figura 8** se esquematiza todo el equipo requerido para la realización de la electroforesis.

1) **Cámara de electroforesis horizontal,** sitio físico para realizar la electroforesis, 2) **Fuente de poder**, proporciona el voltaje adecuado para el mantenimiento del campo eléctrico, 3) **Transiluminador,** equipo con lámparas que proporciona luz ultravioleta y 4) **Equipo de fotodocumentación** el cual sirve para digitalizar la fotografías de los geles.

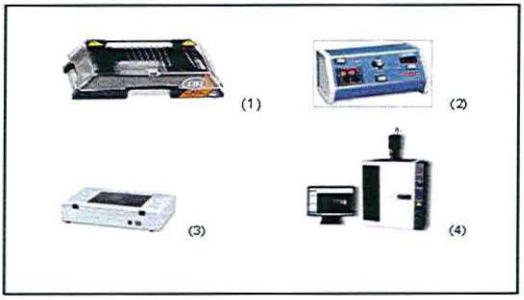


Figura 8. Equipo requerido para realizar una electroforesis.

11.12.8 Análisis de los productos de PCR.

Por lo tanto, para identificar el producto de la reacción de PCR se sometió a una electroforesis en gel de agarosa al 3% a una intensidad de campo eléctrico no mayor de 80V y con buffer TBE 1X como conductor; además se utilizó 1.2µL de buffer de carga por muestra ***(Sambrook 2001)*** y el gel fue teñido con bromuro de etidio.

El marcador de peso molecular utilizado como referencia para el análisis fue de 50pb (Invitogen™), se eligió este marcador debido a que el tamaño del producto de PCR esperado es de 109 pb, después del corrimiento del producto de PCR es visualizado en un transiluminador de luz ultravioleta (*Biomaging System*™), además los geles de interés son fotodocumentados para análisis posteriores.

11.12.9 Identificación del polimorfismo -493G/T del gen *MTP*

A partir del producto de PCR de 109pb previamente amplificado; se tomaron 40µl del fragmento amplificado y se incubaron con 2.5 U de la enzima de restricción *Hph I* (Biolabs) durante 16 hrs a 37ºC. Los fragmentos de restricción fueron analizados en un gel de agarosa al 3% y fueron teñidos con bromuro de etidio. El genotipo silvestre (GG) corresponde a fragmentos de 89 y 20 pb; el genotipo heterocigoto corresponde a 109, 89 y 20 pb; mientras que el genotipo polimórfico (TT) corresponde a un fragmento de 109 pb. El 50% de las muestras fueron genotipificadas por duplicado para confirmar los resultados.

12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó el software SPSS versión 11.0, para el análisis estadístico los sujetos heterocigotos (GT) y homocigotos (TT) fueron agrupados como un solo grupo (GT/TT) vs el grupo silvestre (GG).

El análisis descriptivo de las variables cuantitativas se expresaron como medias ± desviación estándar y las variables cualitativas como frecuencias (%). La comparación entre grupos para variables cuantitativas se realizó mediante la prueba paramétrica "t" Student.

13. RESULTADOS

13.1 Descripción de la población de estudio.

En el presente trabajo se estudiaron un total de 130 sujetos, que presentaron sobrepeso u obesidad (IMC≥25kg/m^2), de los cuales, 78.5% fueron mujeres (n=102) y el 21.5% fueron hombres (n=28). La media de edad fue de 38.7 ±11 años, el rango de edad fue mínimo de 20 años y el máximo de 62 años. Las características socio-demográficas y clínicas de los sujetos estudiados se muestran en la **Tabla 6.**

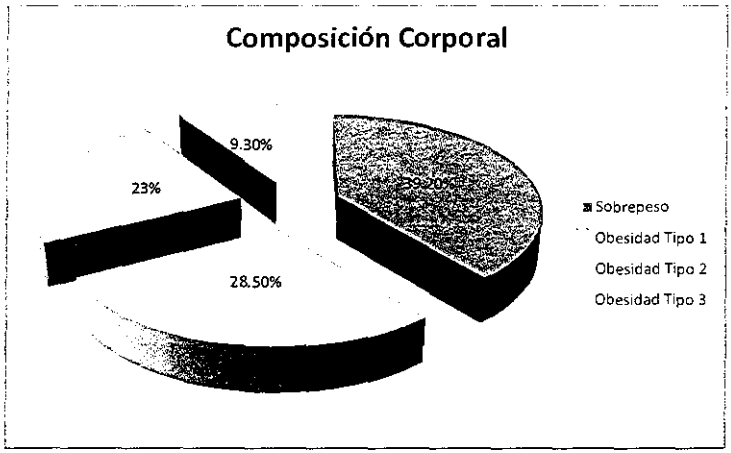
Tabla 6. Características socio-demográficas y clínicas de los sujetos estudiados.

Variables	N (%)
Genero	
Masculino	28 (21.5)
Femenino	102 (78.5)
Estado civil	
Soltero	43 (33.3)
Casado /U.libre	76 (58.4)
Divorciado/Viudo	11 (8.5)
Antecedentes familiares de obesidad	
No	19 (14.6)
Si	111 (85.4)
Antecedentes familiares DM2	
No	38 (29.2)
Si	92 (70.8)
Antecedentes familiares de HTA	
No	44 (33.8)
Si	86 (66.2)
Ingesta de bebidas alcohólicas	
No	113 (87)
Si	17 (13)
Fumadores	
No	117 (90)
Si	13 (10)
Actividad Física	
Sedentaria	68 (52.4)
Moderada	58 (44.6)
Intensa	4 (3.0)

13.2 Estado nutricio.

El peso corporal promedio de los sujetos analizados fue 86.7±18.2 kg y del IMC fue 32.8 ±6 kg/m^2. De acuerdo a los criterios establecidos por la OMS, el 39.2% (n=55) de los sujetos presentó sobrepeso mientras que, el 60.8% (n=79) presentó obesidad. De los sujetos con obesidad 28.5%, presentaban obesidad tipo 1 (n =37), 23% obesidad tipo 2 (n=30) y 9.3% obesidad tipo 3 (n=12) **(Ver Grafica 1).**

Grafica 1. Composición corporal de los sujetos estudiados.



13.3 Características clínicas, antropométricas y bioquímicas.

En la **Tabla 7** se presenta las características generales clínicas y antropométricas de los sujetos estudiados. Como se puede observar los sujetos analizados presentaron una media de circunferencia de cintura por arriba de lo recomendado (Hombres ≥ 94 cm, Mujeres ≥ 80 cm, *OMS, 2000),* resistencia insulina (> 2.5 indicado a través del valor de HOMA-IR) y presentaban un grado de inflamación indicado por la elevación del reactante de fase aguda de proteína C reactiva.

Tabla 7 Características generales clínicas y antropométricas de los pacientes

	Medias ± DE
Edad (años)	38.5 ± 11.0
Peso (Kg)	86.7 ± 18.0
IMC (Kg/m^2)	32.8 ± 6.0
CC (cm)	101.8 ± 15.0
CCa (cm)	115.0 ± 13.0
ICC	0.88 ± 0.08
PA Sistólica (mm Hg)	121.0 ± 15.0
PA Diastólica (mm Hg)	78.0 ± 10.0
Glucosa (mg/dL)	95.3 ± 18.4
Insulina (μU/mL)	12.6 ± 5.6
HOMA-IR	3.0 ± 1.3
CRP (mg/L)	7.0 ± 4.0

En la **Tabla 8** se presentan los valores obtenidos del perfil de lípidos de los sujetos estudiados. Se observa que la media de triglicéridos séricos se encuentran superior a lo recomendado así como también los pacientes presentaron niveles de LDL séricos cercanos al puntos de corte superior permitido o considerado normal. Para la investigación, de acuerdo a los criterios de la ATP III, los siguientes valores de lípidos medidos en estado de ayuno se consideran dislipidemias; hipercolesterolemia valores de CT ≥ 200 mg/dL e hipertrigliceridemia TG ≥ 150 mg/dL, se consideró hipoalfalipoproteinemia valores de HDL-c < 40 mg/dL en hombres ó < 50 mg/dL en mujeres, LDL-c ≥ 130 mg/dL, VLDL-c ≥ 40 mg/dL, *(ATP III, 2001 disponible en línea 6).*

Tabla 8. Perfil de lípidos de los pacientes.

Variables	Medias ± DE
Colesterol (mg/dL)	184.8 ± 35.0
Triglicéridos (mg/dL)	174.0 ± 113.6
HDL (mg/dL)	42.6 ± 27.7
LDL (mg/dL)	109.3 ± 30.5
VLDL (mg/dL)	32.9 ± 19.2

13.4 Identificación de alteraciones metabólicas.

En la **Tabla 9** se muestran las frecuencias de dislipidemias, resistencia a la insulina y obesidad abdominal presente en los sujetos estudiados. Por lo tanto, la dislipidemia mas frecuente en los sujetos con exceso de peso fue la hipoalfalipoproteinemia seguido de la hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia. Así mismo, más de la mitad de la población estudiada presentó otras alteraciones metabólicas tales como obesidad abdominal y resistencia a la insulina, estas últimas son dos condiciones fuertemente asociadas a las comorbilidades asociadas a la obesidad.

Tabla 9. Frecuencia de dislipidemias, resistencia a la insulina y obesidad abdominal presente en los pacientes

	N (%)
Dislipidemias	
Hipercolesterolemia	42(32.3)
Hipertrigliceridemia	63 (48.4)
Hipoalfalipoproteinemia	72 (55.4)
Resistencia a la insulina	85 (65.3)
Obesidad abdominal	99 (76.2)

La resistencia a la insulina se determinó mediante el HOMA-IR

13.5 Características dietéticas de los sujetos de estudio

Al analizar el registro directo del consumo de alimentos durante tres días, en la **tabla 10** se muestra la ingesta dietética obtenida de la población estudiada. De la ingesta calórica que mantenían los pacientes se observa un consumo de grasas superior a lo recomendado (37 ± 6.2 %), siendo principalmente elevado en grasas saturadas y baja en grasas poliinsaturadas.

Tabla 10. Ingesta dietética habitual de los pacientes

Variables dietéticas	Media ± DE	Rango (Min-Max)
Energía (Kcal/ día)	2307.8 ± 720	1055 – 4749
Hidratos de carbono (%)	43.7 ± 7.8	30.1 – 70.2
Proteínas (%)	15.7 ± 3.2	10.4 – 25.5
Grasas (%)	37.7 ± 6.2	22.4 – 52.2
Grasas saturadas (%)	11.3 ± 2.3	6.3 – 17.7
Grasas monoinsaturadas (%)	12.6 ± 3.3	5.3 – 20
Grasas polinsaturadas (%)	5.5 ± 1.6	2.7 – 10
Fibra (gr/día)	19 ± 7.8	5.8 - 42.1

13.6 Identificación del polimorfismo-493 G/T del gen *MTP*.

Se realizó la identificación del polimorfismo -493 G/T del gen *MTP*, los patrones de restricción del polimorfismo se muestran en la **Figura 9**. En esta figura se muestran los productos de PCR, el cual consistió en un fragmento de 109pb; así mismo se muestra una fotografía representativa en la cual se pueden visualizar los 3 genotipos posibles del polimorfismo -493G/T del gen *MTP*.

Con respecto a los productos de digestión que se observan del genotipo heterocigoto los fragmentos de restricción esperados son fragmentos de 109, 89 y 20pb; esta última banda no se visualiza en el gel de electroforesis al 2% debido a la resolución del gel; sin embargo con las bandas de 109 y 89pb es posible identificar los 3 genotipos.

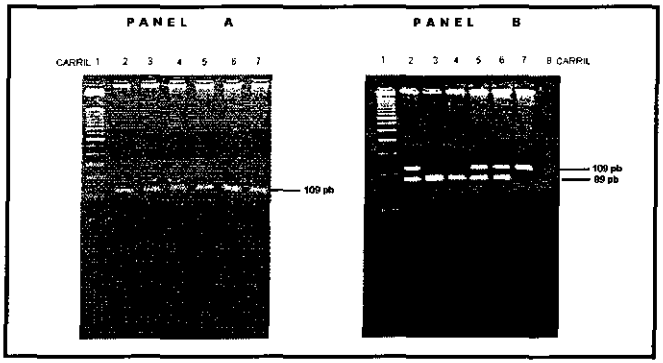
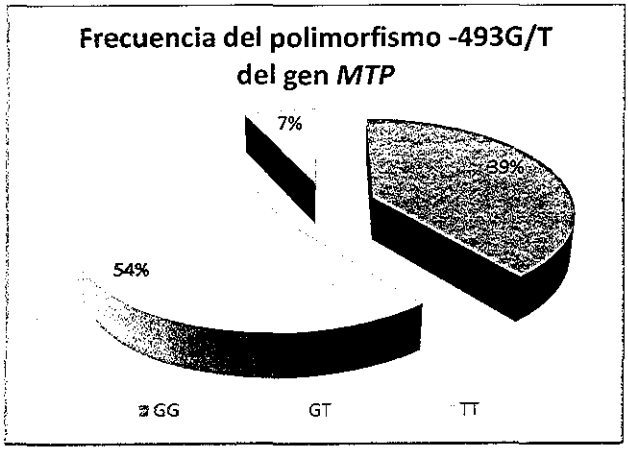


Figura 9. Fragmentos amplificados y patrones de restricción de los polimorfismos -493G/T del gen *MTP*. **Panel A.** Se observa en el carril 1 el marcador de peso molecular de 50 pb (Invitrogen™), del carril 2 al 7 se observa la banda de 109pb que corresponde al amplicon del gen MTP. **Panel B.** Esquematiza los patrones de restricción del polimorfismo -493G/T. Carril 1, marcador de peso molecular de 50pb (Invitrogen™), Carril 2, 5 y 6 corresponde a pacientes con el genotipo G/T , Carril 3,4 corresponde a pacientes con el genotipo GG y el Carril 7 corresponde a un paciente con Genotipo TT.

Al realizar la genotipificación de 130 sujetos incluidos en el estudio el 54% de ellos resultaron ser heterocigotos (n=70); el 39% fueron homocigotos GG (n=51) y el 7% homocigoto TT (n=9).

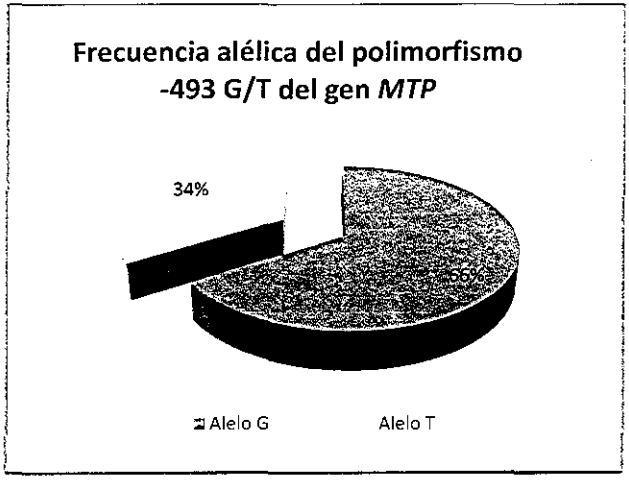
En la **Grafica 2** se presenta la frecuencia de los genotipos del polimorfismo -493G/T en la población estudiada.

Gráfica 2. Frecuencia del polimorfismo -493G/T del gen *MTP* en sujetos con sobrepeso u obesidad



Por otra parte la frecuencia alélica fue de 66% para alelo G (n=172) mientras que, el 34% para el alelo T (n=88) como se muestra en la **Gráfica 3.**

G/T del gen *MTP*



Debido a que, en el estudio encontramos únicamente 9 pacientes con el genotipo TT (7%), los sujetos homocigotos TT se agruparon con los sujetos heterocigotos GT para el análisis de los resultados. Por lo tanto, el 61% de los pacientes fueron portadores del genotipo GT/TT y 39% fueron del genotipo GG.

13.7 Características clínicas, antropométricas de acuerdo al genotipo del gen de *MTP*.

Los 130 pacientes fueron divididos en 2 grupos de acuerdo a su genotipo del polimorfismo -493 G/T de *MTP*, encontrándose que ambos grupos de estudio (GG *vs* GT/TT) no presentaron diferencias estadísticas significativas entre sus características clínicas, antropométricas (**Ver Tabla 11**).

Tabla 11. Características clínicas y antropométricas de acuerdo al genotipo del gen de *MTP*.

Variables	Genotipo (GG)	Genotipo (GT/TT)	Valor de p
Sexo M/F (%)	24/76	19.5/80.5	NS
Edad (Años)	40.4±11.6	37.5±10.8	NS
Peso (Kg)	86.6±20.3	86.7±16.8	NS
IMC (Kg/m^2)	33.3±7.0	32.4±5.2	NS
CC (cm)	102.4±15.4	101.5±14.9	NS
CCa (cm)	114.9±14.6	115.2±12.3	NS
ICC (cm)	0.89±0.09	0.88±0.08	NS
PA Sistólica (mm Hg)	124±17.9	120±13	NS
PA Diastólica (mm Hg)	79±11	78±11	NS
Glucosa (mg/dL)	97.4±22.9	94.0±14.7	NS
Insulina (μU/mL)	14.6±7.8	14±6.4	NS
HOMA-IR	3.4±2.1	3.3±1.6	NS
CRP (mg/L)	7.9±5	7.3±4	NS

MTP: Proteína transportadora de triglicéridos microsomal; IMC: Índice de masa corporal; CC: Circunferencia de cintura; ICC: Índice de cintura-cadera; CCa: Circunferencia de cadera, PA: Presión arterial.

13.8 Asociación del polimorfismo -493 G/T del gen *MTP* con el perfil de lípidos.

En la **Tabla 12** se presentan las medias obtenidas del perfil bioquímico en los 2 grupos, observando que los sujetos con el genotipo GG muestran un ligero aumento en los niveles de colesterol, triglicéridos, LDL, VLDL; y los pacientes portadores del genotipo GT/TT tuvieron un ligero aumento en la concentración sérica de las HDL; sin embargo estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Tabla 12. Perfil de lípidos de acuerdo al genotipo del *MTP*.

Variables	Genotipo GG	Genotipo GT/TT	Valor de P
Colesterol (mg/dL)	188.8 ± 37.1	182.2 ± 33.5	NS
Triglicéridos (mg/dL)	186.3 ± 121.7	166.0 ± 108.1	NS
HDL (mg/dL)	39.7 ± 10.1	44.6 ± 34.7	NS
LDL (mg/dL)	111.3 ± 30.8	108.0 ± 30.4	NS
VLDL (mg/dL)	33.9 ± 18.6	32.3 ± 19.7	NS

MTP: Proteína transportadora de triglicéridos microsomal; HDL: Lipoproteína de alta densidad; LDL Lipoproteína de baja densidad; VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad.

BIBLIOTECA CUCBA

13.9 Asociación del polimorfismo -493 G/T del gen de *MTP* con alteraciones metabólicas.

Se analizó la frecuencia de las dislipidemias de acuerdo al genotipo del gen *MTP* las cuales se muestran en la **Tabla 13**, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la prevalencia de estas dislipidemas; sin embargo se observa que los sujetos portadores del genotipo GT/TT mostraron una prevalencia de dislipidemias ligeramente inferior a los presentado en los sujetos con el genotipo silvestre GG .

Tabla 13. Frecuencias de dislipidemias de acuerdo al genotipo de *MTP*

Dislipidemias	Genotipo GG	Genotipo GT/TT	Valor de P
Hipertrigliceridemia (%)	52.0	46.8	NS
Hipercolesterolemia (%)	35.3	30.4	NS
Hipoalfalipoproteinemia (%)	62.7	50.6	NS
Obesidad visceral (%)	77.6	75.3	NS
Resistencia a la Insulinan(%)	58.3	69.6	NS

En la **Tabla 14** se describe la ingesta calórica habitual de acuerdo al genotipo del gen de *MTP*.

Tabla 14 Ingesta dietética habitual de los sujetos de estudio de acuerdo al genotipo de MTP

Variables dietéticas	Genotipo GG	Genotipo GT/TT	Valor de P
Energía (Kcal /día)	2315±813	2302±663	NS
Hidratos de carbono (%)	48±7	47±9	NS
Proteinas (%)	16±3.4	15±3	NS
Grasas (%)	36.5±6.3	38.5±6	NS
Grasas saturadas (%)	10.7±2.4	11.3±2.3	NS
Grasas monoinsaturadas (%)	12.1±3	12.9±3.5	NS
Grasas polinsaturadas (%)	5.1±1.4	5.8±1.7	0.09
Fibra (gr/día)	20±7.5	18±7.9	NS

No se encontraron diferencias estadísticas significativas en el consumo calórico habitual, ni en el porcentaje de macronutrimentos consumidos; únicamente se observó una ligera tendencia al incremento en el consumo de grasas polinsaturadas en los portadores del genotipo GT/TT (p=0.09).

13.10. Comparación de frecuencias genotípicas del polimorfismo -493 G/T del gen *MTP* a nivel mundial. En la **Tabla 15** se presenta la frecuencia genotípica del polimorfismo -493 G/T de *MTP* reportada en diferentes estudios a nivel mundial.

Tabla 15. Frecuencia relativa de los genotipos del polimorfismo -493G/T de *MTP* reportada a nivel mundial.

Estudio	n	Grupo Racial/País	Estado Enfermedad	GG	GT	TT	Frecuencia Alélica Alelo G	T
Luevano y col. 2009.	155	Latinos/Mex	-	0.65	0.31	0.04	0.81	0.19
C.Phillips y col. 2004.	82	Caucásicos/	Diabéticos controlados	0.55	0.40	0.05	0.75	0.25
Yamada y col. 2006.	1124	Asiáticos/Jap	Hipertensión	0.70	0.27	0.03	0.83	0.17
Lundahl y col. 2000.	424		HCF	0.54	0.40	0.05	0.75	0.25
Ledmyr y col. 2004.	1615		Enfermedad cardiovascular (WOSCOPS)	0.54	0.39	0.07	0.76	0.24
Ledmyr y col. 2004	203		Enfermedad cardiovascular (ULSAM)	0.60	0.26	0.14	0.75	0.25
González 2010	130	Latinos/Mex	Sobrepeso y Obesidad	0.39	0.54	0.07	0.66	0.34

Mex: México, Jap: Japón, HCF: Hipercolesterolemia Familia

14. DISCUSION

La obesidad es una enfermedad crónica degenerativa de origen multifactorial que se caracteriza por un exceso de tejido adiposo en el organismo, el cual resulta de un desequilibrio energético en donde la ingesta calórica es superior al gasto energético (***Olaiz-Fernández G 2006; NOM-174-SSA1-1998***). La obesidad visceral se considera un factor de riesgo importante en el desarrollo de otras patologías crónicas degenerativas, entre las cuales se encuentran: resistencia a la insulina, dislipidemias, diabetes *mellitus* tipo 2, enfermedades cardiovasculares, esteatohepatitis no alcohólica, cáncer entre otras (***Palou A 2004***).

En nuestro estudio encontramos diversas dislipidemias de las cuales las más frecuentes fueron la hipoalfalipoproteinemia (55.4%), la hipertrigliceridemia (48.4%) e hipercolesterolemia (32.3%); así mismo encontramos una elevada incidencia de resistencia a la insulina (65.3%) y de obesidad abdominal (76.2%). Las tres dislipidemias encontradas coinciden con lo reportado previamente por Salinas y cols. 2001 quienes reportaron que la hipoalfalipoproteinemia, hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia, son las dislipidemias con mayor prevalencia en la población mexicana (***Aguilar-Salinas 2001***). Las alteraciones metabólicas encontradas en los sujetos con exceso de peso (sobrepeso u obesidad) pueden ser el resultado del tipo de alimentación de los pacientes, la cual consistió en una dieta con alta densidad energética (2307.8 ± 720kcal/día) y una pérdida en el balance del consumo de macronutrimentos, la proporción de estos en los sujetos estudiados fue de 47% de carbohidratos, 15% de proteínas, 38% de grasas (11% grasas saturadas, 12% monoinsaturadas y 6% poliinsaturadas), este tipo de alimentación no es la recomendada por la ATP-III, que sugiere una dieta distribuida en 55% de carbohidratos, 15% de proteínas, 30% de grasas (<7% saturadas, 10-15% monoinsaturadas y 10% poliinsaturadas del total de calorías)(***Grundy S 2005***). Por lo tanto, la hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia son dos dislipidemias que pueden favorecerse principalmente por la dieta (***Hegsted GM 1993***). Es

posible que, en nuestro estudio, el alto consumo de grasas específicamente las grasas saturadas sean la causa de la hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia. Por otra parte, se encontró una elevada frecuencia de obesidad abdominal (obesidad visceral), la cual es un factor de riesgo para diversas enfermedades crónicas degenerativas, de manera similar se encontró una alta frecuencia de resistencia a la insulina, se conoce que, estos dos factores se encuentran íntimamente relacionados ya que el tejido adiposo se considera un órgano endocrino, el cual tiene la capacidad de secretar diversas adipocitocinas como la adiponectina, el TNFα, el PAI-1, la resistina y la leptina entre otras (***Tilg H 2006; Rutkowski J 2009)***. De estas adipocitocinas, la adiponectina es considerada una adipocitocina benéfica por sus múltiples efectos metabólicos e antiinflamatorios por lo que, se ha reportado que los sujetos obesos presentan hipoadiponectinemia lo cual puede deberse a que las personas con mayor tejido adiposo secretan mas TNFα la cual es una citocina proinflamatoria que perpetua la existencia de resistencia a la insulina, por lo que el proceso inflamatorio crónico, disminuye la expresión de adiponectina. En nuestro estudio, nosotros no evaluamos los niveles de TNFα, pero podemos mencionar que los pacientes tenían un proceso inflamatorio debido a la elevación del marcador de reactante de fase aguda CRP, el cual se sabe que se eleva en respuesta a un aumento en los niveles de TNFα e IL-6 (***Nguyen XT 2009***).

En el presente estudio se evalúo la asociación del polimorfismo -493 G/T del gen de *MTP* con parámetros antropométricos y bioquímicos en pacientes con sobrepeso u obesidad, en donde la frecuencia alélica del alelo G fue 66% y del alelo T 34%. Sin embargo, no encontramos diferencias significativas en los valores antropométricos (peso, IMC, CC, CCa), perfil de lípidos (Colesterol total, triglicéridos, LDL, HDL, VLDL), glucosa, insulina, HOMA-IR y CRP entre los sujetos portadores del genotipo GG comparado con los portadores del genotipo agrupado GT/TT. Aunque nosotros no detectamos diferencias de acuerdo al genotipo, observamos que los sujetos portadores del alelo T (Genotipo GT/TT) presentaron niveles de colesterol total triglicéridos y LDL más bajos que los

portadores del alelo G con niveles de HDL ligeramente superior (NS). Nuestros resultados concuerdan con datos previamente reportados por Phillips y col. 2004 en donde encontraron una asociación del alelo T con niveles bajos de LDL y colesterol. En este último estudio encontraron que los portadores del alelo T tienen niveles elevados de apoB en la fracción de VLDL (***Philips 2004***).

Una posible explicación a esta asociación del alelo T con niveles bajos de LDL podría ser que se ha demostrado que la insulina regula negativamente la expresión del gen de *MTP* (***Lin MC 1995***) por lo tanto podemos suponer que en nuestro estudio se presentó una alta prevalencia de RI, esto podría ser la causa de que pudiera existir mayor expresión de *MTP* y en consecuencia esto podría conducir a una lipidación más eficiente de partículas de VLDL inmaduras (***Karpe FB, 1998***).

De forma similar los portadores del alelo T tuvieron una menor frecuencia de hipoalfalipoproteinemia, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, obesidad abdominal y resistencia a la insulina.

Zák y col. 2008 reportaron que los portadores del alelo T del género masculino con síndrome metabólico tuvieron concentraciones elevadas de insulina, ácidos grasos no esterificados, RI (HOMA-IR) CT, TG y VLDL y niveles más bajos de AG poliinsaturados n-6; sin embargo este efecto no fue observado en mujeres con o sin síndrome metabólico (***Zák A 2008***). Esto puede explicar la falta de asociación en nuestro estudio ya que la mayoría de nuestros pacientes fueron del género femenino (78.5%).

Nuestro estudio tuvo algunas limitaciones como: 1) la falta de un grupo control de sujetos clínicamente sanos, lo cual nos hubiese permitido realizar una comparación en dos grupos y valorar si el alelo T puede ser un factor de riesgo para obesidad, 2) la carencia de no haber medido apoB y 3) el tamaño de la muestra. Sin embargo, es importante realizar un estudio prospectivo grande para valorar el efecto real del polimorfismo -493 G/T de *MTP*.

15. CONCLUSIONES.

- Un alto porcentaje (85.4%) de los pacientes con sobrepeso u obesidad tienen antecedentes familiares de obesidad.
- El consumo habitual que mantenían los pacientes estudiados pudo haber favoreció la hipoalfalipoproteinemia, hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia.
- El consumo de grasas totales de los sujetos con sobrepeso u obesidad correspondía a 37.7±.2% de los cuales el 11.3 % correspondía a grasas saturadas.
- Las alteraciones metabólicas más comunes en los pacientes fueron la hipoalfalipoproteinemia, la hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia.
- Un alto porcentaje de la población estudiada presento obesidad abdominal.
- Se encontró una elevada frecuencia de resistencia a la insulina.
- No existen diferencias significativas en variables antropométricas, bioquímicas así como en la ingesta calórica de los sujetos con exceso de peso de acuerdo al genotipo -493 G/T del gen de *MTP*.
- La frecuencia de alteraciones metabólicas fue similar en ambos grupos de sujetos (GG *vs* GT/TT) con tendencia a la baja en los portadores del genotipo agrupado GT/TT respecto al genotipo silvestre GG.
- El consumo de macronutrimentos (% de Carbohidratos, Proteínas y grasas) fue similar en ambos genotipos (GG vs GT/TT). Los portadores del genotipo GT/TT presentaron una ligera tendencia a consumir más grasas polinsaturadas.
- El polimorfismo -493G/T de *MTP* no se asocia con alteraciones en parámetros antropométricos y bioquímicos en sujetos con sobrepeso u obesidad.

16. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- Aguilar-Salinas, C. A., Olaiz, G., Valles, V., Torres, J. M. High prevalence of low HDL cholesterol concentrations and mixed hyperlipidemia in a Mexican nationwide survey. J Lipid Res, 2001; 42:1298-307.
- American Diabetes Association 2001. Criterios diagnósticos de diabetes mellitus. Disponible en línea 7 <http//diabetes.org/> [consulta: 10 de Abril 2008].
- Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. N Engl Med, 2002; 346(16):1221-1231.
- Arner P. Obesity a genetic disease of adipose tissue?. Br J Nutr, 2000; 83:9-16.
- Baier LJ, Sacchettini JC, Knowler WC et al. An amino acid substitution in the human intestinal fatty acid binding protein is associated with increase fatty acid binding, increase fat oxidation and insulin resistance. J Clin Inves, 1995; 95:1281-1287.
- Barreto L, Munar F, Acosta E, Terront A. Obesidad: fisiología de la ingesta (primera parte) Revista colombiana de cirugía plástica y reconstructiva, 2001; 7:46-51.
- Bastarrachea R, López-Alvarenga JC, Bolado-García V et al. Macrófagos, inflamación, tejido adiposo, obesidad y resistencia a la insulina. Gac Med Mex, 2007; 6:505-512.
- Bender R . Assessment of excess mortality in obesity. Am J Epid, 1998; 142-147.
- Berthier MT, Houde A, Paradis AM, Couture P, Gaudet D, Despres JP, Vohl MC. Molecular screening of the microsomal triglyceride transfer protein: Association between polymorphisms and both abdominal obesity and plasma apolipoprotein B concentration. JHum Genet, 2004; 49:684-690.
- Bouchard C. Current understanding of the etiology of obesity: genetic and nongenetic factors. Am J Clin Nutr, 1991;53:156.

- Brunzell JD. Diagnosis and treatment of dyslipidemia. N Engl Med, 2007; 10:357-369.
- Carmena R. Hiperlipoproteinemias: concepto y clasificación. En Hiperlipemias, clínica y tratamiento Barcelona: Editorial Doyma, 1999; 33-40
- Castro –chavez F. Mendez SanchezN. Uribe Esquivel M. Genes implicados en la susceptibilidad a obesidad y genes antiobesidad Obesidad conceptos clínicos y terapéuticos. Masson-Doyma, Mexico, 2005; 470:63-94.
- Clement K, Ferré P. Genetics and the pathophysiology of obesity. Pediatric Res, 2003; 53:721-725.
- Cristopher G. Bell, Andrew J. Walley and Philipe Froguel. Reviews The genetics of human obesity. Nature review genetics, 2005; 6:221-234.
- Dietschy J, Turley S, Spady G. Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animals species including human. JLipid Res, 1993; 34:1637-1659.
- Eckel RH. Manejo no quirúrgico de la obesidad en adultos. N Engl J Med, 2008; 358:1941-50.
- Fauci et al. Harison´s Principles of Internal Medicine. 2008, 17th Ed. McGraw-Hil. USA
- Fleiss Joseph, Bruce Levin, Myunghee Cho Paik, Statistical Methods for Rates and Proportions, 3rd Edition Book Download Now 1987.
- Flier JS, Maratos E. Biología de la obesidad. En: Principios de medicina interna Harrison. México: Editorial Mc Graw Hill, 2008; 462-473.
- Freedman MR, King J, Kennedy E. Popular diets: a scientific review. Obes Res, 2001; 9:1-40.
- Grundy S, Cleeman J, Daniels S, Donato K, Eckel R, Franklin B, Gordon D, Krauss R, Savage P, Smith S, Spertus, J, Costa F. Diagnosis and Management of the Metabolic Syndrome. An American Heart

Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. Circulation, 2005; 112; 2735-2752.

- Guyton AC. Insulina, glucagon y diabetes melitus. En: Manual de fisiología médica. México: Editorial Mc Graw-Hill Interamericana, 2002; 601-608.
- Hands JI. Internacional standard for ahthropometric assessment. En: Sociedad internacional para el avance de la kinantropometría. Puerto Rico, 2001; 73-76.
- Harris Jamil, John K. Dickson, Jr., Ching-Hsuen Chu, Michael W. Lago,J. Kent Rinehart, Scott A. Biller, Richard E. Gregg, and John R. Wetterau Microsomal Triglyceride Transfer Protein. U.S.A. 1995; 270:6549- 6554.
- Harry Ds, McIntyre N.Plasma lipoproteins and the liver. In wright´s Liver and Biliar Disease, 3rd end, Millward-Sadler GH, Wright R, Arthur MJP, eds. WB saunders, 1992; 61.
- Hegsted, D. M., Ausman, L. M., Johnson, J. A., Dallal, G. E. Dietary fat and serum lipids: an evaluation of the experimental data. Am J Clin. Nutr. 1993; 57:875-83.
- http://www.buenastareas.com/ensayos/Lipoproteinas/810672.html.
- http://www.perderpesoya.info/2009/11/28/el-nexo-entre-sobrepeso-y-el-malestar-psicoemocional/
- Ichihara S, Yamada Y. Genetic factors for human obesity. Cell Mol Life Sci, 2008; 65:1086-1098.
- Karpe F, Lundahl B, Ehrenborg E, Eriksson P, Hamsten A. A common functional polymorphism in the promoter region of the microsomal triglyceride transfer protein gene influences plasma LDL levels. Arterioscler Tromb Vasc Biol, 1998; 18:756-761.
- Keller DE. Managing obesity as firs-line therapy for diabetes mellitus. Nutr Clin Care, 1998; 1:38-43.

- Ledmyr H, Alex D. Mc Mahon, Ewa Ehrenborg, Lars B. Nielsen, Matt Neville, Hans Lithell, Peter W. MacFarlane, Cristopher J. Packard, Frederik Karpe. The Microsomal Triglyceride Transfer Protein Gene -493 T variant Lowers Cholesterol But Increases the Risk of Coronary Heart Disease. Circulation, 2004;109:2279-2284.
- Ledmyr H, Karpe F, Lundahl B, McKinnon M, Skoglund-Andersson C, Ehrenborg E. Variants of the microsomal triglyceride transfer protein gene are associated whit plasma cholesterol levels and boody mass index. J Lipid Res, 2002; 43:51-58.
- Lin MC, Gordon D, Wetterau JR. Microsomal triglyceride transfer protein (MTP) regulation in HepG2 cells: insulin negatively regulates MTP gene expression, J Lipd Res, 1995; 36:1073-1081.
- Luevano K. E, González, J.R. F.J. Perea y M.T. Magaña. Linkage disequilibrium between four MTTP gene polymorphisms in a Mexican population. Annals of Human Biology, 2009; 36 :211-219.
- Lundahl B, Leren TP, Ose L, Hamsten A, Karpe F. A functional polymorphism in the promoter region of the microsomal trygliceride transfer protein (MTP -493 G/T) influences lipoprotein phenotype in familial hypercholesterolemia. Arterioscler Thromb Vas Biol, 2000; 20:1784-1788.
- Mahmood Hussain M., Jason Shi, and Paul Dreizen. Review. Microsomal triglyceride transfer protein and its role in apoB-lipoprotein assembly. Journal of Lipid Research, 2003; 44:22-23.
- Masson LF. Genetic variatión and the lipid response to dietary intervention: a sistematic review. Am J Clin Nutr, 2003; 77:1098-111.
- Mathews CK, Van Holde KE. Bioquimica. Edit. McGrawHill. 2da. Edición. 2000 España
- Moreno-Aliaga MJ, Campion J, Milagro F, Berjon A, Martinez JA. Adiposity and proinflammatorystate: the chicken or the egg Adipocytes, 2005; 1:1-13

- Nguyen, X. T., Lane, J., Smith, B. R., Nguyen, N.T. Changes in Inflammatory Biomarkers Across Weight Classes in a Representative U.S. population: A Link Between Obesity and Inflammation. J Gastrointest. Surg, 2009; 13:1205-12.
- Norma Oficial Mexicana NOM-174-SSA1-1998 Para el manejo integral de la obesidad. Disponible en línea 5 <www.salud.gob.mx/unidades/.../nom/174ssa.html>[consulta: 20 de Abril 2010].
- Olaiz G, Rojas R, Barquera S, ShamahT, Aguilar C, Cravioto P, López P, Hernández M, Tapia R, Sepúlveda J. Encuesta Nacional de Salud 2000. Tomo 2. La salud de los adultos. Cuernavaca, Morelos, México. Instituto Nacional de Salud Pública. 2003.
- Olaiz-Fernández G, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Rojas R, Villalpando Hernández S, Hernández-Avila M, Sepúlveda-Amor J. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública, 2006. Disponible en línea 3 < http://www.insp.mx/ensanut/ensanut2006.pdf> [consulta: 20 de Abril 2010].
- Ordovas JM y Carmena R. Hiperlipemias: Clinica y tratamiento.Edit. DOYMA. Barcelona, España.1999:9
- Organización Mundial de la salud (World Health Organization). Physical status: the use and interpretation of antropometry. Report of a WHO Expert Committee. 1998:854:1-452.
- Palou A, Bonet M L, Picó C y Rodríguez A M. Nutrigenómica y obesidad. Revista de medicina de la Universidad de Navarra, 2004.; 48:36-48.
- Phillips C, K. Mullan, D. Owens and G.H. Tomikin. Microsomal triglyceride transfer protein polymorphisms and lipoprotein levels in type 2 diabetes. QJM Med, 2004; 97:211-218.
- Powers, A. Diabetes mellitus. . En: Principios de medicina interna Harrison. México: Editorial Mc Graw Hill 2008; 462-473. Pública, 2006.

Disponible en línea 3 < http://www.insp.mx/ensanut/ensanut2006.pdf> [consulta: 20 de Abril 2010].

- Puchau MZ, Navarro C, Martí A, Martínez JA. Biomarcadores del estado inflamatorio: nexo de unión con la obesidad y complicaciones asociadas. Nutr Hosp, 2007; 22:511-527.
- Quetelet J. Anthropometrie pour mesure des diferentes facultes de l'homme. Brussels : C. Muquart, 1871; 479.
- Quinteros S, Canizales. Aspectos genéticos de la obesidad humana. Articulo de revisión. Revista de Endocrinología y Nutrición, 2008; 16:1: 9-15.
- Redgrave T, Roberts D, West C. Separation of plasma lipoproteins by density gradient centrifugation. An Biochem, 1975; 65:42-49.
- Rubin D, Helwing U, Pfeuffer M, Schreiber S, Boeing H, Fisher E, Pfeiffer A, Freitag-Wolf S, Foelsch UR, Doering F, Schrezenmeir J. A common functional exon polymorphism in the microsomal triglyceride transfer protein gene is associated whit type 2 diabetes, impaired glucose metabolism and insulin levels. JHum Genet, 2006; 51:567-574.
- Rutkowski Joseph M, Kathryn E. Davis and Philipp E. Scherer: Mechanisms of obesity and related phatologies: The macro-and microcirculation of adipose tissue.The FEBS Journal, 2009; 276:5738-5746.
- Sambrook JF y Rusell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Tercera edicion . cold Spring. Harbor. Laboratory Press, cold Spring. Harbor, New York USA. 2001. apéndices A8.19, A8.23, A8.24.
- Sánchez-Castillo CP. Epidemiología de la obesidad. Rev Med Mexicana INNSZ 2004;140:S2. Secretaria de Salud presupuesto 2008. Disponible en línea 1 <dgpop.salud.gob.mx/descargas/presenta_dgdif120208.pdf> [consulta: 20 Abril 2010].

- Tilg Herbert and Alexander R. Moschen Rewiews Adipocitokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and inmmunity. Nature rewiews immunology, 2006; 6:772-783.
- Van der ploeg LHT. Obesity: epidemic in need of therapeutics. Curr. OP. Chem. Biol, 2000; 4:452-460.
- Walley AJ, Blakemore A, Froguel P. Genetics of obesity and prediction of risk for healt. Human Molecular Genetics, 2006; 15:124-130.
- Wannamethee. Weight change and duration of overweight and obesity in the incidence of type 2 diabetes. Diab Car, 2000; 1222-66.
- World Health Organization. World Health Statistics Report 2007. http://www.who.int/whosis/whostat/2007/en(accessed 07 December 2009).
- Zak A, Marie Jáchymová, Eva Tvrzicka, Marek Vecka, Ladislava Duffková, Miroslav Zeman, Adolf Slabý. Barbora Stanková. The influence of polymorphism of -493G/T gene promoter and metabolic syndrome on lipids, fatty acids and oxidative stress. Journal of Nutritional Biochemistry, 2008; 19:634-641.

17. ANEXOS

ANEXO 1 CONSENTIMIENTO INFORMADO

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
SERVICIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR EN MEDICINA
HOSPITAL CIVIL "FRAY ANTONIO ALCALDE"

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Quien con mi firma valido este documento manifiesto que con un lenguaje claro y simple el responsable del proyecto explicó la importancia y beneficio(s), de mi participación en este estudio. Así, mismo, aclaró cada una de las dudas surgidas en relación a mi participación en el estudio. De tal forma que para ambos queda perfectamente claro que tomando en consideración mis características personales, he decidido aprobar la determinación de los análisis propuestos.

Los beneficios que se generan de mi participación en este estudio consistirán en:

1. Conocer la composición corporal mediante el uso de Bioimpedancia eléctrica.
2. Conocer su gasto energético en reposo mediante calorimetría indirecta
3. Evaluar la ingesta dietética habitual
4. Conocer mi estado de salud mediante la determinación de parámetros bioquímicos que incluyen: perfil de lípidos, química sanguínea y perfil hepático.
5. Conocer el genotipo del polimorfismo -493 G/T del gen *MTP*

*Todas estas determinaciones se realizarán sin ningún costo para el paciente.

Además se me informó de las condiciones de toma de muestra sanguínea, así como también el manejo confidencial de los datos que se obtengan y la libertad de abandonar mi participación en el estudio. Me ha indicado también que los resultados de las pruebas se manejarán con las finalidades de investigación y docencia.

Por lo tanto **ACEPTO** y doy mi consentimiento para que realicen las pruebas necesarias para este estudio.

_____

Nombre y firma del paciente

Dra. Erika Martínez López Responsable del Proyecto	LN. Maritza R. García García Testigo.

ANEXO 2. CUESTIONARIO APLICADO A LOS PARTICIPANTES

FOLIO_____

FECHA____/____/____

DATOS PERSONALES

Nombre:_____Edad:_____años

Fecha de nacimiento:_____/_____/_____ Sexo: ☐ 0.Hombre ☐ 1.Mujer

Domicilio Actual:_____

Colonia:_____Ciudad:_____ Estado:_____

Teléfono:_____ Celular:_____ Mail:_____

Estado Civil: ☐ 0.Soltero ☐ 1. Casado ☐ 2. Unión libre ☐ 3. Divorciado

☐ 4. Viudo ☐ 5. Separado

Ocupación:_____ Horas:____/semana Ingresos mensuales _____

Grado de Escolaridad:

☐ 0.Analfabeta ☐ 1. Primaria ☐ 1.1 Primaria incompleta

☐ 2. Secundaria ☐ 2.1 Secundaria incompleta

☐ 3. Preparatoria ☐ 3.1 Preparatoria incompleta

☐ 4. Técnica ☐ 5. Licenciatura ☐ 6. Posgrado

ANTECEDENTES FAMILIARES

1. Obesidad ☐ 0. No ☐1. Sí ¿Quién?_____
2. Diabetes tipo2 (DM2) ☐ 0. No ☐ 1. Sí ¿Quién?_____
3. Diabetes tipo1 (DM1) ☐ 0. No ☐ 1. Sí ¿Quién?_____

4. Litiasis Biliar ☐ 0. No ☐ 1. Sí ¿Quién?_____
5. Hipertensión ☐ 0. No ☐ 1. Sí ¿Quién?_____
6. Alcoholismo ☐ 0. No ☐ 1. Sí ¿Quién?_____
7. Cardiovascular ☐ 0. No ☐ 1. Sí ¿Quién?_____
8. Cirrosis alcohólica ☐ 0. No ☐ 1. Sí ¿Quién?_____
9. Hepatitis viral ☐ 0. No ☐ 1. Sí ¿Quién?_____
10. Depresión ☐ 0. No ☐ 1. Sí ¿Quién?_____
11. Cáncer ☐ 0. No ☐ 1. Sí ¿Quién?_____
12. Infarto ☐ 0. No ☐ 1. Sí ¿Quién?_____
13. Enfermedad pulmonar ☐ 0. No ☐ 1. Sí ¿Quién?_____

ANTECEDENTES PATOLÓGICOS

Alergias: ☐ 0. No ☐ 1. Sí Tipo:_____

Intolerancias: ☐ 0. No ☐ 1. Sí Tipo:_____

Enfermedad Actual:_____

Medicamentos actuales: ☐ 0. No ☐ 1. Sí Tipo/Dosis:_____

Bebidas Alcohólicas

Consumo de alcohol: ☐ 0. No ☐ 1. Sí Edad de inicio_____ años

Bebidas de consumo habitual:

☐ 0. Cerveza ☐ 1. Tequila ☐ 2. Alcohol puro ☐ 3. Brandy y/o Ron

☐ 4. Vino de mesa ☐ 5. Aguardiente ☐ 6. Combina dos o más

☐ 7. Otros: _____

Cantidad (ml):_____ Frecuencia:_____ Embriaguez/mes:_____

Tabaco

Fuma: ☐ 0. No ☐ 1. Sí Edad de inicio_____ años

N° cigarros/día: _____ Por semana:_____

APARTADO DE NUTRICIÓN

Evaluación Antropométrica

Parámetro	1° Fecha :	2° Fecha:	3° Fecha:
Talla			
Peso			
IMC (kg/m^2)			
Interpretación IMC (OMS)			
Circunferencia de muñeca			
Complexión			
Circunferencia de Cintura			
Circunferencia de Cadera			
ICC			
Distribución de Grasa corporal (A/G)			
% Masa Muscular			
% Grasa			
Calorimetría Kcal en Reposo			

Actividad Física y Ejercicio

Realiza ejercicio ☐ 0. No ☐ 1. SÍ Tipo de ejercicio:_____

¿Desde cuándo inició?:_____

¿Sudoración? ☐ 0. No ☐ 1. SÍ Horas (minutos):_____

Horas/semana:_____

Televisión

Horas que ve televisión/día:_____ N° horas/semana:_____

Evaluación Bioquímica

Parámetro	Fecha:	Fecha:	Fecha:
Glucosa			
Colesterol Total			
LDL			
VLDL			
HDL			
Triglicéridos			
Leptina			
Resistina			
Insulina			

Evaluación Clínica

Parámetro	Fecha:		Fecha:		Fecha:	
	SI	NO	SI	NO	SI	NO
Diarrea						
Estreñimiento						
Gastritis						
Ulcera						
Colitis						
Presión arterial	mm/Hg		mm/Hg		mm/Hg	

Evaluación Dietética

Hábitos de Alimentación

N° Comidas realizadas/día: ☐ 1/día ☐ 2/día ☐ ≥ 3/día ¿Cuántas?_____

N° Comidas fuera de casa/día: ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ ≥ 3 ¿Cuántas?_____

N° Comidas fuera de casa/semana: ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ ≥5 ¿Cuántas?_____

Tipo de grasa utilizada más frecuentemente para la preparación de alimentos

☐ 0. Aceite vegetal ☐ 1. Aceite oliva ☐ 2. Manteca ☐ 3. Mantequilla

☐ 4. Margarina ☐ 5. Otro Cuál:_____

Le desagrada algún alimento ☐ 0. No ☐ 1. Sí Cuál:_____

Conductas Alimentarias

	0. No	1. Sí
1. ¿Mientras come, ve la televisión?	___	___
2. ¿La tristeza lo conduce a comer?	___	___
3. ¿El enojo lo conduce a comer?	___	___
4. ¿La preocupación lo conduce a comer?	___	___
5. ¿Come por aburrimiento?	___	___
6. ¿Come en exceso hasta sentirse más que satisfecho?	___	___
7. ¿Sabe usted distinguir cuando come por hambre o por otra causa?	___	___
8. ¿Considera que come rápido?	___	___
9. ¿Come de manera abundante?	___	___
10. ¿Ha presentado pérdida de apetito?	___	___
11. ¿Le aterroriza ganar peso?	___	___
12. ¿Anteriormente había realizado un régimen dietético (dietas)?	___	___
13. ¿Se siente satisfecho con la forma de su cuerpo?	___	___
14. ¿Se siente culpable después de haber comido?	___	___

Motivo_____

Califique del 1 al 10 que tan culpable se siente_____

Frecuencia de Consumo de Alimentos

Conteste de acuerdo a su ingesta de los últimos 3 meses

Alimentos	Diariamente					Semanal				Mensual			Tipo/Cantidad
	0	1	2	3	≥4	1	2	3	≥4	1	2	3	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Tortilla, birote, pan de caja													
Avena													
Arroz													
Granos integrales													
Leguminosas													
Frutas													
Verduras													
Carne res													
Carne pollo													
Carne cerdo													
Pescado													
Mariscos													
Lácteos													
Aceites vegetales													
Aguacate													
Embutidos (jamón, salchicha, salami)													

Tocino, chorizo													
Cremas, aderezos, mayonesa													
Manteca, mantequilla													
Frituras													
Oleaginosas													
Refrescos													
Café													
Alcohol													
Galletas, pastelitos													
Azúcares													

ANEXO 3. FORMATO DE PCR

Gen a amplificar:_____ Fecha:_____

Realizado por:_____

Correspondencia de tubos

	Muestra		Muestra		Muestra
1		9		17	
2		10		18	
3		11		19	
4		12		20	
5		13		21	
6		14		22	
7		15		23	
8		*16*		*24*	

Reactivo	[Stock]	[Final]	Añadir	Mezcla
Buffer				
$MgCl_2$				
dNTPs				
Iniciador 1				
Iniciador 2				
Taq Pol				
Agua				
DNA				
Vol. Final				

	T°C	Tiempo
Hot Start :	_____	_____
Ciclos: _____		
	T°C	Tiempo

Observaciones:_____