

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

**Participación del SNP rs8050136 en la regulación del
gen *FTO* en individuos con diferente nivel de actividad
física**

TESIS PROFESIONAL PRÁCTICA

Que para obtener el Título de

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

Presenta:

Luis José Montañez Rascón

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como
openAccess

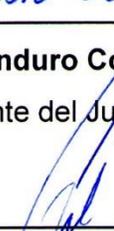
VOTOS APROBATORIOS

Los miembros del jurado calificador del examen profesional de Luis José Montañez Rascón hemos revisado detenidamente su trabajo escrito titulado "Participación del SNP 8050136 en la Regulación del gen *FTO* en individuos con diferente nivel de actividad física" y encontramos que cumple con los requisitos para la presentación de su examen profesional. Por tal motivo recomendamos se acepte dicho trabajo como requisito parcial para la obtención de título de Químico Biólogo Clínico

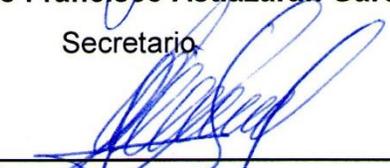
Atentamente:



Dr Iván Anduro Corona
Presidente del Jurado



Dr. Humberto Francisco Astiazarán García
Secretario



Dr. Eduardo Ruiz Bustos
Vocal



Dra. Olivia Valenzuela Antelo
Suplente

DEDICATORIA

*A mi Venezuela querida,
anhelo tu presuroso advenimiento de paz.*

*“Más cuesta mantener el equilibrio de la libertad,
que soportar el peso de la tiranía”
Simón Bolívar, 1819.*

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora por ser mi Alma Mater, y conformar mi primer eslabón en el mundo profesional.

A CIAD por abrirme las puertas y permitirme ser parte de un proyecto de investigación.

A mi director de tesis, Dr. Iván Anduro Corona por ser un excelente maestro, por su apoyo académico y personal durante el desarrollo de este trabajo.

A mis padres por su cariño, por ser: un ejemplo a seguir, por apoyarme en todos los aspectos y proveerme de sustento económico y emocional durante todas las etapas de mi vida.

A mi hermana Luisana por su amor, comprensión y ternura.

A la QBC. Bertha Pacheco por su apoyo técnico y su amable compañía durante mi estancia en CIAD.

A mis compañeras de laboratorio, Lic. en Nutrición Diana Núñez, QBC Zuleth Gomeztagle, Lic. en Nutrición Herminia Mendivil, M.C. Brianda Monreal por sus consejos, compañía y apoyo.

A mis colegas QBC. Erick Armenta, QBC. René Navarro por su apoyo y asesoría durante toda la carrera.

A mi amigo y colega QBC. Enrique Téllez por su apoyo académico y personal que me ha brindado durante 13 años.

A los miembros de mi comité de tesis: Dr. Humberto Astiazarán, Dra. Olivia Valenzuela y Dr. Eduardo Ruiz.

A la Dra. Osiris por su gran apoyo en el análisis estadístico.

Al M.C. Orlando Tortoledo por su apoyo en la preparación de reactivos.

A la Empresa Geno+ por su colaboración en el análisis y procesamiento parcial de las muestras para la genotipificación.

A mis tíos Lucila y Humberto por ser un ejemplo a seguir para mi desarrollo personal y académico.

A QBC Itzel Astiazaran por todo el apoyo académico y personal que me ha brindado desde siempre.

A mi pareja QBC. Samantha Cibrián por su cariño, amor, compañía y su apoyo incondicional en todos los aspectos de mi trayectoria tanto académica como personal.

CONTENIDO

DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS	v
CONTENIDO	vi
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABLAS	ix
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
OBJETIVOS.....	4
Objetivo General.....	4
Objetivos Específicos	4
ANTECEDENTES	5
Generalidades	5
Aspectos Socioeconómicos y Culturales	6
Nutrición	7
Actividad Física	7
Factores Heredofamiliares.....	8
Historia de <i>FTO</i>	10
Función de <i>FTO</i>	10
<i>FTO</i> y polimorfismos.....	12
Leptina.....	15
Metilación	16
MATERIALES Y MÉTODOS	18
Antropometría.....	18
Evaluación Dietaria.....	19
Evaluación de la Actividad Física.....	19

Determinaciones Bioquímicas	20
Extracción de los Ácidos Nucleicos	20
Aislamiento de ARN Total	21
Salting Out	21
Back Extraction	22
Genotipificación	22
Genotipificación Para los SNPS rs1421085 y rs9939609	24
Evaluación de la Metilación	24
Expresión Génica	26
Análisis Estadísticos	27
RESULTADOS Y DISCUSION	28
Genotipificación	28
Expresión Génica	34
Epigenética.....	39
CONCLUSIONES	43
RECOMENDACIONES	44
BIBLIOGRAFÍA	45
ANEXOS	50

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Genes implicados en la obesidad poligénica y el efecto que suelen causar	9
2. Mapa genético de <i>FTO</i> y algunos de sus SNPs de interés	11
3. Función de <i>FTO</i>	12
4. Mecanismo de acción del SNP rs142185	13
5. Mecanismo de acción del SNP rs8050136	14
6. Condiciones fisiológicas que afectan los niveles de leptina	16
7. Regulación de la expresión génica mediada por metilación	17
8. Mecanismo de acción del polimorfismo de riesgo rs8050136 en la obesidad	33
9. Integridad de las muestras de ARN	35
10. Comparativo de la expresión relativa del gen <i>FTO</i> en los participantes con normopeso y participantes con obesidad	38
11. Comparativo de la expresión relativa del gen <i>FTO</i> en los participantes con actividad física y participantes con sedentarismo	38
12. Comparación de la secuencia normal y secuencia tratada con bisulfito <i>in silico</i>	40
13. Comparación de las secuencias de metilación	41

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Valores de referencia del IMC	3
2. Genotipo de cada muestra para los polimorfismos rs1421085, rs9939609 rs8050136	29
3. Genotipo, HDL y actividad física.	30
4. Frecuencia genotípica del polimorfismo rs8050136 en diferentes poblaciones	32
5. Media de IMC por alelo del SNP rs9939609.	34
6. Media del IMC por alelo del SNP rs1421085	34
7. Cuantificación y pureza de las muestras para expresión	35
8. Grupos de participantes en función de IMC y actividad física	36
9. Subcategoría de los Grupos	36
A1. Δ CT, $\Delta\Delta$ CT y Expresión relativa para cada muestra	50
A2. CT del gen problema <i>FTO</i>	51
A3. Δ CT, $\Delta\Delta$ CT y Expresión relativa para cada muestra	51

RESUMEN

La obesidad es un padecimiento que se caracteriza por la acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud, el cual se ha convertido en un problema de salud a nivel mundial debido a las co-morbilidades relacionadas a esta patología (diabetes mellitus tipo 2, dislipidemia aterogénica, depresión, ansiedad, entre otras) y a su creciente incidencia y prevalencia a nivel mundial. En 2016 se estimó que el 39% de los adultos mayores de 18 años padecían sobrepeso a nivel mundial, mientras que el 13% tenía algún tipo de obesidad. Resultado de esta creciente problemática se ha generado un gran interés por su estudio. Recientemente se ha vinculado SNPs en el primer intrón del gen *FTO* con la predisposición a la obesidad. Es por ello que en el presente trabajo se genotipificaron los polimorfismos rs8050136, rs1421085, rs9939609 con *loci* en el primer intrón de dicho gen, y se analizó la relación con marcadores bioquímicos y antropométricos para la obesidad. Se evaluó la expresión génica de *FTO* por medio de PCR en tiempo real y determinándose la relación de dicha expresión con biomarcadores de obesidad en individuos con diferente nivel de actividad física. También se identificó la metilación de la región reguladora por medio del tratamiento de ADN con bisulfito de sodio y posterior secuenciación. Se encontró que el genotipo de riesgo para rs8050136 está relacionado con niveles inferiores de HDL que el genotipo protector a un nivel de confianza del 90% (43.4 vs 49.54, $p = 0.082$). Los genotipos de riesgo para rs1421085, rs9939609 mostraron menor IMC que los genotipos silvestres a un nivel de confianza del 90% (rs1421085: 21.47 vs 31.20, $p = 0.010$, y rs9939609: 21.87 vs 29.42, $p = 0.085$). Las variaciones de expresión en individuos con diferentes niveles de actividad física e IMC no fueron significativas. Sin embargo, se espera que al aumentar el tamaño de muestra logremos observar una tendencia a presentar menor expresión en los individuos con mayor IMC y menor actividad física. No fue posible establecer una relación contundente entre la presencia del SNP rs8050136, la expresión del gen *FTO* y la metilación de la región reguladora. Sin embargo, se logró determinar que la metilación de otras islas contiguas a la región reguladora podrían estar participando en el control de la expresión de el gen *FTO*.

INTRODUCCIÓN

Desde que la humanidad tiene memoria, las enfermedades infecciosas han presentado y han mermado el desarrollo humano, pues las grandes epidemias han causado muchísimas muertes a lo largo de la historia (J. Maradona, 2010). Sin embargo, con el avance de la medicina y el cambio de estilo de vida de la humanidad, entre otros factores han logrado que estas enfermedades ya no representen un mayor problema de salud para muchos países (Aranda, 2009; Kumate, 2002). Las enfermedades infecciosas han sido sustituidas por otro tipo de patologías que anteriormente no se conocían o eran poco comunes entre la población, estas son conocidas como enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT), y aumentando año con año su prevalencia entre la población. Las ECNT han desplazado a las enfermedades infecciosas como principales causas de muerte en la población (Bolaños, 1999), fenómeno conocido transición epidemiológica.

Según la OMS, las ECNT son un grupo de patologías que se caracterizan por ser de larga duración, no se resuelven espontáneamente, no suelen curarse por completo y no son transmisibles. Este tipo de enfermedades han causado en las últimas décadas la mayoría de las defunciones en países en vías de desarrollo y subdesarrollados. Entre ellas están: obesidad, el cáncer, diabetes, y enfermedades respiratorias como la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) (OMS, 2017).

Existen 4 factores de riesgo principales que predisponen a padecer este tipo de patologías: el consumo del tabaco, las dietas no saludables, la inactividad física y el consumo inadecuado del alcohol (OMS, 2017). Por lo antes mencionado, las ECNT han tomado gran relevancia a nivel mundial y por consiguiente el gran interés por su estudio.

En este trabajo se aborda el tema de la obesidad, que se ha convertido en un problema de salud pública, debido a que sus cifras han aumentado de manera alarmante en los últimos años. Definiendo, primeramente. Obesidad como un padecimiento que se caracteriza por la acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud (OMS, 2018) La energía proviene de la dieta, cuyos componentes más abundantes son lípidos, proteínas y carbohidratos que se metabolizan para cubrir las funciones biológicas del organismo, y su exceso es almacenado como grasa (Esther, 2003; Tejero, 2008). Cuando este desbalance es continuo, se presenta el sobrepeso y posteriormente la obesidad (Esther, 2003).

El sobrepeso y la obesidad son dos términos que se utilizan para denotar el grado de masa grasa que una persona tiene en exceso. A menudo estos términos son utilizados indistintamente, pero es importante aclarar que su diferencia radica en el índice de masa corporal (IMC), el cual se obtiene del cociente del peso del individuo en kilogramos, dividido entre su estatura en metros al cuadrado (Puche, 2005). Este cociente nos da una idea del estado nutricional en el que se encuentra la persona (Moreno, 2018). Existen valores de referencia para este índice, los cuales han sido estandarizados previamente conforme a la raza, edad y sexo de la población que se desea estudiar (CDC, 2015). Por ejemplo, en la tabla 1 se muestran los valores de referencia para adultos masculinos de 20 años o más:

Tabla 1. Valores de referencia del IMC (CDC, 2015).

IMC	Nivel de peso
Por debajo de 18.5	Bajo peso
18.5-24.9	Normal
25-29.9	Sobrepeso
Más de 30	Obesidad

Por lo anterior podemos concluir que el sobrepeso no es lo mismo que la obesidad, y si bien las dos condiciones son perjudiciales para la salud, la obesidad es aún más grave, pues implica tener un IMC más elevado y por lo tanto más masa corporal, lo cual representa un mayor riesgo para la salud.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar los polimorfismos rs8050136, rs1421085, rs9939609, así como la metilación de la región reguladora de *FTO*, como posibles reguladores de la expresión génica de *FTO* en respuesta a la actividad física.

Objetivos Específicos

1. Evaluar la expresión del gen *FTO* en células mononucleares de sangre periférica en participantes con diferente estado de nutrición y nivel de actividad física.
2. Evaluar la presencia del SNP rs8050136 de *FTO* en los participantes.
3. Identificar la metilación de la región reguladora de *FTO* en los participantes con diferente nivel de actividad física.
4. Investigar la relación entre la expresión de *FTO*, la presencia del SNP rs8050136 y la metilación de su región reguladora.

ANTECEDENTES

Generalidades

“La obesidad y sobrepeso son una enfermedad que ha ido aumentando su prevalencia a lo largo de los años, pues tan solo desde 1980 a la fecha, esta cifra se ha duplicado” (OMS, 2016). En el año 2016 se estimó una prevalencia mundial de 1900 millones de adultos mayores de 18 años de edad con sobrepeso y 600 millones con obesidad. Esto indica que el 39% de la población mundial tenía sobrepeso, mientras que el 13% presentaba algún tipo de obesidad. En cuanto a la población infantil, 41 millones de niños menores de 5 años padecían sobrepeso en todo el mundo, mientras que alrededor de 340 millones de niños de 5 a 19 años, padecen sobrepeso u obesidad. (OMS, 2016). Estas cifras no son muy diferentes en nuestro país, ya que se estima que alrededor del 72.5% de la población adulta tiene sobrepeso u obesidad. La obesidad infantil en México también ocupa uno de los primeros lugares en cuanto a prevalencia mundial, puesto que aproximadamente el 33.2% de la población infantil padece sobrepeso u obesidad (ENSANUT-MC, 2016).

En lo que concierne a la prevalencia de comorbilidades, la obesidad y el sobrepeso tienen una aparición muy activa (OMS, 2015). Existen 3 grupos principales de comorbilidades: las asociadas a alteraciones metabólicas, donde se encuentra primordialmente la diabetes mellitus tipo 2, la dislipidemia aterogénica, hígado graso y síndrome ovárico poliquístico. Las asociadas al cambio físico-mecánico del exceso de peso, donde se encuentran la hipoventilación, apnea nocturna, insuficiencia cardíaca, osteoartrosis, entre otras. Por último, todas aquellas condiciones psicopatológicas asociadas al rechazo social y personal del sobrepeso, como son la depresión, ansiedad, alteraciones conductuales, mayor riesgo a adicciones y discriminación social. Entre todas las comorbilidades destacan las asociadas a alteraciones metabólicas, ya que estudios indican que aproximadamente el 70-80% de los individuos con sobrepeso u obesidad padecen alguna de estas patologías (Arteaga, 2012)

Hablar de la obesidad y el sobrepeso como una condición aislada es exiguo, pues como se mencionó anteriormente, existen diversos factores que están implicados tanto en la patogénesis como en la fisiopatología misma, pues es una condición multifactorial. Es por ello que es imprescindible conocer los factores de riesgo que predisponen al desarrollo de esta enfermedad para una mejor comprensión de la misma.

Aspectos Socioeconómicos y Culturales

Los aspectos socioeconómicos y culturales tienen un impacto sobre la nutrición, la actividad física y los factores heredofamiliares en el desarrollo de la obesidad, por lo que juega un rol mucho más dinámico de lo que se podría esperar.

El ser humano es un animal sociable, que tiende a agruparse para sobrevivir. Es precisamente esta conducta la que ha permitido la existencia de culturas, países, estados, ciudades, sociedades hasta núcleos familiares. congregaciones que en gran medida han definido el comportamiento y las conductas de los individuos pertenecientes a ellas (Lera, 2002; Monclús, 2011). A esto lo conocemos como cultura, tradiciones y costumbres. que influirán en todas las agrupaciones humanas antes descritas. (Juan Oliva y col., 2008). La estructura de la agrupación humana va influenciar en el desarrollo de la obesidad, aquí estaríamos hablando de modelos socio-económicos en el caso de países, y la estructura familiar en el caso del núcleo familiar. En este último rubro, existen estudios donde se han analizado familias con y sin hermanos en presencia de uno o los dos padres de familia y han mostrado predisposición a obesidad infantil (Chen y Escarce, 2010). Por otro lado, se ha reportado que existe tendencia a sufrir obesidad infantil cuando se vive con padres y/o abuelos que padecen obesidad (Lee y col., 2013). Así mismo, cuando existen problemas intrafamiliares y poca comunicación o falta de autoridad por parte de los padres, aumenta las probabilidades de desarrollar obesidad infantil (Halliday y col., 2013). Estos estudios sugieren una relación importante en la estructura familiar y la predisposición a padecer obesidad (Chen y Escarce, 2010).

Los aspectos Económicos también juegan un rol en el desarrollo de la obesidad, debido a que la población con menor poder adquisitivo es más vulnerable al consumo de alimentos menos saludables, tomando en cuenta esto es importante recalcar que en México aproximadamente el 43.6% de la de la población se considera de bajos recursos (CONEVAL, 2016).

Nutrición

El desequilibrio entre la ingesta y el gasto calórico debido a malas prácticas alimentarias son un factor de gran importancia en el desarrollo de la obesidad, pues constituye el primer paso para el desarrollo de esta patología (V. Fuchs y col., 2012). Actualmente en México se está viviendo una transición nutricional debida principalmente a la globalización e industrialización. Estos procesos han cambiado la industria alimentaria, poniendo a disposición de la población alimentos muy procesados, de fácil consumo y elevado contenido energético como: bebidas azucaradas, comida rápida, dulces, botanas con alto contenido de sodio (Fausto y López, 2006). Ocasionando la disminución del consumo de la comida tradicional mexicana, y de productos naturales con menor contenido de azúcar como: verduras, frutas, legumbres, en general productos menos procesados. Finalmente, estas prácticas alimenticias predisponen a los individuos a padecer sobrepeso u obesidad (OMS, 2018)

Actividad Física

La actividad física es otra variable fundamental, pues supone cualquier movimiento corporal que genere un gasto energético para el organismo (OMS, 2018) dicho gasto, es factor importante en el balance energético. Actualmente en México existen una disminución de la actividad física, diversos factores podrían explicar esta tendencia en el mexicano como: la mecanización de los transportes públicos, la limitación de las actividades debido a la falta de tiempo libre, el aumento de formas de trabajo más sedentarias, la disponibilidad de alimentos de forma sencilla, espacios recreativos limitados debido a la inseguridad y violencia que se viven en muchos lugares de Mexico, las nuevas tecnologías que nos proporcionan diversas facilidades en la comodidad de nuestros hogares, entre otros (Fausto y López, 2006; OMS, 2018).

Factores Heredofamiliares

Existe una hipótesis llamada “genotipo de ahorro”, propuesta por Neel en 1962, esta refiere que las personas obesas de bajos recursos podrían haber desarrollado un mecanismo de adaptación metabólica. Dicha hipótesis postula que, durante la exposición a un período prolongado de hambruna, se presentan adaptaciones en el organismo como el almacenamiento y metabolismo de menos nutrientes, una vez que se logra disponer de alimentos en forma regular, el organismo tiende a almacenar energía en forma de grasa, provocando finalmente la obesidad (Fausto y López, 2006).

Otra hipótesis importante, es la propuesta por Barker en 1980. Esta propone que el ambiente intrauterino (nutrición, salud y desarrollo), así como enfermedades infecciosas en edad temprana, podrían predisponer a determinadas enfermedades crónicas no transmisibles en la edad adulta. Dicho fenómeno parece estar mediado por procesos epigenéticos (Durán, 2004; González, 2010).

El IMC está fuertemente influenciado por la carga genética en alrededor del 40% – 80% (Maes y col., 1997) esto es regulado por un gran número de genes (figura 1), que a su vez están implicados en la regulación del apetito y la sensación de saciedad, síntesis de adipocitos, metabolismos de grasas, entre otras (Goodarzi, 2017).

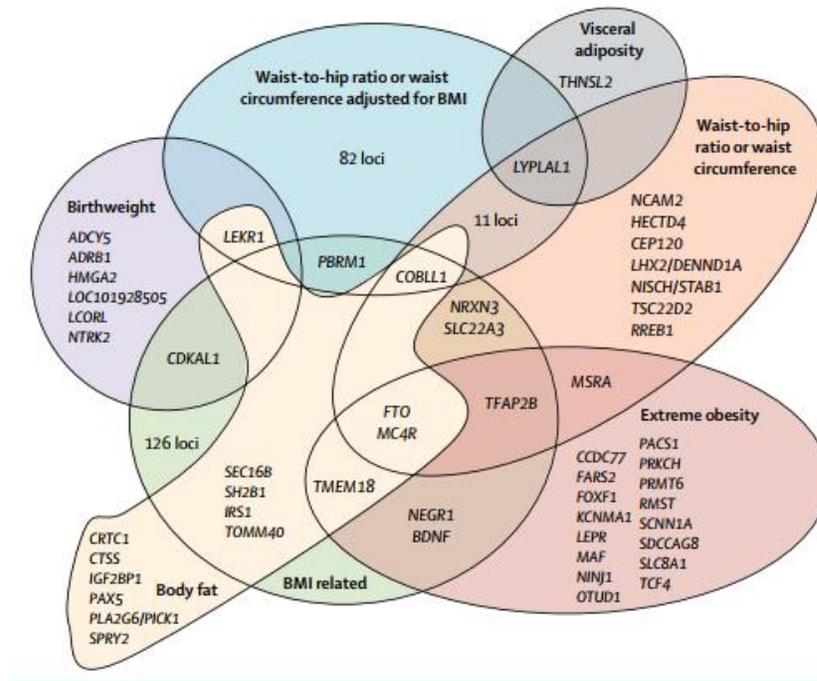


Figura 1. Algunos de los genes implicados en la obesidad poligénica y el efecto que suelen causar (Goodarzi, 2017).

La genética de la obesidad se clasifica en obesidad monogénica y poligénica. La obesidad monogénica ocurre cuando hay alteraciones en un solo gen, y dichas alteraciones son responsables directamente de esta patología (Canizales y quinteros, 2008). En este caso la obesidad monogénica se puede desarrollar por alteraciones en alguno de estos genes: *MC4R*, *BDNF*, *PCSK1*, *POMC*, *SH2B1*, *LEPR*, y/o *NTRK2*, los cuales están encargados de la regulación del apetito (Goodarzi, 2017). Este tipo de obesidad se presenta desde temprana edad, y tiene una prevalencia de alrededor del 5% de la población mundial (C. Nobrega, 2014). La obesidad poligénica es la que afecta a la mayoría en la población. Esta de etiología multifactorial, pues se presenta cuando hay alteraciones en múltiples genes, y a su vez responde a estímulos ambientales (Goodarzi, 2017).

Historia de *FTO*

FTO es uno de los genes que han mostrado mayor relación con la obesidad poligénica (Sällman y col., 2012). Fue descubierto en el año 1999 en Alemania por Thomas Peters y colaboradores, donde trabajaron con ratones transgénicos que Catherine Woodroffe había genotipificado en 1989. Dichos ratones tenían la mutación “fused toes”, que se presenta por eliminar varias pares de bases en el cromosoma 8 del ratón, produciendo ratones heterocigotos y homocigotos para esta mutación. (Peters y col., 1999). Los resultados arrojaron que los ratones heterocigotos desarrollaban sindáctilia (dedos fusionados) en los dedos de los pies, lo que dio origen al nombre de la mutación “fused toes”. Por otro lado, los ratones homocigotos murieron a la mitad de la gestación y desarrollaron malformaciones craneales. Posteriormente realizaron la técnica Exon Trapping, con la cual corroboraron que en la delección de 1.6 millones de pares de bases solo se encontraban 6 genes, 3 conocidos y 3 desconocidos. Los conocidos corresponden al clúster *IrxB* que está constituido por *Irx3*, *Irx5* e *Irx6*. Entre los desconocidos se encontraron *fantom* (*Ftm*), llamado así por el arduo trabajo que requirió su caracterización (hoy en día llamado *Rpgrip11*), *Fatso* (*Fto*), nombre que se le otorgó por el gran número de pares de bases de este, y *Ft1* (hoy en día llamado *Fts*) (Fischer, 2008). En el 2007 se realizaron estudios de asociación del genoma completo (GWAS), donde buscaban polimorfismos relacionados con la obesidad y encontraron varios polimorfismos en *FTO* que estaban relacionados con la obesidad. (Dina y col., 2007).

Función de *FTO*

La función de *FTO* aún no se ha elucidado del todo, solo se sabe que variantes (figura 2) de este gen están relacionadas con obesidad y su producto es una enzima desmetilasa (Sällman y col., 2012). Es un gen ubicuo pues se expresa en la mayor parte de los tejidos humanos. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que existe mayor expresión en el cerebro y en concreto en el hipotálamo. Esto podría explicar la relación que tiene con la obesidad, ya que el hipotálamo se encarga de regular conductas relacionadas con la ingesta de alimentos y de normalizar la temperatura corporal (Fawcett, 2010).

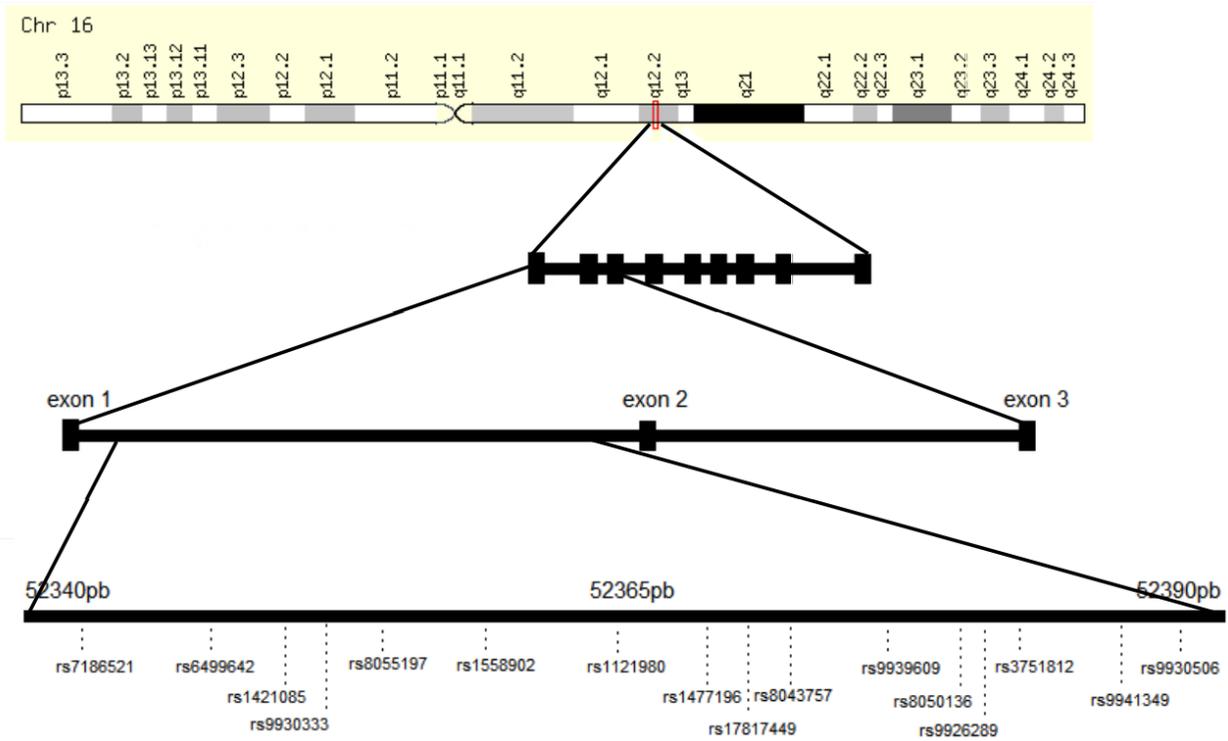


Figura 2. Mapa genético de *FTO* y algunos de sus SNPs de interés. (Apal Sammy y col., 2012; Berulava y Horsthemke, 2010).

Estudios del producto de *FTO* demostraron que tiene homología con la familia de las enzimas oxigenasas dependientes de 2 oxoglutarato y oxigenasas dependientes de Fe(ii) (AlkB) de *Escherichia coli*. Esta familia de enzimas se encargan de reparar el ADN por medio de una reacción de hidroxilación del grupo metilo de la 1-metiladenina (1-meA) y la 3-metilcitosina (3-meC) seguido de una reacción retroaldólica (Gerken y col., 2009). No obstante, la desmetilasa que codifica el gen *FTO* es específica para 3-metil timina y 3-metil uracilo (figura 3) (Jia y col., 2008).

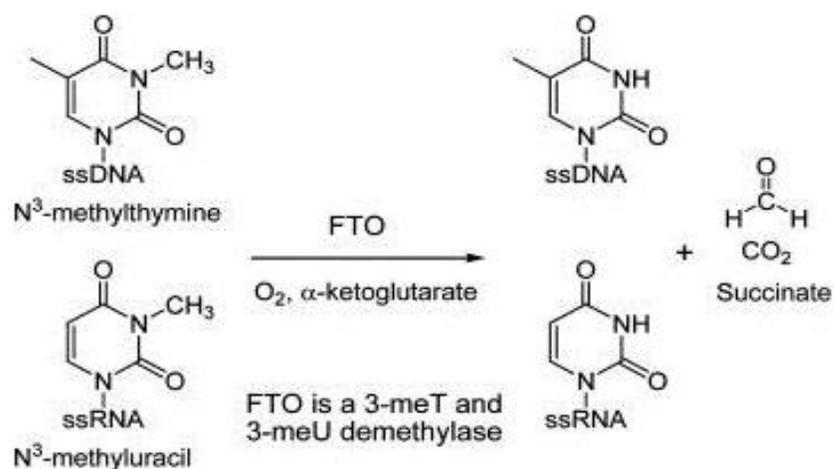


Figura 3. Función de FTO (Jia y col., 2008) .

***FTO* y polimorfismos**

Polimorfismos de nucleótido simple (SNP's por sus siglas en inglés) en el intrón 1 de *FTO* han sido fuertemente relacionados a valores altos de IMC y circunferencia de cadera. Sin embargo, no hay muchos mecanismos que expliquen cómo estos polimorfismos causan la obesidad. Uno de ellos fue identificado en el 2015 Claussnitzer y col. encontrando que el SNP rs1421085 de *FTO*, el cual es un cambio de timina por citosina capaz de interrumpir la unión de una proteína represora de unión al ADN llamada ARID5B (figura 4) que regula la transcripción de genes relacionados con el desarrollo del hígado y la termogénesis, provocando la sobreexpresión de *IRX3* e *IRX5*. Se sabe que estos genes participan en la diferenciación negativa de los adipocitos generadores de calor durante su maduración provocando un cambio de adipocitos marrones (termogénicos) a adipocitos blancos (almacenadores de grasa) (Claussnitzer y col., 2015).

El proceso por el cual se forman los adipocitos se denomina adipogénesis, donde las células madres mesenquimales multipotentes se diferencian en adipocitos por medio de dos fases. La primera fase es cuando la célula multipotente pierde su potencialidad para formar otros tejidos, pero permanece morfológicamente igual que la célula multipotente. La segunda fase

(diferenciación terminal) es cuando la célula adquiere todas las características de un adipocito maduro. Entre estas la sensibilidad a la insulina, la maquinaria para el transporte y la síntesis de lípidos, y la secreción de proteínas específicas de adipocitos (Tang y Lane, 2012). Sin embargo, en los mamíferos existen dos tipos de adipocitos, los adipocitos “blancos” almacenadores de grasa y los adipocitos “marrones” ricos en mitocondrias que disipan la energía en forma de calor (termogénesis). Los adipocitos marrones y los adipocitos blancos expresan más o menos los mismos genes, pero difieren en la expresión de algunos genes. Por ejemplo, los adipocitos marrones expresan un gen llamado *UCP*, cuyo producto participa en la conversión de energía (lípidos) en calor (Rosen y Macdougald, 2006). Básicamente es un transportador de protones facultativo que es capaz de desacoplar la oxidación del combustible celular destinado a la producción de ATP y producir calor en su lugar (Sarjeant y Stephens, 2012).

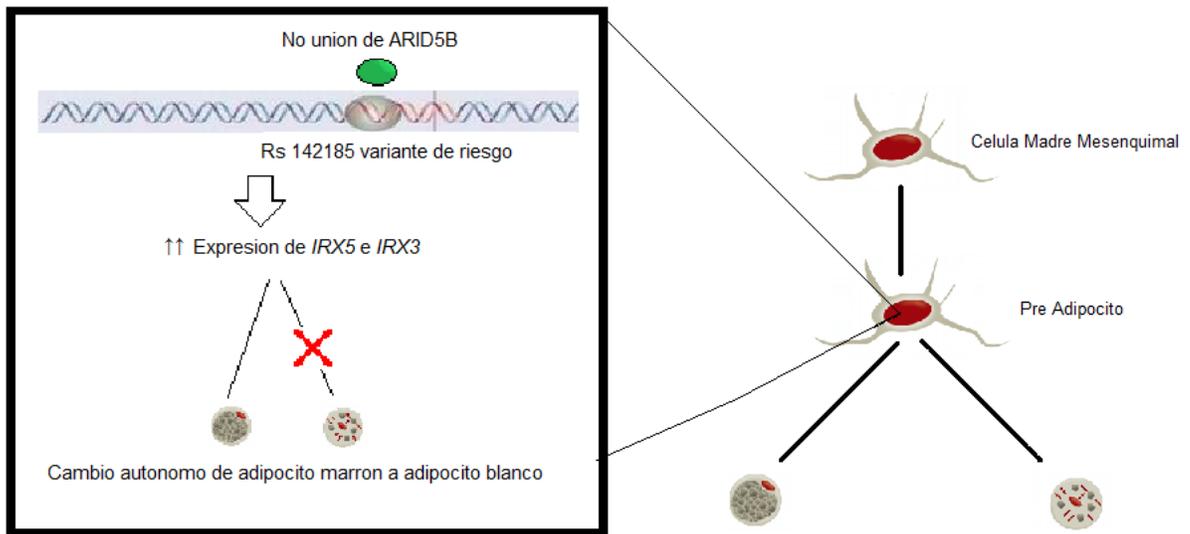


Figura 4. Mecanismo de acción del SNP rs142185. (Claussnitzer y col., 2015).

Otro SNP importante, el cual ha mostrado correlación significativa con la obesidad y se conoce su mecanismo (Stratigopoulos y col., 2011), es el rs8050136, que se encuentra en el intrón 1 de *FTO*. Stratigopoulos y col (2011) sugieren que *FTO* y *RPGRIP1L* están asociados con la señalización de la leptina, que el factor de transcripción CUTL1 se une a la región de dicho SNP y regula la expresión de *FTO* y *RPGRIP1L* (figura 5). El factor de transcripción CUTL1 está conformado por un dominio auto inhibitorio, tres dominios de interacción con el ADN, un dominio de corte y dos dominios de represión que no interactúan con el ADN. Una enzima llamada cathepsina L, la cual es una proteasa presente en los lisosomas de los vertebrados, escinde la isoforma p200 de CUTL1 en una región entre el dominio de interacción con el ADN uno y tres formando la isoforma P110 (Stratigopoulos y col., 2011). Los dominios de interacción al ADN de CUTL1 tienen alta flexibilidad pues solo reconocen tres nucleótidos de unión (ATA) y el dominio de corte reconoce únicamente los nucleótidos (ATC). Se ha descubierto que la isoforma P110 actúa como activador transcripcional de *FTO* y *RPGRIP1L*, y la isoforma P200 es un represor transcripcional de *FTO*. Dicho esto, la escisión de CUTL1 probablemente sea responsable de la modulación de la expresión de *FTO* y *RPGRIP1L* mediada por el entorno metabólico (Stratigopoulos y col., 2011).

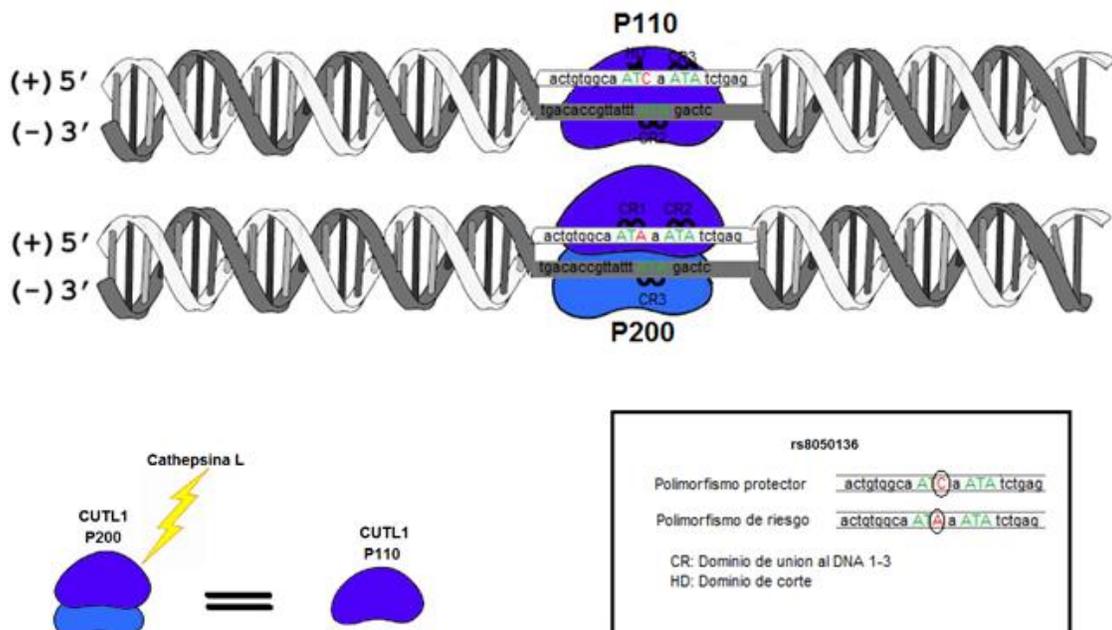


Figura 5. Mecanismo de acción del SNP rs8050136. (Stratigopoulos y col., 2011).

Leptina

La leptina es una hormona peptídica que se produce principalmente en las células adiposas. (E. Rosado, 2006). La función principal de esta hormona reside en la regulación de la homeostasis energética. Sin embargo tiene funciones en el metabolismo de los lípidos, los huesos y de la glucosa, también tiene funciones neuroendocrinas y participa en el sistema inmune (Klok, y col., 2006). Es secretada principalmente en tejido adiposo, y en menor cantidad en otros tejidos como placenta, músculo, tejido mamario, entre otros. Varios polimorfismos de riesgo de *FTO* han sido relacionados con la obesidad, así como con los niveles de leptina. El nivel de leptina aumenta en sangre dependiendo de ciertas condiciones (Figura 6) como energía almacenada en grasa (obesidad), glucosa en sangre, sobrealimentación, estrógeno en sangre, insulina, citosinas proinflamatorias (IL-6, TNF- α). El ayuno, los depósitos de energía bajos, la exposición al frío, el ejercicio, el aumento de testosterona en sangre, el aumento de hormona tiroidea, disminuyen el nivel de leptina en sangre. (Klok y col., 2006; Park y Ahima, 2015).

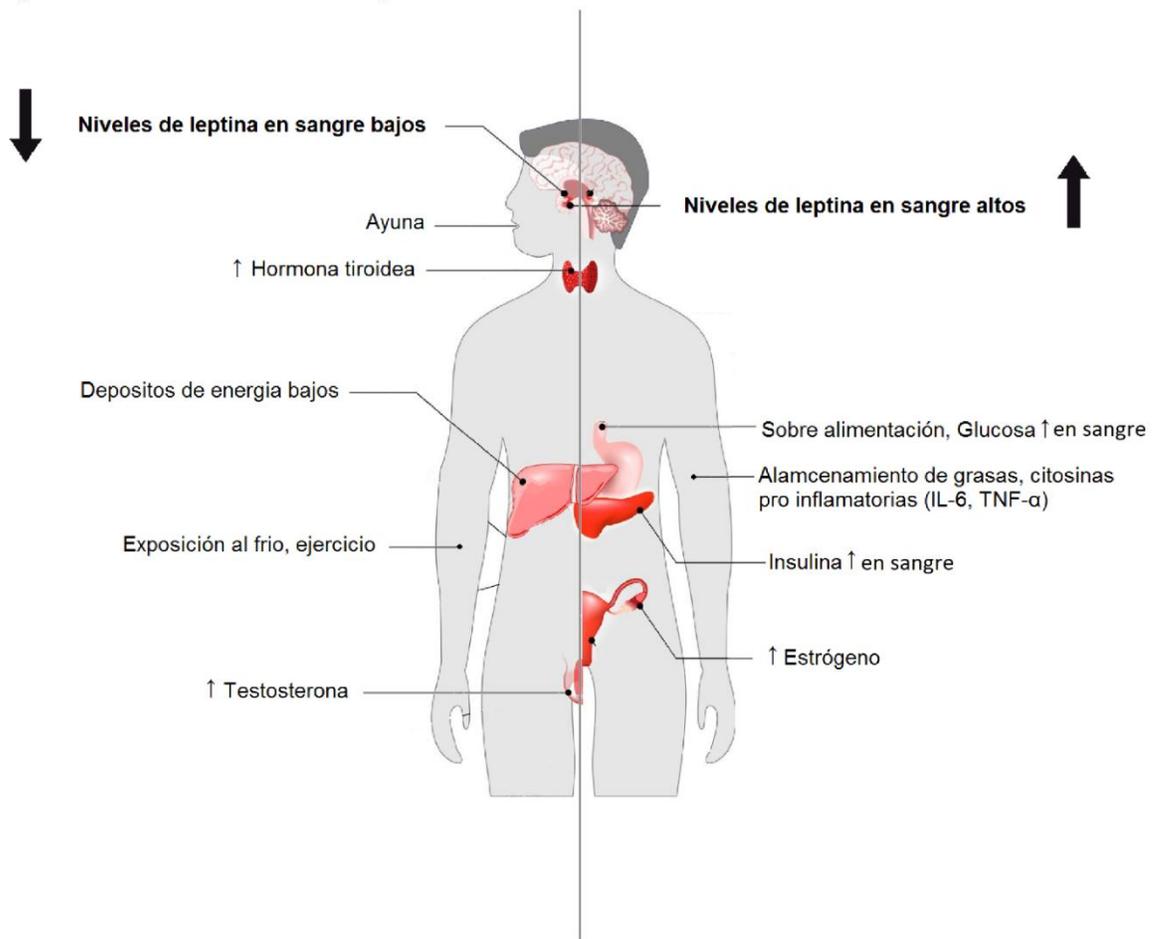


Figura 6. Condiciones fisiológicas que afectan los niveles de leptina. (Klok y col., 2006; Park y Ahima, 2015).

Metilación

La epigenética es el estudio de los cambios a nivel molecular adquiridos y hereditarios que son capaces de modular la expresión de los genes. Estos cambios ocurren sin modificación alguna en la secuencia de ADN. Esto se puede dar por diversos mecanismos, siendo la metilación (Figura 7) uno de los más importantes (Sällman y col., 2012). En este proceso ocurre una transferencia de un grupo metilo en el dinucleótido de citosina-guanina (5'-CpG3'). Estos dinucleótidos no están distribuidos al azar en el genoma, si no que se agrupan formando islas CpG en los promotores de diversos genes, ejerciendo un efecto sobre los factores de transcripción, controlando la expresión de estos. Un ejemplo de ello es cuando las islas CpG en el promotor están sin metilar y permite la unión de factores de transcripción, pudiendo llevarse a

cabo la transcripción de dicho gen. Cuando las islas CpG están metiladas impiden la unión de los factores de transcripción y el resultado es silenciamiento del gen (Lim y Maher, 2010).

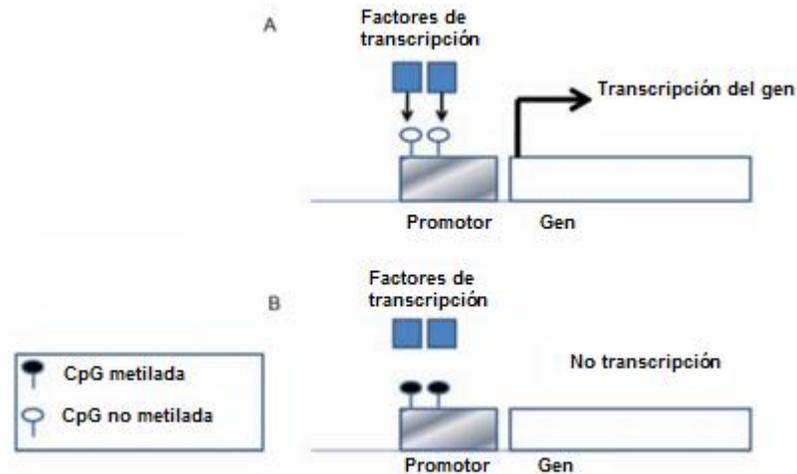


Figura 7. Regulación de la expresión génica mediada por metilación (Lim y Maher, 2010).

Como se mencionó antes, *FTO* codifica para una enzima dioxigenasa dependiente de alfa cetoglutarato/Fe(ii), la cual tiene una función reparadora en el ADN metilado. Con base en las características de la secuencia principal, se cree que el producto de *FTO* puede ser proteínas globulares, citosólicas con estructuras α/β mixtas que llevan una señal de localización nuclear (Fawcett, 2010). Por consiguiente, es factible que por su actividad desmetilasa y su estructura globular participe en la regulación de la expresión de otros genes (Fawcett, 2010; Rouzé y col., 2008). Estudios realizados con *FTO* han demostrado asociación con los niveles de metilación de varios sitios del genoma. Por otro lado se ha descubierto que polimorfismos genéticos responsables de los mecanismos de metilación están relacionados con cambios en la metilación de otros genes (Sällman y col., 2012). Lo anterior sugiere una relación contundente entre las variantes genéticas y la metilación del ADN, que nos permite inferir que los polimorfismos están relacionados con la epigenética como tal. En el año 2011, en la universidad de Uppsala, Suecia, se realizó un estudio donde se encontró que los efectos de ciertos polimorfismos con la variante de riesgo del gen *FTO* pueden estar modulados por cambios epigenéticos. Dicho esto se puede inferir que los mecanismos epigenéticos participan regulando la expresión de genes, tal como los SNP's (Sällman y col., 2012).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron muestras de sangre y ADN de células sanguíneas procedentes de la tesis de maestría de Rendón, (2016), donde se trabajó con 51 adultos jóvenes (26 mujeres y 25 hombres) proporcionando su consentimiento informado. Como criterios de inclusión se tomaron: adultos jóvenes (entre 20 y 40 años de edad) residentes de Hermosillo, Sonora y que hayan firmado el consentimiento informado. Como criterios de exclusión: personas con alguna situación fisiológica especial, como embarazo, tratamiento médico en curso o problemas para realizar las encuestas o las mediciones, personas previamente diagnosticadas con enfermedades crónicas no transmisibles como diabetes, dislipidemias o enfermedades cardiovasculares, así como en estado de salud comprometido. Las personas que no cuenten con al menos 2 recordatorios de 24 horas, el IPAQ o la determinación de los marcadores bioquímicos fueron excluidos del análisis.

Antropometría

Se utilizó una báscula electrónica con capacidad de 250 kg \pm 0.2 kg (Seca gmbh y co. Alemania). Se solicitó a la persona mantener un ayuno de al menos dos horas y vaciamiento de líquidos a través de micción y vaciamiento gastrointestinal inmediatamente anterior a la medición. La medición se realizó con la menor cantidad de prendas posibles, por parte del sujeto, evitando, así, un peso agregado al sujeto.

Talla. Se utilizó un estadiómetro portátil Holtain capacidad 20-207 \pm 0.1 cm. Se solicitó a la persona retirarse zapatos y arreglos en el cabello que pudieran entorpecido la medición; se siguió la técnica descrita por Lohman, utilizada y recomendada por la OMS (Suverza y Haua, 2010).

Para la circunferencia de cintura, se utilizó una cinta métrica flexible marca Januvia©. Esta medición se realizó en el punto medio de la cresta ilíaca y la última costilla. Una vez colocada la cinta sobre la región, se pidió a la persona que inhalara y exhalara y, posteriormente, se tomó la medición.

El IMC se obtuvo mediante el cociente del peso (kg) y talla (m²). Para la clasificación del normopeso, sobrepeso y obesidad, se utilizaron los puntos de corte recomendados por la OMS (2015).

Para determinar la composición corporal se utilizó el equipo portátil para bioimpedancia Impedimed Pty Ltd IMP5©. Se pidió a la persona seguir las indicaciones para la realización de la técnica: haber realizado un ayuno de al menos 2 horas; haber vaciado líquidos mediante micción y vaciamiento gastrointestinal inmediatamente previo a la prueba y vestir con ropa libre de metales o que entorpezcan la medición. Además, se solicitó al participante no haber ingerido alcohol o algún componente que haya alterado el estado hidroelectrolítico durante las 24 horas previas y, en caso de presentar período menstrual, se reprogramó la medición. Una vez realizada la medición, se capturaron los resultados de resistencia (R) y reactancia (X) arrojados por el equipo. Estas variables se introdujeron a la ecuación de Macías *et al.* (2006), validada para población sonoreense y de las mismas características; así, se obtuvo la masa libre de grasa e indirectamente la masa grasa en unidades porcentuales.

Evaluación Dietaria

Para estimar la dieta actual y conocer la ingesta en los participantes, se realizaron dos a tres recordatorios de 24 horas. Éstos, se tomaron en días no consecutivos, dos entre semana y uno en fin de semana. El período entre cada uno de ellos fue de aproximadamente 3 semanas con el fin de evitar el entrenamiento del entrevistado. Para la estimación del consumo de micro y macronutrientes se siguió el procedimiento de Ortega *et al.* (1999).

Evaluación de la Actividad Física

A cada participante, se le aplicó el cuestionario internacional de actividad física (IPAQ) versión corta, en español. Este instrumento consiste en 7 preguntas correspondientes a las actividades ligeras, moderadas y vigorosas (Craig *et al.*, 2003). El instrumento registró la actividad física realizada durante 1 semana habitual al año. La codificación de los cuestionarios y clasificación de la actividad física fue mediante la conversión de unidades metabólicas (METs) por minuto a la semana. Así mismo, para disminuir el sesgo de los METs por semana realizados, se aplicó la ecuación de Medina *et al.* (2013), validada en población mexicana: $MVPA \text{ ajustada} = 10:8335 \sqrt{\text{IPAQ MVPA (minutos por semana)} * (\text{moderada (incluyendo caminatas)} + (\text{vigorosa}) 2)}$; donde

MVPA: Actividad física moderada-vigorosa. Con esto, obtenemos una corrección de la actividad física sobreestimada.

Determinaciones Bioquímicas

A cada participante se le extrajeron 8 ml de sangre venosa en dos tubos. Para la determinación de glucosa se utilizó un tubo con EDTA + fluoruro de sodio (inhibidor de glucólisis) y se cuantificó mediante la prueba de glucosa oxidasa (GOD-PAD, Randox cat. No. GL2623). Para la determinación de triglicéridos, colesterol total y colesterol HDL se utilizó un tubo con SST (inhibidor de coagulación) y se cuantificaron mediante pruebas enzimáticas colorimétricas (GPO-PAD para triglicéridos, Randox cat. No. TR210; CHOD-PAP para colesterol total Randox Cat. No. CH200 y colesterol HDL, cat. No. CH2013). Estas determinaciones se realizaron en equipo Randox Xmonza™. La cuantificación de colesterol LDL se determinó por diferencia. Las condiciones para la toma de muestra fueron las siguientes: se le solicitó al participante un ayuno de al menos 12 horas, haber cenado ligero la noche anterior, ausencia de ejercicio físico previo y haber evitado ingesta de alcohol durante las últimas 24 horas.

Las determinaciones anteriores: Antropometría, evaluación dietaria, evaluación de la actividad física y las determinaciones bioquímicas se realizaron en la tesis de maestría de Rendon, 2016.

Extracción de los Ácidos Nucleicos

Para la extracción de ácidos nucleicos se utilizaron 3 protocolos; para la obtención de ADN se utilizaron los métodos Salting Out y Back Extraction. En las muestras que mostraron dificultad para la extracción por el método de Salting Out, se utilizó la técnica de Back Extraction. Para la extracción de ARN se utilizó el reactivo de TRIZOL basado en la técnica descrita por Chomczynsk y Sacchi, (1987).

Aislamiento de ARN Total

Se adicionó 1mL de TRIZOL[®] por cada 300 μ L de suspensión celular y se homogeneizó mediante pipeteo por 1 minuto. Posteriormente se incubó la mezcla a temperatura ambiente por 5 minutos. A esta mezcla se adicionaron 200 μ L de cloroformo por cada mL de TRIZOL[®], se agitó por 15 segundos y se dejó incubando de 2 a 3 minutos a temperatura ambiente. Una vez concluida la incubación se centrifugó la muestra a 12000x g por 15 minutos a 4 °C. Después separándose la fase acuosa donde permanece el ARN, teniendo cuidado de no tomar fase orgánica ni de la interfase (la fase orgánica fue reservada a -80 °C para futuras extracciones de ADN). Seguido de ello se agregaron 500 μ L de isopropanol al 100% por cada mL de TRIZOL[®] utilizado, se homogeneizó y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. Finalizado esto se procedió a centrifugar la muestra a 12000x g por 15 minutos a 4 °C, se decantó el sobrenadante y se lavó el pellet con 1mL de etanol al 75% por cada mL de TRIZOL[®] utilizado, agitándose brevemente mediante a Vórtex. Entonces se centrifugó la muestra 7500x g por 5 minutos a 4 °C, se dejó secar por 10 minutos y por último se resuspendió la muestra con 20-50 μ L de agua libre de RNAsas.

Salting Out

Se agregaron 200 μ L de la capa leucocitaria en un tubo de 15 mL con 3 mL de buffer de lisis (Tris-HCl 1mM; NaCl 400mM y Na₂EDTA 2 mM, pH 8.2), posteriormente se agregó 0.5 mL de proteinasa K (1 mg de proteinasa K en 1% de SDS y 2 mM de Na₂EDTA) y 0.2 mL de solución SDS al 10%, incubándose a 37 °C. Después se agregó 1 mL de NaCl (6 M), se agitó vigorosamente (Vórtex) por 15 segundos, se centrifugó a 700x g con una centrifuga Thermo Scientific SL 16R por 15 min a 5 de aceleración y 2 de desaceleración. Finalizada la centrifugación, se transfirió el sobrenadante a otro tubo, se le agregó 2x el volumen de etanol absoluto y se invirtió hasta observar hebras de ADN; seguido de ello se transfirieron las hebras con una pipeta a un tubo Eppendorf y se incubó a 50 °C hasta que se evaporó el etanol y finalmente se resuspendió el ADN precipitado en el tubo en 40-200 μ L de buffer TE (Tis-HCl 10 mM; Na₂EDTA pH 7.5).

Back Extraction

A la fase orgánica sobrante de la técnica de Chomczynsk y Sacchi (1987), se adicionaron 500 µL de BACK EXTRACTION buffer (4 M de Tiocianato de guanidinio; 50mM de Citrato de Sodio y 1M de Tris base) por cada mL de TRIZOL utilizado; posteriormente se agitaron vigorosamente las muestras por 15 segundos, se incubaron a temperatura ambiente por 10-15 minutos a centrifugándose a 12000x g con el equipo Thermo Scientific SL 16R por 30 minutos, después se transfirió la fase acuosa de cada muestra a su nuevo tubo correspondiente e inmediatamente se le agregó 500µL de isopropanol por cada mL de TRIZOL® utilizado. Seguido de esto se invirtieron las muestras para mezclarlas y se procedió a incubarlas a temperatura ambiente por 5 minutos. Terminada la incubación se centrifugó a 12,000x g a 4 °C por 40 minutos, posteriormente se desechó el sobrenadante y se lavó el pellet con 1 mL de etanol al 70%, seguido de una centrifugación a 12000x g a 4 °C por 15 minutos. Por último, se decantó el etanol e incubó a 50 °C hasta que se evaporó el etanol (cuidando que la muestra no permaneciera seca mucho tiempo) y se disolvió en 20-50 µL de buffer TE 1X.

Genotipificación

Para realizar el estudio de este polimorfismo, primeramente, se localizó a *FTO* con código de secuencia NC_000016.10, empleándose la base de datos GenBank del Centro Nacional para la Biotecnología e Información (NCBI por sus siglas en inglés). Para encontrar la región específica del polimorfismo en cuestión, se llevó a cabo el diseño de los iniciadores utilizando la herramienta Primer-BLAST del NCBI. Como resultado obtuvimos los iniciadores para *FTO* el cual tienen como secuencia FTOfw6 5'- ATGGACAGGATCCCTAAAGTCATC- 3' y FTORv6 5'- GTACTCTAGATCAGACATGACCAT- 3'. Finalizado el diseño de los primers, se llevó a cabo la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la amplificación de la región de interés. Para dicha amplificación se realizó una reacción total de 50 µL, conteniendo 38.75 µL de agua milliQ, 5 µL de buffer, 1 µL de dNTP's 10mM, 1.5 µL de cada primer en una concentración de 10 µM, 0.25 µL de Taq polimerasa Qiagen Cat. No. 201205 y 2 µL de templado aproximadamente 200 ng totales. Para realizar la PCR convencional se utilizó un termociclador T100™ Bio-Rad bajo las siguientes condiciones: temperatura inicial de precalentamiento a 95 °C por 3 min, seguido de

una temperatura de desnaturalización de 94 °C por 45 segundos y posteriormente una temperatura de alineamiento de 60 °C por 30 segundos. La temperatura de elongación fue de 72 °C por 1 minuto con una repetición de 35 ciclos a partir de la segunda temperatura. Una vez finalizado los 35 ciclos se continuó con una temperatura de elongación final de 72 °C por 5 minutos. Al finalizar el proceso de PCR, se evidenció la amplificación mediante una técnica de electroforesis en gel de agarosa al 1% donde se utilizó el buffer de corrida TAE 1X (Tris base 0.04 M, Ácido acético 0.02 M, EDTA 0.01 M pH 8), un colorante de ADN Gel Red (1 µL en la preparación del gel), colorante de carga 4 µL Azul de bromofenol para evidenciar la progresión de la electroforesis, 50 µL de producto del PCR y 4 µL de un marcador de peso molecular de 1 kb cat. No. D0428 del fabricante SIGMA. La electroforesis se llevó a cabo a 4 °C con un voltaje de 80 volts por 80 minutos. Para observar el gel, se irradió la muestra con luz ultravioleta de 302 nm con un fotodocumentador PhotoDOC-it™ 65 LM-20 transiluminator.

Para la secuenciación de las muestras se cortaron los amplicones del gel cuidadosamente utilizando un bisturí. Su tubo debidamente rotulado, y una vez realizado el corte procediéndose a purificar los amplicones utilizando el kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up del fabricante MACHERY-NAGEL, bajo el siguiente protocolo: para cada 100 mg de agarosa se adicionaron 200 µL de buffer NT1, inmediatamente después se incubaron las muestras a 50 °C hasta la disolución total del gel, 5-10 minutos aproximadamente, entonces el gel se transfirió 700 µL de mezcla a una columna de elución incluida en el kit, se centrifugó la columna a 11,000x g a temperatura ambiente por 30 segundos, posteriormente se descartó el fluido de elución y se adicionaron 700 µL de buffer NT3 directamente a la columna, centrifugando a las mismas condiciones del paso anterior. Se adicionaron nuevamente 700 µL de buffer NT3 y se repitió la centrifugación, después se descartó el fluido de elución y se procedió a secar la columna por medio de centrifugación 11,000x g a temperatura ambiente por 60 segundos, para finalizar se adicionaron 15-30 µL de buffer de elución y se incubó a 70 °C por 5 minutos, se centrifugó a 30x g a temperatura ambiente por 60 segundos, luego de ello se realizó nuevamente otra centrifugación a 11,000x g a temperatura ambiente por 60 segundos.

Una vez obtenidos los productos purificados se prepararon para enviarlos a secuenciar en Instituto de Biotecnología de la UNAM en la Ciudad de Mexico. Se preparó una mezcla con 100-120 ng totales de producto y una concentración final de 10 mM de los primers en un volumen final de 16 µL en un tubo de PCR convencional.

Genotipificación Para los SNPS rs1421085 y rs9939609

Para la evaluación de los SNP's rs1421085 y rs9939609 se extrajeron las muestras de ADN por medio de Salting Out y/o Back Extraction y se prepararon tubos de 30 ng/ μ L en 35 μ L y se enviaron a secuenciar a la empresa GENO+ con sede en Cuernavaca, Morelos.

Evaluación de la Metilación

Para realizar el análisis epigenético, primero se hizo una conversión *in silico* de la secuencia normal de *FTO* con código de acceso 79068, simulando el tratamiento con bisulfito de sodio con ayuda del software MethPrimer, la cual inicia 800 nucleótidos río arriba a partir del SNP rs8050136 y finaliza 1,649 nucleótidos río abajo a partir del SNP antes mencionado. Posteriormente se diseñaron varios posibles pares de iniciadores (todos contenían el SNP 8050136) de forma artesanal y posteriormente confirmado con ayuda del software MethPrimer. Sin embargo, solo se utilizaron los primers FTOBis 284M, con una secuencia nucleotídica de 5'- TYG GTT TTT ATA ATT ATT TTA AAT T- 3' y 5'- ACA CCA AAA TAA TCA TAT CTA ATC -3' forward y reverse respectivamente, una vez realizado el diseño de los primers, se llevó a cabo la conversión con bisulfito del ADN genómico mediante el uso del kit comercial Methylamp™ DNA Modification Kit del fabricante EPIGENETEK. El protocolo utilizado fue el descrito en el kit.

Para comenzar, se agregaron 7 mL de etanol al 100% al R5 para hacer el buffer de limpieza final, después se preparó un tubo de PCR con una mezcla de agua destilada y muestra en un volumen final de 24 μ L y se homogeneizó mediante pipeteo, añadiendo 1 μ L de R1 al tubo, homogeneizándose e incubándose a 37 °C durante 10 minutos. Mientras transcurre la incubación se preparó el mix R1/R2/R3: agregando 1100 μ L de R3 a un vial de R2, se agitó en Vórtex hasta que la solución se aclaró o saturó (aproximadamente 2 minutos), y por último se añadieron 40 μ L de R1 a la solución. Se homogeneizó brevemente e inmediatamente finalizada la incubación se agregaron 125 μ L del mix R1/R2/R3 a la muestra y se homogeneizó mediante Vórtex. Posteriormente se incubó a 65 °C durante 90 minutos, se adicionaron 300 μ L de R4 a la muestra. Se mezcló mediante pipeteo y se colocó en una columna incluida en el kit. Se centrifugó a 16,100x g durante 15 segundos a temperatura ambiente utilizando una centrífuga Thermo Scientific SL 16R. Seguido de la centrifugación, se descartó el fluido de elusión y se agregaron

200 µL de solución R5 (buffer de limpieza final) a la columna y se centrifugó a 16,100x g por 15 segundos a temperatura ambiente. Seguido de la centrifugación se descartó el fluido de elusión y se procedió a preparar el mix de R1/etanol, el cual consta de 10 µL de R1 a 1,100 µL de etanol al 90%. Se mezcló y se adicionaron 50 µL de este mix a la columna y posteriormente se incubó durante 8 minutos a temperatura ambiente. Después se centrifugó a 16,100x g durante 15 segundos a temperatura ambiente y se eliminó el fluido de elusión. Se agregaron 200 µL de etanol al 90% a la columna y se centrifugó de nuevo a 16,100x g durante 15 segundos a temperatura ambiente. Se procedió a realizar otro lavado con 200 µL de etanol al 90%, se centrifugó a 16,100x g durante 35 segundos temperatura ambiente y se colocó la columna en un nuevo tubo de 1.5 mL. Finalmente se agregaron 8-18 µL de R6 directamente al filtro de columna y se centrifugó a 16,100x g durante 20 segundos a temperatura ambiente. El ADN modificado se puede almacenar a -20 °C durante un máximo de 2 meses.

Una vez finalizado el proceso de conversión, se realizó una PCR convencional con un total de 50 µL conteniendo 45 µL de Platinum® PCR SuperMix, 0.5 µL de Taq polimerasa Qiagen y 2 µL de templado. Para llevar a cabo dicha reacción se utilizó un termociclador T100TM Bio-Rad bajo las siguientes condiciones: temperatura inicial de temperamento de 95 °C/5 min, luego una temperatura de desnaturalización de 95 °C/30 segundos y posteriormente una temperatura de alineamiento de 48°C/30 segundos. La temperatura de elongación fue de 72°C por 30 segundos con una repetición de 35 ciclos a partir de la segunda temperatura. Una vez finalizado los 35 ciclos se continuó con una temperatura de elongación final de 72°C por 4 minutos.

Al finalizar el proceso de PCR se evidenció la amplificación mediante una técnica de electroforesis en gel de agarosa al 1% donde se utilizó el buffer de corrida TAE 1X (Tris base, Ácido acético EDTA), un colorante de ADN Gel Red (1 µL en la preparación del gel), colorante de carga 4 µL Azul de bromofenol para evidenciar la progresión de la electroforesis, 50 µL de producto del PCR y 4 µL de un marcador de peso molecular de 1 kb del fabricante SIGMA. La electroforesis se llevó acabo a temperatura ambiente con un voltaje de 80 volts por 80 minutos. Para observar el gel se irradió la muestra con luz ultravioleta de 302 nm con un fotodocumentador PhotoDOC-it™ 65 LM-20 transiluminator.

Para la secuenciación de las muestras se cortó el amplicón del gel cuidadosamente utilizando un bisturí. Se separó cada amplicón en su tubo debidamente rotulado, y una vez realizado el corte se procedió a purificar los amplicones mediante el kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up del fabricante MACHERY-NAGEL con el protocolo antes descrito. Una vez obtenidos los productos purificados se prepararon para enviarlos a secuenciar en IBT-UNAM. Para esto se

preparó una mezcla con 100-120 ng de producto y una concentración final de 10 mM de los primers en un volumen final de 16 μ L en un tubo de PCR convencional.

Expresión Génica

Para la evaluación de este apartado se realizó la extracción de ARN a partir de sangre periférica almacenada durante dos años a 4 °C en tubos PAXgene Blood RNA Cat. No./ID: 762125, por medio del protocolo de TRIZOL®. Una vez obtenido el ARN se estimó su pureza y concentración con el equipo Nano Drop® ND-1000 Spectrophotometer, ThermoFisher Scientific. Después se realizó la síntesis de ADNc, empezando la transcriptasa reversa SuperScript™ IV por el fabricante THERMO FISHER.

Para cada reacción se mezcló 1 μ L de hexámeros (50 ng/ μ L), 1 μ L de dNTP's (10 mM de cada uno) y 11 μ L de ARN. La mezcla se incubó por 5 min a 65 °C, una vez finalizada la incubación, inmediatamente se colocó la muestra en hielo mientras se preparaba la reacción transcriptasa reversa: para cada reacción se adicionaron 4 μ L de buffer 5x SSIV (previamente homogeneizado mediante Vórtex), 1 μ L de DTT 100 mM, 1 μ L de inhibidor de RNAasa y 1 μ L de SSIV RT (200 u/ μ L). Después se procedió a centrifugar la muestra para eliminar burbujas y se mezcló con el tubo de la reacción anterior, incubándose a 23 °C por 10 minutos, luego a 55 °C por 10 minutos y por último a 80 °C por 10 minutos, se adicionó 1 μ L de *E. coli* RNase H y se incubó a 37 °C por 20 min.

Al finalizar la síntesis de ADNc se realizó un ensayo de qPCR (PCR cuantitativa). Para lo que se preparó una master mix con 10 μ L de TaqMan® gene Expression Master mix por el fabricante Applied Biosystems, 7 μ L de agua DEPC, 2 μ L de muestra (ADNc) y 1 μ L de sonda para *FTO* (Hs01057145_m1) marcada con FAM™. Para normalizar la expresión de *FTO* se utilizó una sonda marcada con VIC® del gen constitutivo β -actina. Al finalizar la reacción se insertaron las muestras en el termociclador en tiempo real StepOnePlus™ Real-Time PCR System del fabricante Applied Biosystems™ bajo las siguientes temperaturas: 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos, 95 °C por 15 segundos y 60° C por un minuto, con una repetición de 40 ciclos a partir de la tercera temperatura.

Finalmente, los datos se analizaron utilizando el método de $2^{-\Delta\Delta C_T}$, método propuesto por Livak y Schmittgen en el 2001. Este es un método simplificado para calcular la expresión relativa sin necesidad de calcular la eficiencia, es decir, sin realizar una curva estándar, pues en este se

asume que se tiene un 100% de eficiencia (Livak & Schmittgen, 2001). La elección de este método se hizo debido a la utilización de sondas TaqMan®, el cual se reporta que se tiene una eficiencia del 100% con el uso de ellas (Life Technologies Corporation, 2012).

Análisis Estadísticos

Se utilizó el paquete estadístico IBM® SPSS® Statistics 25 para el análisis de los datos. Para el análisis de expresión del gen *FTO* y genotipificación de los polimorfismos rs1421085 y rs9939609, se utilizó la comparación de medianas U de Mann-Whitney, para visualizar diferencias entre los parámetros bioquímicos y las mediciones antropométricas en función del genotipo. Para el polimorfismo rs8050136, se utilizó la prueba estadística T de Student, para visualizar diferencias entre los parámetros bioquímicos y las mediciones antropométricas en función del genotipo. Se trabajó con un nivel de confianza del 90%.

RESULTADOS Y DISCUSION

Genotipificación

Para el análisis de la genotipificación de los polimorfismos rs1421085 y rs9939609, fue posible secuenciar 14 muestras, mientras que para el polimorfismo rs8050136 se secuenciaron un total de 29 muestras. En la Tabla 2 se muestran los resultados de la genotipificación de cada muestra para los tres polimorfismos.

Tabla 2. Genotipo de cada muestra para los polimorfismos rs1421085, rs9939609 y rs8050136

ND= no documentado

REF	GENOTIPO rs1421085	GENOTIPO rs9939609	GENOTIPO rs8050136
REF30	AG	TA	CA
REF55	AG	TA	CA
REF89	AG	TA	CC
REF22	AG	TA	CA
REF40	AG	TA	CC
REF07	AG	TA	CA
REF74	AG	TA	CC
REF68	AA	TT	CC
REF98	AA	TT	CC
REF63	AA	TT	CC
REF85	AA	TT	CC
REF42	AA	TT	CC
REF87	AA	TT	CC
REF97	AG	TT	CA
REF29	ND	ND	CA
REF26	ND	ND	CA
REF05	ND	ND	CA
REF08	ND	ND	CA
REF64	ND	ND	CC
REF12	ND	ND	CA
REF31	ND	ND	CC
REF34	ND	ND	CC
REF18	ND	ND	CC

Se realizaron modelos estadísticos para averiguar si existía una relación entre el polimorfismo rs8050136 y algún componente bioquímico (Tabla 3). Se encontró una diferencia estadísticamente significativa para los valores de HDL y actividad física (min/semana), entre participantes con el genotipo CC e individuos con genotipo CA

Tabla 3. Genotipo, HDL y actividad física (\pm desviación estándar, n = número de muestra).

Genotipo	CA	CC	p
Actividad física (min/sem)	147.1 \pm 81.3 (n = 11)	216 \pm 115 (n = 14)	0.093
HDL (mg/dL)	43.4 \pm 9.19 (n = 12)	49.54 \pm 7.73 (n = 14)	0.082

Se observaron valores bajos de HDL y el genotipo de riesgo (CA), lo cual podría implicar mayor riesgo de padecer: síndrome metabólico, obesidad, dislipidemia aterogénica, riesgo cardiovascular entre otros padecimientos metabólicos (Ezquerro y col., 2008). estos padecimientos antes mencionados, conforman algunas de las ECNT's que mayor número de muertes causan nivel mundial. Se estima que las enfermedades cardiovasculares ocasionan alrededor de 17.7 millones de muertes en todo do el mundo cada año (OMS, 2017).

En diversos estudios se relacionaron bajos niveles de HDL con polimorfismos de un solo nucleótido del gen *FTO*, un ejemplo es un estudio realizado por Ahmad y col., 2010 el cual investigaron el a asociación entre el polimorfismo rs8050136 y enfermedad cardiovascular en una población de origen Estadounidense, conformada por mujeres de mediana edad, aparentemente sanas. En este estudio encontraron que los individuos portadores del alelo de riesgo presentaban menor nivel de HDL, y en general tenían mayor riesgo cardiovascular, lo cual es consistente con nuestros resultados entre rs8050136 y HDL. Sin embargo, no encontramos relación con los datos antropométricos (IMC, % de grasa, circunferencia de cintura y talla). Tampoco hubo relación entre el genotipo y metabolitos como LDL, triglicéridos, glucosa, folatos ni proteínas, lo cual se puede deber a la carga genética ancestral, ya que en México existe una gran carga indígena ancestral (Moreno y Sandoval, 2013). La frecuencia genotípica suele variar dependiendo de la población que se estudie. Podemos observar que en nuestro estudio no se encontró ningún participante homocigoto para el alelo de riesgo (A), pero si se encontró gran prevalencia para el genotipo heterocigoto (CA), lo cual nos permite constatar que el polimorfismo está presente en población sonoreense. Hasta ahora la frecuencia genotípica del polimorfismo rs8050136 no se ha investigado

en población indígena, por lo tanto esta población indígena podría no presentar asociación entre obesidad y el polimorfismo rs8050136 al igual que algunos estudios en donde ciertas poblaciones no muestran relación, tal como un estudio realizado por Song y col. (2009), donde se estudió un grupo de mujeres isleñas del pacífico y mujeres asiáticas, los resultados mostraron no tener una relación entre el polimorfismo rs805136 y la obesidad. Otro estudio el cual no se encontró relación entre el polimorfismo y la obesidad fue realizado por Li y col. (2008) en el cual se estudiaron a 3,210 individuos, hombres y mujeres procedentes de China. Lo cual podría concluir que en la población asiática no presenta relación entre el polimorfismo en cuestión y un elevado IMC.

El tamaño reducido de muestra podría estar ocasionando sesgo en este estudio, pues se sabe que en los estudios probabilísticos el tener un tamaño de muestra mayor el valor p disminuye, lo que significa que habrá menos sesgo debido al tamaño de muestra (V. Manzano, 2013).

Se sabe que el alelo de riesgo (A) del SNP rs8050136 de *FTO*, propicia al padecimiento de obesidad alterando el sentido de la saciedad (Stratigopoulos et al., 2011). En el modelo de Stratigopoulos se propone que cuando los niveles de leptina descienden, los niveles de cathepsina L también bajan, por lo tanto, no hay suficiente enzima que escinda CUTL1 isoforma p200, lo que conduce a una disminución de isoforma p110 (activador transcripcional), resultando en una mayor cantidad de isoforma p200 (represor transcripcional) llevando al sistema a la disminución de la expresión de *FTO* y *RPGRIP1L*. Al ocurrir esto, la señalización por leptina disminuye provocando el sentimiento de hambre en el individuo. El caso contrario es el estado alimentado, en donde los niveles de leptina suben, y a su vez aumentan los niveles de cathepsina L, por lo tanto, se escinde CUTL1, lo que conduce a un aumento de la isoforma p110 (activador transcripcional). Como resultado hay menor cantidad de la isoforma p200 (represor transcripcional) y por lo tanto la transcripción de *FTO* y *RPGRIP1L* aumenta; al ocurrir esto, la señalización por leptina se eleva provocando el sentimiento de saciedad en la persona.

Este sistema se ve alterado en los portadores del polimorfismo rs8050136. Se caracteriza por el cambio de un solo nucleótido en el sitio de unión al dominio 1 de interacción con el ADN, donde ocurre un cambio de una adenina (A) por una citosina (C). Esto provoca una mayor afinidad de la subunidad p200 respecto a la subunidad p110, lo que impide el aumento en la expresión de *FTO* y *RPGRIP1L*. Esto se debe a una competencia anormal de la subunidad p200 con la subunidad p110, lo que impide una correcta señalización de leptina que se traduce en una sensación de saciedad ineficiente (figura 8). Con base en este modelo, niveles bajos de HDL podrían ser el inicio de un desbalance energético que podría traducirse en obesidad o sobre peso en un futuro.

Tabla 4. Frecuencia genotípica del polimorfismo rs8050136 en diferentes poblaciones.

	CA	CC	AA
Asiáticos (Y. Qian y col., 2013)	18.5%	80.5%	1.1%
Población Iraní (F. Esfahani y col., 2017)	42%	45%	13%
Mujeres Brasileñas (R. Ramos y col., 2012)	35.80%	50.60%	13.60%
Mujeres Mexicanas (R. Saucedo y col., 2017)	25%	73.80%	1.20%
Blancos (Y. Song y col., 2008)	44.40%	38%	17.60%
Afro Americanos (Y. Song y col., 2008)	47.50%	34.30%	18.30%
Hispanos (Y. Song y col., 2008)	36.60%	52.20%	11.20%
Isleños del Pacífico (Y. Song y col., 2008)	27.30%	68.30%	4.35%
Población Sonorense (Presente trabajo)	45.45%	54.54%	0%

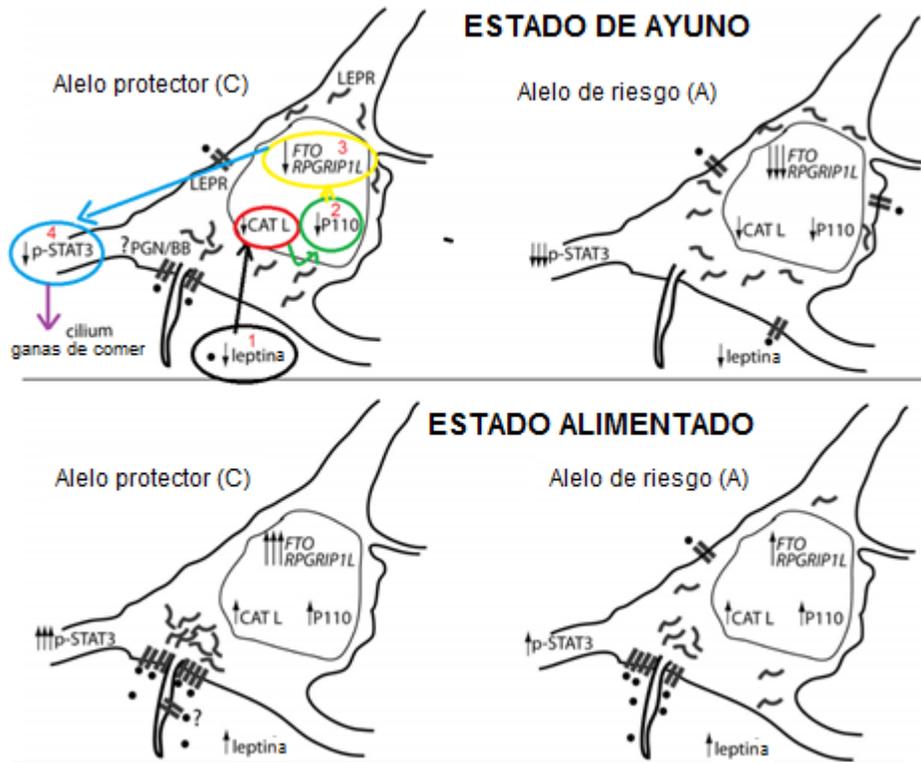


Figura 8. Mecanismo de acción del polimorfismo de riesgo rs8050136 en la obesidad. Modificado de Stratigopoulos y col., 2011.

Por otro lado, los polimorfismos rs9939609 y rs1421085 no presentaron relación con ningún parámetro bioquímico, sin embargo, se encontró que los participantes portadores del polimorfismo de riesgo (A) rs9939609 presentaron menor IMC $p = 0.085$. De igual manera los individuos portadores del polimorfismo de riesgo (C) rs1421085 también presentaron menor IMC $p = 0.010$.

Con base en los resultados resumidos en las tablas 5 y 6 es inconsistente con algunos reportes (Watanabe y col., 2012; Srivastava y col., 2016; Albuquerque y col., 2013), donde encontraron que el alelo A del polimorfismo rs9939609 y el alelo C del polimorfismo rs1420185 estaban asociados a un IMC elevado.

Los resultados contrastantes, podrían deberse a un sesgo por el tamaño de muestra reducido como el que se utilizó en este estudio.

Tabla 5. Media de IMC por alelo del SNP rs9939609.

GENOTIPO RS9939609	N	Media \pm (desv. estándar)
TT	7	29.42 (9.46)
TA	7	21.87 (3.42)
Total	14	25.64 (7.88)
Valor p	$p = 0.085$	

Tabla 6. Media del IMC por alelo del SNP rs1421085.

GENOTIPO RS1421085	N	Media \pm (desv. estándar)
TT	6	31.20 (8.97)
TC	8	21.47 (3.36)
Total	14	25.64 (7.88)
Valor p	$p = 0.010$	

Se encontró un patrón en la presencia de los diferentes genotipos de los tres polimorfismos. Para el caso del genotipo AA rs1421085 se encontró en el 100% junto a los genotipos, TT y CC de los polimorfismos rs9939609 y rs8050136 respectivamente. Para el genotipo AG rs1421085, se encontró en el 87.5% de los casos junto a la presencia del genotipo TA del polimorfismo rs9939609. Para el genotipo CA rs8050136 se encontró en el 50% de los casos junto a la presencia de los genotipos TA y AG de los polimorfismos rs9939609 y rs1421085. La implicación de estos patrones sería interesante explorar.

Expresión Génica

Para el análisis de la expresión génica, únicamente fue posible recuperar ARN de 10 muestras, los resultados de la cuantificación y pureza realizados se presentan en la tabla 6 y en la figura 9 se muestra la integridad del ARN.

Tabla 7. Cuantificación y pureza de las muestras para expresión.

No. de Muestra	Concentración	Pureza 260/280
19	245ng/ μ L	1.5
86	260ng/ μ L	1.4
44	247ng/ μ L	1.4
15	220ng/ μ L	1.5
12	170ng/ μ L	1.5
64	250ng/ μ L	1.5
84	110ng/ μ L	1.3
34	190ng/ μ L	1.5
94	235ng/ μ L	1.5
59	100ng/ μ L	1.4

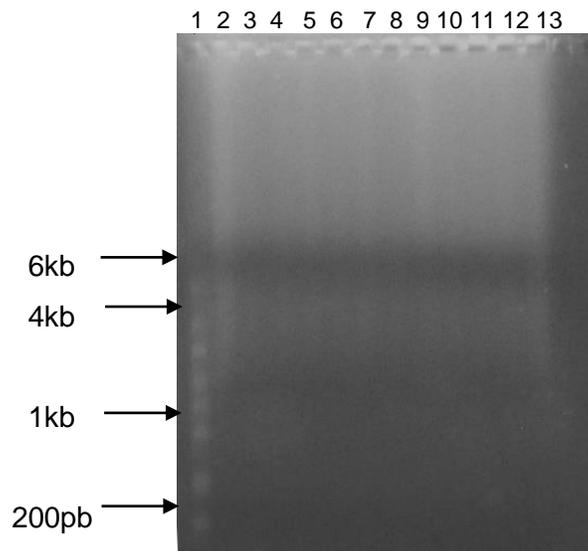


Figura 9. Integridad de las muestras de ARN, el carril 1 corresponde al marcador de peso molecular RiboRuler de 6000 a 200 pb #SM1821, los carriles 2 y 3 corresponden a los controles, carriles de 4-13 muestras.

Las muestras fueron estratificadas con respecto a su actividad física, e IMC (Tabla 8). El grupo 1 incluye a los individuos con sobrepeso y obesidad, en el grupo dos se encuentran los sedentarios con normopeso, el grupo tres está conformado por los participantes que realizan actividad física moderada y por último en el grupo cuatro se encuentran aquellos que declararon realizar actividad física vigorosa. Además de los grupos se realizó una segunda estratificación en subcategorías (Tabla 9) las cuales fueron: Sobre peso y obesidad donde se encontraba el grupo uno, Normopeso participantes de los grupos dos, tres y cuatro, Sedentarismo individuos de los grupos uno y dos, por ultimo Actividad física donde se colocaron los grupos tres y cuatro.

Tabla 8. Grupos de participantes en función de IMC y actividad física

Grupo	Categoría
1	Sobre peso y obesidad
2	Sedentarios con normopeso
3	Nivel de actividad física moderado
4	Nivel de actividad física vigoroso

Tabla 9. Subcategoría de los Grupos

Grupos	Subcategoría
1	Sobre peso y obesidad
2, 3 y 4	Normopeso
1 y 2	Sedentarismo
3 y 4	Actividad física

Se puede observar que la integridad del ARN es mínima, pues las muestras se aprecian degradadas. Sin embargo, se procedió a realizar las pruebas de expresión debido a que nuestra sonda para *FTO* Hs01057145_m1, tiene un tamaño de 60 pb, lo cual permite trabajar con este tipo de muestras.

Para determinar el valor del ΔCT , $\Delta\Delta CT$ y de expresión relativa se utilizaron las formulas propuestas por Livak y Schmittgen 2001:

$$\Delta CT = CT_{gen\ problema} - CT_{gen\ constitutivo}$$

$$\Delta\Delta CT = CT_{muestra\ problema} - CT_{muestra\ control}$$

$$Expresion\ relativa = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Es importante destacar que el ΔCT se hace utilizando los valores de CT de la misma muestra, mientras que en $\Delta\Delta CT$ se hace utilizando el valor de CT de la muestra problema y el valor de CT de una muestra control, que en este caso se utilizó el promedio de las muestras 15 y 12 que corresponden al grupo 3

No se encontraron diferencias significativas en la expresión del gen *FTO* en los individuos con sobrepeso y los individuos normopeso (Figura 10). Tampoco hubo diferencia significativa entre los participantes con actividad física y los sedentarios (Figura 11). Esto puede ser por el reducido tamaño de la muestra, debido a que no fue posible recuperar un número de muestra representativo.

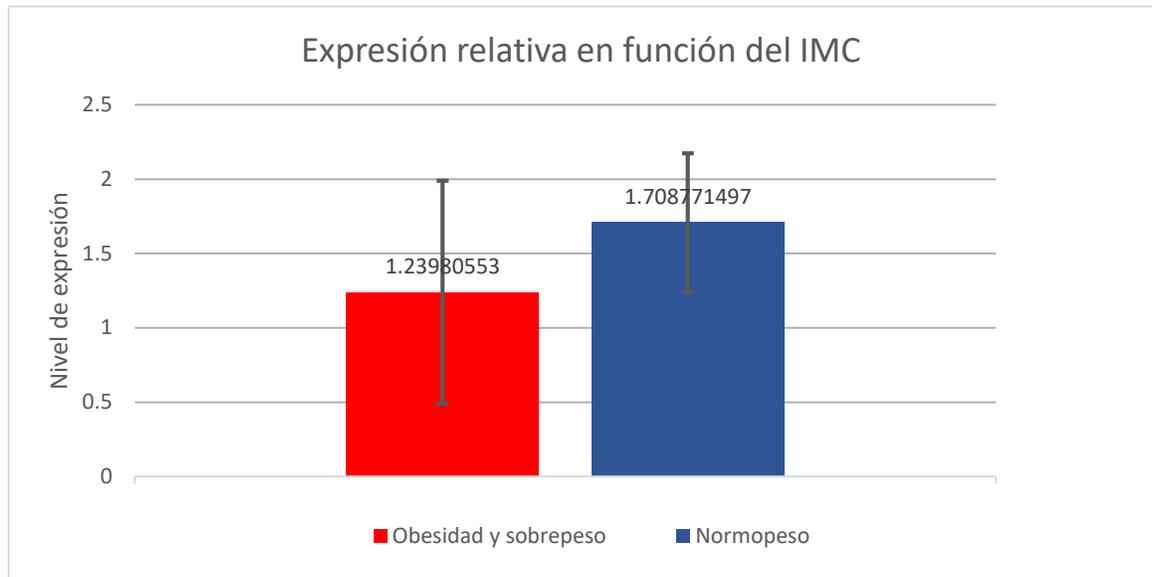


Figura 10. Comparativo de la expresión relativa del gen *FTO* en los participantes con normo peso y participantes con obesidad. U de Mann-Whitney $P = 0.15$.

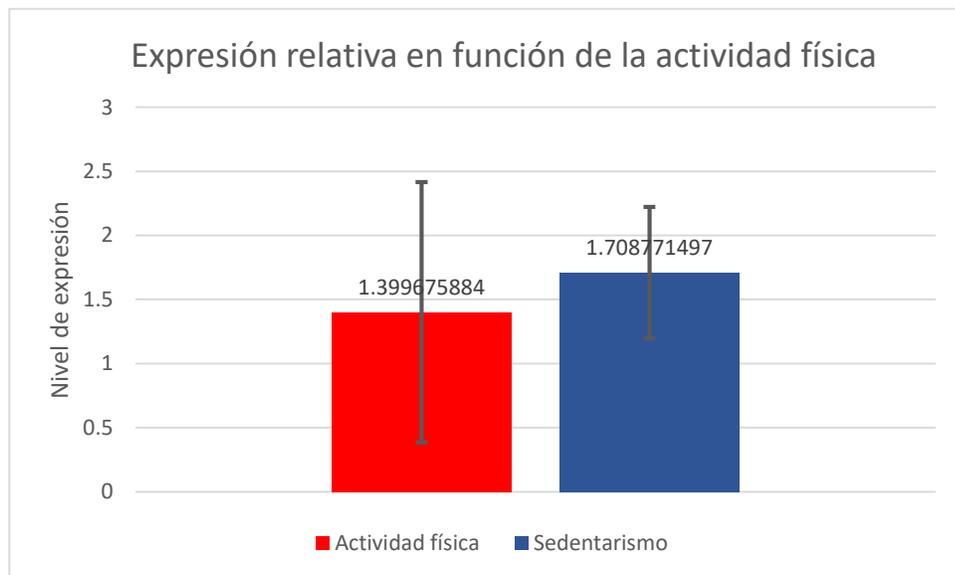


Figura 11. Comparativo de la expresión relativa del gen *FTO* en los participantes con actividad física y participantes con sedentarismo U de Mann-Whitney $P = 0.833$.

En los gráficos anteriores (Figura 10 y 11) se aprecia en promedio una menor expresión en los participantes con obesidad, sobrepeso y sedentarismo, con respecto a los participantes con normopeso y actividad física. Sin embargo los resultados no fueron estadísticamente significativos, podemos observar que las barras de desviación estándar se traslapan, lo que significa que no existe una diferencia verdadera, sin embargo esperamos que con un aumento en el tamaño de la muestra las diferencias se definan mejor y observemos el patrón de comportamiento propuesto en el modelo propuesto por Stratigopoulos y col. 2011. Donde los individuos con menor expresión de *FTO* son más propensos a padecer obesidad. A grandes rasgos, esto representa una mayor dificultad para alcanzar el sentido de saciedad, lo que conduce a una mayor ingesta de alimentos y a lo largo del tiempo un aumento en la masa corporal. Esto confiere mayor facilidad de padecer sobrepeso u obesidad en estas personas, en comparación con aquellos que presentan mayor expresión del gen *FTO*.

Epigenética

Con respecto a los estudios epigenéticos se logró modificar, amplificar y secuenciar 6 muestras. A continuación se muestra la secuencia normal y la secuencia convertida con bisulfito *in silico* donde se muestran las potenciales islas metilables de nuestra región de interés (Figura 12). Posteriormente se muestra las secuencias obtenidas (Figura 13).

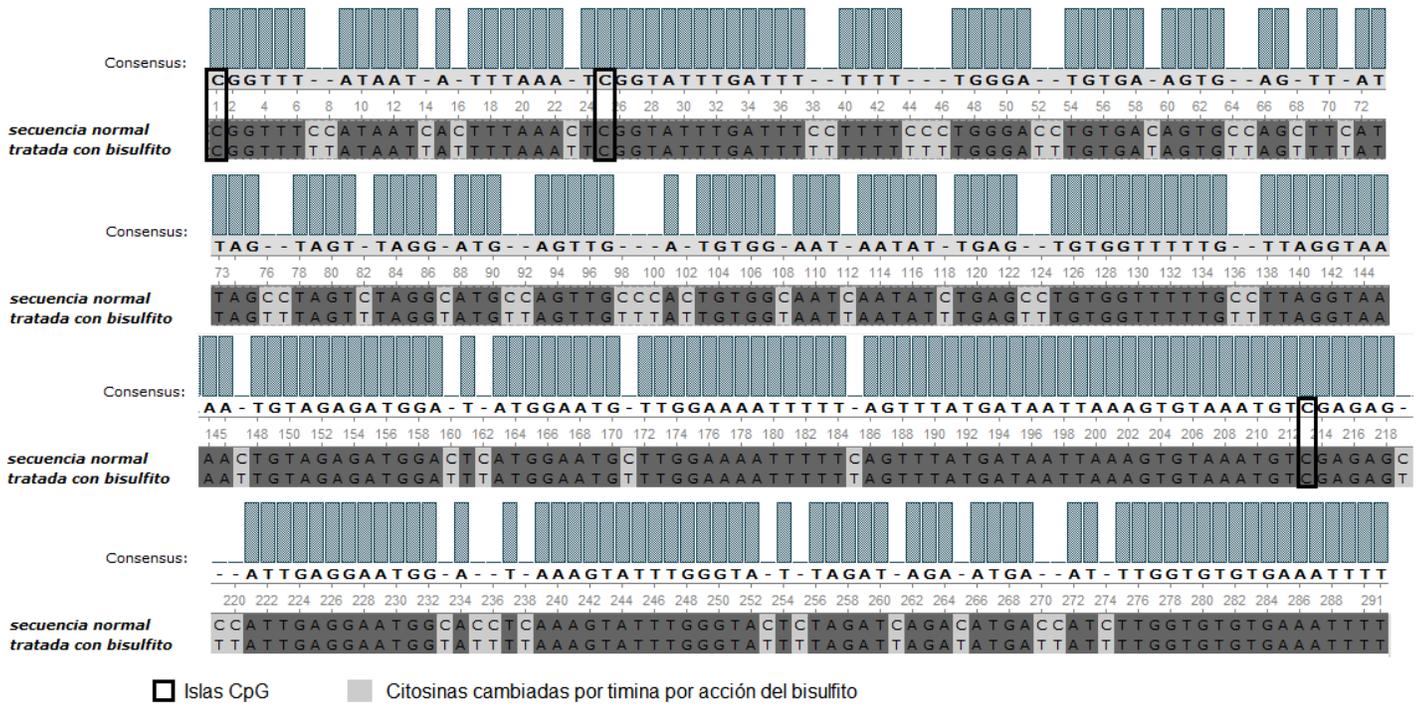


Figura 12. Comparación de la secuencia normal y secuencia tratada con bisulfito *in silico*.

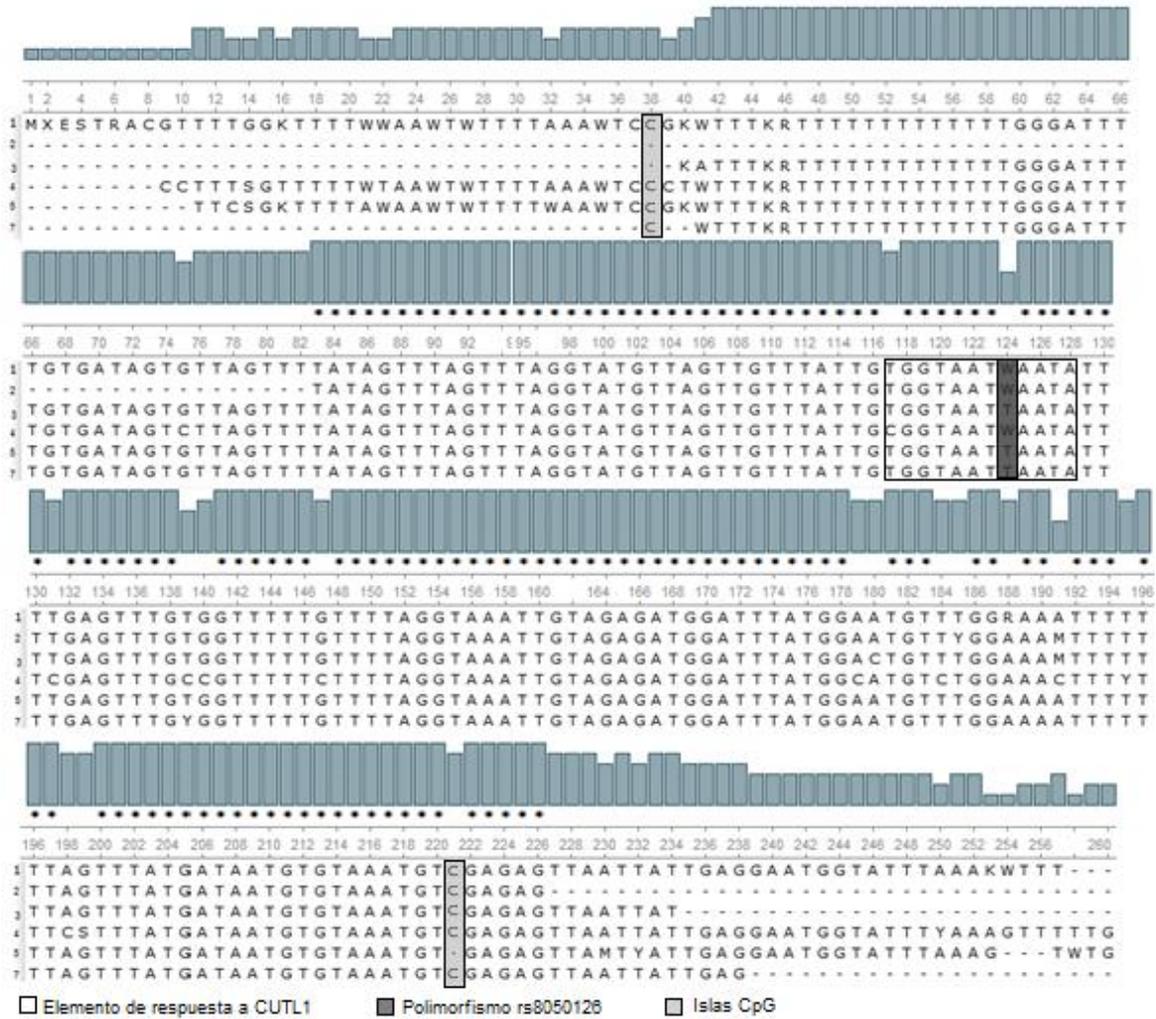


Figura 13. Comparación de las secuencias de metilación. Código para nomenclatura de nucleótidos A = Adenina, G = Guanina, C = Citosina, T = Timina, Y = C ó T, W = A ó T, R = A ó G, S = G ó C.

Se identificaron las dos últimas islas CpG rio abajo apartir del inicio de la secuencia de interés de las 3 que se esperaban (Figura 13). Podemos observar que la metilación se encuentra presente en estas dos islas, podemos observar que los participantes dos y tres no presentan secuencia en la primera isla rio arriba de rs8050136, de igual manera el participante cinco no muestra secuencia en la isla dos rio abajo de rs8050136. No obstante, esto no significa que no esté presente la metilación, sino falta de especificidad en el proceso de secuenciación en los extremos del amplicon. En resumidas cuentas, no podemos saber si la metilación está presente o no en estos individuos.

El tamaño de la muestra impidió realizar cualquier tipo de análisis, sin embargo, se logró estandarizar la técnica, lo cual representa un gran logro debido que fue un reto tanto técnico como de diseño experimental. Debido a las complicaciones de realizar la conversión de la secuencia y el diseñar los primers a partir de esta secuencia, pues *in silico* se teorizan ciertos cambios, sin embargo, *in vitro* no siempre ocurren estos cambios teorizados. Por lo tanto, el diseño de los primers fue meramente artesanal.

CONCLUSIONES

A pesar de que no se observó diferencias significativas en el nivel de expresión del gen *FTO*, en los participantes con obesidad, sobrepeso y sedentarismo con respecto a los participantes con normopeso y actividad física, un aumento del número de muestra podría ser suficiente para ver las diferencias esperadas.

El 51.7% de los voluntarios analizados porta el genotipo de riesgo (CA) para el polimorfismo rs8050136, también se encontró que los individuos portadores de este genotipo presentaron bajos niveles de HDL y menor actividad física ($p < 0.1$). Sin embargo, no se encontró relación con el IMC.

No se encontró metilación específica en el elemento de respuesta a CUTL1, tampoco relación con la regulación de *FTO*.

En resumen, no fue posible establecer una relación contundente entre la presencia del SNP rs8050136, la expresión del gen *FTO* y la metilación de la región reguladora. Sin embargo, se logró determinar que la metilación de otras islas contiguas a la región reguladora podrían estar participando en el control de la expresión de el gen *FTO*.

RECOMENDACIONES

1. Aumentar el tamaño de muestra.
2. Realizar el experimento de metilación específica en la región de aproximadamente 1kb, rica de islas CpG que comienza 400 pb río a bajo del elemento de respuesta a CUTL1.

BIBLIOGRAFÍA

Ahmad, T., Chasman, D. I., Samia, M., Paré, G., R, C. N., Buring, J. E., ... Lee, I.-M. M. 2010. The Fat-Mass and Obesity-Associated (FTO) Gene, Physical Activity, and Risk of Incident Cardiovascular Events in Caucasian Women. *National Institute of Health*, 31(9), 1713–1723.

Albuquerque, D., Nóbrega, C., & Manco, L. 2013. Association of FTO Polymorphisms with Obesity and Obesity-Related Outcomes in Portuguese Children. *PLoS ONE*, 8(1).

Arteaga, L. 2012. El sobrepeso y la obesidad como un problema de salud. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 23(2), 145–153.

Apal Sammy, Y. D., Ming, M. F., Rampal, S., Bulgiba, A., Mohamed, Z., Apal Sammy, Y. D., ... Mohamed, Z. 2012. Genetic association of SNPs in the FTO gene and predisposition to obesity in Malaysian Malays Genetic association of SNPs in the FTO gene and predisposition to obesity in Malaysian Malays, 45(December). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* (2012) 45: 1119-1126.

Aranda, C. M. A. 2009. EDITORIAL. *Salud Pública de México*, 51, 373–376.

Berulava, T., & Horsthemke, B. 2010. The obesity-associated SNPs in intron 1 of the FTO gene affect primary transcript levels. *European Journal of Human Genetics*, 18(9), 1054–1056.

Bolaños, M. G. V. 1999. La teoría de la transición epidemiológica. *Documentos de Investigación. Colegio Mexiquense*, (7), 1–11.

Canizales-quinteros, S. 2008. Aspectos genéticos de la obesidad humana. *Revista de Endocrinología Y Nutrición*, 16(1), 9–15.

Chen, A. Y., & Escarce, J. J. 2010. Family Structure and Childhood Obesity , Early Childhood Longitudinal Study — Kindergarten Cohort. *Prev Chronic Dis*. 2010 May; 7(3): A50.

Chomczynski, P. 1987. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Extraction. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY* 162, 156- 159 (1987).

Claussnitzer, M., Dankel, S. N., Kim, K.-H., Quon, G., Meuleman, W., Haugen, C., ... Kellis, M. 2015. FTO Obesity Variant Circuitry and Adipocyte Browning in Humans. *The New England Journal of Medicine*, 373(10), 895–907.

C. Nobrega y R. Rodriguez. 2014. *Molecular Mechanisms Underpinning the Development of Obesity*. Switzerland 2014. Springer. 193p.

CONEVAL, Consejo Nacional de Evaluación de la Política de Desarrollo Social. 2016. Resultados de pobreza en México 2016 a nivel nacional y por entidades federativas . Disponible en: <https://www.coneval.org.mx/Medicion/Paginas/PobrezalInicio.aspx> (Fecha de acceso: enero de 2018).

Dina, C., Meyre, D., Gallina, S., Jacobson, P., Durand, E., Ko, A., ... Che, J. 2007. Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nature Genetics* volume 39, pages 724–726 (2007).

Durán, P. 2004. Nutrición temprana y enfermedades en la edad adulta : acerca de la “ hipótesis de Barker .” *Arch.argent.pediatr*, 102(1), 26–34.

E. L. Rosado, J. B. Monteiro, V. Chaia y M. F. do Lago. 2006. Efecto de la leptina en el tratamiento de la obesidad e influencia de la dieta en la secreción y acción de la hormona. *Nutrición Hospitalaria*, 21(6), 686–693.

Esther, R. S. L. 2003. 4. *Revista Cubana Endocrinología*.

Ezquerro, E. A., Castellano, J. M., & Alegría, A. 2008. Obesidad , síndrome metabólico y diabetes : implicaciones cardiovasculares y actuación terapéutica. *Revista Española de Cardiología*, 61(7), 752–764.

Fausto Guerra Josefina, Valdez López Rosa María, A. R. M. G. y L. Z. M. del C. 2006. Antecedentes históricos sociales de la obesidad en México. *Medigraphic Artemisa En Línea Antecedentes*, VIII, 91–94.

Fawcett, K. A. and I. B. 2010. The genetics of obesity : FTO leads the way. *Trends Genet*. 2010 Jun; 26(6): 266–274.

Fischer, J. 2008. On the History of Fto. *Obesity Facts* 2008;1:43–44.

Freathy, R. M., Timpson, N. J., Lawlor, D. A., Pouta, A., Ben-Shlomo, Y., Ruukonen, A., ... Frayling, T. M. 2008. Common variation in the FTO gene alters diabetes-related metabolic traits to the extent expected given its effect on bmi. *Diabetes*, 57(5), 1419–1426.

Graven, T., Girard, C. A., Tung, Y. L., Webby, C. J., Saudek, V., Hewitson, K. S., ... Schofield, C. J. 2009. Europe PMC Funders Group The Obesity-Associated FTO Gene Encodes a 2-Oxoglutarate – Dependent Nucleic Acid Demethylase. *Science* . 2007 November 30; 318(5855): 1469–1472.

Goodarzi, M. O. 2017. Series Obesity 1 Genetics of obesity : what genetic association studies have taught us about the biology of obesity and its complications. *THE LANCET Diabetes & Endocrinology*, 8587(17), 1–14.

Halliday, J. A., Palma, C. L., Mellor, D., Green, J., & Renzaho, A. M. N. 2013. The relationship between family functioning and child and adolescent overweight and obesity : a

systematic review, (October). *International Journal of Obesity* volume 38, pages 480–493 (2014).

Hosseini-Esfahani, F., Koochakpoor, G., Daneshpour, M. S., Sedaghati-Khayat, B., Mirmiran, P., & Azizi, F. 2017. Mediterranean dietary pattern adherence modify the association between FTO genetic variations and obesity phenotypes. *Nutrients*, 9(10), 1–13.

H K Lim, Derek R Maher, E. (2010). SAC review DNA methylation: a form of epigenetic control of gene expression. *The Obstetrician & Gynaecologist*, 12(12), 37–4237.

Jia, G., Yang, C. G., Yang, S., Jian, X., Yi, C., Zhou, Z., & He, C. 2008. Oxidative demethylation of 3-methylthymine and 3-methyluracil in single-stranded DNA and RNA by mouse and human FTO. *FEBS Letters*, 582(23–24), 3313–3319.

José Antonio Maradona Hidalgo. 2010. Historia de las enfermedades infecciosas. Oviedo España. Universidad de Oviedo. 398 p.

Juan Oliva, Laura González , José M. Labeaga, C. Á. D. 2008. Salud pública , economía y obesidad : el bueno, el feo y el malo. *Gac Sanit*, 22(6), 507–510.

Klok, M. D., Jakobsdottir, S., & Drent, M. L. 2006. The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans : a review. *Obes Rev.* 2007 Jan;8(1):21-34

Kumate, J. 2002. La transición epidemiológica del siglo XX : ¿ vino nuevo en odres viejos ? *REVISTA DE LA FACULTAD DE MEDICINA*, 45.

Lee, H., Duffey, K. J., Kim, C., & Popkin, B. M. 2013. The relationship between family and child weight status by household structure in South Korea : 2007 – 2010. *Nutrition & Diabetes*, 3(6), e73-5.

Lera, M. J. 2002. La naturaleza social del ser humano, 1–59. Capítulo IV. La naturaleza social del ser humano Paradigmas en la Educación y el Desarrollo.

Li, H., Wu, Y., Loos, R. J., Hu, F. B., Liu, Y., Wang, J., ... Lin, X. 2008. Variants in the fat mass- and obesity-associated (FTO) gene are not associated with obesity in a Chinese Han population. *Diabetes*, 57(1), 264–268.

Life Technologies Corporation. 2012. Amplification Efficiency of TaqMan Gene Expression Assays, 2–7.

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4), 402–408.

Maes, H. H. M., Neale, M. C., & Eaves, L. J. 1997. Genetic and environmental factors in relative body weight and human adiposity. *Behavior Genetics*, 27(4), 325–351.

Monclús, A. P. 2011. La naturaleza humana en Aristóteles. *Espíritu LX*, (141), 35–50.

Moreno, A., & Sandoval, K. 2013. Pasado indígena y mestizaje. *Cuicuilco* vol.20 no.58 México sep./dic. 2013

Moreno, G. M. (2018). Definición y clasificación de la obesidad. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 23(2), 124–128.

OMS, Organización Mundial de la Salud. (2017), Enfermedades no Transmisibles. Disponible en: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>. (Fecha de acceso: febrero 2018).

OMS, Organización Mundial de la Salud. (2018), Obesidad. Disponible en: <http://www.who.int/topics/obesity/es/> (Fecha de acceso: abril 2018).

OMS, Organización Mundial de la Salud. (2018), Actividad física. Disponible en: <http://www.who.int/dietphysicalactivity/pa/es/> (Fecha de acceso: abril 2018).

Origen fetal de enfermedades expresadas en la edad adulta Fetal origins of adult diseases. 2010. *ACTUALIZACIÓN EN NUTRICIÓN*, 11(4), 303–314.

Pablo Alejandro Rendón Delcid. 2016. PRESENCIA DEL SNP RS8050136 DE FTO EN POBLACIÓN SONORENSE Y SU RELACIÓN CON LA OBESIDAD, LA DIETA, LA CONDICIÓN METABÓLICA Y LA ACTIVIDAD FÍSICA. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo Sonora.

Park, H., & Ahima, R. S. 2015. Physiology of leptin: energy homeostasis, neuroendocrine function and metabolism. *Metabolism*, 64(1), 24–34.

Peters, T., Ausmeier, K., & Ru, U. 1999. Cloning of Fatso (Fto), a novel gene deleted by the Fused toes (Ft) mouse mutation. *Mammalian Genome* 10, 983–986 (1999).

Puche, R. C. 2005. El Índice de Masa Corporal y los razonamientos de un astrónomo. *Medicina*, 65(4), 361–365.

Ramos, R. B., Casanova, G. K., & Spritzer, P. M. 2012. Fat mass and obesity-associated gene polymorphisms do not affect metabolic response to hormone therapy in healthy postmenopausal women. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology*, 165(2).

Rosen, E. D., & Macdougald, O. A. 2006. Adipocyte differentiation from the inside out, 7(December), 885–896. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* volume 7, pages 885–896 (2006).

Ruizé, P., Cock, J. M., Bern, U., Worden, A. Z., & Peer, Æ. Y. Van De. 2008. The FTO Gene , Implicated in Human Obesity , Is Found Only in Vertebrates and Marine Algae Vertebrates and Marine Algae. *J Mol Evol* (2008) 66:80–84.

Sällman, M., Jacobsson, A., Moschonis, G., Benedict, C., Chrousos, G. P., Fredriksson,

R., & Schiöth, H. B. 2012. Genomics Genome wide analysis reveals association of a FTO gene variant with epigenetic changes. *Genomics* Volume 99, Issue 3, March 2012, Pages 132-137.

Saucedo, R., Valencia, J., Gutierrez, C., Basurto, L., Hernandez, M., Puello, E., ... Zarate, A. 2017. Gene variants in the FTO gene are associated with adiponectin and TNF-alpha levels in gestational diabetes mellitus. *Diabetology and Metabolic Syndrome*, 9(1), 1–7.

Shamah-Levi, T., Cuevas-Nasu, L., Dommarco-Rivera, J., & Hernandez-Avila, M. 2016. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016. (ENSANUT MC 2016). *Instituto Nacional de Salud Pública, 2016*(Ensanut).

Song, Y., You, N., Hsu, Y., Howard, B. V, Langer, R. D., Manson, J. E., ... Liu, S. 2009. FTO Polymorphisms Are Associated With Obesity but Not Diabetes Risk in Postmenopausal Women. *Obesity* (Silver Spring). 2008 Nov;16(11):2472-80.

Srivastava, A., Srivastava, N., Mittal, B., Prakash, J., Srivastava, P., & Srivastava, N. 2016. Association of rs9939609 and rs1421085 with Obesity Risk in North Indian Population. *International Physiology*, 4(2), 45–48.

Stratigopoulos, G., Leduc, C. A., Cremona, M. L., Chung, W. K., & Leibel, R. L. 2011. Cut-like Homeobox 1 (CUX1) Regulates Expression of the Fat Mass and Obesity-associated and Retinitis Pigmentosa Genes and Coordinates Leptin Receptor Signaling. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* VOL. 286, NO. 3, pp. 2155–2170, January 21, 2011

Tang, Q. Q., & Lane, M. D. 2012. Adipogenesis: From Stem Cell to Adipocyte. *Annual Review of Biochemistry*, 81(1), 715–736.

Tejero, M. E. (2008). Artemisa Genetics of obesity. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* vol.65 no.6 México nov./dic. 2008.

Vicente Manzano Arrondo. 2013. El tamaño de la muestra. Disponible en <http://asignatura.us.es/dadpsico/apuntes/TamMuestra.pdf>. (Fecha de acceso: mayo 2018).

Watanabe, S.-Y., Iga, J.-I., Numata, S., Nakataki, M., Tanahashi, T., Itakura, M., & Ohmori, T. 2012. Association Study of Fat-mass and Obesity-associated Gene and Body Mass Index in Japanese Patients with Schizophrenia and Healthy Subjects. *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience: The Official Scientific Journal of the Korean College of Neuropsychopharmacology*, 10(3), 185–189.

Yun Qian, Sijun Liu, Feng Lu, Huizhang, Meihua Dong, Yudi Lin, Jiangbo Du, Yuan Lin, Jianhang Gong, Guangfu Jin, Juncheng Dai, Zhibin Hu and Hongbing Shen. 2013. Genetic variant in fat mass and obesity-associated gene associated with type 2 diabetes risk in han chinese. *BMC Genetics*, 14, 2–7.

ANEXOS		# Muestra	Δ CT	$\Delta\Delta$ CT	Expresión relativa
En las siguientes los resultados de la del gen constitutivo problema <i>FTO</i> gen constitutivo		19	-5.12	-1.35	2.55
		86	-3.81	-0.04	1.03
		44	-3.09	0.68	0.62
		15	-4.34	-0.57	1.00
		12	-3.20	0.57	1.00
		64	-4.89	-1.12	2.17
		84	-4.77	-1.00	2.00
		34	-4.09	-0.32	1.25
		94	-3.99	-0.22	1.16
		59	-4.73	-0.96	1.95

tablas se muestran expresión génica *β ACTINA* y el gen respectivamente.

Tabla A1. CT del *β ACTINA*.

# Muestra	CT por triplicado			Promedio	Desviación Estándar
19	27.26	27.1	27.28	27.21	0.10
86	29.34	28.36	28.19	28.63	0.62
44	26.69	27.24	27.07	27	0.28
15	28.45	28.84	28.06	28.45	0.39
12	29.05	29.79	28.86	29.23	0.49
64	28.32	29.8	28.58	28.9	0.79
84	30.09	30.83	30.04	30.32	0.44
34	29.03	27.99	28.05	28.36	0.58
94	28.41	29.3	29.46	29.06	0.57
59	27.18	26.62	28.49	27.43	0.96

Tabla

A2. CT del gen problema *FTO*.

Tabla A3. Δ CT, $\Delta\Delta$ CT y Expresión relativa para cada muestra

# Muestra	CT por triplicado			Promedio	Desviación estándar
19	31.89	32.27	32.84	32.33	0.49
86	33.48	31.99	31.84	32.44	0.91
44	29.7	31.15	29.42	30.09	0.93
15	32.14	32.97	33.25	32.79	0.58
12	32.34	32.61	32.36	32.44	0.15
64	33.34	34.46	33.57	33.79	0.59
84	35.34	34.56	35.38	35.09	0.46
34	32.84	31.12	33.39	32.45	1.18
94	32.54	32.94	33.66	33.05	0.57
59	31.99	31.85	32.65	32.16	0.43