



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

---

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN

“Contribución de la variante N131S del gen VNN1  
en la modulación de los niveles plasmáticos de  
las lipoproteínas de alta densidad y otros rasgos  
metabólicos en población mexicana”

T E S I S

Que para obtener el título de

Licenciada en Nutrición

P R E S E N T A

P.L.N. Vizzueth Herrera Itssel Evelyn

Bajo la Dirección de:

Dr. Samuel Canizales Quinteros

M.C. Leonor Jacobo Albavera



Pachuca, Hgo.05 de junio de 2009



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO  
INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN



De acuerdo con el artículo 134 del Reglamento de Control Escolar vigente, el jurado de examen recepcional designado, autoriza para su impresión la Tesis titulada

**"Contribución de la Variante N131S del Gen VNN1 en la Modulación de los Niveles Plasmáticos de las Lipoproteínas de Alta Densidad y Otros Rasgos Metabólicos en Población Mexicana"**

Que para obtener el Título de Licenciado de Nutrición sustenta la Pasante

**C. Itssel Evelyn Vizzueth Herrera**

**ATENTAMENTE**  
**Pachuca, Hidalgo., 12 de Mayo del 2009**  
**"Amor, Orden y Progreso"**

PRESIDENTE	DRA. YOLANDA SÁNCHEZ MONJARAZ
SECRETARIO	M. EN N.H. TRINIDAD LORENA FERNÁNDEZ CORTÉS
PRIMER VOCAL	M. EN N.H. AMANDA PEÑA IRECTA
SEGUNDO VOCAL	DR. GABRIEL BETANZOS CABRERA
TERCER VOCAL	DR. SAMUEL CANIZALES QUINTEROS
PRIMER SUPLENTE	DRA. MIRANDELI BAUTISTA ÁVILA
SEGUNDO SUPLENTE	M. EN N.H. ZULI CALDERÓN RAMOS

## AGRADECIMIENTO Y DEDICATORIA

Agradecer principalmente a Dios por permitirme vivir, llenar mi vida de dicha, bendiciones y lograr uno de mis sueños.

Una especial dedicatoria a mis padres Ave y Eva: por que gracias a su cariño y guía he llegado a realizar uno de mis anhelos más grandes de la vida, fruto de inmenso apoyo, amor y confianza incondicional que en mi se depositó y con los cuales he logrado terminar esta tesis y mis estudios profesionales que constituyen el legado más grande que pudiera recibir y por el cual les viviré eternamente agradecida.

A mis hermanas Yussela y Aleyda por la compañía, el apoyo, la paciencia, por permitirme compartir mis metas y sueños. Le ruego a Dios que se cristalicen sus triunfos profesional y personales.

Quiero agradecer a mi director de tesis el Dr. Samuel Canizales por su asesoramiento científico y estímulo para seguir creciendo intelectualmente y sobre todo por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo.

A la M.C. Leonor Jacobo por su predisposición permanente e incondicional en aclarar mis dudas y por sus substanciales sugerencias, así como sus observaciones críticas durante la redacción de esta tesis.

A Tere, Mary y Blanca que al término de esta etapa de mi vida, quiero expresar un profundo agradecimiento ya que con su ayuda, apoyo y comprensión me alentaron a lograr esta hermosa realidad. No voy a olvidar sus consejos, enseñanzas y ayuda. Por su amistad y cariño, gracias.

Agradezco a mis amigos Dayana, Sonia y Marco por su confianza y lealtad, chicos los quiero mucho.

## INDICE GENERAL.

Índice de tablas.....	6
Índice de figuras.....	7
Índice anexos.....	8
Abreviaturas.....	9
1. Resumen.....	11
1.2 Abstract.....	12
2. Marco Teórico	
2.1. Lípidos y lipoproteínas plasmáticas.....	13
2.1.1. Lípidos.....	13
2.1.2. Apolipoproteínas.....	13
2.1.3. Lipoproteínas.....	14
2.1.4. Lipoproteínas de alta densidad (HDL).....	14
2.1.4.1 Clasificación de las HDL.....	14
2.1.4.2. Metabolismo de las HDL y Transporte reverso de colesterol (TRC).....	17
2.1.5. Efecto de las HDL en la modulación del riesgo cardiovascular.....	21
2.1.5.2. Análisis clínico y genético de la variación del los niveles de HDL.....	21
2.1.5.3. Mecanismos de acción de las HDL.....	22
2.1.5.4. Estudios genéticos para la identificación de los loci asociados a la variación de los niveles de HDL en humanos.....	22
3. Antecedentes	
3.1. Estudios genéticos de las HDL en población mexicana.....	23
3.2. Gen Vanina 1 (VNN1).....	23
4. Problema de investigación.....	25
5. Justificación.....	26
6. Objetivo general.....	27
7. Objetivos específicos.....	27
8. Hipótesis.....	27
9. Metodología	
9.1. Sujetos de estudio .....	28
9.1.1. Criterios de exclusión.....	29
9.2. Reactivos.....	29
9.3. Material de plástico y vidrio.....	30
9.4. Equipo.....	30
9.5. Métodos	
9.5.1. Datos Antropométricos.....	31
9.5.2. Parámetros bioquímicos.....	31

9.5.3. Diagnóstico de síndrome metabólico (SM).....	32
9.5.4. Extracción de DNA.....	32
9.5.4.1. Cuantificación y valoración de DNA.....	33
9.5.5. Genotipificación de la variante <i>N131S</i> .....	33
9.5.5.1. Fundamento de la técnica de PCR en tiempo real.....	34
9.5.5.2. Ensayo de discriminación alélica.....	36
9.5.6. Análisis estadístico de resultados.....	38
9.5.7. Equilibrio de Hardy-Weinberg (HW).....	38
9.5.8. Análisis por medio de los modelos Aditivo, Recesivo y Dominante.	39
9.6. Predicción de daño funcional a proteínas (Programa Polyphen).....	39
10. Resultados	
10.1. Daño funcional de la variante <i>N131S</i> del gen <i>VNN1</i> .....	40
10.2. Frecuencia de la variante <i>N131S</i> del gen <i>VNN1</i> en las poblaciones de estudio.....	40
10.3. Características epidemiológicas de las 3 diferentes poblaciones en estudio.....	40
10.4. Asociación de <i>N131S</i> del gen <i>VNN1</i> con parámetros bioquímicos y antropométricos	
10.4.1. Población mestiza.....	43
10.4.2. Población indígena.....	43
10.4.3. Síndrome metabólico.....	47
11. Discusión.....	49
12. Conclusión.....	51
13. Bibliografía.....	52
14. Anexos.....	61

## INDICE TABLAS.

Tabla 1. Características bioquímicas de las lipoproteínas.....	16
Tabla 2. Proteínas implicadas en el metabolismo y transporte de las HDL..	19
Tabla 3. Frecuencia genotípica y alélica de las poblaciones mestiza, maya, cora, africana, europea y asiática.....	41
Tabla 4. Características bioquímicas y antropométricas de las poblaciones analizadas.....	42
Tabla 5. Análisis de asociación de la variante <i>N131S</i> del gen <i>VNN1</i> a los rasgos cuantitativos en la población mestiza.....	44
Tabla 6. Análisis de asociación de la variante <i>N131S</i> del gen <i>VNN1</i> a los rasgos cuantitativos en la población maya.....	45
Tabla 7. Análisis de asociación de la variante <i>N131S</i> del gen <i>VNN1</i> a los rasgos cuantitativos en la población cora.....	46
Tabla 8. Análisis de asociación de la variante <i>N131S</i> a síndrome metabólico y parámetros asociados .....	48
Tabla 9. Valores de Presión Arterial para adultos mayores de 18 años.....	61
Tabla 10. Valores para determinar el Índice de Masa Corporal (IMC).....	61
Tabla 11. Índice de Cintura Cadera.....	61
Tabla 12. Valores de colesterol HDL.....	62
Tabla 13. Equilibrio de Hardy-Weinberg.....	62
Tabla 14. Distribución de nutrimentos en tratamiento dietético de HDL bajas.	63

## INDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Vía del transporte reverso del colesterol.....	18
Figura 2. Gen VNN1.....	24
Figura 3. Mecanismo de acción de la sonda TaqMan en una PCR en tiempo real.....	35
Figura 4. Grafica del ensayo de discriminación alélica.....	37

## INDICE ANEXOS.

Anexo 1. Tablas de valores de PA, IMC, Índice cintura-cadera, niveles plasmáticos de HDL, LDL.....	61
Anexo 2. Equilibrio de Hardy-Weinberg.....	62
Anexo 3. Tratamiento (No farmacológico) de los pacientes con bajos niveles de C-HDL.....	62
Anexo 4. Carta de consentimiento informado.....	64

## ABREVIATURAS.

ABCA1	ATB Binding Cassette A1 (Transportador de membrana)	HOMA-IR	Modelo de Homeostasis para evaluar Resistencia a la Insulina
ADN	Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)	HTA	Hipertensión
Apo	Apolipoproteínas	IC	Intervalo de Confianza
CE	Colesterol ésterificado	IMC	Indice de masa corporal
CETP	Proteína Transferidora de Ésteres de Colesterol	IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
C-HDL	Colesterol de las Lipoproteínas de alta densidad	INCMNSZ	Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición Salvador Zubiran
cM	Centi Morgan	IR	Insulin Resistens (Resistencia a la insulina)
CT	Colesterol Total	kDa	Kilodaltons
dNTPs	Desoxirribonucleotidos	LCAT	Lecitin-Colesterol Acil Transferasa
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer (energía fluorescente mediante resonancia)	LDL	Low Density Lipoproteins (Lipoproteínas de baja densidad)
GPI	Glicosilfosfatidil inositol	LE	Lipasa Endotelial
HDL	High Density Lipoproteins (lipoproteínas de alta densidad)	LH	Lipasa Hepática
TRC	Transporte reverso del colesterol	OR	Odds Ratio (razón de momios)
UAM	Universidad Autónoma Metropolitana	PA	Presión Arterial

PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de Polimerasa)	TRC	Transporte reverso del colesterol
PLTP	Proteína Transferidora de Fosfolípidos	UAM	Universidad Autónoma Metropolitana
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor (Receptores Activadores por Proliferadores Peroxisomales)	UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
QM	Quilomicrones	UV	Ultravioleta
QTL	Quantitative Trait Loci (Rasgo Cuantitativo)	V	Volt
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (polimorfismo de un solo nucleótido)	Vitamina B5	Ácido Pantoténico
SR-BI	Receptor Basurero BI	VLDL	Very Low Density (lipoproteins Lipoproteínas de muy baja densidad)
TBE	Tris Boroato de EDTA (Tris Base, ácido bórico, EDTA)	VNN1	Vanina 1
TG	Triglicéridos		

## 1. RESUMEN.

Los lípidos son componentes fundamentales en la estructura de las membranas celulares, y son transportados en sangre a través de complejos de macromoléculas llamadas lipoproteínas. Entre los distintos tipos de lipoproteínas, las lipoproteínas de alta densidad (HDL) son clínicamente relevantes debido a que niveles elevados de HDL en plasma están asociados con la disminución del riesgo cardiovascular, mientras que niveles disminuidos de HDL (hipoalfalipoproteinemia) se asocian a un mayor riesgo cardiovascular. A través de la Encuesta Nacional de Salud realizada en áreas urbanas de México, se determinó que el 50% de la población adulta presenta hipoalfalipoproteinemia. Los niveles plasmáticos de C-HDL son determinados tanto por factores genéticos como ambientales y algunos genes que participan en distintas rutas metabólicas han sido asociados con este rasgo. En este estudio se genotipificó el polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) del gen *vanina1* (*VNN1*, rs2272996), el cual confiere un cambio de aminoácido de asparagina por serina en la posición 131 (N131S) del gen *VNN1*. Este SNP fue genotipificado a través de PCR en tiempo real empleando una sonda TaqMan en 754 individuos mexicanos mestizos no relacionados, 87 mayas y 111 coras. La posible asociación de este SNP con diferentes parámetros bioquímicos y antropométricos se evaluó con dos diferentes modelos genéticos (aditivo y dominante) utilizando el programa estadístico SPSS v15. La frecuencia de este polimorfismo fue similar en las 3 poblaciones estudiadas y no se observó asociación con los niveles de HDL en ninguna de ellas. Sin embargo, el alelo S131 fue asociado significativamente a una mayor circunferencia de cintura y niveles elevados de triglicéridos en la población cora ( $p=0.041$  y  $0.009$ , respectivamente). Debido a que estos dos rasgos forman parte del síndrome metabólico (SM), se estudió la posible asociación de esta variante con el SM, encontrando sólo asociación significativa en la población cora. En conclusión, este estudio sugiere que la variante N131S no participa en la modulación de los niveles de HDL en las poblaciones estudiadas. Sin embargo, pudiera ser relevante para el desarrollo del SM en las poblaciones indígenas de México.

**Palabras Clave:** Colesterol HDL, gen *VNN1*, población mexicana, síndrome metabólico.

## **ABSTRACT.**

Lipids are important structural components of cell membranes, and are transported in blood as macromolecular complexes called lipoproteins. Among the different type of lipoproteins, high density lipoproteins (HDL) are clinically important because high HDL plasma levels are associated with decreased cardiovascular risk, while low HDL plasma levels (hipoalpha-lipoproteinemia) are associated with increased cardiovascular risk. In a widespread study performed in urban areas of Mexico, 50% of adults showed hipoalpha-lipoproteinemia. HDL-C plasma levels are determined by both genetic environmental factors, and several genes participating in different metabolic pathways have been associated with this trait. In the present study, we genotyped a single nucleotide polymorphism (SNP) within the vanin 1 gene (*VNN1*, rs2272996), that leads to an asparagine to serine substitution at position 131 of the vanin protein (*N131S*). This SNP was genotyped by real-time PCR using Taqman probes in 754 unrelated Mexican Mestizos, 87 Mayans and 111 Coras. The possible association of this SNP with different anthropometric and biochemical parameters was explored under two different genetic models (dominant and additive), using the SPSS v15 statistical package. The allelic frequency of this SNP was similar in the 3 different populations analyzed, and no association with HDL levels was observed. However, this SNP was significantly associated with higher waist circumference and triglyceride levels only in the Cora population ( $p=0.041$  and  $0.009$ , respectively). Because these two traits are part of the metabolic síndrome (MS), the posible association of this variant with MS was explored, finding significant association only for the Cora population; In conclusion, this study suggest that this SNP does not participating in the modulating of HDL levels in the populations study. However, could be outstanding for the development of MS in the Indians population of Mexico.

**Key words:** Cholesterol-HDL, *VNN1* gene, Mexican population, metabolic syndrome.

## **2. Marco Teórico.**

### **2.1 Lípidos y lipoproteínas plasmáticas.**

#### **2.1.1 Lípidos.**

Los lípidos son componentes fundamentales en la estructura de las membranas celulares y representan para la célula la mayor fuente de energía metabólica. Además, algunos de ellos sirven como reserva energética (ej. los triacilgliceroles), como precursor de hormonas esteroideas y ácidos biliares (ej. el colesterol) y como mensajeros intracelulares y extracelulares (ej. prostaglandinas y fosfatidil inositol) (Ganong, 2002).

Los lípidos plasmáticos más importantes clínicamente son el colesterol y los triacilgliceroles conocidos también como triglicéridos (TG), ambos insolubles en agua, por lo que son transportados en sangre unidos a proteínas (apolipoproteínas), formando macromoléculas llamadas lipoproteínas (Phillips y Rothblat, 1997; Pérez-Méndez *et al.*, 2002).

#### **2.1.2 Apolipoproteínas.**

Las apolipoproteínas son un grupo de proteínas anfipáticas que se asocian a algunos pasos bioquímicos del metabolismo de los lípidos. Las masas moleculares de las apolipoproteínas abarcan un intervalo de menos 7 kDa (apo C-I) a más de 500 kDa (Apo B-100 y Apo A) (Pérez-Méndez *et al.*, 2002).

La mayoría de las apolipoproteínas son solubles y se unen fácilmente a las estructuras lipídicas, tanto *in vivo* como *in vitro*, por lo que en un inicio se sugirió que eran únicamente vehículos para la solubilización y el transporte de los lípidos en el plasma. Sin embargo, existe evidencia que sugiere que las apolipoproteínas también tienen funciones activas en el metabolismo de las lipoproteínas actuando como ligandos para receptores de lipoproteínas, así como cofactores para enzimas lipolíticas y proteínas transferidoras de lípidos (Kwiterovich, 2002).

### **2.1.3 Lipoproteínas.**

Los lípidos provenientes de la dieta se integran en el hígado y en el intestino formando partículas lipoproteicas (lipoproteínas).

Las lipoproteínas plasmáticas son macromoléculas esféricas formadas de lípidos y proteínas (apolipoproteínas), están constituidas por un núcleo lipídico no-polar con una cubierta hidrofílica constituida por colesterol libre, fosfolípidos y apolipoproteínas (Ganong, 2002; Civeira *et al.*, 2004).

El transporte de los lípidos en sangre se realiza a través de diferentes lipoproteínas. Los triglicéridos son transportados principalmente por los quilomicrones (QM) y las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, very low density lipoproteins). El colesterol a su vez es transportado por las lipoproteínas de baja densidad (LDL, low density lipoproteins) y por las lipoproteínas de alta densidad (HDL, high density lipoproteins).

Las lipoproteínas son clasificadas con base a su tamaño y densidad entre otras características (Tabla 1). En orden decreciente a su densidad se ubican inicialmente las HDL, LDL, VLDL y QM (Leon *et al.*, 1991; Skinner, 1994; Van-Tol *et al.*, 2001 y Barter, 2003).

El metabolismo de las lipoproteínas es una red compleja de procesos bioquímicos, incluyendo el ensamblaje, la secreción y el catabolismo (Grundy *et al.*, 2004).

### **2.1.4 Lipoproteínas de alta densidad (HDL)**

#### **2.1.4.1 Clasificación de las HDL**

Se han descrito diferentes subclases de HDL basándose en ciertas características fisicoquímicas y funcionales. Una clasificación se fundamenta en su densidad de flotación; por medio de ultracentrifugación, las partículas son separadas y dependiendo de la mayor o menor cantidad de proteínas y lípidos que transportan se distinguen en HDL<sub>2</sub> y en HDL<sub>3</sub> (Tabla 1). La concentración de ambos tipos de

partículas es variable y se ve modificada por diferentes condiciones ambientales como el alcohol y el ejercicio. Otros métodos de separación que se han utilizado para afinar la clasificación de las HDL son la electroforesis en gradiente o filtración en gel (William *et al.*, 1993; Civeira *et al.*, 2004; Marcovina *et al.*, 2006).

Las HDL son las lipoproteínas con mayor proporción proteica (55-60% de masa seca), siendo la apo A-I su apolipoproteína más abundante. En ausencia de Apo A-I, Apo E es requerida para un metabolismo normal de las lipoproteínas que contienen un porcentaje alto de triglicéridos (González-Sastre *et al.*, 2003).

Tabla 1. Características bioquímicas de las lipoproteínas.

Lipoproteínas	Densidad (g/ml)	Lípidos principales	Apolipoproteínas	Contenido de colesterol	Características
Quilomicrones	< 0.95	Triglicéridos	Apo B-48, Apo A-I, A-II, Apo C-I, C-II, Apo E		Permanecen en el sitio de origen.
VLDL	0.95-1.006	Triglicéridos y esteres de colesterol	ApoB-100, ApoC-I, ApoC-II, Apo E	11-15 %	Sintetizadas en hígado, transportan triglicéridos
LDL	1.019-1.063	Colesterol	B-100	50-70 %	Derivadas del procesamiento de las VLDL por acción de lipasa lipoproteica, transportan colesterol
HDL2	1.063-1.125	Lípidos hidrofóbicos.	ApoA-I, apoA-II, ApoC-I y ApoC-II		Transportan el colesterol desde los tejidos del cuerpo hasta el hígado
HDL3	1.125-1.210	Fosfolípidos y proteínas.	ApoA-I, ApoA-II, ApoC-I y ApoC-II	20 al 30%	El ejercicio físico las aumenta
			ApoC-III, ApoE		El alcohol las disminuye

Modificado de Van- Tol A *et al.*, 2001; Barter, 2003

#### **2.1.4.2 Metabolismo de las HDL y transporte reverso de colesterol (TRC).**

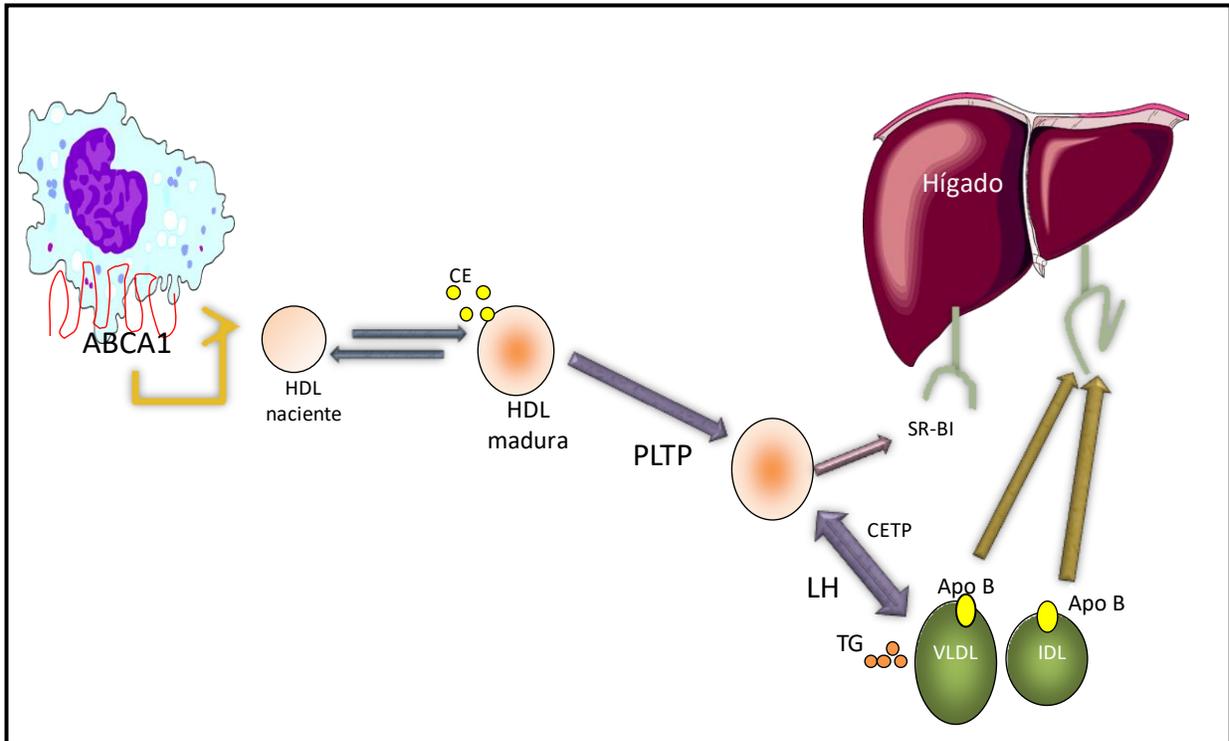
El transporte reverso del colesterol (TRC) se define como el regreso del colesterol proveniente de las células periféricas hacia el hígado para su excreción y reciclaje (Figura 1). El TRC es uno de los mecanismos por medio del cual las HDLs evitan la formación de placa ateromatosa.

Las etapas del proceso de TRC se describen a continuación:

Las HDL se originan principalmente en el hígado y en el intestino, donde son secretadas como partículas nacientes de forma discoidal, compuestas fundamentalmente por fosfolípidos y apolipoproteínas A-I y A-II, con muy bajo contenido de colesterol. Estas partículas nacientes atraviesan el endotelio vascular de los tejidos periféricos, desde los cuales remueven el exceso de colesterol libre celular por acción del transportador de membrana ABCA1 (*ATP binding cassette A-1*). ABCA1 es importante para la lipidización inicial de las HDL nacientes (Figura 1). El colesterol captado por estas partículas es esterificado por la lecitina-colesterol aciltransferasa (LCAT), por lo cual el colesterol pierde su carácter anfipático transformándose en una molécula hidrofóbica; el colesterol esterificado abandona la superficie de la lipoproteína que lo transporta para situarse en el interior de la partícula, aumentando el tamaño de la misma y formando partículas esféricas. Estas partículas continúan creciendo por la acción de la proteína transferidora de fosfolípidos (PLTP) que media la fusión de remanentes de superficie y la LCAT continúa esterificando colesterol pasando sucesivamente de HDL<sub>3</sub> a HDL<sub>2</sub>. La proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP) intercambia ésteres de colesterol provenientes de las HDL<sub>2</sub> por triglicéridos de las lipoproteínas con Apo-B y posteriormente la lipasa hepática (LH) hidroliza los triglicéridos y fosfolípidos de las HDL disminuyendo su diámetro. Como paso final, las partículas de HDL se unen al receptor basurero B-I (SR-BI), el cual reconoce a las HDL maduras para su selectiva utilización en el hígado y para su posible excreción por medio de sales biliares (Peelman *et al.*, 2000; Yokohama *et al.*,

2000; Angelin *et al.*, 2002; Nofer *et al.*, 2002; Pérez-Méndez *et al.*, 2002; Assmann *et al.*, 2003; Brewer *et al.*, 2003).

Debido al proceso complejo que significa el transporte reverso del colesterol, es necesaria la participación de una gran variedad de proteínas. Estas proteínas se describen en la tabla 2.



**Figura 1. Vía del transporte reverso del colesterol (TRC):** Inicia con la interacción del transportador transmembranal ABCA1 y las HDL nacientes promoviendo el eflujo de colesterol y fosfolípidos. El colesterol captado por las HDL es esterificado por LCAT. Los ésteres de colesterol abandonan la superficie de la lipoproteína para situarse en el interior de la partícula, constituyendo así las HDL maduras. El colesterol esterificado puede ser intercambiado por triglicéridos provenientes de las lipoproteínas que contienen Apo-B; este intercambio está facilitado por CETP. El paso final de este proceso es la unión de las HDL a SR-BI, para su utilización selectiva en el hígado.

**Tabla 2. Proteínas Implicadas en el metabolismo y transporte de las HDL.**

<b>Proteína</b>	<b>Características</b>
<p>Lipasa Lipoproteica (LPL)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Es sintetizada principalmente en musculo esquelético, músculo cardiaco y adipocitos.</li> <li>• Desempeña un papel fundamental en el metabolismo de lípidos a través de la hidrólisis de los TG, transportados por quilomicrones y VLDL.</li> <li>• Actúa como un mediador importante en el mantenimiento de la homeostasis energética y acumulación de grasa en tejido adiposo.</li> </ul>
<p>Lipasa Hepática (LH)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Enzima que se encuentra en la superficie de las células endoteliales del hígado, ovarios y glándulas suprarrenales.</li> <li>• Su acción es la hidrólisis de fosfolípidos y triglicéridos, las partículas lipoproteicas sobre las que actúan esta enzima son preferentemente LDL y HDL.</li> <li>• Su acción provoca el paso de partículas grandes (HDL<sub>2</sub>) a otras más pequeñas (HDL<sub>3</sub>), ya que la hidrólisis de triglicéridos de HDL provoca la disociación de moléculas de Apo A-I de estas partículas.</li> <li>• Sirve como cofactor para el metabolismo selectivo del colesterol de las HDL mediado por el receptor SR-BI.</li> <li>• La actividad de la LH se ve suprimida por el estradiol e incrementada por testosterona; éste puede ser un mecanismo por el cual las hormonas afectan los niveles de HDL.</li> <li>• La actividad alta de LH está asociada con niveles bajos de HDL, mientras que su deficiencia está asociada con un modesto aumento de HDL.</li> </ul>
<p>Lipasa Endotelial (LE)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sintetizada por células endoteliales, expresada en hígado, placenta, pulmón y riñón.</li> <li>• Utiliza como sustrato principal a los fosfolípidos, los cuales al ser hidrolizados de las HDL, provocan la liberación de ácidos grasos generando HDL pequeñas.</li> <li>• La participación de LE es determinante en la variación de los niveles de HDL.</li> </ul>
<p>Lecitina: colesterol aciltransferasa (LCAT)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sintetizada principalmente por hepatocitos; transfiere un grupo acilo de la fosfatidilcolina hacia un grupo hidroxilo del colesterol.</li> <li>• El colesterol que es esterificado por la LCAT proviene en parte directamente de las membranas celulares. La esterificación del colesterol es muy importante en la maduración de las HDL y el TRC.</li> <li>• La deficiencia de LCAT se manifiesta en una marcada disminución en la formación de ésteres de colesterol de las HDL aunado a un incremento en el catabolismo de Apo A-II.</li> <li>• Se ha encontrado actividad antioxidante asociada a esta proteína que podría tener relevancia para explicar la capacidad antioxidante y antiinflamatoria de las HDL.</li> </ul>

<b>Proteína</b>	<b>Características</b>
Proteína Transportadora de ésteres de colesterol (CETP)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Secretada en plasma desde diferentes tejidos (Hígado, intestino delgado, bazo, tejido adiposo, glándulas suprarrenales y músculo esquelético)</li> <li>• Su función es transferir ésteres de colesterol contenidos en las HDL a las lipoproteínas de densidad intermedia (IDL, intermediate density lipoprotein) y VLDL.</li> </ul>
Proteína Transportadora de fosfolípidos (PLTP)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se sintetiza en ovario, timo y placenta.</li> <li>• Su función consiste en transferir fosfolípidos de membrana hacia las partículas precursoras de las HDL.</li> <li>• Favorece el eflujo de colesterol de las células hacia hígado.</li> </ul>
Proteína transportadora de colesterol ABCA1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Es una proteína transmembranal que se expresa en tejido fetal, pulmón, glándulas suprarrenales e hígado.</li> <li>• Su función es la de transportar colesterol libre a través de la membrana plasmática, donde es capturado por la ApoA-I para la formación de HDL.</li> <li>• Mutaciones en ABCA1 se asocian a niveles reducidos de HDL y Apo A-I</li> </ul>
Receptor basurero BI (SR-BI)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína de superficie que fija lipoproteínas HDL y LDL, así como colesterol libre.</li> <li>• Es capaz de facilitar la captación selectiva de HDL, a través de la formación del complejo lipoproteína-receptor.</li> <li>• La sobreexpresión hepática de SR-BI se asocia a disminución del C-HDL, acelerando el aclaramiento de ésteres de colesterol reducido y secreción de colesterol biliar.</li> </ul>
Receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPAR)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Son factores de transcripción dependientes de ligando que forman una subfamilia de los receptores nucleares hormonales.</li> <li>• Regulan el metabolismo de los lípidos y la glucosa.</li> <li>• Se ha identificado 3 isoformas PPAR<math>\alpha</math>, PPAR<math>\beta</math>, PPAR<math>\delta</math> y PPAR<math>\gamma</math>.</li> <li>• La activación de los PPARs incrementa la salida de colesterol mediada por Apo A-I en macrófagos.</li> </ul>

(Cohen *et al.*, 1999; Homon *et al.*, 2000; Trigatti *et al.*, 2000; Silver y Tall, 2001; Perret *et al.*, 2002; Zambo *et al.*, 2003; Ishida *et al.*, 2003; Mertens *et al.*, 2003; Ritsch y Patsch, 2003).

## **2.1.5 Efecto de las HDL en la modulación del riesgo cardiovascular**

### **2.1.5.1 Análisis clínico y genético de la variación de los niveles de HDL.**

Estudios clínicos y epidemiológicos han demostrado que los niveles bajos de colesterol HDL (C-HDL), condición conocida como hipoalfalipoproteinemia, es uno de los principales factores de riesgo para enfermedad arterial coronaria, aún con niveles normales de colesterol total (Kolovou *et al.*, 2005). Es importante mencionar que más del 40% de los pacientes con infarto al miocardio, presentan niveles bajos de C-HDL (Genest *et al.*, 1999).

La hipoalfalipoproteinemia está caracterizada por niveles bajos de C-HDL (<35 mg/dL) en ausencia de otras alteraciones lipídicas. Su prevalencia en población anglosajona es de 11% y 13% en varones de Estados Unidos y Canadá respectivamente; mientras que en población mexicana la hipoalfalipoproteinemia es muy frecuente, ya que su prevalencia es mayor al 48% (Aguilar-Salinas *et al.*, 2001). Es muy probable que la mayor parte de los sujetos con niveles bajos de C-HDL en plasma tengan mayor riesgo de desarrollar enfermedad arterial coronaria.

Algunos de los factores que provocan el decremento de los niveles de C-HDL son el tabaquismo, la obesidad, la falta de ejercicio (sobre todo aeróbico), algunos medicamentos (andrógenos, progestágenos, corticoides, beta bloqueadores y diuréticos), eventos de estrés agudo y las infecciones (Aguilar-Salinas *et al.*, 2004).

En contraparte niveles elevados de C-HDL (hiperalfalipoproteinemia), han sido asociados a la disminución y al retardo de la formación de las lesiones ateroscleróticas en humanos (Solá-Alberich *et al.*, 2001); se caracteriza por niveles elevados de C-HDL (>60 mg/dL) y longevidad, en la mayoría de los casos se sugiere una forma de herencia poligénica y multifactorial para esta condición. Sin embargo, existen reportes de familias con un patrón aparente de herencia autosómica dominante (Ordovas *et al.*, 2000).

### **2.1.5.2 Mecanismos de acción de las HDL.**

El efecto protector de las HDL pudiera estar mediado principalmente por 4 mecanismos: 1) transporte reverso de colesterol, 2) disminución de oxidación de las LDL, 3) inhibición de la expresión de las moléculas de adhesión inducidas por citocinas endoteliales y 4) la activación de la sintetasa endotelial de óxido nítrico (Cuevas *et al.*, 2004; Ansell *et al.*, 2005).

### **2.1.5.3. Estudios genéticos para la identificación de los loci asociados a la variación de los niveles de HDL en humanos.**

Estudios realizados en gemelos sugieren que entre el 50-70% de la variación de los niveles de las HDL en humanos está determinada genéticamente, es por ello que algunos esfuerzos han sido orientados a tratar de identificar las variantes genéticas que determinan las concentraciones de HDL en el humano. Debido a que en la mayoría de las familias esta condición no parece cosegregar de forma mendeliana sino como un rasgo complejo, la identificación de los genes involucrados en el metabolismo de las HDL se ha complicado, por lo que se conoce poco de las causas moleculares que lo condicionan (Miller *et al.*, 2003).

Las dos principales estrategias utilizadas para la búsqueda de genes que regulen los niveles de C-HDL son: 1) estudio de genes candidato y 2) el escrutinio del genoma, mediante un análisis de ligamiento genético, para identificar diferentes loci que modulen como rasgo cuantitativo (Quantitative trait loci [QTL]) los niveles de HDL. El papel de muchos de los genes candidatos en la regulación de los niveles de C-HDL no ha sido estudiado; es posible que varios de estos genes tengan un efecto pequeño, dependiendo además de su interacción con el medio ambiente y otros genes. A pesar de estas limitaciones se ha confirmado la participación de cerca de 10 genes en la regulación de los niveles de C-HDL en humanos, todos ellos son responsables de enfermedades mendelianas que cursan con alteraciones en los niveles de C-HDL y participan en el transporte reverso del colesterol (Wang y Paigen, 2005; Oram y Heinecke, 2005).

### **3. ANTECEDENTES.**

#### **3.1 Estudio genético de las HDL en población Mexicana.**

Con la finalidad de identificar las posibles causas de las variaciones plasmáticas de C-HDL en población mexicana, diversos grupos de investigación se han enfocado en el estudio de genes relacionados con el metabolismo de lípidos. De los cuales, sobresale un estudio reciente que permitió identificar un cambio no sinónimo de una arginina por una cisteína en la posición 230 (*R230C*) de la proteína ABCA1 en un grupo de sujetos con hipoalfalipoproteinemia, el cual parece ser exclusivo de poblaciones amerindias o derivadas de éstas, ya que sólo se ha identificado en mestizos mexicanos y poblaciones indígenas como son yaquis, purépechas, mazahuas, mayas y zapotecos (Wang *et al.*, 2000; Villarreal-Molina *et al.*, 2007).

Inicialmente el análisis de la variante *R230C* en una población abierta mexicana, mostró asociación no sólo a concentraciones bajas de C-HDL, sino también y de manera independiente a la obesidad, síndrome metabólico y diabetes (Villarreal-Molina *et al.*, 2007; Villarreal-Molina *et al.*, 2008).

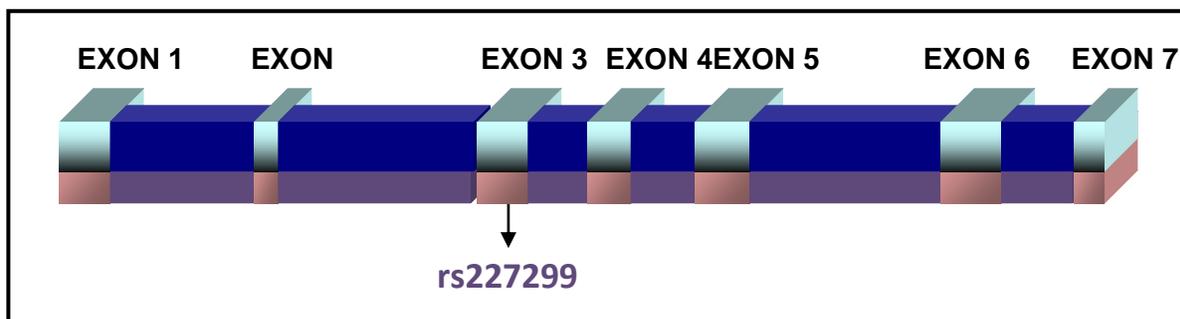
Aún cuando esta variante parece ser de gran relevancia en la modulación de los niveles plasmáticos de C-HDL en la población mexicana, sólo explica aproximadamente el 4% de esta variación (Villarreal-Molina *et al.*, 2008); lo cual a pesar de que constituye un impacto alto para una variante genética, sugiere la existencia de otros genes que podrían contribuir en el metabolismo de las HDL en la población mexicana; tal es el caso del gen *VNN1*, recientemente asociado a la modulación de los niveles plasmáticos de C-HDL (Göring *et al.*, 2007).

#### **3.2 Gen Vanina 1 (*VNN1*)**

El gen *VNN1* se encuentra ubicado en el cromosoma 6 en la banda q23-q24 (Figura 2), tiene 7 exones y se expresa en diversos tejidos como colon, riñones, páncreas, placenta, células T e intestino (Granjeaud *et al.*, 1999; Martin *et al.*, 2001), codifica para una proteína de 513 aminoácidos denominada molécula

vascular no inflamatoria (Aurround-Lions *et al.*, 1996), la cual es una ectoenzima con actividad de panteteinasa que hidroliza panteteina en ácido pantoténico y cisteamina (Pitari *et al.*, 2000; Berruyer *et al.*, 2006). Esta molécula se encuentra anclada a la superficie de las células epiteliales por un grupo glicosilfosfatidil inositol (GPI) (Berruyer *et al.*, 2004).

Un estudio del transcriptoma humano, reportó que el incremento en la expresión del gen *VNN1* está asociado significativamente con aumento de los niveles de C-HDL y cambios en los niveles de TG, ApoA-I, ApoA-II y LDL. (Göring *et al.*, 2007; ASHG Annual Meeting, 2007). De igual manera, Yang y cols (2005) realizaron un escrutinio completo del genoma para identificar regiones cromosómicas asociadas a los niveles de C-HDL, mediante un análisis de ligamiento genético. En este estudio se encontró evidencia de ligamiento en el cromosoma 6 en la banda 6q22.33-6q24.3, región que incluye al gen *VNN1*. Sin embargo, no se encontró asociación con polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) de este gen y la variación de los niveles de C-HDL (específicamente en la subfracción 3) (Yang *et al.*, 2005). Con estos antecedentes, se considera de gran interés analizar la participación del gen *VNN1*, particularmente el cambio no sinónimo de aminoácido (asparagina por serina en la posición 131: [N131S, SNP rs2272996]) ubicado en el exón 3 (figura 2), el cual ha sido asociado a distintos rasgos metabólicos incluyendo hipertensión arterial (Zhu *et al.*, 2007).



**Figura 2. Gen *VNN1*:** El polimorfismo rs2272996: esta ubicado en el exón 3 del gen vanina 1 (*VNN1*).

#### 4. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.

La anormalidad lipídica más prevalente en la población mexicana adulta es la hipoalfalipoproteinemia, presente en el 50% de nuestra población; es una característica frecuente en pacientes con diabetes o síndrome metabólico, condiciones asociadas a un riesgo cardiovascular aumentado (Aguilar-Salinas *et al.*, 2001; Barquera *et al.*, 2007).

Estudios realizados en gemelos sugieren que entre el 50 y 70 % de la variación de los niveles de HDL está determinado genéticamente, es por ello que algunos esfuerzos se han orientado a tratar de identificar las variantes genéticas que determinen las concentraciones de HDL (Miller *et al.*, 2003); sin embargo, a pesar de que nuestra población representa uno de los grupos de estudio más interesantes para la identificación de los genes que participan en el metabolismo de las HDL, aún es poco lo que se sabe de la contribución genética en la variación de los niveles de C-HDL.

A la fecha, se ha podido confirmar la participación de la variante *R230C* del gen *ABCA1* en la modulación de los niveles plasmáticos de las HDL en población mexicana (Villarreal-Molina *et al.*, 2007). No obstante, esta variante solo explica el 4% de la variación en los niveles plasmáticos de C-HDL. Por lo cual, resulta interesante evaluar otros genes que pudieran modular los niveles de C-HDL en nuestra población. El gen *VNN1* fue asociado con el incremento de los niveles de C-HDL así como cambios en los niveles de TG, y otras subfracción lipídica (Göring *et al.*, 2007). De este gen en cuanto asociación solo se tiene evidencia de una SNP (rs2272996 [N131S]) al que asocian con la presencia de HTA (Zhu *et al.*, 2007); sin embargo, aún se desconoce el papel de este polimorfismo en la modulación de los niveles de C-HDL y su posible interacción con otras variables metabólicas.

## 5. JUSTIFICACIÓN

La regulación de los niveles plasmáticos de C-HDL es un proceso complejo en el que participan tanto factores genéticos como ambientales. Los genes que hasta el momento se ha evidenciado que tienen relevancia en la regulación de los niveles plasmáticos de C-HDL, explican solo el 4% de la variación en este rasgo metabólico, lo que sugiere que existen otros genes que podrían contribuir de manera importante en el metabolismo de las HDL.

Uno de los genes de interés es *vanina1* (*VNN1*), el cual fue recientemente identificado a través del escrutinio completo de expresión genómica, mostrando asociación muy significativa entre el aumento de los niveles de C-HDL con un incremento en los niveles de expresión del RNAm de dicho gen. Aún son pocos los estudios que han evaluado la participación de este gen en la modulación de los niveles de C-HDL y rasgos metabólicos relacionados. Por lo que este gen constituye un candidato importante en la modulación de los niveles de C-HDL en la población mexicana.

Debido a la necesidad de realizar estudios integrales en los cuales se valoren tanto el componente genético como el factor ambiente en este trabajo se plantea analizar la participación de la variante *N131S* del gen *VNN1* que pudiera contribuir en la comprensión de los mecanismos involucrados en las alteraciones plasmáticas de C-HDL de tal forma que permitirá tener más elementos diagnósticos que ayuden a un manejo más racional de esta importante variable metabólica. Por lo que en este estudio se propone evaluar la participación de la variante *N131S* del gen *VNN1* en la modulación de los niveles de C-HDL en el desarrollo de obesidad y síndrome metabólico.

## **6. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la contribución de la variante *N131S* del gen *VNN1* en la modulación de los niveles plasmáticos de C-HDL y otros rasgos metabólicos en una muestra de población mestiza mexicana y dos poblaciones indígenas.

## **7. OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Determinar la frecuencia de la variante *N131S* del gen *VNN1* en población mestiza, maya y cora.
- Analizar si existe asociación de la variante *N131S* del gen *VNN1* con los niveles de C-HDL y con otros parámetros bioquímicos y antropométricos en población mestiza, maya y cora.
- Establecer la asociación de la variante *N131S* del gen *VNN1* con el síndrome metabólico en las tres poblaciones estudiadas.

## **8. HIPOTESIS.**

El polimorfismo *N131S* del gen *VNN1* está asociado a la variación de los niveles de C-HDL y/o a rasgos bioquímicos y antropométricos en la población mestiza mexicana y poblaciones indígenas.

## **9. METODOLOGIA**

### **9.1 Sujetos de estudio**

Este proyecto fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (INCMNSZ) y todos los participantes firmaron un consentimiento informado.

En este estudio se analizaron 753 sujetos mestizos no relacionados, provenientes de una muestra de 1000 individuos de población general. Los sujetos fueron seleccionados bajo los siguientes criterios de inclusión:

- Mexicanos en al menos tres generaciones (hijo, padre y abuelo de origen mexicano).
- Edad entre 18 y 69 años.
- Sin tratamiento médico que altere o modifique los niveles plasmáticos de C-HDL o alguna subfracción lipídica.
- Niveles plasmáticos de glucosa <126 mg/dL (exclusión de diabéticos).
- IMC <40 kg/m<sup>2</sup> (exclusión de obesos clase III).
- En caso de mujeres, que no estén en tratamiento hormonal o usen anticonceptivos orales.

La captación de estas muestras se realizó en cinco instituciones gubernamentales de la Ciudad de México: INCMNSZ, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) plantel Iztapalapa. A cada sujeto se le aplicó un cuestionario estandarizado para obtener información del nivel socioeconómico, historia clínica, antecedentes familiares, uso de medicamentos, alcoholismo y tabaquismo. Las mediciones antropométricas como peso, talla, circunferencia de cintura, cadera, presión arterial y toma de sangre fueron realizadas por personal capacitado.

En cuanto a las poblaciones nativas de México se analizaron 198 individuos pertenecientes a dos grupos étnicos: 87 mayas originarios de una comunidad rural del estado de Campeche y 111 coras de una comunidad del sur del estado de Nayarit.

A todos los individuos participantes se les tomó una muestra de 20 mL de sangre periférica después de un ayuno de 12 horas para medir parámetros bioquímicos y extraer ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico.

### **9.1.1 Criterios de exclusión**

Para las tres poblaciones estudiadas se consideraron los siguientes criterios de exclusión:

- Uso de hipolipemiantes y patologías que afecten los niveles de C-HDL como neuropatía, hepatopatía y trastornos tiroideos.
- En el caso de las mujeres, se excluyeron aquellas que usaban anticonceptivos orales, que estaban bajo tratamiento hormonal, uso de estrógenos y/o que estaban embarazadas, en estado fisiológico del climaterio o menopausia.
- Individuos con tratamiento de esteroides.

### **9.2. Reactivos.**

- Extracción de DNA

- Fenol  $C_6H_6O$
- Cloroformo  $CHCl_3$
- Alcohol isoamílico  $C_5H_{12}O$

- Determinación de perfil bioquímico

- Ácido fosfotúngstico
- Magnesio ( $Mg^{2+}$ )

- Valoración de DNA

- Agarosa (Ultra Pure Agarose. Invitrogen No. 15510-019)

- TBE 10x (Ambion No.9863)
  - Bromuro de etidio (0.5µg/µL)
  - Colorante de carga (azul de bromofenol; xilencianol y glicerol 40%)
- Reactivos de reacción en cadena para PCR en tiempo real
- Mezcla muestra de reacción (5x) (Master Mix Applied Biosystems, No. 4371355)  
Taq ADN polimerasa, solución amortiguadora de reacción MgCl<sub>2</sub>, mezcla de deoxirribonucleotidos (dNTPs)
  - H<sub>2</sub>O MilliQ
  - Sonda TaqMan Applied Biosystems C\_\_25472082\_10

### **9.3. Material de plástico y vidrio**

- Pipeta de 10 µL, 10 µL, 200 µL, 1000 µL (Gilson y Accumax pro)
- Puntas para micropipetas de polipropileno de 10 µL, 50 µL, 200 µL, 1000 µL
- Microtubos Eppendorf de polipropileno de 1.5 mL y 5 mL
- Tubos de polipropileno de 15 mL (Corning)
- Matraz Erlenmeyer de 250 mL (Pyrex)
- Vaso de precipitados (Pyrex)
- Placas de 384 pozos para PCR tiempo real de polipropileno (Applied Biosystems)
- MicroAmp 100 Optical Adhesive Films (Applied Biosystems)

### **9.4. Equipo**

- Termociclador ABI PRISM 7900 HT (Applied Biosystems)
- Refrigerador de 4°C/ congelador de -20°C/ ultracongelador de -70°C (REVCO)
- Vortex (ThermoLyne, 16700 Mixer)
- Espectrofotómetro (NanoDrop ND100)
- Transiluminador de luz Ultra Violeta (UVP M-20)

- Computadora (Compaq Presario V3000)
- Balanza analítica (Mettler AE500)
- Centrifuga Eppendorf 5415C; Ultracentrífuga (Heraeus Multifuge 3S-R)
- Horno de microondas (Samsung)
- Cámara de electroforesis (Bio Rad)
- Fuente de poder (Bio Rad)

## **9.5 Métodos**

### **9.5.1 Datos antropométricos**

Se realizó medición de peso, talla, cintura, cadera y presión arterial (PA) con baumanómetro. Se calculó el índice de masa corporal (IMC) dividiendo el peso en kilogramos entre la talla en metros elevada al cuadrado ( $IMC = \text{peso}/\text{talla}^2$ ) (Anexo1).

### **9.5.2 Parámetros bioquímicos.**

Todas las mediciones bioquímicas se realizaron en el Departamento de Endocrinología y Metabolismo de los Lípidos del INCMNSZ, utilizando procedimientos estandarizados y reactivos comerciales.

La glucosa sérica se midió utilizando el método de la glucosa oxidasa. Los niveles plasmáticos de colesterol total (CT) y triglicéridos (TG) se midieron a través de métodos enzimáticos (Boehringer-Mannheim); los niveles plasmáticos de HDL se midieron usando ácido fosfotúngstico y  $Mg^{2+}$ ; los niveles plasmáticos de insulina se midieron por radioinmunoensayo, y los niveles de Apo A-I y Apo B se midieron con un kit comercial (Beckman). Se calculó el modelo de homeostasis para evaluar resistencia a la insulina (HOMA-IR), a partir de las mediciones de glucosa e insulina en ayunas de acuerdo a la fórmula reportada por Matthews *et al.*, 1985, como sigue:

$$\text{Resistencia a la insulina (\%IR)} = \text{insulina } [\mu\text{U/dL}] * (\text{glucosa } [\text{mg/mL}] / 18) / 22.5$$

### **9.5.3 Diagnóstico de Síndrome Metabólico.**

Considerando los resultados de las mediciones bioquímicas y la exploración física (datos antropométricos) se diagnosticó síndrome metabólico (SM) por la presencia de al menos 3 de los rasgos establecidos por el panel de expertos en la detección, evaluación y tratamiento de niveles elevados de colesterol sanguíneo en adultos, pertenecientes al programa nacional de educación del colesterol (NCEP Expert Panel. 2001; Reaven, 2006) (National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Panel de tratamiento en adultos (Adult Treatment Panel III) [ATP-III]):

- Cintura mayor a 102 cm en hombres o mayor a 88 cm en mujeres.
- TG  $\geq$ 150 mg/dL o tratamiento hipolipemiante.
- HDL  $<$ 40mg/dL en hombres o  $<$ 50 mg/dL en mujeres.
- Presión arterial  $\geq$ 130/85 mmHg o tratamiento antihipertensivo.
- Glicemia en ayunas  $\geq$  100 mg/dL o tratamiento médico para la diabetes mellitus.

### **9.5.4 Extracción de ADN.**

La extracción de ADN genómico se realizó a partir de leucocitos de 1mL sangre total, a través de la técnica de fenol-cloroformo-álcohol isoamílico. La técnica consiste en añadir 2 mL de un amortiguador de lisis al botón de células agitando súbitamente durante 15 minutos; posteriormente se agrega 1mL de fenol-cloroformo-álcohol isoamílico (1:1:25), se agita por 3 minutos y se centrifuga a 1000 g durante 15 minutos. Se extrae la fase acuosa con una pipeta; a esta fase acuosa se le añade el triple de su volumen de etanol al 100% y al agitar suavemente comienza a aparecer un precipitado. Posteriormente se retira el sobrenadante, teniendo cuidado de no tomar el botón de ADN precipitado y se deja evaporar el etanol sobrante. Finalmente se resuspende el botón de ADN en 200  $\mu$ L de agua milliQ. La muestra se conservó para su posterior análisis a  $-20^{\circ}\text{C}$  (Sombrook *et al.*, 1989; Jiménez-Escrig, 2003).

#### **9.5.4.1 Cuantificación y Valoración de ADN**

La cuantificación de la muestra de ADN se realizó utilizando un espectrofotómetro (NanoDrop) mediante lecturas de absorbancia a 260 nm y 280 nm, para posteriormente realizar diluciones de 10 ng/ $\mu$ L, las cuales fueron empleadas en la genotificación. La relación  $A_{260}/A_{280}$  promedio de las muestras fue de 1.85.

La integridad del ADN se determinó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio [0.5  $\mu$ g/ $\mu$ L], en amortiguador TBE (Tris base 0.089 M, ácido bórico 0.089 M, EDTA, pH 8, 0.002 M) al 10%, conectado a una fuente de poder que se programó una velocidad de corrida de 90 volts (V) durante 10 min, para finalmente observar el gel a través de un transiluminador con luz ultravioleta (UV).

#### **9.5.5 Genotipificación de la variante N131S**

Se genotipificó la variante *N131S* por la técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR) en tiempo real con sondas TaqMan en las poblaciones mestiza, maya y cora, utilizando un termociclador ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems), para posteriormente realizar una discriminación alélica en el programa SDS 2.2 acoplado al equipo de PCR en tiempo real.

La PCR en tiempo real consistió en preparar una mezcla de 2.5  $\mu$ L de Master Mix y 0.125  $\mu$ L de la sonda C\_\_25472082\_10 (rs2272996 [N131S]) por cada muestra.

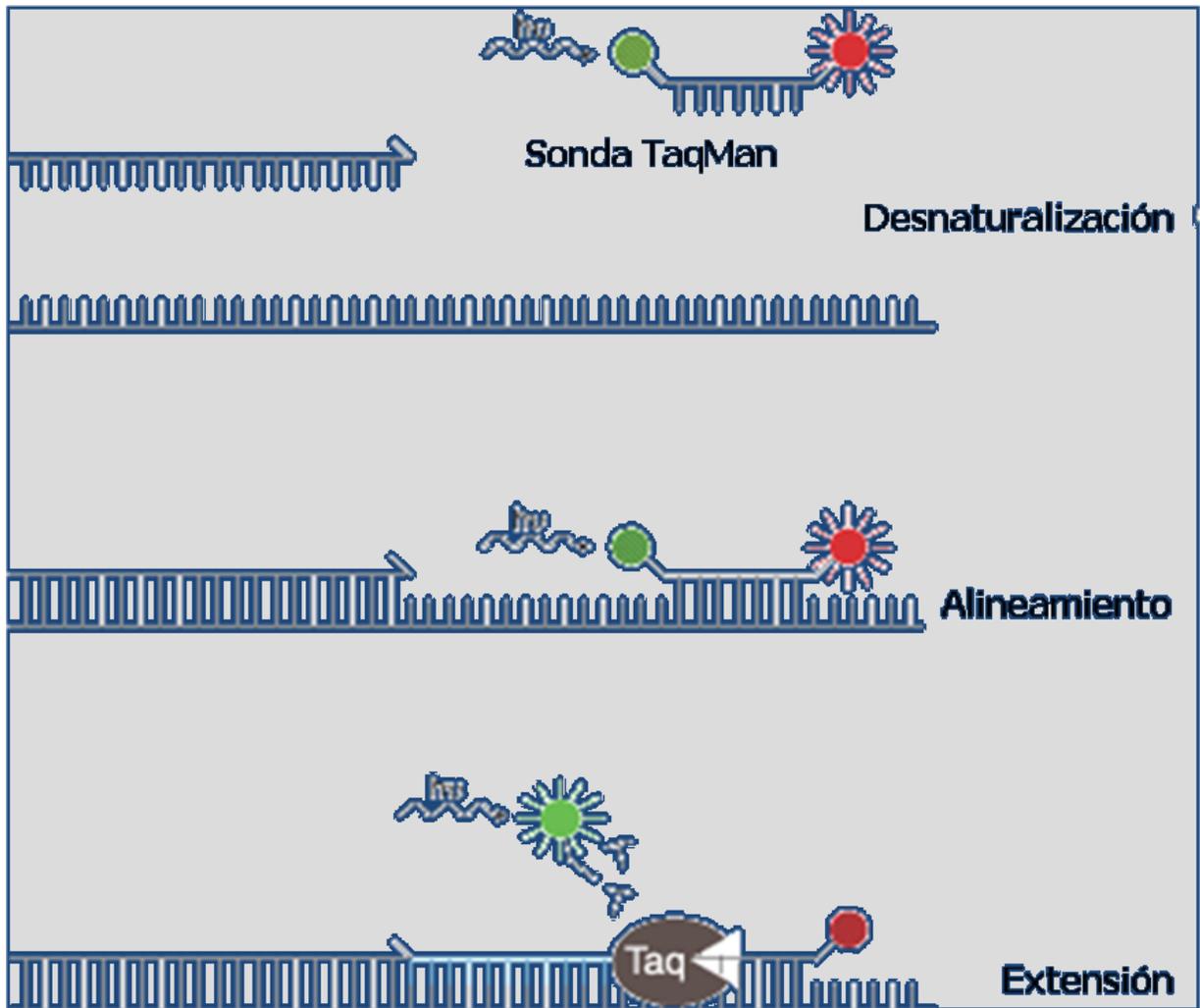
Inicialmente se colocaron 2.5  $\mu$ L de las diluciones de ADN de las distintas muestras en cada uno de los pozos de una placa de polipropileno en donde posteriormente se agregó 2.5  $\mu$ L de la mezcla de Master Mix y sonda, teniendo un volumen final de 5  $\mu$ L. como paso final de colocó la placa de polipropileno en la base del termociclador ABI Prism 7900HT, dando inicio a la etapa de desnaturalización que dura aproximadamente 1 minuto y esta a una temperatura de 94°C, en donde la sonda se encuentra intacta, los fluoróforos reportero y apagador están próximos entre sí y no hay emisión de fluorescencia;

posteriormente prosigue con la etapa de alineamiento: baja a una temperatura de 54° C durante 45 segundos, la sonda se hibrida con su secuencia complementaria y en la etapa de extensión: en la que la temperatura se lleva a 72 °C durante 2 minutos, una vez que ha comenzado la amplificación del DNA molde, se enciende la sonda y el alejamiento del fluoróforo reportero y el apagador provoca la emisión de fluorescencia. Estas etapas o ciclos los realizó el equipo 40 veces, en un tiempo aproximado de 1 hora 40 minutos (Figura 3).

#### **9.5.5.1 Fundamento de la técnica de PCR en tiempo real.**

La PCR en tiempo real es un método específico y sumamente sensible; mediante la reacción de PCR y la detección de fluorescencia permite cuantificar la cantidad de ADN producido, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado. En esta técnica los procesos de amplificación y detección se llevan a cabo de manera simultánea (Higuchi *et al.*, 1993); esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación.

El empleo de sondas TaqMan garantiza la especificidad de la detección y permite identificar polimorfismos o mutaciones puntuales (McGuigan *et al.*, 2002; Gibson *et al.*, 2006). Las sondas TaqMan presentan dos fluoróforos reporteros diferentes (VIC y FAM), lo cual permite la detección de la base incorporada. Una de las sondas incluye la base correspondiente al alelo silvestre y la otra sonda presenta la base correspondiente al alelo mutado; el fluoróforo detectado revela la presencia o ausencia del polimorfismo en la muestra analizada.



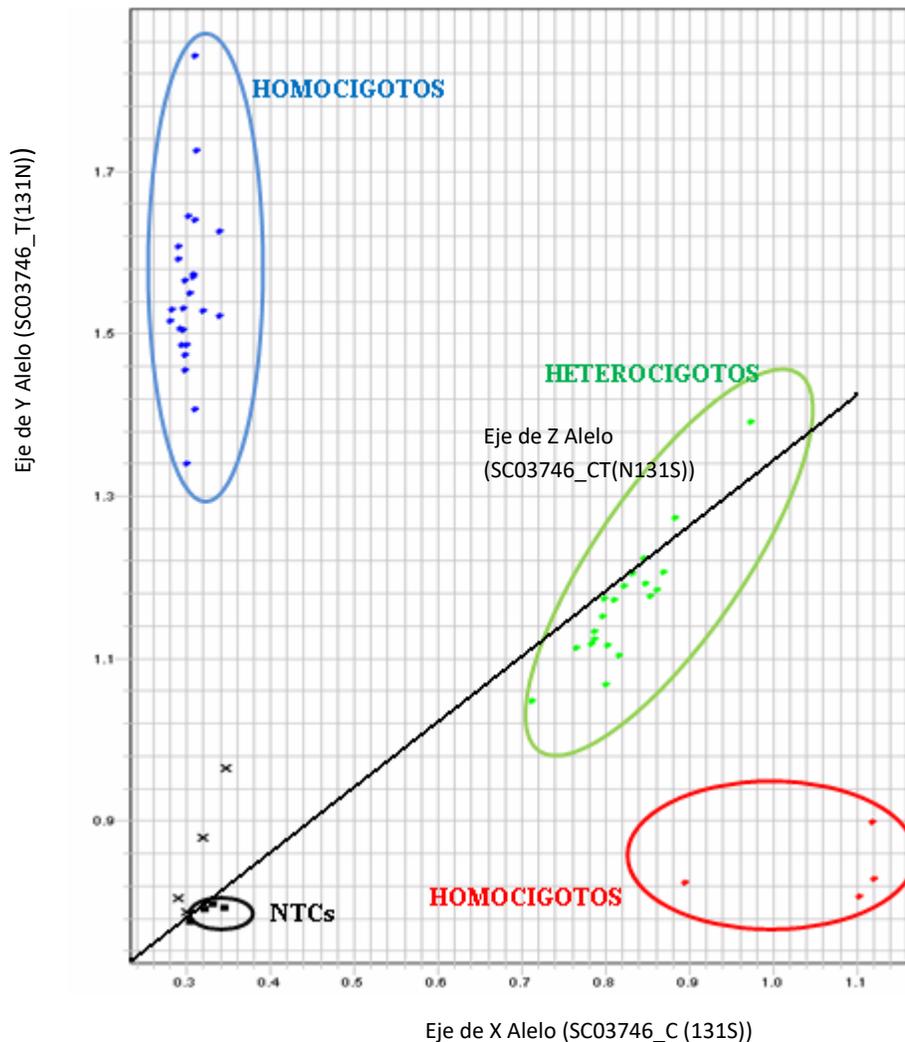
**Figura 3. Mecanismo de acción de la sonda TaqMan en una PCR.** En la etapa de desnaturalización la sonda se encuentra intacta, los fluoróforos reportero (en verde) y apagador (en rojo) están próximos entre sí y no hay emisión de fluorescencia. En la etapa de alineamiento la sonda se hibrida con su secuencia complementaria y en la etapa de extensión una vez que ha comenzado la amplificación del ADN molde, se escinde la sonda y el alejamiento del fluoróforo reportero y el apagador provoca la emisión de fluorescencia.

#### **9.5.5.2. Ensayo de discriminación alélica**

El ensayo de discriminación alélica, es una de las aplicaciones de PCR en tiempo real; mediante el programa computacional SDS 2.2 acoplado al equipo de PCR en tiempo real.

Los sistemas de detección de secuencia (SDS) por fluorescencia empleados en PCR en tiempo real son: agentes intercalantes y sondas específicas marcadas con fluorocromo; por medio de la aplicación de un algoritmo previamente establecido y tomando en cuenta la fluorescencia basal del ensayo nos permite conocer el genotipo presente en cada una de las muestras de ADN analizadas. Los resultados de la discriminación alélica son presentados en forma de gráfica (alelo Y vs alelo X), en donde se pueden identificar a los homocigotos en el eje X o Y y a los heterocigotos en el eje Z (Figura 4)

Las sondas de hibridación específicas son sondas marcadas con dos tipos de fluorocromos, un donador y un aceptor. El proceso se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (Fluorescence Resonance Energy Transfer: FRET) entre las dos moléculas (Livak, 1999; McGuigan *et al.*, 2002).



**Figura 4. Gráfica de un ensayo de discriminación alélica** para la genotipificación de muestras de PCR en tiempo real obtenida mediante en programa SDS 2.2, el color y la ubicación de las muestras dentro de la grafica permiten la determinación del genotipo, considerando la fluorescencia basal del ensayo, representada por NTCs controles negativos; sin DNA), el fluoróforo reportero FAM detecta el alelo menos común (S131) dando un color rojo al presentarse de manera homocigota los cuales recaen el en eje de las "X" y el fluoróforo reportero VIC detecta el alelo común (N131) que recae en el eje de las "Y" representado de color azul. Si se presentan los dos alelos es decir heterocigoto (N131/S131) se observara en el eje de las "Z" representados de color verde, esto nos indica la combinación de las dos fluorescencias.

### 9.5.6 Análisis estadístico de resultados

Se utilizó el paquete estadístico SPSS v15.0 (SPSS Chicago, IL) para el análisis de resultados. Se calcularon medias  $\pm$  desviación estándar de los parámetros basales de los individuos participantes. Puesto que los niveles de TG e insulina así como los índices HOMA-IR no mostraron una distribución normal, se normalizaron los valores de CT, TG e insulina por medio de los logaritmos en base 10 ( $\log_{10}$ ) para el análisis. Se utilizó una prueba de covarianza para el análisis de los rasgos cuantitativos, tomando como factor fijo la variante *N131S* y utilizando como covariables la edad, género e IMC.

### 9.5.7 Equilibrio de Hardy-Weinberg (HW).

La determinación del equilibrio de HW es un importante paso de control de calidad en los estudios de población genética. El principio del equilibrio de Hardy-Weinberg determina que en una población en equilibrio, las frecuencias genómicas están definidas por las frecuencias alélicas (Iniesta *et al.*, 2005).

Si en una población se observan dos 2 alelos, por ejemplo p y q, estos dan origen a tres genotipos pp, pq y qq; si la frecuencia del alelo p=a y la frecuencia del alelo q=b, entonces las frecuencias genotípicas quedan definidas por el binomio cuadrado perfecto:

$$(a + b)^2 = a^2 + 2ab + b^2$$

Donde la frecuencia genotípica de pp=a<sup>2</sup>, la frecuencia genotípica de pq=2ab, la frecuencia del genotipo qq=b<sup>2</sup> y p + q= 1.

Para saber si nuestra población a analizar estaba en equilibrio de Hardy-Weinberg, primero se obtuvieron las frecuencias alélicas de la variante *N131S* en cada población. El análisis de equilibrio de HW se realizó mediante un programa estadístico disponible en la página (<http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hwa1.pl>)

### **9.5.8 Análisis por medio de los modelos Aditivo, Dominante y Recesivo.**

Desde el punto de vista estadístico, un polimorfismo constituye una variable categórica con varios genotipos posibles. Se suele considerar como categoría de referencia al grupo de individuos homocigotos para el alelo más frecuente. Los modelos permiten evaluar fácilmente si hay interacciones entre el polimorfismo y otros factores (Iniesta *et al.*, 2005).

Ya que cada individuo posee una pareja de alelos, el riesgo asociado con cada genotipo puede depender del número de copias del alelo, lo que permite definir varios modelos de herencia posible cuya verosimilitud se puede explorar mediante una adecuada codificación de los genotipos. Los 3 modelos de herencia posibles son:

*Modelo Dominante:* supone que una única copia de S131 es suficiente para modificar el riesgo y que ser portador de dos copias lo modifica en igual magnitud, es decir heterocigoto N131S y homocigoto S131S tienen el mismo riesgo; en este modelo se comparan estos 2 genotipos respecto al homocigoto N131N (N131N vs N131S+S131S).

*Modelo Recesivo:* supone que son necesarias dos copias de S131 para modificar el riesgo, por lo tanto heterocigoto N131S y homocigoto del alelo más frecuente N131N tienen el mismo riesgo; bajo este modelo se compara la combinación de estos con respecto a los homocigotos del alelo mutado S131S (N131N+N131S vs S131S).

*Modelo Aditivo:* supone que cada copia de S131 modifica el riesgo en forma aditiva, por lo tanto, los homocigotos S131S tienen el doble de riesgo que los heterocigotos N131S, y N131N se considera un riesgo nulo (N131N vs N131S vs S131S).

### **9.6 Predicción de daño funcional a proteínas (Programa Polyphen)**

Este análisis consiste en predecir si los cambios de aminoácidos en las proteínas alteran la funcionalidad de la proteína ([www.genetig.bwn.harvard.edu](http://www.genetig.bwn.harvard.edu)).

## **10.RESULTADOS**

### **10.1 Daño funcional de la variante *N131S* del gen *VNN1***

Se evaluó la variante *N131S* mediante el programa Polyphen; este programa predijo al cambio no sinónimo de asparagina por serina en el codón 131 de la proteína del gen *VNN1* como posiblemente dañino, ya que la asparagina en esta posición es un aminoácido conservado en diversas especies, lo cual sugiere que el cambio podría alterar la función de la proteína.

### **10.2 Frecuencia de la variante *N131S* del gen *VNN1* en las poblaciones de estudio.**

Se analizó el equilibrio de HW para esta variante, observando que *N131S* se encuentra en equilibrio de HW en la población mestiza, maya y cora (Anexo 2). En la tabla 3 se muestra la frecuencia de los genotipos *N131N*, *N131S*, *S131S* de la variante *N131S* de *VNN1* y la frecuencia alélica en las tres poblaciones. No se observaron diferencias significativas en la frecuencia alélica entre las tres poblaciones estudiadas. De igual manera, no se observaron diferencias significativas al comparar las frecuencias de la población mestiza con las frecuencias registradas en la base de datos del HapMap para población africana, europea y asiática ([http://www.ncbi.nlm.nih./snp\\_ref.cgi?rs=2272996](http://www.ncbi.nlm.nih./snp_ref.cgi?rs=2272996)). En cuanto a las poblaciones indígenas, se observaron diferencias significativas al comparar la frecuencia alélica de estos dos grupos con la población europea y asiática.

### **10.3 Características epidemiológicas de las 3 diferentes poblaciones en estudio.**

En la tabla 4 se muestran los parámetros antropométricos y bioquímicos de la población mestiza así como de dos poblaciones nativas mexicanas (mayas y coras). Diferencias significativas fueron observadas en la mayoría de las variables analizadas exceptuando circunferencia de cintura la cual presentó valores similares en las tres poblaciones estudiadas. Interesantemente, la población maya presentó un IMC significativamente mayor que los mestizos de la Ciudad de

México e incluso que los coras. Es importante destacar que los niveles de C-HDL fueron significativamente más bajos en la población cora que en la población mestiza y maya (p<0.001, en ambos casos).

Tabla 3: Frecuencia genotípica y alélica de las poblaciones mestiza, maya, cora, africana, europea y asiática.

Población	N	Frecuencia genotípica			Frecuencia alélica		P alelica			
		N131N %	N131S %	S131S %	N131	S131		P <sup>Af</sup>	P <sup>Eu</sup>	P <sup>As</sup>
Mestiza <sup>a</sup>	754	67.63	28.64	3.71	0.819	0.180	0.525*	0.911 <sup>a</sup>	0.552 <sup>a</sup>	0.376 <sup>a</sup>
Maya <sup>b</sup>	87	71.26	25.28	3.44	0.839	0.160	0.165**	0.552 <sup>b</sup>	3.96x10 <sup>-5b</sup>	1.64x10 <sup>-6b</sup>
Cora <sup>c</sup>	111	63.03	30.63	6.30	0.783	0.216	0.199***	0.376 <sup>c</sup>	0.002 <sup>c</sup>	0.001 <sup>c</sup>
Africana	120	66.7	30.0	3.3	0.817	0.183				
Asiática	120	43.3	45.0	11.7	0.658	0.324				
Europea	90	15.6	46.7	37.8	0.611	0.389				

\* Comparación de la población abierta mestiza vs población maya; \*\*comparación de mayas vs coras;

\*\*\* comparación de población abierta vs cora. P<sup>af</sup>: P de frecuencia alélica de población africana vs frecuencia alélica de <sup>a</sup> población mestiza, <sup>b</sup> maya <sup>c</sup>cora; P<sup>Eu</sup>: P de frecuencia alélica de población europea vs frecuencia alélica de

<sup>a</sup> población mestiza, <sup>b</sup> maya <sup>c</sup>cora; P<sup>As</sup>: P de frecuencia alélica de población asiática vs frecuencia alélica de <sup>a</sup> población mestiza, <sup>b</sup> maya <sup>c</sup>cora

Tabla 4. Características bioquímicas y antropométricas de las poblaciones analizadas.

	<b>MESTIZA</b>	<b>MAYAS</b>	<b>CORAS</b>	<b>P<sup>a</sup></b>	<b>P<sup>b</sup></b>	<b>P<sup>c</sup></b>
<b>N</b>	754	87	111			
<b>% Hombres</b>	34.48	39.08	30.63			
<b>Edad</b>	39.67 ± 13.28	43.21 ± 15.01	45.60 ± 18.14	0.022	<0.001	0.329
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	26.92 ± 4.52	29.18 ± 4.15	25.77 ± 4.56	<0.001	0.013	<0.001
<b>Cintura (cm)</b>	88.56 ± 12.44	90.64 ± 10.52	89.28 ± 11.54	0.140	0.570	0.402
<b>Cadera (cm)</b>	102.57 ± 9.56	103.04 ± 9.02	99.26 ± 10.11	0.668	0.001	0.008
<b>Obesidad (%)</b>	22.60	39.0	19.8	0.012	0.628	0.002
<b>Cintura/cadera (cm)</b>	0.86 ± 0.08	0.88 ± 0.06	0.89 ± 0.06	0.052	<0.001	0.215
<b>PAS (mmHg)</b>	118.00 ± 16.65	*	117.96 ± 16.49	*	0.893	*
<b>PAD (mmHg)</b>	78.81 ± 10.66	*	72.94 ± 10.47	*	<0.001	*
<b>Glucosa (mg/dL)</b>	92.74 ± 10.53	100.09 ± 10.14	93.23 ± 9.61	<0.001	0.644	<0.001
<b>Colesterol (mg/dL)**</b>	208.06 ± 41.49	195.47 ± 34.65	175.15 ± 35.05	0.007	<0.001	<0.001
<b>Triglicéridos(mg/dL)**</b>	178.52 ± 133.00	183.49 ± 91.77	168.55 ± 107.46	0.056	0.719	0.082
<b>HDL (mg/dL)</b>	47.47 ± 12.81	48.85 ± 10.77	36.95 ± 9.56	0.334	<0.001	<0.001
<b>LDL (mg/dl)</b>	125.32 ± 35.92	113.64 ± 28.73	106.87 ± 27.67	0.007	<0.001	0.123
<b>Apo A-I (mg/dL)</b>	137.79 ± 25.88	143.07 ± 24.76	* * *	0.071	*	*
<b>Insulina (μU/mL)**</b>	10.37 ± 7.67	11.44 ± 10.27	12.17 ± 10.21	0.771	0.048	0.312
<b>HOMA-IR</b>	2.44 ± 2.09	2.92 ± 2.93	2.86 ± 2.67	0.550	0.061	0.878

\*Datos no disponibles; P<sup>a</sup> comparación de la población abierta vs población Maya; P<sup>b</sup> comparación de población abierta vs población Coras; P<sup>c</sup> comparación de población Maya vs Coras. PAS: Presión Arterial Sistólica; PAD: Presión Arterial Diastólica; HOMA: Índice de Homeostasis.

\*\* valores normalizados por logaritmo

## **10.4 Asociación de N131S del gen VNN1 con parámetros bioquímicos y antropométricos**

### **10.4.1 Población mestiza**

Los resultados obtenidos para todos los parámetros analizados se muestran en la tabla 5. No se observaron diferencias significativas entre la presencia de la variante N131S y los niveles plasmáticos de C-HDL ( $P_{dom}=0.673$  y  $P_{adit}=0.537$ ), ni con ningún otro parámetro bioquímico o antropométrico evaluado.

### **10.4.2 Poblaciones indígenas**

En la tabla 6 se muestran los resultados obtenidos en la población maya. Se encontró una tendencia en los niveles de insulina ( $P_{dom}=0.075$ ), mientras que para los niveles de C-HDL no se observó diferencia significativa ( $P_{dom}=0.185$  y  $P_{adit}=0.116$ ), aún cuando los niveles de C-HDL fueron más bajos en los portadores del genotipo S131S.

En la tabla 7 se muestran los resultados obtenidos para la población cora. En esta población se observaron mediciones mayores de circunferencia de cintura en los sujetos portadores del alelo S131 ( $P_{adit}=0.041$  y  $P_{dom}=0.057$ ). De igual manera, los niveles de triglicéridos fueron significativamente más altos en los sujetos con los genotipos N131S y S131S ( $P_{adit}=0.009$  y  $P_{dom}=0.009$ ). Con respecto a los niveles plasmáticos de C-HDL, no se observaron diferencias significativas bajo ninguno de los dos modelos utilizados ( $P_{dom}=0.649$  y  $P_{adit}=0.585$ ).

Tabla 5. Análisis de asociación de la variante N131S del gen VNN1 a los rasgos cuantitativos en la población mestiza.

	<b>N131N</b>	<b>N131S</b>	<b>S131S</b>	<b>N131S/S131S</b>	<b>Padit</b>	<b>Pdom</b>
<b>N</b>	510	216	28	244		
<b>% Hombres</b>	34.70	38.18	25.00	34.01		
<b>Edad</b>	39.49 ± 13.55	39.83 ± 12.71	41.64 ± 13.09	40.04 ± 12.74		
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)*</b>	26.85 ± 4.66	27.09 ± 4.21	26.75 ± 4.20	27.05 ± 4.20	0.776	0.638
<b>Cintura (cm)</b>	88.60 ± 12.85	88.26 ± 11.84	90.16 ± 9.22	88.48 ± 11.57	0.923	0.819
<b>Cadera (cm)</b>	102.67 ± 9.91	102.32 ± 8.78	102.70 ± 9.18	102.36 ± 8.81	0.645	0.610
<b>Cintura/cadera (cm)</b>	0.86 ± 0.08	0.86 ± 0.08	0.88 ± 0.07	0.86 ± 0.07	0.388	0.763
<b>Obesidad (%)</b>	22.70	23.10	21.50	23.00	0.144	
<b>PAS (mmHg)</b>	118.09 ± 16.79	118.11 ± 16.55	115.46 ± 15.06	117.80 ± 16.38	0.352	0.525
<b>PAD (mmHg)</b>	78.84 ± 10.75	78.67 ± 10.40	79.32 ± 11.48	78.74 ± 10.51	0.806	0.686
<b>Glucosa (mg/dL)</b>	92.36 ± 10.40	93.39 ± 11.02	94.54 ± 8.70	93.52 ± 10.77	0.121	0.171
<b>Colesterol (mg/dL)**</b>	208.29 ± 41.74	208.25 ± 40.77	202.39 ± 43.63	207.57 ± 41.06	0.456	0.654
<b>Triglicéridos(mg/dL)**</b>	177.01 ± 137.77	180.92 ± 123.50	187.39 ± 117.79	181.66 ± 122.64	0.199	0.299
<b>HDL (mg/dL)</b>	47.58 ± 13.31	47.25 ± 11.67	47.14 ± 12.16	47.24 ± 11.70	0.537	0.673
<b>LDL (mg/dL)</b>	125.39 ± 36.88	126.16 ± 33.13	117.79 ± 39.29	125.18 ± 33.92	0.510	0.823
<b>Apo A-I (mg/dL)</b>	137.66 ± 26.38	138.14 ± 25.23	137.40 ± 22.34	138.05 ± 24.86	0.932	0.864
<b>Insulina (μU/mL)**</b>	10.42 ± 7.83	10.07 ± 7.48	11.54 ± 6.33	10.25 ± 7.35	0.925	0.431
<b>HOMA-IR</b>	2.44 ± 2.16	2.40 ± 1.98	2.73 ± 1.59	2.44 ± 1.94	0.800	0.918

Ajustado por edad, género e IMC (Índice de masa corporal); Pdom (valor de P para un modelo dominante comparando los genotipos N131S y S131S vs N131N) y Prec (valor de P para un modelo recesivo comparando N131N y N131S vs S131S); PAS: Presión Arterial Sistólica; PAD: Presión Arterial Diastólica, HDL: Lipoproteínas de alta densidad; LDL: Lipoproteínas de baja densidad; ApoA: apolipoproteína A; ApoB: apolipoproteínas B; HOMA-IR: modelo de homeostasis para calcular resistencia a la insulina= (insulina [μU/mL]\* (glucosa [mg/dL]/18))/22.5.

\* Ajustado por sexo y edad

\*\* valores normalizados

Tabla 6. Análisis de asociación de la variante N131S del gen VNN1 a los rasgos cuantitativos en la población maya.

	N131N	N131S	S131S	N131S/S131S	Padit	Pdom
<b>N</b>	62	22	3	25		
<b>% Hombres</b>	38.70	40.90	33.33	40		
<b>Edad</b>	42.07 ± 14.78	44.81 ± 14.78	55.33 ± 20.79	46.13 ± 15.50		
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)*</b>	29.20 ± 4.04	29.21 ± 4.20	28.60 ± 7.38	29.14 ± 4.49	0.705	0.819
<b>Cintura (cm)</b>	90.28 ± 10.08	91.52 ± 12.38	91.67 ± 7.64	91.54 ± 11.76	0.967	0.356
<b>Cadera (cm)</b>	103.11 ± 8.96	102.81 ± 8.95	103.00 ± 14.53	102.83 ± 9.38	0.728	0.878
<b>Cintura/cadera (cm)</b>	0.88 ± 0.06	0.89 ± 0.07	0.89 ± 0.05	0.89 ± 0.07	0.498	0.804
<b>Obesidad (%)</b>	37.10	45.40	33.30	44.00	0.745	
<b>Glucosa (mg/dL)</b>	100.76 ± 10.35	99.18 ± 9.47	93.00 ± 10.44	98.44 ± 9.58	0.112	0.241
<b>Colesterol (mg/dL)**</b>	194.05 ± 32.15	203.82 ± 40.10	163.67 ± 29.57	199.00 ± 40.71	0.437	0.928
<b>Triglicéridos (mg/dL)**</b>	183.39 ± 99.98	188.77 ± 71.04	147.00 ± 44.23	183.76 ± 69.07	0.928	0.919
<b>HDL (mg/dL)</b>	49.52 ± 10.28	47.68 ± 12.59	43.67 ± 5.69	47.20 ± 11.96	0.116	0.185
<b>LDL (mg/dL)</b>	112.04 ± 27.31	122.17 ± 31.11	90.67 ± 31.53	117.67 ± 32.39	0.757	0.728
<b>Apo A-I (mg/dL)</b>	143.06 ± 21.66	144.18 ± 33.51	135.00 ± 11.79	143.08 ± 31.68	0.428	0.639
<b>Insulina (μU/mL)**</b>	10.33 ± 6.60	14.71 ± 16.87	10.43 ± 7.85	14.20 ± 16.00	0.150	<b>0.075</b>
<b>HOMA-IR</b>	2.65 ± 1.87	3.76 ± 4.88	2.34 ± 1.83	3.59 ± 4.62	0.175	0.094

Ajustado por edad, género e IMC (Índice de masa corporal); Pdom (valor de P para un modelo dominante comparando los genotipos N131S y S131S vs N131N) y Prec (valor de P para un modelo recesivo comparando N131N y N131S vs S131S); PAS: Presión Arterial Sistólica; PAD: Presión Arterial Diastólica, HDL: Lipoproteínas de alta densidad; LDL: Lipoproteínas de baja densidad; ApoA: apolipoproteína A; ApoB: apolipoproteínas B; HOMA-IR: modelo de homeostasis para calcular resistencia a la insulina= (insulina [μU/mL]\* (glucosa [mg/dL]/18))/22.5.

\* Ajustado por sexo y edad

\*\* valores normalizados

Tabla 7. Análisis de asociación de la variante N131S del gen VNN1 a los rasgos cuantitativos en la población cora.

	N131N	N131S	S131S	N131S/S131S	Padit	Pdom
N	70	34	7	41		
% Hombres	35.71	25.52	14.28	21.95		
<b>Edad</b>	44.93 ± 18.99	48.94 ± 16.53	35.86 ± 14.62	46.71 ± 16.81		
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)*</b>	25.46 ± 4.64	25.85 ± 4.29	28.43 ± 4.70	26.29 ± 4.41	0.256	0.429
<b>Cintura (cm)</b>	87.78 ± 11.35	91.42 ± 11.53	94.75 ± 12.20	91.94 ± 11.53	<b>0.041</b>	<b>0.057</b>
<b>Cadera (cm)</b>	98.22 ± 10.75	100.29 ± 8.21	105.67 ± 10.52	101.12 ± 8.67	0.112	0.218
<b>Cintura/cadera (cm)</b>	0.89 ± 0.06	0.90 ± 0.06	0.89 ± 0.05	0.90 ± 0.05	0.160	0.127
<b>Obesidad (%)</b>	21.4	11.7	42.9	17.00	0.883	
<b>PAS (mmHg)</b>	116.79 ± 16.84	120.32 ± 15.91	117.71 ± 17.07	119.88 ± 15.92	0.353	0.297
<b>PAD (mmHg)</b>	72.30 ± 11.61	74.12 ± 8.18	73.43 ± 9.62	74.00 ± 8.31	0.478	0.365
<b>Glucosa (mg/dL)</b>	92.49 ± 9.63	94.00 ± 9.55	96.71 ± 9.96	94.46 ± 9.55	0.132	0.236
<b>Colesterol (mg/dL)**</b>	171.70 ± 34.49	185.71 ± 36.77	157.86 ± 16.96	180.95 ± 35.65	0.702	0.224
<b>Triglicéridos (mg/dL)**</b>	150.83 ± 85.28	195.15 ± 136.14	214.14 ± 123.99	198.39 ± 132.85	<b>0.009</b>	<b>0.009</b>
<b>HDL (mg/dL)</b>	36.77 ± 9.67	37.82 ± 9.09	34.57 ± 11.63	37.27 ± 9.49	0.885	0.649
<b>LDL (mg/dL)</b>	106.03 ± 26.75	112.70 ± 29.66	89.33 ± 22.97	108.45 ± 29.68	0.593	0.814
<b>Insulina (μU/mL)**</b>	11.27 ± 6.87	12.51 ± 14.66	19.44 ± 10.66	13.70 ± 14.19	0.552	0.946
<b>HOMA-IR</b>	2.61 ± 1.77	3.02 ± 3.91	4.56 ± 2.38	3.28 ± 3.71	0.263	0.444

Ajustado por edad, género e IMC (Índice de masa corporal). Pdom (valor de P para un modelo dominante comparando los genotipos N131S y S131S vs N131N) y Prec (valor de P para un modelo recesivo comparando N131N y N131S vs S131S). \* Ajustado por sexo y edad

PAS: Presión Arterial Sistólica; PAD: Presión Arterial Diastólica, HDL: Lipoproteínas de alta densidad; LDL: Lipoproteínas de baja densidad; ApoA: apolipoproteína A; ApoB: apolipoproteínas B; HOMA-IR: modelo de homeostasis para calcular resistencia a la insulina= (insulina [μU/mL]\* (glucosa [mg/dL]/18))/22.5

\* Ajustado por sexo y edad

\*\* valores normalizados

### 10.4.3 Síndrome metabólico (SM)

Considerando que en este estudio se observó asociación de la variante *N131S* con los niveles plasmáticos de TG y la circunferencia de cintura en una de las poblaciones indígenas y que esta variante fue asociada con la presencia de HTA en estudios previos (tres de los cinco parámetros que toma en cuenta la ATP-III para el diagnóstico de SM [cintura, TG, C-HDL, PAS/PAD y glucosa en ayuno]), se decidió estudiar la posible asociación de esta variante con el síndrome metabólico en las distintas poblaciones analizadas. La frecuencia de este síndrome fue de 27.1% para la población mestiza y 29.7% en cora (para la población maya no fue posible establecer el diagnóstico de SM debido a que no se cuenta con los datos de PAS y PAD).

En la tabla 8 se muestra el análisis de la variante *N131S* con el síndrome metabólico en las poblaciones mestiza y cora; para el análisis se utilizó una prueba de regresión logística considerando un modelo dominante o aditivo. En la población mestiza no se observó asociación de la variante *N131S* con la presencia de SM ( $P_{dom}=0.914$ ). De igual manera, no se identificó ninguna asociación significativa con ninguno de los rasgos que conforman el síndrome metabólico. Sin embargo, para la población cora se observó una tendencia o asociación con el SM dependiendo del modelo utilizado ( $P_{dom}=0.059$  y  $P_{adit}=0.032$ ).

Tabla 8. Análisis de asociación de la variante N131S a síndrome metabólico y parámetros asociados.

Trastorno Metabólico	Mestiza (n=854)					Mayas (n=87)			PAdit	PDom	Coras (n=111)				
	N131N (%)	N131S (%)	S131S (%)	Padit	Pdom	N131N (%)	N131S (%)	S131S (%)			N131N (%)	N131S (%)	S131S (%)	Padit	Pdom
Individuos con SM	137 (67.2)	57 (28)	10 (4.8)	0.708	0.914	-	-	-	-	-	16 (48.5)	13 (39.4)	4 (12.1)	0.032	0.059
Individuos sin SM	373 (67.8)	159 (28.9)	18 (3.3)			-	-	-			54 (69.2)	21 (26.9)	3 (3.9)		
Con obesidad abdominal	179 (67.5)	74 (27.9)	12 (4.6)	0.991	0.869	26 (70.3)	9 (24.3)	2 (5.4)	0.958	0.851	25 (54.3)	16 (34.8)	5 (10.9)	0.082	0.195
Sin obesidad abdominal	326 (67.4)	142 (29.3)	16 (3.3)			35 (72.9)	12 (25)	1 (2.1)			44 (71.0)	17 (27.4)	1 (1.6)		
Con hipertrigliceridemia	238 (64.9)	112 (30.5)	17 (4.6)	0.073	0.116	36 (66.6)	17 (31.5)	1 (1.9)	0.724	0.371	31 (58.5)	17 (29.8)	5 (11.4)	0.133	0.236
Sin hipertrigliceridemia	272 (70.3)	104 (26.8)	11 (2.9)			26 (78.8)	5 (15.1)	2 (6.1)			38 (66.7)	17 (30)	2 (3.3)		
Con hipoalfalipoproteinemia	244 (67.6)	101 (27.9)	16 (4.5)	0.716	0.959	23 (63.8)	11 (30.5)	2 (5.6)	0.203	0.130	58 (63.7)	28 (30.7)	5 (5.6)	0.393	0.494
Sin hiperalfalipoproteinemia	266 (67.7)	115 (29.2)	12 (3.1)			39 (75)	11 (21.1)	1 (3.9)			11 (57.9)	6 (31.5)	2 (10.5)		
Con HTA	162 (67.5)	69 (28.8)	9 (3.7)	0.936	0.966	-	-	-	-	-	14 (58.3)	8 (33.3)	2 (8.4)	0.349	0.506
Sin HTA	348 (67.7)	147 (28.6)	19 (3.7)			-	-	-			53 (63)	26 (30.9)	5 (6.1)		
Glucosa ≥ 110 mg/dL	34 (61.8)	21 (38.2)	-	0.776	0.323	11 (84.6)	2 (15.4)	-	0.130	0.159	3 (75)	1 (25)	-	0.500	0.552
Glucosa < 110 mg/dL	476 (68)	195 (27.9)	28 (4.1)			51 (68.9)	20 (27)	3 (4.1)			66 (62.3)	33 (31.1)	7 (6.6)		

Ajustadas por edad y género. Con obesidad abdominal: cintura ≥ 88 cm en mujeres y ≥102cm en hombres; sin obesidad abdominal: cintura <88 cm en mujeres y <102 cm en hombres; con hipertrigliceridemia: triglicéridos ≥150 mg/dL; sin hipertrigliceridemia: triglicéridos <150 mg/dL; con hipoalfalipoproteinemia: HDL ≥ 50 mg/dL en mujeres y ≥ 40 mg/dL; sin hipoalfalipoproteinemia: HDL <50 mg/dL en mujeres y <40 mg/dL en hombres; con HTA: presión arterial ≥130/85 mmHg; sin HTA: presión arterial <130/85 mmHg;. - Datos no disponibles

## 11. DISCUSIÓN

La enfermedad arterial coronaria constituye una de las principales causas de morbi-mortalidad en la mayoría de las poblaciones, independientemente de su origen étnico; uno de los principales factores de riesgo cardiovascular es la modificación de los niveles de lípidos plasmáticos, los cuales en su mayoría son transportados por tres familias de lipoproteínas VLDL, LDL y HDL. Las dos primeras lipoproteínas son principalmente aterogénicas y en consecuencia están implicadas en el desarrollo de enfermedad arterial coronaria; mientras que para la tercera existen evidencias cada vez mayores de que ejerce un papel protector frente a la formación de placa aterosclerótica.

En México la anomalía lipídica más prevalente es la hipoalfalipoproteinemia (niveles plasmáticos de C-HDL <35 mg/dL) presente en 48.4% de la población adulta entre 20 y 69 años (Aguilar-Salinas *et al.*, 2001). Sin embargo, aun cuando esta dislipidemia representa uno de los principales factores de riesgo cardiovascular (Rader *et al.*, 2002; Aguilar-Salinas *et al.*, 2007), poco es lo que conocemos de su componente genético en la población mexicana. Por ello, nuestro grupo de investigación ha realizado diversos estudios para evaluar la contribución genética en la variación plasmática de las HDL en población mexicana. Lo que ha permitido identificar un cambio de aminoácido en la posición 230 (R230C) de la proteína ABCA1 (Villarreal-Molina *et al.*, 2007). Estos hallazgos muestran la importancia de la búsqueda de otras variantes genéticas que estén participando en la modulación de los niveles del C-HDL en esta población. Así, se decidió evaluar a el gen *VNN1* el cual ha sido asociado con los niveles plasmáticos de C-HDL en estudios previos (Göring *et al.*, 2007; ASHG Annual Meeting, 2007; Holleboom, *et al.*, 2008). Particularmente, se analizó la participación de una variante no sinónima N131S de este gen (SNP rs2272996) en población mestiza de la Ciudad de México y en dos grupos étnicos mexicanos (mayas y coras).

La variante *N131S* del gen *VNN1* se encontró en equilibrio de HW en población mestiza, maya y cora mientras que las frecuencias alélicas de la variante *N131S* obtenidas de cada una de las tres poblaciones de estudio (mestizos, mayas y coras) no mostraron diferencias significativas entre ellas; esto pudiera deberse a que en la población mestiza existe un pequeño porcentaje de componente genético de origen caucásico y africano. Sin embargo, las poblaciones indígenas mostraron frecuencias alélicas significativamente diferentes al compararlas con población europea y asiática. Estos hallazgos fortalecen lo observado en diversos estudios genéticos, en los cuales se muestran diferencias en la frecuencia de los alelos en estudios al comparar poblaciones nativas americanas y otros grupos étnicos (Canizales-Quinteros, *et al.* 2007).

Con respecto al análisis metabólico, los resultados obtenidos sugieren que la variante *N131S* del gen *VNN1* no afecta los niveles de C-HDL, confirmando lo observado por Yang y colaboradores (2005), quienes no encontraron asociación de la variante *N131S* con los niveles plasmáticos de C-HDL<sub>3</sub>. Sin embargo, es interesante mencionar que en la población maya se observó una tendencia a presentar niveles más bajos de C-HDL conforme aumenta el número de copias del alelo de riesgo, es decir, los sujetos homocigotos para el alelo poco común (*S131S*) presentan niveles de C-HDL más bajos que los sujetos con los genotipo *N131S* y *N131N* (*P<sub>adj</sub>*=0.116), aunque para confirmar esta tendencia se requiere aumentar el número de sujetos estudiados en este grupo indígena. Estos resultados sugieren que son las variantes en la región reguladora del gen *VNN1* más que los cambios no-sinónimos, las que pudieran condicionar de manera importante la variación de los niveles de C-HDL.

De manera interesante, los resultados más significativos para las variables metabólicas fueron observados en la población cora del estado de Nayarit. Así tenemos que la presencia de la variante *N131S* se asoció con niveles elevados de triglicéridos y a una mayor circunferencia de cintura, aunque para este último las diferencias no fueron significativas. Tomando en consideración que la circunferencia de cintura y los triglicéridos son dos de los cinco criterios usados

para establecer el diagnóstico de síndrome metabólico (SM), se analizó la participación de esta variante en el desarrollo de este síndrome. Interesantemente, se encontró asociación de *N131S* con el SM, aunque únicamente en la población cora. Estos hallazgos representan el primer reporte en donde se establece que la variante *N131S* del gen *VNN1* aumenta el riesgo para el desarrollo del síndrome metabólico.

Finalmente, es importante mencionar que la aparente inconsistencia en la asociación de la variante *N131S* con distintos rasgos metabólicos en los grupos poblacionales estudiados se debe a la compleja interacción tanto de factores genéticos como ambientales (ejercicio, tabaquismo, cantidad y calidad de ingesta de grasas, consumo de alcohol, entre otros) asociados al desarrollo de los padecimientos complejos. Por ello, es necesaria la realización de estudios integrales en los cuales se valoren tanto el componente genético como el factor ambiental, particularmente el nutrimental.

## **12. CONCLUSIONES.**

1. Con base en los resultados obtenidos en el análisis de asociación con los parámetros bioquímicos podemos concluir que en nuestra población de estudio, la variante *N131S* del gen *VNN1* no se asocia a los niveles plasmáticos de C-HDL en las poblaciones mestiza, maya y cora.
2. Por primera vez se presenta evidencia de la asociación de la variante *N131S* con el síndrome metabólico en una población indígena de México.
3. La variante *N131S* del gen *VNN1* por su asociación con trastornos metabólicos muy prevalentes en la población mexicana pudiera tener relevancia epidemiológica en esta población.

### 13. BIBLIOGRAFIA.

- Aguilar-Salinas, C.A., Delgado, A. y Gómez-Pérez, F.J. 2000. The advantages of using non-HDL-C in the diagnosis and treatment of dyslipidemia. *Arch. Intern. Med.* 162(1): 108-109.
- Aguilar-Salinas, C.A., Olaiz, G., Valles, V., Torres, J.M., Pérez, F.J., Rull, J.A., Rojas, A., Franco, A. y Sepúlveda, J. 2001. High prevalence of low HDL cholesterol concentrations and mixed hyperlipidemia in Mexican nationwide survey. *J. Lipid. Res.* 31(1):227-233.
- Aguilar-Salinas, C.A., Gómez-Pérez, F.J., Lerman-Garber, I., Vázquez-Chávez, C., Pérez-Méndez, O. y Posadas-Romero, C. 2004. Diagnostico y tratamiento de las dislipidemias: posición de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología. *Revista de Endocrinología y Nutrición.* 12(1): 7-41.
- Aguilar-Salinas, C.A., Canizales-Quinteros, S., Rojas-Martinez, R., García-García, E., Olaidez-Fernández, G., Gómez-Pérez F.J. y Tusié-Luna M.T. 2007. Colaboraciones exitosas entre tres instituciones mexicanas en el estudio de las dislipidemias, la obesidad y la diabetes. *Gac. Med. Méx.* 143(5): 335-364.
- American Association of Clinical Endocrinologist, 2002. Medical Guidelines for Clinical Practice for the Diagnosis and Treatment of Dyslipidemia and Prevention of Atherogenesis. Amended Version.
- Angelin, B., Parini, P. y Eriksson, M. 2002. Reverse cholesterol transport in man: promotion of fecal steroid excretion by infusion of reconstituted HDL. *Atheroscler. Suppl.* 3(4): 23-30.
- Ansell, B.J., Watson, K.E., Fogelman, A.M., Navab, M. y Fonarow, G.C. 2005. High-density lipoprotein function recent advances. *J. Am. Coll. Cardio.* 46(10): 1792-1798.
- Assmann, G. y Nofer, J.R. 2003. Atheroprotective effects of high-density lipoproteins. *Annu. Rev. Med.* 54(1): 321-341.
- Aurrand-Lions, M., Galland, F., Bazin, H., Zakharyev, V.M., Imhof, B.A. y Naquet, P. 1996. Vanin-1, a novel GPI-linked perivascular molecule involved in thymus homing. *Immunity.* 5(5):391-405.

- Barquera, S., Flores, M., Olaiz-Fernández, G., Monterrubio, E., Villalpando, S., González, C., Rivera, J. y Sepúlveda, J. 2007. Dyslipidemias and obesity in Mexico. *Salud Publica Mex.* 49(3): 338-347.
- Barter, P., Kastelein, J., Nunn, A. y Hobbs, R. 2003. High density lipoproteins (HDL) and atherosclerosis; the unanswered questions. *Atherosclerosis.* 168: (1) 195-211.
- Berruyer, C., Martin, F.M., Castellano, R., Maccone, A., Malergue, F., Garrido-Urbani, S., Millet, V., Imbert, J., Duprè, S., Pitari, G., Naquet, P. y Galland, F. 2004. Vanin1<sup>-/-</sup> mice exhibit a luteal-mediated tissue resistance to oxidative stress. *Mol. Cell. Biol.* 24(16): 7214-7224.
- Berruyer, C., Pouyet, L., Millet, V., Martin, F.M., LeGoffic, A., Canonici, A., Garcia, S., Bagnis, C., Naquet, P., Galland, F. 2006. Vanin-1 licenses inflammatory mediator production by gut epithelial cells and controls colitis by antagonizing peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity. *The Journal of Experimental Medicine.* 203(13): 2817-2827.
- Bonilla, C., Parra, E.J., Pfaff, C.L., Dios, S., Marshall, J.A., Hamman, R.F., Ferrell, R.E., Hoggart, C.L., McKeigue, P.M. y Shriver, M.D. 2004. Admixture in the Hispanics of the San Luis Valley, Colorado, and its implications for complex trait gene mapping. *Ann Hum Genet.* 68(1):139-53.
- Brewer, H.B. Jr. y Santamarina-Fojo, S. 2003. Clinical significance of high-density lipoproteins and the development of atherosclerosis: focus on the role of the adenosine triphosphate-binding cassette protein A1 transporter. *Am J Cardiol.* 92(1): 10-16.
- Canizales-Quinteros, S., Aguilar-Salinas, C.A., Ortiz-López, M.G., Rodríguez-Cruz, M., Villarreal-Molina, M.T., Coral-Vázquez, R., Huertas-Vázquez, A., Hernández-Caballero, A., López-Alarcón, M., Brito-Zurita, O.R., Domínguez-Banda, A., Martínez-Sánchez, L.R., Canto-de Cetina, T., Vilchis-Dorantes, G., Rosas-Vargas, H., Granados-Silvestre, M.A., Medeiros-Domingo, A., Menjivar, M. y Tusié-Luna, M.T. 2007. Association of PPARG2 Pro12Ala variant with

larger body mass index in Mestizo and Amerindian populations of Mexico. *Hum Biol.* 79(1):111-119.

- Casanueva, E., Kaufer-Horwitz, M., Pérez-Lizaur, A.B. y Arroyo, P. 2008. Nutriología Médica. En: Evaluación del estado nutricional. Ávila-Rosas, H., Caraveo-Enríquez, V.E., Valdés-Ramos, R. y Tejero-Barrera, E. México. 3er ed. Editorial Medica Panamericana, pp: 747-767.
- Civeira, F., Bustamante, E. y Sierra, A. 2004. La heterogeneidad de las partículas y su relación con la enfermedad cardiovascular. *Cardiovascular Risk. Factors.* 13(2): 83-93.
- Cohen, J.C., Vega, G.L. y Grundy, S.M. 1999. Hepatic Lipase: New insight from genetic and metabolic studies. *Curr. Opin. Lipidol.* 10(3): 259-267.
- Cossrow, N. y Falkner, B. 2004. Race/ethnic issues in obesity and obesity-related comorbidities. *J Clin Endocrinol Metab.* 89(1):2590-4.
- Cuevas, A.M., Alvarez, V.V., Acosta, A.M.B., Altayo, M.F., Montero, J.L. y Rigotti, A.R. 2004. Mecanismos de hipo e hiper alfa lipoproteinnemia en individuos adultos chilenos. *Rev. Med. Chile.* 132(1): 421-428.
- Ganong, W. 2002. Fisiología Médica. El Manual Moderno. En: Metabolismo de las grasas 18a. edición. México. Pag: 327-339.
- Genest, J. Jr., Marcil, M., Denis, M. y Yu, L. 1999. High density lipoproteins in health and in disease. *J Investig Med.* 47(1):31-42
- Gibson, N.J. 2006. The use of real-time PCR methods in DNA sequence variation analysis. *Clin. Chim. Acta.* 363(1-2):32-47.
- González-Sastre, F., Guinovart, J.J. Patología Molecular. En: Lipoproteínas de alta densidad: bases moleculares del metabolismo y relación con la arterosclerosis. Blanco-Vaca, F., Marzal-Casacuberta, Á. y González-Sastre, F. 1er edición, Ed: Masson. España. 2003, pp:263-287.
- Granjeaud, S., Naquet, P. y Galland, F. 1999. An EST description of the new Vanin gene family conserved from fly to human. *Inmunogenetic.* 49(1): 964-972.

- Grundy, S.M., Hansen, B., Smith S.C., Cleeman, J.I. y Kahn, R.A., American Heart Association, National Heart, Lung and Blood Institute, American Diabetes Association. 2004. Clinical management of metabolic syndrome: report of the American Heart Association/National Heart, Lung and Blood Institute/American Diabetes Association conference on scientific issues related to management. *Circulation*. 109(1):551-556.
- Göring, H.H., Curran, J.E., Johnson, M.P., Dyer, T.D., Charlesworth, J., Cole, S.A., Jowett, J.B.M., Lawrence, J.A., Rainwater, D.L., Comuzzie, A.G., Mahaney, M.C., Almasy, L., MacClouer, J.W., Kissebah, A.H., Collier, G.R., Moses, E.K. y Blangero, J. 2007. Discovery of Expression QTLs Using Large-Scale Transcriptional Profiling in Human Lymphocytes. *Nature. Genetics*. 39(1): 1208-1216.
- Higuchi, R., Fokler, C., Dollinger, G. y Watson, R. 1993. Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of ADN amplification reactions. *Biotechnology*. 11(1): 1026-1030.
- Homon, Y., Broccardo, C., Chambenoil, O., Luciani, M.F., Tuti, F., Chalsin, S., Freyssinet, J.M., Devaux, P.F., McNeish, J., Marguet, D. y Chimin, G. 2000. ABCA 1 promotes engulfment of apoptotic cell and transbilayer redistribution of phosphatidylserine. *Nat. Cell. Biol.* 2(7): 199-406.
- Holleboom, A.G., Vergeer, M., Hovingh, G.K., Kastelein, J.J. y Kuivenhoven, J.A. 2008. The value of HDL genetics. *Curr. Opin. Lipidol.* 19(4):385-394. Review.
- Iniesta, R., Guianó, E. y Moreno, V. 2005. Statical analysis of genetic polymorphisms in epidemiological studies. *Gac Snit.* 19 (4): 333-341.
- Ishida, T., Choi, S., Kundu, R.K., Hirata, K., Rubin, E.M., Cooper, A.D. y Quertermou, T. 2003. Endothelial lipase is a major determinant of HDL level. *J. Chio. Invest.* 111(3): 347-355.
- Jiménez-Escrig, A. Técnicas de biología molecular en investigación y diagnóstico, En: Manual de neurogenética. Jiménez-Escrig, A. 1er edición Ed: Díaz de Santos S.A. Madrid, España. 2003, pp: 23-36

- Kolovou, G.D., Anagnostopoulou, K., Pilatis, N.D., Salpea, K.D., Hoursalas, I.S., Petropoulos, I., Bilianou, H.I. y Cokkinos, D.V. 2005. Fasting serum trygliceride and hig-density lipoprotein cholesterol levels in patiend to be treated for dyslipidemia. *Vasc Health Risk Manag.* 1(2): 155-161.
- Krimbou, L., Marcil, M. y Genest, J. 2006. New insights into the biogenesis of human high-density lipoproteins. *Curr Opin Lipidol.* 17(1):258-67.
- Kwiterovich, P.O. Jr. 2002. Lipoprotein heterogeneity: diagnostic and therapeutic implications. *Am J Cardiol.* 90(8A): 1i-10i. Review.
- Leon, A.S. y Connett, J. 1991. Phisical activity and 15.5 year mortality in the multiple risk factor intervention trial (MRFIT). *Int. J. Epidemiol.* 20(3): 39-47.
- Livak, J.K. 1999. Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. *Genet. Anal.* 14(5-6): 143-149.
- Matthews, D.R., Hosker, J.P., Rudenski, A.S., Naylor, B.A., Treacher, D.F. y Turner, R.C. 1985. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* 28(1):412-9.
- Marcovina, S. y Packard, C.J. 2006. Measurement and meaning of lipoprotein AI and apolipoprotein B plasma levels. *Drugs.* 15(3): 227-241.
- Martin, F., Malergue, G., Philippe, J.M., Philips, S., Chabret, C., Granjeaud, S., Mattei, M.G., Mungall, A.J., Naquet, P. y Galland, F. 2001. Vanin gen are clustered (human 6q22.24 and mouse A102B1) and encode isoform of pantetheinase ectoenzyme. *Inmunogenetics.* 53(1): 296-306.
- McGuigan, F.E. y Ralston, S.H. 2002. Single nucleotide polymorphism detection: allelic discrimination using TaqMan. *Psychiatr. Genet.* 12(3): 133-1336.
- Matthews, D.R., Hosker, J.P., Rudenski, A.S., Naylor, B.A., Treacher, D.F. y Turner, R.C. 1985. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* 28(1):412-9.

- Mertens, A., Verhamme, P., Bielicki, J.K., Philips, M.C., Quarek, R., Verreth, W., Stangel, D., Nino, E., Nautab, M., Mackness, B., Mackness, M. y Holvoet, P. 2003. Increased low-density lipoprotein oxidation and impaired high-density lipoprotein antioxidant defense are associated with increased macrophage homing and atherosclerosis in dyslipidemic obese mice: CLATgene transfer decelerates atherosclerosis. *Circulation*. 107(12): 1640-1646.
- Miller, M., Rhyne, J., Hamlette, S., Bimbaum, J. y Rodríguez, A. 2003. Genetics of HDL regulations in human. *Curr. Opin. Lipidol*. 14(3): 273-279. Review.
- Nofer, J.R., Kehrel, B., Fobker, M., Levkau, B., Assmann, G. y Von-Eckardstein, A. 2002. HDL an arteriosclerosis: Beyond reverse cholesterol transport. *Artherosclerosis*. 161(1): 1-16.
- NCEP Expert Panel. 2001. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*. 285(1): 2486 –97.
- Oram, J.F. y Heinecke, J.W. 2005. ATP-binding cassette transporter A1: a cell cholesterol exporter that protects against cardiovascular disease. *Physiol. Rev*. 85(1): 1343-72.
- Ordovas, J.M., Cupples, L.A., Corella, D., Otvos, J.D., Osgood, D., Martinez, A., Lahoz, C., Coltell, O., Wilson, P.W. y Schaefer, E.J. 2000. Association of cholesteryl ester transfer protein-TaqIB polymorphism with variations in lipoprotein subclasses and coronary heart disease risk: the Framingham study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 20(5): 1323-1329.
- Peelman, F., Vandekerckhove, J. y Rosseneu, M. 2000. Structure and function of lecithin cholesterol acyltransferase: new insights from structural predictions and animal models. *Curr. Opin. Lipidol*. 11(1): 155-160.
- Pérez-Méndez, O., Luc, G. y Posadas-Romero, C. 2002. Concentraciones bajas de lipoproteínas de alta densidad (HDL) en plasma y enfermedad arterial coronaria. *Arch. Inst. Cardiol*. 70(1): 312-321.

- Perret, B., Mabile, L., Martinez, L., Tercer, F., Barbara, R. y Collet, X. 2002. Hepatic Lipase: Structure/ Function relationship synthesis and regulation. *J. Lipid. Res.* 43(8): 1163-1169.
- Phillips, M.C. y Rothblat, G.H. 1997. HDL and cholesterol efflux. *Atherosclerosis.* 114(1):134.
- Pitari, G., Malergue, F., Martin, F., Philippe, J.M., Massucci, M.T., Chabret, C., Maras, B., Duprè, S., Naquet, P. y Galland, F. 2000. Pantetheinase activity of membrane-bound Vanin-1: lack of free cysteamine in tissues of Vanin-1 deficient mice. *FEBS Lett.* 483(2-3): 149-154.
- Rader, D.J. 2002. High-density lipoproteins and atherosclerosis. *Am. J. Cardiol.* 90(1):62-70.
- Reaven G.M. 2006. The metabolic syndrome: is this diagnosis necessary?. *Am J Clin Nutr.* 83(6):1237-1247. Review.
- Ritsch. A. y Patsch. J.R. 2003. Cholesteryl ester transfer protein gathering momentum as a genetic marker and as drug target. *Curr Opin. Lipidol.* 14(2): 173-179.
- Silver, D.L. y Tall, A.R. 2001. The cellular biology of scavenger receptor class B type I. *Curr Opin Lipidol.* 12(5): 497-504.
- Skinner, E.R. 1994. High density lipoprotein subclass. *Curr. Opin. Lipidol.* 5(1): 241-247.
- Solá-Alberich, R. y Girona-Tell, J. 2001. Tratamiento de los pacientes con concentraciones bajas de colesterol HDL. *Cardiovascular. Risk. Factors.* 10(3): 163-170.
- Sambrook, J., Fritsch, F. y Maniatis, T. 1989 Molecular cloning. En: A laboratory manual. Spiring Harbor, N.Y. 2<sup>nd</sup> Ed. Cold; Cold Spring Harbor Laboratory, Press: pp. B24.
- Tall, A.R. y Wang, N. 2000 Tangier disease as a test of the reverse cholesterol transport hypothesis. *J, Clin, Invest.* 106(1):1205-7.

- THE AMERICAN SOCIETY OF HUMAN GENETICS. 2007. Gold mine of gene discovery yield “good cholesterol” gene work to be presented at the 57 th ASHG Annual Meeting.
- Trigatti, B., Rigotti, A. y Krieger, M. 2000. The role of the high-density lipoprotein receptor SR-B1 in cholesterol metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.* 11(2): 123-131.
- Van-Tol, A. y Hendriks, H.F. 2001. Moderate alcohol consumption: effects on lipids and cardiovascular disease risk. *Curr. Opin. Lipidol.* 12(1): 19-23.
- Villareal-Molina, M.T., Aguilar-Salinas, C.A., Rodríguez-Cruz, M., Ríoña, D., Villalobos-Camporan, M., Coral-Vazquez, R., Menjivar, M., Yescas-Gómez, P., Königsoerg-Fainstein, M., Romero-Hidalgo, S., Tusié-Luna, M.T. y Canizales-Quinteros, S. 2007. The ATP-Binding Cassette Transporter A1 R230C Variant Affects HDL Cholesterol Levels and BMI in the Mexican Population. *Diabetes.* 56(1):1881-1887.
- Villarreal-Molina, M.T., Flores-Dorantes, M.T., Arellano-Campos, O., Villalobos-Comparan, M., Rodríguez-Cruz, M., Miliar-García, A., Huertas-Vazquez, A., Menjivar M., Romero-Hidalgo, S., Wachter, N.H., Tusie-Luna, M.T., Cruz M., Aguilar-Salinas, C.A. y Canizales-Quinteros, S.; Metabolic Study Group. 2008. Association of the ATP-binding cassette transporter A1 R230C variant with early-onset type 2 diabetes in a Mexican population. *Diabetes.* 57(2): 509-513.
- Wang, J., Burnett, J.R., Near, S., Young, K., Zinman, B., Hanley, A.J.G., Connelly, P.W., Harris, S.B. y Hegele, R.A. 2000. Common and rare ABCA1 variants affecting plasma HDL cholesterol. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20(1):1983-9.
- Wang, X. y Paigen, B. 2005. Genome-wide search for new genes controlling plasma lipid concentrations in mice and humans. *Curr. Opin. Lipidol.* 16(1):127-37.

- William, P.T., Vranizan, K.M., Autin, M.A. y Krauss, R.M. 1993. Association of age, adiposity, alcohol intake, menstrual status and estrogen therapy with High-density lipoproteins subclass. *Arterioscler Thromb.* 13(11): 1654-1661.
- Yang, Q., Chao-Qiang, L., Laurence, P., Cupples, L.A., Adiconis, X., Zhu, X., Wilson, P.W.F., Housman, D.E., Shearman, A.M., D'Agostino, R.B. y Ordovas, J.M. 2005. Linkage Analyses and Candidate Gene Fine Mapping For HDL Cholesterol: The Framingham Study. *Journal. Of. Lipid. Research.* 46(1): 1416-1425.
- Yokohama, S. 2000. Release of cellular cholesterol: Molecular mechanism for cholesterol homeostasis in cells and in the body. *Biochim. Biophys. Acta.* 1529(1): 231-244.
- [www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com) Applied Biosystems
- [www.ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hwa1.pl](http://www.ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hwa1.pl) Hardy-Weinberg equilibrium  
Actualización:      Consulta: 20/12/08
- [www.ncbi.nlm.nih./snp\\_ref.cgi?rs=2272996](http://www.ncbi.nlm.nih./snp_ref.cgi?rs=2272996) NCBI:SNP  
Actualización: 25/05/05      Consulta: 17/07/08
- [www.genetig.bwn.harvard.edu](http://www.genetig.bwn.harvard.edu) Programa Polyphen  
Actualización:      Consulta: 11/02/09
- Zambo, A., Deeb, S.S., Pauletto, P., Grepald, G. y Brucell, J.D. 2003. Hepatic Lipase: A marker for cardiovascular disease risk and response to therapy. *Curr. Opinion. Lipidol.* 14(2): 179-189.
- Zhu, X. y Cooper, R.S. 2007. Admixture mapping provides evidence of association of the VNN1 gene with hypertension. *PLos. One.* 2(11): 1244.

## 14. ANEXOS.

### Anexo1. Tablas de valores de PA, IMC, índice cintura cadera, HDL,LDL.

- **Tabla 9. Valores de Presión Arterial para adultos mayores de 18 años.**

Clasificación	Presión Arterial Sistólica (mmHg)	Presión Arterial Diastólica (mmHg)
Optima	≤ 120	≤ 80
Normal	≤ 130	≤ 85
Normal Alta	130- 139	85-89
HTA 1° Ligera	140-159	90-99
HTA 2° Moderada	160-179	100-109
HTA 3° Grave	≥ 180	≥ 110

Organización Mundial de la Salud (OMS), 2007

- **Tabla 10. Valores para determinar el Índice de Masa Corporal (IMC).**

Clasificación	IMC (Kg/m <sup>2</sup> )
Normal	18.50-24.99
Sobrepeso	25-29.99
Obesidad I°	30-34.99
Obesidad II°	35-39.99
Obesidad III°	≥ 40

Tomado de Casanueva 2008

- **Tabla 11. Índice de Cintura Cadera.**

Riesgo*	Hombres	Mujeres
Alto	≥ 0.95	≥ 0.85
Moderado	0.90-0.94	0.80-0.84
Bajo	≤ 0.89	≤ 0.79

Tomado de Casanueva 2000. \* Se refiere al riesgo que tiene un individuo de desarrollar alguna patología y la fuerte relación que existe entre este parámetro y el síndrome metabólico.

- **Tabla 12. Valores de colesterol HDL.**

Clasificación niveles de HDL	mg/dL
Optima de colesterol HDL	≥ 60
Niveles medios	45-59
Bajo nivel	≤ 40

Tomado de American Association of Clinical Endocrinologist, 2002. Los valores de colesterol de las HDL considerados recomendables para los hombres son iguales o superiores a 40 mg/dL y para las mujeres, son iguales o superiores a 50 mg/dL.

**Anexo 2. Tabla 13 Equilibrio de Hardy-Weinberg. (POBLACIÓN ESPERADA)**

Población	N131N	N131S	S131S	P*
Mestiza	510 (506)	216 (222)	28 (24)	0.392
Mayas	62 (61)	22 (23)	3 (2)	0.553
Coras	70 (68)	34 (37)	7 (5)	0.310

\*: P de Pearson; entre paréntesis es la población esperada, fuera de estos es la población observada.

**Anexo 3. Tratamiento (No farmacológico) de los pacientes con bajos niveles de C-HDL**

Las perspectivas terapéuticas están dirigidas a aumentar los niveles de colesterol HDL; la clave reside, en las modificaciones terapéuticas del estilo de vida:

- Suspensión del tabaquismo y de cualquier fármaco que afecte el perfil de lípidos:** El consumo crónico de tabaco es una de las causas más frecuentes de colesterol HDL bajo. La reducción en el consumo de bebidas alcohólicas permite disminuir la concentración de los triglicéridos séricos.
- Pérdida de peso:** La pérdida de peso resulta en disminución de la concentración de colesterol total, triglicéridos y apo-B.
- Tratamiento dietético:** Debe aportar la cantidad adecuada de calorías para alcanzar o mantener el peso ideal.

**Tabla 14. Distribución de nutrimentos en tratamiento dietético de HDL bajas.**

Nutrimento	Porcentaje
Carbohidratos	50-60 %
Grasas	25-35 %
- Grasas saturadas	< 7%
- Grasas mono-insaturadas	20%
- Grasas poli-insaturadas	10%
Proteínas	15-20 %
Colesterol	< 200 mg/d
Fibra soluble	20-30 g/d

(Tomado de Aguilar *et al.*, 2000)

Los nutrimentos que tienen mayor impacto sobre la concentración de colesterol LDL son las grasas saturadas; los que afectan la concentración de triglicéridos son las grasas saturadas poli-insaturadas, y los azúcares simples. Una ingestión alta de hidratos de carbono puede favorecer la hipertrigliceridemia y un posible descenso de las HDL.

**d) Ejercicio.** Es uno de los componentes más importantes del tratamiento no farmacológico. Los ejercicios más recomendados para ser realizados en personas con esta patología (o algunas asociadas como la obesidad, hipertensión arterial y cardiopatía isquémica) son los aeróbicos como; caminar rápido, trotar, nadar, o montar bicicleta; por consumir mayor cantidad de energía y crear menos productos de desechos nocivos al organismo (como el ácido láctico), ya que utilizan como fuente de energía los carbohidratos y lípidos, para obtener estos beneficios, se recomiendan de 20 a 30 minutos de ejercicio al menos tres veces por semana.

**Anexo 4. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.**

**CONTRIBUCIÓN DE LAS VARIANTES ALÉLICAS FUNCIONALES GENÉTICAS  
EN LA VARIACIÓN DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE LAS LIPOPROTEÍNAS  
DE ALTA DENSIDAD (HDL)**

Yo \_\_\_\_\_ con No de Registro \_\_\_\_\_ declaro libre y voluntariamente que acepto participar en el proyecto para estudiar los genes del metabolismo de las HDL, que se llevará a cabo en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. También es de mi conocimiento que puedo retirarme de este estudio en cualquier momento si así lo deseo. En caso que decidiera retirarme, la atención que recibo como paciente no se verá afectada.

Me queda claro también que se hará una medición en sangre, para determinar el polimorfismo del gen de ABCA1 y algunas variables metabólicas como: **Glucosa, Hemoglobina glucosilada, Insulina, Colesterol total, Triglicéridos, Colesterol HDL y LDL, Apo A-I y Apo B**; y que se tomarán algunas medidas antropométricas como peso, estatura, circunferencia abdominal y de cadera.

Se realizará una punción venosa de 45 ml, por una persona capacitada. Entiendo que la muestra de sangre que done para el proyecto servirá para estudiar los genes que pudieran estar relacionados con el metabolismo del colesterol, principalmente de las HDL.

El investigador principal se ha comprometido a responder dudas acerca de los procedimientos que se le realizarán, los riesgos, los beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación, para lo cual se me proporcionan los números teléfonos pertinentes.

Se me ha explicado que esto no representa un riesgo adicional para mi salud. También se me ha explicado que en el futuro, este estudio podría ayudar a identificar posibles blancos terapéuticos para prevenir o mejorar la calidad de vida de pacientes con enfermedad cardiovascular.

Estoy consciente de que los resultados de la investigación son confidenciales y que se contestarán todas las dudas que pueda tener sobre el estudio.

Firma del Paciente \_\_\_\_\_

Firma del Investigador \_\_\_\_\_

Testigo 1 (firma) \_\_\_\_\_

Testigo 2 (firma) \_\_\_\_\_

México, D. F. a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ del \_\_\_\_\_ .