



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS  
FACULTAD DE MEDICINA



SECRETARIA DE DOCENCIA  
JEFATURA DE POSGRADO

**Búsqueda de nuevos polimorfismos en el dominio de unión al ADN de  
PPAR $\gamma$  en voluntarios estudiantes de Medicina de la UAEM con  
dislipidemias.**

TESIS

Que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular

Presenta

Q. B. P. Gabriela Salgado Cortez

Director de tesis:

Dr. Jesús Santa Olalla Tapia

Cuernavaca, Morelos, México a mayo del 2020.

**Lugar y fecha de realización de tesis:**

Cuernavaca, Morelos, México a mayo del 2020.

**Miembros del comité tutorial:**

Tutor principal: Dr. Jesús Santa Olalla Tapia.

Tutor personal: Dra. Luz María González Robledo.

1° Vocal: Dra. Alma Ethelia López Caudana

2° Vocal: Dr. José Santos Ángeles Chimal.

3° Vocal: Dr. Juan José Acevedo Fernández

**Miembros del jurado de examen:**

Presidente: Dr. Armando Herrera Arellano

Secretario: Dr. José Santos Ángeles Chimal

1° Vocal: Dra. Luz María González Robledo

2° Vocal: Dra. Alma Ethelia López Caudana

3° Vocal: Dr. Jesús Santa Olalla Tapia

### **Agradecimiento de fuentes de financiamiento:**

- Laboratorio de Biología de Células Troncales de la Universidad Autónoma de Morelos



### **Proyecto de tesis vinculado a:**

- Estudio GEMM (Genética de las Enfermedades Metabólicas en México): Bases Genómicas del Metabolismo Postprandial



FACULTAD DE MEDICINA

Secretaría de Docencia

Jefatura de Posgrado

Cuernavaca, Mor., 28 de julio de 2020.

**Dra. Vera Lucia Petricevich**

Directora

Facultad de Medicina

Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "Búsqueda de nuevos polimorfismos en el dominio de unión al ADN de PPAR $\gamma$  en voluntarios estudiantes de Medicina de la UAEM con distipdemtas", que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Gabriela Salgado Cortez. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 110 del Reglamento de Posgrado de la UAEM le otorgo:

**Dictamen l se aprueba el trabajo de tesis tal como se presenta.**

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

**Atentamente**

**Dr. Armando Herrera Arellano**

Calle Lañeros esquina Itzacihuatl s/n Col. Volcanes. C.P. 62350. Cuernavaca, Morelos, México.  
Tel. (777)3 29-3473 • jefatura\_posgrado.medicina@uaem.mx

**UA  
EM**

Una universidad de excelencia

RECTORÍA  
2017-2023



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

**Sello electrónico**

ARMANDO HERRERA ARELLANO | Fecha:2020-09-10 18:50:47 | Firmante  
s+R4eC32/wYj1p11C1w0G8QpQ4kZRDCA17F09PWH4egpG21cZT5XLUjyqG5vK4qj675y1Q9Wk1E2u96Pz3Z95Uc20ytm0QhV50L3+bk/vz1D6n1bcaEjub85uJkRw7Ckukj  
v42Qn072jV5C8BDVCh65QzJ2U8gpeG5B78Po15x1DAuNksu10gtTA1d19acEJyhtvlykYSHWYkC2NePeTEDkolepWY15UacDL214Lop05YCPopu00z9eK1z61FwRfpQjWR  
UH4ALM27a19e1DvxaQ5Rm2vQa1DmR8nFshdFv611dKPyVK1PyAALTRKVDue\*\*

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



110ZPI

<https://firma.uaem.mx/hoReputio/TL0k2nug1740k06E1C1u1q2ojGMsa>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA  
2017-2023



FACULTAD DE MEDICINA

Secretaría de Docencia

Jefatura de Posgrado

Cuernavaca, Mor., 27 de julio de 2020.

**Dra. Vera Lucia Petricevich**  
Directora  
Facultad de Medicina  
Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Búsqueda de nuevos polimorfismos en el dominio de unión al ADN de PPAR $\gamma$  en voluntarios estudiantes de Medicina de la UAEM con dislipidemias**", que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Gabriela Salgado Cortez. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 110 del Reglamento de Posgrado de la UAEM le otorgo:

**Dictamen I se aprueba el trabajo de tesis tal como se presenta.**

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

**Atentamente**

**Dr. José Santos Ángeles Chimal**

Calle Leñeros esquina Itzacibua s/n Col. Volcanes, C.P. 62350. Cuernavaca, Morelos, México.  
Tel. (777) 3 29-3473 • jefatura\_posgrado.medicina@uaem.mx

**UA  
EM**

*Una universidad de excelencia*

RECTORÍA  
2017-2021



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

**Sello electrónico**

JOSE SANTOS ANGELES CHIMAL | Fecha:2020-07-30 11:40:24 | Firmante  
UN2a3naEKdva8GN1a1tTajnpu+Algvr1+2oal0SXBRS/Ud73KA6pbv5NTTJJNmT2qgM72D9XaxTAonCR1YWy#te1Xk5WwUZNGOul8u7XoQCEvTZDa8NAID8mhUoGKvX  
BRE3yC1ETm1+XoCQeHEDJw+PUlqzQheMOCCONumFRA2bSpV6elnEMoJui8BqRR/m1g0Ph8TTgCAj7Wk0uRbN0a3TCI+u00QGRQ8gVpc8c1K3yC0ggp9eQ2w88M  
u1ea8huR3mC51GxJDNH0XR9q2VUFp2EPJULQmAsyInotgFS10Im7qTVaSRw\*\*

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



Lovyub

<https://efirma.uaem.mx/hoReputio/6c2k09DD12QoJWhUGQK7Cz1BcYms>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA  
2017-2023



FACULTAD DE MEDICINA

Secretaría de Docencia

Jefatura de Posgrado

Cuamavaca, Mor., 28 de julio de 2020.

**Dra. Vera Lucia Petricevich**  
Directora  
Facultad de Medicina  
Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "Búsqueda de nuevos polimorfismos en el dominio de unión al ADN de PPAR $\gamma$  en voluntarios estudiantes de Medicina de la UAEM con distlipidemias", que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Gabriela Salgado Cortez. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 110 del Reglamento de Posgrado de la UAEM le otorgo:

**Dictamen l se aprueba el trabajo de tesis tal como se presenta.**

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

**Atentamente**

**Dra. Luz María González Robledo**

Calle Loferos esquina Itzacohualli s/n Col. Volcanes. C.P. 62350. Cuamavaca, Morelos, México.  
Tel. (777)3 29-3473 • jofatura\_posgrado.medicina@uaem.mx

**UA  
EM**

Una universidad de excelencia

RECTORÍA  
2017-2023



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

**Sello electrónico**

LUZ MARIA GONZALEZ ROBLEDO | Fecha:2020-08-11 16:18:31 | Firmante  
 beUwGtcLg/L+60qqFbP0QAsogeRVImo5Zr668bMnLlvGzU09bnkP50ZD8U0pwTV0CUwDpC6eVA70nRnATD49O1EZZFNy+SMKq7X+Nule30H3OdehMa0902+5jDw  
 Rp5KNCZ7+G6Aq9H4Tuv4Hta03V80wa27cy9V6dHURXUR5mk3nU+18LuofnMSNz1R5R18kNEPy105f8Mp8L26DmbqYdZ6e+1V0P4QZ3nuJDrQH+DnYqK7wvC6e  
 vR1bb2+GcZ@hw3VgaMLQZMOWPypFP6e05WuL6JESLO+RIGgOhwUOCbhpKA7jUw\*\*

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
 escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



P00AZm

<https://efirma.uaem.mx/Reputacion/Ww/Ko080jDk0ZCa3Rj5MNeZover0010>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA  
 2017-2023



FACULTAD DE MEDICINA

Secretaría de Docencia

Jefatura de Posgrado

Cuernavaca, Mor., 28 de julio de 2020.

**Dra. Vera Lucia Petricevich**  
Directora  
Facultad de Medicina  
Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "Búsqueda de nuevos polimorfismos en el dominio de unión al ADN de PPAR $\gamma$  en voluntarios estudiantes de Medicina de la UAEM con dislipidemias", que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Gabriela Salgado Cortez. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 110 del Reglamento de Posgrado de la UAEM le otorgo:

**Dictamen l se aprueba el trabajo de tesis tal como se presenta.**

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

**Atentamente**

**Dra. Alma Ethelia López Caudana**

Calle Lañeros esquina Itzacoatlalli s/n Col. Volcanes. C.P. 62350. Cuernavaca, Morelos, México.  
Tel. (777)3 29-3473 • jefatura\_posgrado.medicina@uam.mx

**UA  
EM**

*Una universidad de excelencia*

RECTORÍA  
2017-2022



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

**Sello electrónico**

ALMA ETHELIA LÓPEZ CAUDANA | Fecha: 2020-08-10 17:56:56 | Firmante  
 IBAHgwT0avz15VEJn7CA19epZkFPgN2d7me4k5BacyUeMhavoGeCEwV33OOL7T1eVhLnlYkKQeYdURmuW09ic+5Z3yulRuz+VWa3oZTJEIwQjn+HvH89KZzDeWjNov  
 zYolOkpVEEz13rON2Ljy7V8iVvH1B2vL544eeGu3Bu54M9Dn5Dkcl+6TnU0jFap8GZbPTP0RAcToyolHu5MogReavlgOT0AcAzcCgrUkgWle+KTMZ1VTJp8yHodZamH0g  
 ENYc4LMSLoL5mWndVQaMD4CnPo7oCJw6Ruln6gurgnlymav6hZGg/yGnTMsuWA\*\*

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
 escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



MRYLm

<https://firma.uaem.mx/hoReputio65rM9u654DCgFb5UoW8X35HCq5G9C>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA  
 2017-2023



FACULTAD DE MEDICINA

Secretaría de Docencia

Jefatura de Posgrado

Cuernavaca, Mor., 28 de julio de 2020.

**Dra. Vera Lucia Petricevich**

Directora

Facultad de Medicina

Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "Búsqueda de nuevos polimorfismos en el dominio de unión al ADN de PPAR $\gamma$  en voluntarios estudiantes de Medicina de la UAEM con dislipidemias", que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Gabriela Salgado Cortez. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 110 del Reglamento de Posgrado de la UAEM le otorgo:

**Dictamen l se aprueba el trabajo de tesis tal como se presenta.**

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

**Atentamente**

**Dr. Jesús Santa Olalla Tapia**

Calle Lofanos esquina Itzacoatl s/n Col. Volcanes. C.P. 62350. Cuernavaca, Morelos, México.  
Tel. (77 7) 3 29-3473 • jefatura\_posgrado.medicina@uaem.mx

**UA  
EM**

Una universidad de excelencia

RECTORÍA  
2017-2022



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

**Sello electrónico**

JESUS SANTA OLALLA TAPIA | Fecha:2020-08-10 17:28:48 | Firmante:  
NpuDF9GT0U7H1boatr9REyC UowPv3yC2HJzZaY1to4D54Y2+69X9C9CaACleMgADJcTosXlka6M96eAUZaOy6CbX3wpgU3zbt7RmRnH6pgELURpaxxyKu3ZDnrbhG/u  
pIqQw5IK7FFXZ+59bG1zfmZ1YkX5ncdPfbCTM7F2q3eVChGua9COPQw6bEgacej66+pyf9kImqNGwWDragZ0Z9kaN8TW8hQNgruFE DvCWV9e4CbeAp54G45E]  
eZue8UaXk9KUZPZuMieVVY8TKPqbiAo1K5rIeCNGGQm7ytC2ziNeubNUCMa6A\*\*

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



8Wkda

<https://firma.uaem.mx/holReputdoH6Qh4W7Ye8DnWEaVJz9TAnglPRbaGD>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA  
2017-2023

## AGRADECIMIENTOS

Mi mayor agradecimiento es a mi Dios por permitirme llegar a esta etapa de mi vida profesional y también permitirme terminar un posgrado aún con todas las dificultades que se presentaron.

Quiero agradecer a mi mamá Martha por su amor y consejos, a mis hermanas Diana y Arani por siempre apoyarme en todo momento y a mis sobrinitos Ángel, Valeria, Natalia y Gabriel por darme su amor y alegrar mis días.

En tercer lugar, quiero agradecer a mis compañeros: Susy, Víctor, Sandy, Sebastian, Christian, Edmundo, Óliver, Nichim, Gueorgui y Melissa, con quienes me apoyé para la realización de los experimentos y juntos hicimos muy amena la estancia en el laboratorio de Biología de Células Troncales. En este punto quiero agradecer especialmente a Alondra que sin su apoyo no hubiera sido posible la mayor parte de los procedimientos que se incluyeron en esta tesis. Un agradecimiento también a Elizabeth quien me compartió sus conocimientos de purificación de ADN.

Agradecimiento especial al Dr. Jesús Santa Olalla por ser un muy buen asesor de tesis, una persona estricta y exigente pero también muy paciente y comprensiva. Gracias por sus revisiones, sus correcciones, sus clases muy amenas y por explicarme “con manzanitas” cuando no lograba entender.

Otro agradecimiento a mis sinodales: Dra. Alma López, Dra. Luz María González, Dr. Juan José Acevedo y Dr. José Santos Chimal quienes durante todo el desarrollo del proyecto de investigación estuvieron ahí para evaluarme, darme sus ideas, correcciones y consejos para que pudiera ser posible la culminación de esta tesis. Al Dr. Armando Herrera quien me impartió clases particulares de Bioestadística y quien se incorporó al comité revisor de tesis con sus muy acertadas observaciones.

Me gustaría agradecer también al Dr. Fernando Zenteno quien tuvo toda la disponibilidad para apoyar en la parte de la asesoría médica que se incluyó en el proyecto de investigación. Por último y no menos importante, al contrario, las piezas clave para la realización de la presente tesis, fueron los alumnos de la Facultad de Medicina a quienes les agradezco su valiosa participación en nuestra investigación.

## Índice general

|   | Página |
|---|--------|
| Lista de figuras .....  | 18     |
| Lista de gráficos .....   | 19     |
| Lista de cuadros .....  | 20     |
| Lista de abreviaturas .....   | 21     |
| <b>1.0      Resumen</b> .....   | 24     |
| <b>2.0      Introducción</b> .....  | 25     |
| 2.1    Generalidades de PPARs .....   | 25     |
| 2.2    Dominios de PPAR $\gamma$ .....  | 26     |
| 2.3    Mecanismos de regulación transcripcional de PPAR $\gamma$ .....        | 28     |
| 2.3.1    Activación transcripcional de PPAR $\gamma$ .....                    | 28     |
| 2.3.2    Represión transcripcional de PPAR $\gamma$ .....                     | 30     |
| 2.4    Distribución en tejidos y funciones metabólicas de PPAR $\gamma$ ..... | 31     |
| 2.4.1    PPAR $\gamma$ en las células $\beta$ del páncreas .....              | 31     |
| 2.4.2    PPAR $\gamma$ en músculo liso-esquelético .....                      | 32     |
| 2.4.3    PPAR $\gamma$ en el hígado .....                                     | 32     |
| 2.4.4    PPAR $\gamma$ en el tejido adiposo .....                             | 32     |
| 2.5    Metabolismo de lípidos .....   | 33     |
| 2.5.1    Participación de PPAR $\gamma$ en el metabolismo de lípidos .....    | 36     |
| 2.6    Polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en PPAR $\gamma$ .....      | 37     |
| 2.7    Definición de dislipidemias .....                                      | 38     |
| 2.7.1    Clasificación de dislipidemias .....                                 | 39     |
| 2.7.2    Prevalencia de dislipidemias en adultos jóvenes .....                | 40     |
| 2.7.3    Factores de riesgo para el desarrollo de dislipidemias .....         | 41     |
| <b>3.0      Antecedentes</b> .....  | 43     |
| 3.1    Genes asociados a dislipidemias .....                                  | 43     |
| 3.2    Polimorfismos reportados del gen de PPAR $\gamma$ .....                | 45     |
| 3.2.1    Polimorfismos de PPAR $\gamma$ asociados a dislipidemias .....       | 46     |

|            |  |    |
|------------|--|----|
| <b>4.0</b> | <b>Planteamiento del problema</b> .....  | 48 |
| <b>5.0</b> | <b>Objetivos</b> .....   | 49 |
| 5.1        | Objetivo general .....   | 49 |
| 5.1.1      | Objetivos específicos .....  | 49 |
| <b>6.0</b> | <b>Hipótesis</b> .....   | 50 |
| <b>7.0</b> | <b>Metodología</b> .....   | 51 |
| 7.1        | Consideraciones éticas .....   | 54 |
| 7.2        | Consideraciones de bioseguridad .....  | 55 |
| 7.3        | Recursos .....   | 55 |
| 7.4        | Procedimientos de laboratorio .....  | 57 |
| 7.4.1      | Extracción de muestras sanguíneas .....  | 57 |
| 7.4.2      | Determinación del perfil lipídico .....  | 57 |
| 7.4.3      | Extracción y purificación del ADN .....  | 58 |
| 7.4.4      | Determinación del rendimiento y pureza del ADN .....   | 59 |
| 7.4.5      | Evaluación de la integridad del ADN .....  | 59 |
| 7.4.6      | Evaluación de amplificación de ADN .....   | 59 |
| 7.4.7      | Diseño de oligonucleótidos .....   | 60 |
| 7.4.8      | Amplificación del exón 5 de PPAR $\gamma$ .....  | 61 |
| 7.4.9      | Purificación de los productos de PCR .....   | 62 |
| 7.4.10     | Determinación del tamaño del producto de PCR purificado .....  | 63 |
| 7.4.11     | Secuenciación del dominio de unión a ADN de PPAR $\gamma$ .....  | 63 |
| 7.4.12     | Evaluación de calidad de las secuencias del dominio de unión a ADN de PPAR $\gamma$ .....                    | 64 |
| 7.4.13     | Alineamiento de secuencias con el dominio de unión a ADN de PPAR $\gamma$ .....                              | 65 |
| 7.4.14     | Alineamiento múltiple de las secuencias de nucleótidos con el dominio de unión al ADN de PPAR $\gamma$ ..... | 65 |
| 7.4.15     | Traducción nucleótido a proteína y alineamiento de aminoácidos ....  | 65 |
| 7.4.16     | Predictor de daño a la estructura y función de la proteína .....   | 65 |
| 7.5        | Análisis estadístico .....   | 66 |
| <b>8.0</b> | <b>Resultados</b> .....  | 67 |

|             |  |     |
|-------------|--|-----|
| 8.1         | Características generales de la población de estudio .....   | 68  |
| 8.2         | Extracción y purificación de ADN .....   | 71  |
| 8.2.1       | Determinación del rendimiento y pureza del ADN .....   | 71  |
| 8.2.2       | Evaluación de la integridad del ADN purificado .....   | 73  |
| 8.2.3       | Evaluación de la amplificación del ADN purificado .....  | 74  |
| 8.3         | Diseño de oligonucleótidos .....   | 74  |
| 8.4         | Amplificación del exón 5 de PPAR $\gamma$ .....  | 76  |
| 8.5         | Análisis de las secuencias de ADN .....  | 77  |
| 8.6         | Alineamiento múltiple de las secuencias de nucleótidos .....   | 78  |
| 8.7         | Traducción nucleótido a proteína y predictor de daño a la estructura<br>y función de la proteína .....           | 80  |
| <b>9.0</b>  | <b>Discusión</b> .....   | 84  |
| <b>10.0</b> | <b>Fortalezas y limitaciones</b> .....   | 91  |
| <b>11.0</b> | <b>Conclusiones</b> .....  | 92  |
| <b>12.0</b> | <b>Perspectivas</b> .....  | 93  |
| <b>13.0</b> | <b>Referencias bibliográficas</b> .....  | 94  |
| <b>14.0</b> | <b>Anexos</b> .....  | 103 |
|             | Anexo 1. Carta de consentimiento informado .....   | 103 |
|             | Anexo 2. Parámetros del diseño de oligonucleótidos para amplificar el exón 5 de<br>PPAR $\gamma$ .....           | 107 |
|             | Anexo 3. Alineamiento múltiple de secuencias.....  | 108 |
|             | Anexo 4. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la serie E-UDMM<br>con la proteína PPAR $\gamma$ ..... | 109 |
|             | Anexo 5. Cronograma de actividades .....   | 110 |

## Lista de figuras

|  | Página |
|--|--------|
| Figura 1 Estructura de los dominios de PPAR .....  | 27     |
| Figura 2 Modelo del complejo transcripcional PPAR: RXR .....   | 30     |
| Figura 3 Lipoproteínas y transporte normal de lípidos .....  | 35     |
| Figura 4 Lipogénesis mediada por genes blanco de PPAR $\gamma$ en el adipocito .....   | 37     |
| Figura 5 Metabolismo de lípidos en obesidad .....  | 41     |
| Figura 6 Código de nucleótidos de la secuenciación según la IUPAC .....  | 64     |
| Figura 7 Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% de ocho muestras de ADN de voluntarios de la serie E-UDMM .....  | 73     |
| Figura 8 Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de amplificación para GAPDH de ocho muestras de ADN de la serie E-UDMM .....              | 74     |
| Figura 9 Organización de exones y dominios de PPAR $\gamma$ .....  | 75     |
| Figura 10 Ubicación de los oligonucleótidos para amplificar el exón 5 de PPAR $\gamma$ .....   | 76     |
| Figura 11 Electroforesis en gel de agarosa al 2% de productos de amplificación para el exón 5 de PPAR $\gamma$ de 10 muestras de ADN de la serie E-UDMM... | 76     |
| Figura 12 Electroferograma de la secuencia E-UDMM-00114 .....  | 77     |
| Figura 13 SNPS reportados en el exón 5 de PPAR $\gamma$ .....  | 79     |

## Lista de gráficos

|  | Página |
|--|--------|
| Gráfico 1 Distribución de la población de estudio por sexo ..... | 68     |
| Gráfico 2 Prevalencia de tipos de dislipidemias por sexo .....   | 70     |
| Gráfico 3 Prevalencia de dislipidemias combinadas .....          | 71     |

## Lista de cuadros

|          | Página  |
|----------|---|
| Cuadro 1 | Valores de lípidos en sangre. .... 69   |
| Cuadro 2 | Frecuencias del rendimiento total del ADN purificado ..... 72   |
| Cuadro 3 | Frecuencias de los valores de pureza del ADN ..... 73   |
| Cuadro 4 | Identificación de SNPs en el exón 5 de PPAR $\gamma$ de las secuencias de la serie E-UDMM ..... 79                  |
| Cuadro 5 | Frecuencias de las nuevas variantes identificadas en el exón 5 de PPPAR $\gamma$ de las secuencias E-UDMM ..... 81  |
| Cuadro 6 | Cambio de nucleótido a aminoácido en PPAR $\gamma$ de las variantes identificadas en las secuencias E-UDMM ..... 82 |
| Cuadro 7 | Identificación de SNPs en los intrones 4 y 5 de PPAR $\gamma$ de las secuencias E-UDMM ..... 83                     |

## Lista de abreviaturas

|                 |   |
|-----------------|---|
| <b>ABC</b>      | Proteínas transportadoras dependiente de ATP (del inglés: ATP-Binding Cassete).                                   |
| <b>ABC-A1</b>   | Transportador con Dominio de unión a ATP-A1.  |
| <b>ACS</b>      | Acyl CoA sintasa (Del inglés: Acyl-CoA Synthetase)  |
| <b>ADN</b>      | Ácido Desoxirribonucleico.  |
| <b>AP2</b>      | Proteína de unión de ácidos grasos (del inglés: Adipocyte Protein 2).   |
| <b>Apo</b>      | Apolipoproteína   |
| <b>AQP7</b>     | Aquaporina 7 (del inglés: Aquaporin 7)  |
| <b>BLAST</b>    | Programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local (del inglés: Basic Local Alignment Search Tool). |
| <b>CAP</b>      | Proteína asociada a c-Cbl.  |
| <b>CBP/p300</b> | Proteína de unión a CREB (del inglés: CREB-Binding Protein).  |
| <b>CETP</b>     | Proteína transportadora de ésteres de colesterol (del inglés: Cholesteryl Ester Transfer Protein)                 |
| <b>DBD</b>      | Dominio de unión a ADN (del inglés: DNA-Binding Domain).  |
| <b>DR-1</b>     | Secuencia repetida directa 1 (del inglés: Sequence Identity of the Direct Repeats)                                |
| <b>ENSANUT</b>  | Encuesta Nacional de Salud y Nutrición.   |
| <b>FATP</b>     | Proteína transportadora de ácidos grasos (del inglés: Fatty Acid Transport Protein).                              |
| <b>FFA</b>      | Ácidos grasos libres (del inglés: Free Fatty Acids).  |
| <b>FGF</b>      | Factor de crecimiento de fibroblastos (del inglés: Fibroblast Growth Factor).                                     |
| <b>FOXO 1</b>   | Proteína FOXO1 (del inglés: forkhead box protein class O type 1)  |
| <b>GAPDH</b>    | Gliceraldehído 3 Fosfato Deshidrogenasa (del inglés: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)                    |
| <b>GK</b>       | Glicerol quinasa (del inglés: Glycerol Kinase)  |
| <b>GLUT</b>     | Transportador de glucosa (del inglés: Glucose transporter)  |
| <b>HAT</b>      | Histona acetiltransferasa.  |
| <b>HDAC</b>     | Histona desacetilasa (del inglés: histone deacetylase).   |

|                                |  |
|--------------------------------|--|
| <b>HDL</b>                     | Lipoproteínas de alta densidad (del inglés: High-density lipoprotein).   |
| <b>HMT</b>                     | Histona metil-trasferasa (del inglés: histone methyltransferase).  |
| <b>IBT</b>                     | Instituto de Biotecnología.  |
| <b>IDL</b>                     | Lipoproteínas de densidad intermedia (del inglés: Intermediate density lipoprotein).                             |
| <b>IMC</b>                     | índice de Masa Corporal.   |
| <b>IUPAC</b>                   | Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (del inglés: International Union of Pure and Applied Chemistry).  |
| <b>LBD</b>                     | Dominio de unión a ligando (del inglés: Ligand Binding Domain).  |
| <b>LCAT</b>                    | Lecitina-colesterol acil transferasa (del inglés: Lecitin Colesterol Acil Transferasa).                          |
| <b>LDL</b>                     | Lipoproteínas de baja densidad (del inglés: Low-density lipoprotein).  |
| <b>LDLR</b>                    | Receptor LDL.  |
| <b>LPL</b>                     | Lipoproteína lipasa  |
| <b>MAG</b>                     | Monoacilgliceroles.  |
| <b>N-Cor</b>                   | Co-receptor nuclear.   |
| <b>NCBI</b>                    | Centro Nacional para la Información Biotecnológica (del inglés: National Center for Biotechnology Information).  |
| <b>NPC1L1</b>                  | Proteína 1 del tipo Niemann-Pick C1 (del inglés: Niemann-Pick C1-Like 1).  |
| <b>NRs</b>                     | Receptores nucleares (del inglés: Nuclear receptor).   |
| <b>NTD</b>                     | Dominio N-terminal (del inglés: N- terminal domain)  |
| <b>PCR</b>                     | Reacción en Cadena de la Polimerasa (del inglés: Polymerase Chain Reaction)                                      |
| <b>PEPCK</b>                   | Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (del inglés: Phosphoenolpyruvate carboxykinase)                                 |
| <b>PLTP</b>                    | Proteína de transferencia de fosfolípidos (del inglés: Phospholipid transfer protein)                            |
| <b>PPAR</b>                    | Receptor Activador de la Proliferación de Peroxisomas (del inglés: Peroxisome Proliferator-Activated Receptors). |
| <b>RXR <math>\alpha</math></b> | Receptores de Ácido Retinoico X $\alpha$ (Retinoid X Receptor $\alpha$ ).  |

|                                |  |
|--------------------------------|--|
| <b>SMRT</b>                    | Silenciador mediador del ácido retinoico y del receptor de hormonas tiroideas (del inglés: Silencing mediator of retinoid hormone receptor). |
| <b>SNP</b>                     | Polimorfismos de Nucleótido Único (del inglés: Single Nucleotide Polymorphism).  |
| <b>TG</b>                      | Triglicéridos.   |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | Factor de necrosis tumoral alfa (del inglés: Tumor Necrosis Factor).   |
| <b>TZD</b>                     | Tiazolidinedionas.   |
| <b>UAEM</b>                    | Universidad Autónoma de Morelos.   |
| <b>UNAM</b>                    | Universidad Nacional Autónoma de México.   |
| <b>USSDNA</b>                  | Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA.   |
| <b>VLDL</b>                    | Lipoproteínas de muy baja densidad (del inglés: Very low density lipoprotein).   |

## 1.0 RESUMEN

**Introducción:** Las dislipidemias son un conjunto de padecimientos relacionados con alteraciones del metabolismo de los lípidos. En su desarrollo participan variantes alélicas de genes que regulan la homeostasis energética, entre estos está el Receptor Activador de la Proliferación de Peroxisomas (PPAR, del inglés: Peroxisome Proliferator-Activated Receptors). De los PPARs existen tres miembros: PPAR $\alpha$ , PPAR $\delta/\beta$  y PPAR $\gamma$ . PPAR $\gamma$  participa en el metabolismo de glucosa y lípidos y se expresa principalmente en tejido adiposo, donde regula la transcripción de genes blanco, incluidos: lipoproteína lipasa (LPL), proteína transportadora de ácidos grasos (FATP), Acyl CoA sintasa (ACS), glicerol quinasa (GK), entre otros. Se han descrito polimorfismos en PPAR $\gamma$  relacionados con la presencia de dislipidemias. **Objetivo:** Identificar la presencia de nuevos SNPs en el dominio de unión a ADN de PPAR $\gamma$  y determinar su frecuencia en voluntarios estudiantes de Medicina de la UAEM con dislipidemias. **Métodos:** Se incluyeron 52 voluntarios de 18 a 25 años, estudiantes de Medicina de la UAEM, con dislipidemias. Se purificó el ADN con la técnica del fenol con cloroformo. Se diseñaron oligonucleótidos en el programa “Oligo Calculator” de NCBI específicos para el exón 5 de PPAR $\gamma$  (mayor parte del dominio de unión al ADN (DBD)). Se realizó la amplificación mediante PCR punto final. Los productos de la amplificación se secuenciaron por el método de Sanger y se analizaron en el programa *Sequence Scanner v.2*. El análisis estadístico fue descriptivo, con cálculo de medidas de tendencia central, de dispersión y de proporciones, con el software *Stata v14.2*. **Resultados:** Se incluyeron 20 hombres (38.5%) y 32 mujeres (61.5%), con edad promedio de 20.3 años (DE=  $\pm 1.7$ ). La dislipidemia con mayor frecuencia fue hipoalfalipoproteinemia (75%). Se identificaron 13 variantes nuevas en el exón 5 de PPAR $\gamma$  con frecuencias de 3.3 a 13.3%. Según el software *PolyPhen-2* la predicción del efecto de la estructura y función de la proteína fue "probablemente dañino" en la mayoría de los SNPs no sinónimos identificados. **Conclusión:** Se identificaron nuevos SNPs en el exón 5 que comprende la mayor parte del DBD de PPAR $\gamma$ . La mayoría de los SNPs fueron predichos como potencialmente dañinos para la estructura y función de la proteína de PPAR $\gamma$ .

## 2.0 INTRODUCCION

Las dislipidemias son un conjunto de padecimientos relacionados con alteraciones del metabolismo de los lípidos, las cuales forman parte del Síndrome Metabólico y se asocian con enfermedades cardiovasculares. En su desarrollo participan variantes alélicas de genes que alteran los niveles de expresión o la actividad de proteínas involucradas en la homeostasis energética. Una proteína que se encuentra en tejidos como hígado, páncreas, tejido adiposo y músculo, donde participa principalmente en la regulación de su diferenciación y del metabolismo de glucosa y lípidos, es el Receptor Activador de la Proliferación de Peroxisomas (PPAR, del inglés: Peroxisome Proliferator-Activated Receptors).<sup>1</sup>

PPAR es un factor de transcripción miembro de la familia de receptores nucleares que se expresa en diferentes tejidos incluyendo hígado,<sup>2</sup> corazón,<sup>3</sup> páncreas<sup>4</sup> y tejido adiposo,<sup>5</sup> en el cual desarrolla un papel importante en la adipogénesis y el metabolismo de lípidos y carbohidratos, principalmente PPAR $\gamma$ . Se tiene registro de que varias mutaciones localizadas en los diferentes dominios de la proteína de PPAR $\gamma$  se relacionan con niveles anormales de lípidos en sangre, hipertensión, obesidad, resistencia a la insulina y diabetes.<sup>6</sup>

### 2.1 Generalidades de PPARs.

Los PPAR pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares (NRs, por sus siglas en inglés: Nuclear receptor) que funcionan como factores de transcripción, regulan la expresión de genes que participan en la homeostasis del metabolismo. Participan induciendo o reprimiendo genes involucrados en la adipogénesis, metabolismo de lípidos, glucosa, proteínas, balance energético e inflamación.<sup>7</sup> Existen tres miembros de la familia: PPAR $\alpha$ , PPAR $\delta/\beta$  y PPAR $\gamma$ ; cada uno de estos se codifica por genes independientes, que pueden a su vez generar variantes por procesamiento alternativo, que le brindan además la posibilidad de proporcionar distintos patrones de expresión y actividad en diferentes tejidos.<sup>8</sup>

PPAR $\alpha$  se expresa en tejidos como hígado, corazón y tejido adiposo marrón, tiene un rol importante en el metabolismo de lípidos regulando la expresión de genes que codifican

proteínas involucradas en la captación celular de ácidos grasos libres, su oxidación y el tráfico celular de colesterol, además se ha visto que tiene una actividad antiinflamatoria. La oxidación de ácidos grasos tienen lugar en organelos especializados: en los peroxisomas y mitocondria la  $\beta$ -oxidación y en microsomas la  $\omega$ -oxidación.<sup>5,7</sup>

PPAR $\delta/\beta$  tiene un patrón de expresión ubicua, con niveles mayores en hígado, intestino, pulmones, tejido adiposo marrón, piel, cerebro y músculo esquelético, donde regula el catabolismo, transporte y almacenamiento de lípidos, además puede expresarse en endotelio vascular, donde reduce la expresión de mediadores de inflamación y moléculas de adhesión, contribuyendo de esta manera a la atenuación de la aterogénesis.<sup>9,10</sup>

PPAR $\gamma$  es indispensable para inducir el crecimiento y diferenciación de adipocitos, facilita el metabolismo de glucosa y lípidos al incrementar la sensibilidad a la insulina en tejidos periféricos, además ejerce un efecto antiinflamatorio por la reducción de la expresión de TNF- $\alpha$ . Una característica interesante es su distribución tisular limitada: abundante en tejido adiposo y presente en niveles muy bajos en otros tejidos<sup>5,9,10</sup>. Se subdivide en cuatro isoformas: PPAR $\gamma$ 1 expresada en corazón, músculo, colon, hígado, páncreas y bazo; PPAR $\gamma$ 2 expresado principalmente en tejido graso; PPAR $\gamma$ 3 expresado en macrófagos, intestino delgado y tejido adiposo blanco; y PPAR $\gamma$ 4 expresado en células endoteliales.<sup>9</sup>

La afectación de la actividad de los PPARs puede llevar a desórdenes en el metabolismo de ácidos grasos y lípidos, patologías cardiovasculares e incluso resistencia a la insulina.<sup>11</sup>

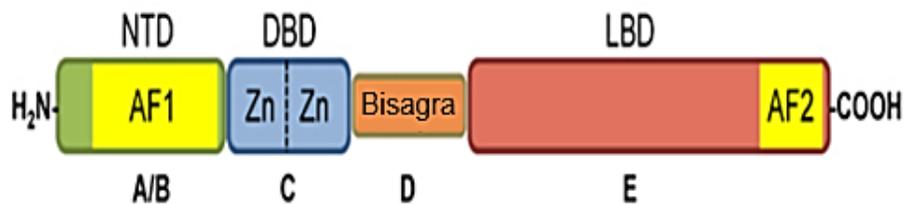
## **2.2 Dominios de PPAR $\gamma$ .**

El gen de PPAR $\gamma$  es el más estudiado de los PPARs, se localiza en el cromosoma 3 en la posición 3p25 y tiene un tamaño de 153,507 bp. Su organización genómica se caracteriza por tener seis exones codificantes para sus diferentes dominios estructurales: un exón para el dominio N-terminal (NTD, del inglés: N- terminal domain; también llamado dominio A/B), dos exones para el dominio de unión al ADN (DBD del inglés: DNA-Binding Domain o dominio C), un exón para la región de la bisagra (dominio D) y dos exones para el dominio

de unión a ligando (LBD, del inglés: Ligand Binding Domain, o dominio E). Estos dominios son regiones que guardan actividades o acciones independientes para la modulación de la señalización mediada por parte de PPAR $\gamma$  (figura 1).<sup>12-14</sup>

El NTD, es el más conservado a través de la evolución. Está compuesto principalmente por una  $\alpha$  hélice y tiene la función de activación transcripcional independiente de ligando (AF1). El DBD es altamente conservado y está compuesto por dos dedos de zinc que son los responsables de la unión del receptor a su elemento de respuesta, ubicado en el promotor de los genes blanco. En los dedos de zinc hay motivos estructurales de aminoácidos que reconocen la secuencia del DNA que se va a unir al receptor, además, una gran parte de este dominio participa en el reconocimiento de los Receptores de Ácido Retinoico X  $\alpha$  (RXR $\alpha$ ) que conforman el complejo PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$ . El dominio D es el menos conservado, es una bisagra entre los dominios DBD y LBD, es un sitio de unión de cofactores y contiene la señal de localización nuclear, que es una secuencia reconocida por proteínas que determinan la reubicación de la proteína retenida en el citoplasma hacia el núcleo de la célula.<sup>12,13</sup>

El dominio más grande es el LBD localizado en C-terminal, contiene un fragmento llamado de transactivación dependiente del ligando 2 (AF2), que participa en el reclutamiento de cofactores de PPAR para contribuir a los procesos de transcripción de genes. Su estructura consta de 13 hojas  $\alpha$  hélices y una pequeña hoja  $\beta$  de cuatro cadenas que forman un gran “bolsillo” hidrófobo en forma de Y que representa la cavidad de unión del ligando.<sup>5,13</sup>



**Figura 1.** Estructura de los dominios de PPAR. El dominio N-terminal (NTD, dominio A/B), contiene la función de activación independiente del ligando (AF1). El dominio de unión al ADN (DBD, dominio C) contiene dos dedos de Zinc. La región de la bisagra (dominio D) es altamente flexible. El dominio de unión al ligando (LBD, dominio E) contiene la función de activación dependiente del ligando. Modificado de Poulsen *et al.*, 2012<sup>12</sup>.

## **2.3 Mecanismos de regulación transcripcional de PPAR $\gamma$ .**

PPAR $\gamma$  es un receptor nuclear que tiene la capacidad de unirse con una gran variedad de moléculas llamadas ligandos, lo que resulta en la inducción de modificaciones estructurales que favorecen el reclutamiento de coactivadores transcripcionales, con lo cual se forma un complejo que se une a regiones específicas del ADN. La modificación estructural varía de acuerdo con el tipo de ligando, ya sea natural o sintético, y esto determina el acoplamiento con el ADN y la acción biológica que puede dar origen, tanto de activación transcripcional, como de represión, es decir, presenta efectos contrarios dependientes del complejo heterodimérico que se establece.<sup>8</sup>

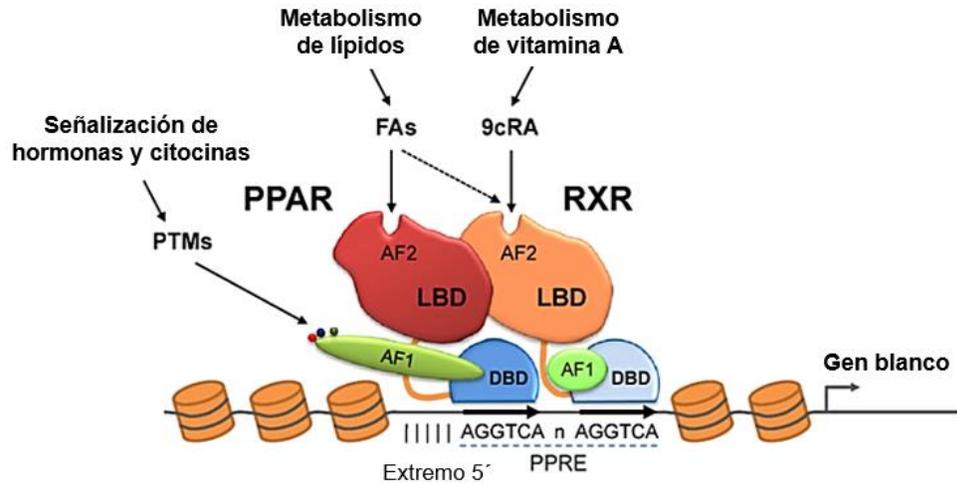
En la activación y represión transcripcional de PPAR $\gamma$  durante la adipogénesis, que es el proceso de diferenciación del adipocito, participan otros factores de transcripción. Entre ellos se encuentra C/EPB $\alpha$  (de sus siglas en inglés CCAAT/enhancer-binding protein type  $\alpha$ ) que induce la expresión de PPAR $\gamma$  y viceversa.<sup>15</sup> Por su parte FOXO 1 (del inglés: forkhead box protein class O type 1) suprime la diferenciación del tejido adiposo al inhibir la transcripción de PPAR $\gamma$ , este mecanismo ocurre mediante la interacción física entre PPAR $\gamma$  y su sitio promotor.<sup>16</sup>

### **2.3.1 Activación transcripcional de PPAR $\gamma$**

La actividad de PPAR $\gamma$  está estrechamente regulada en todos sus dominios. El dominio AF1 está implicado en la activación independiente del ligando de los genes diana de PPAR $\gamma$ , como se mencionó anteriormente, y alberga varios sitios para las modificaciones postraduccionales (ubiquitinación, O-Glucosil-N-Acetilación, fosforilación, acetilación, SUMOilación y S-nitrosilación). El LBD es esencial para la unión del ligando, la heterodimerización del receptor y la activación dependiente del ligando de los genes inducidos por PPAR $\gamma$ . El dominio AF2 albergado en el LBD, funciona como plataforma para las proteínas correguladoras.<sup>17-19</sup>

PPAR $\gamma$  se une al ADN a través de dos dedos de zinc en su DBD e identifican el ligando a través del “bolsillo” en su LBD. Después de su activación, a través de la unión a un ligando, PPAR $\gamma$  forma un complejo heterodimérico con el RXR $\alpha$ , que se une al elemento de respuesta del Receptor de la Proliferación del Peroxisoma (PPRE) dentro de los promotores de genes regulados por PPAR  $\gamma$  (figura 2); este proceso activa la transcripción del gen regulado. El motivo de PPRE tiene una secuencia característica de 13 nucleótidos, distribuidos en 2 hexanucleótidos separados por un nucleótido: AGGTCA N AGGTCA (N, puede ser cualquier nucleótido), la cual se conoce como secuencia repetida directa 1 (DR-1) en la cual cada uno de los componentes del complejo heterodimérico se une a un hexámero de DR1.<sup>12</sup> PPAR $\gamma$  y RXR $\alpha$  se unen con una orientación específica al ADN, PPAR $\gamma$  ocupa la mitad del sitio 5' del PPRE y RXR $\alpha$  reside en la mitad del sitio 3'.<sup>17</sup> El heterodímero PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$  puede ser activado por ligandos naturales y sintéticos. Los ligandos naturales incluyen ácidos grasos poliinsaturados, prostaglandinas J2 y fosfolípidos oxidados y en los ligandos sintéticos se incluyen a las tiazolidinedionas (TZD), siendo estos compuestos los que presentan alta afinidad para PPAR $\gamma$ , utilizados para incrementar la actividad de la insulina en pacientes diabéticos.<sup>10</sup> La transactivación de los PPARs se realiza a través de la función de activación del dominio dependiente del ligando 2 (AF2) en el LBD y la función de activación independiente del ligando 1 (AF1) en el dominio N terminal (NTD), lo que produce un cambio conformacional que permite la interacción con cofactores.<sup>12,13</sup>

La función más estudiada de PPAR $\gamma$  es la relacionada a la adipogénesis, donde participa como uno de los factores de transcripción en este proceso. Este factor de transcripción también regula la expresión de varias proteínas responsables de la acumulación de triglicéridos en los adipocitos, como es el caso de la proteína de unión de ácidos grasos AP2, la proteína transportadora de ácidos grasos (FATP, del inglés: Fatty Acid Transport Protein), la acil-CoA sintetasa (ACS) y la lipoproteína lipasa (LPL). Estos genes poseen un PPRE en sus regiones regulatorias.<sup>9</sup>



**Figura 2.** Modelo del complejo transcripcional PPAR:RXR. El heterodímero PPAR:RXR se une al elemento de respuesta del Proliferador del Peroxisoma (PPRE). Los PPARs son activados por ácidos grasos (FAs) y sus derivados, mientras que el RXR se activa por el ácido 9-cis retinoico (9cRA) y ciertos FAs. La actividad de los PPARs es activada aún más por modificaciones postraduccionales (PTMs, por sus siglas en inglés post translational modifications), incluyendo fosforilaciones, ubiquitinaciones y sumoilaciones, que se producen principalmente en el dominio N- terminal (NTD), pero también en otros dominios. Modificado de Poulsen *et al.*, 2012<sup>12</sup>.

### 2.3.2 Represión transcripcional de PPAR $\gamma$

PPAR $\gamma$  tiene la capacidad de suprimir respuestas transcripcionales a través de un proceso llamado transrepresión, cuyo mecanismo es muy poco conocido. Sin embargo, se sabe que en ausencia de un ligando, PPAR $\gamma$  recluta a proteínas co-represoras que suprimen la actividad transcripcional, proteínas tales como el mediador de los receptores de hormonas tiroideas y ácido retinoico (SMRT del inglés: Silencing Mediator of Retinoid Hormone Receptor) y el co-receptor nuclear (N-Cor), que se unen a enzimas represoras tales como histona desacetilasa (HDAC, del inglés: histone deacetylase), particularmente HDAC3 o la histona metil-trasferasa (HMT, del inglés: Histone Methyltransferase) SUV39H1 que metila específicamente la histona H3 en lisina 9 (H3K9), además el receptor que interactúa con la proteína 140 (RIP140, del inglés: Receptor Interacting Protein 140) también puede ser parte del complejo co-represor.<sup>6,20</sup>

La unión de ligandos exógenos y endógenos estimula la liberación del co-represor y el reclutamiento de co-activadores que contienen una proteína con actividad histona acetiltransferasa (HAT), tales como CBP/p300 (proteína de unión a CREB, CREB, proteína de unión al elemento de respuesta de AMPc) o SRC1 (etapa de des-represión). La unión a acetiltransferasas permite la relajación de la cromatina; por consiguiente, el complejo HAT se disocia y cualquier factor de transcripción o el complejo de iniciación de la RNA polimerasa II se reclutan sobre el promotor que esté disponible, iniciando de esta manera la activación de la transcripción del gen blanco (paso de activación de la transcripción). Las interacciones de PPAR $\gamma$  con un activador o co-represor regulan su actividad transcripcional por la alteración en la estructura de la cromatina a través de la acetilación o des-acetilación de histonas, respectivamente.<sup>13,20</sup>

#### **2.4 Distribución en tejidos y funciones metabólicas de PPAR $\gamma$ .**

El estudio de PPAR $\gamma$  es de particular interés debido a las funciones pleiotrópicas que desempeña. Tiene un papel crucial en la expresión de genes implicados en adipogénesis, metabolismo de lípidos y carbohidratos, arterosclerosis, inflamación y cáncer. Sus isoformas, la gran cantidad de genes diana, sus ligandos y co-reguladores contribuyen a determinar la complejidad de su función.<sup>21</sup>

##### **2.4.1 PPAR $\gamma$ en las células $\beta$ del páncreas.**

PPAR $\gamma$  mantiene la función de las células  $\beta$ , en las cuales regula directamente los genes clave implicados en la captación de glucosa, secreción de insulina y transcripción de genes de insulina. Es decir, regula los componentes de la vía clásica de secreción de insulina estimulada por glucosa.<sup>22</sup> PPAR $\gamma$  tiene una baja expresión en páncreas; a pesar de esto, juega un rol importante en la expansión de células  $\beta$  durante una dieta alta en grasas y después de una pancreatectomía parcial.<sup>12</sup>

#### **2.4.2 PPAR $\gamma$ en músculo liso-esquelético.**

El nivel de PPAR $\gamma$  es bajo en tejido músculo esquelético, en comparación con PPAR $\alpha$  y PPAR $\delta/\beta$ . Las funciones de PPAR $\gamma$  en músculo esquelético no se conocen por completo, estudios en ratones sugieren que está involucrado en el aumento en el manejo de los ácidos grasos y en el gasto energético.<sup>12</sup> Algunos estudios demuestran que la pérdida de PPAR $\gamma$  afecta la expansión de células troncales musculares y la miogénesis in vivo.<sup>23</sup>

#### **2.4.3 PPAR $\gamma$ en el hígado.**

La expresión de PPAR $\gamma$  en el hígado es muy baja, su función aún no está clara; se sabe que participa en el almacenamiento de lípidos, se ha demostrado en estudios en ratones que su expresión está regulada por dietas altas en grasas. Lo que sugiere que PPAR $\gamma$  podría estar implicado en la esteatosis hepática.<sup>12,24</sup> Además, se une a los promotores de hexoquinasa 2 y piruvato quinasa M para activar la transcripción, durante la glucólisis en hepatocitos.<sup>22</sup>

#### **2.4.4. PPAR $\gamma$ en el tejido adiposo.**

PPAR $\gamma$  en el tejido adiposo es necesario para la diferenciación, proliferación y funcionalidad de adipocitos; aumenta la captura de ácidos grasos y en consecuencia promueve su almacenamiento. Aumenta la sensibilidad de los adipocitos a la insulina y a la vez incrementa la utilización de la glucosa.<sup>8,12</sup> Es un factor conocido por su papel en la regulación de las vías adipogénicas y lipogénicas y es fundamental para controlar los genes implicados en la homeostasis de la glucosa, entre ellos el aumento de la expresión del transportador de glucosa 4 (GLUT 4) y la proteína asociada a c-Cbl (CAP). PPAR $\gamma$  controla la expresión de numerosos factores secretados por el tejido adiposo, tales como la adiponectina (implicada en la síntesis de glucosa hepática), la resistina, la leptina (implicada en el comportamiento de la alimentación) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ , del inglés: Tumor Necrosis Factor) a través de vías de señalización distintas y varios mecanismos diferentes para lograr el efecto de sensibilización a la insulina.<sup>21</sup>

Se han identificado dos miembros sensibles a PPAR $\gamma$  de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF1 y FGF21), que actúan localmente en el tejido adiposo para promover la sensibilización a la insulina en respuesta a dieta alta en grasas. El FGF21 y FGF1 adiposos actúan de manera autócrina para transducir localmente la señalización hacia PPAR $\gamma$  para mejorar la adipogénesis, también pueden actuar de manera parácrina o ambas para mediar en las acciones fisiológicas de PPAR $\gamma$ .<sup>21</sup>

## **2.5 Metabolismo de lípidos.**

Existen numerosos procesos metabólicos involucrados en la captura, transporte y almacenamiento de lípidos, que entran en función en el organismo ante la ingesta de alimentos que contienen grasas, en su mayoría en forma de triglicéridos, los cuales se hidrolizan en el intestino a ácidos grasos libres y 2-monoacilgliceroles (MAG) por la lipasa pancreática, posteriormente son absorbidos por los enterocitos a través de difusión pasiva y unidos al transportador específico CD36. Al mismo tiempo, el colesterol es introducido a los enterocitos a través de la Proteína 1 del tipo Niemann-Pick C1 (NPC1L1), un transportador específico. Dentro del enterocito, el colesterol se transforma en ésteres de colesterol, mientras que los ácidos grasos libres y MAG se reconvierten a triglicéridos. Por último, los ésteres de colesterol y los triglicéridos se empaquetan junto con fosfolípidos con la apolipoproteína (Apo B48, proteína estructural) para constituir a los quilomicrones, que son incorporados a la circulación general por el sistema linfático para que finalmente alcancen la circulación sanguínea y puedan ser incorporados al hígado o depositados en el tejido adiposo. En el hígado se sintetizan las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) que son ricas en triglicéridos, los cuales se incrementan postprandialmente, su estructura se asemeja a los quilomicrones con la diferencia de que en las VLDL la proteína estructural es la Apo 100. Los quilomicrones y las VLDL se distribuyen al corazón, tejido muscular esquelético y tejido adiposo para su gasto energético y almacenamiento.<sup>25</sup>

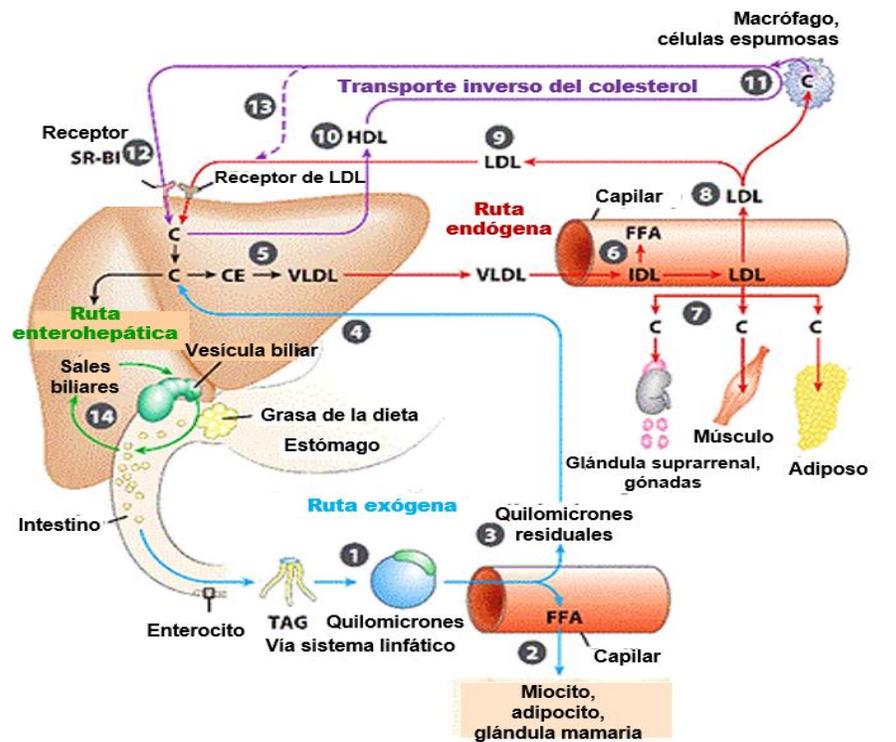
En la circulación sanguínea la hidrólisis de quilomicrones y VLDL por la lipoproteína lipasa da como resultado restos de quilomicrones, lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) y lipoproteínas de baja densidad (LDL), que se unen a receptores específicos en el hígado, el

receptor LDL (LDLR), receptor VLDL y proteínas relacionadas con receptores de LDL (LRP) participan para su remoción del plasma. En este mecanismo participan las lipasas del endotelio vascular, corazón, músculo, tejido adiposo y en el hígado la lipasa hepática, cuya función esta mediada por la acción de la insulina. Las LDL constituyen las principales transportadoras de colesterol plasmático hacia los tejidos.<sup>26,27</sup>

El transporte inverso del colesterol, es decir de los tejidos hacia el hígado para su metabolismo y excreción,<sup>28</sup> ocurre cuando las Apo A1 y Apo E incorporan colesterol y fosfolípidos para formar las partículas llamadas lipoproteínas de alta densidad (HDL). En este proceso participan las proteínas transportadoras ABC (Del inglés: ATP-binding cassette), siendo la ABCA1 la proteína clave de la membrana celular para la formación de nuevas partículas de HDL. Existen varias proteínas y enzimas que modulan la concentración del colesterol en la circulación sanguínea.<sup>25</sup> Las HDL capturan el colesterol y remanentes de colesterol desde tejidos periféricos, incluyendo macrófagos en la pared arterial, hasta el hígado.<sup>29</sup> El colesterol dentro de las HDL se esterifica en ésteres de colesterol por la asociación de las HDL a lecitina-colesterol acil transferasa (LCAT). En la circulación sanguínea las HDL también son enriquecidas con ésteres de colesterol por la acción de la proteína transportadora de ésteres de colesterol (CETP, del inglés: cholesteryl ester transfer protein), además la proteína de transferencia de fosfolípidos (PLTP, del inglés: Phospholipid transfer protein) transfiere fosfolípidos de las HDL a las VLDL y también hacia otras HDL. La principal función de las HDL es el intercambio de colesterol libre y su esterificación, esta lipoproteína es muy importante debido a que permite retornar el colesterol al hígado y de esta manera prevenir la aterogénesis.<sup>26,27,29</sup>

En la figura 3 se muestra el proceso de transporte de lípidos en el plasma sanguíneo a través de lipoproteínas, de las cuales existen diferentes tipos con diferentes funciones, composiciones en lípidos y proteínas; por lo tanto, diferentes densidades. En la ruta exógena (flechas azules), los lípidos de la dieta se empaquetan en los quilomicrones (1), la mayor parte de su contenido en triglicéridos es liberado por la lipoproteína lipasa en los tejidos adiposo y muscular durante el transporte a través de los capilares (2). Los quilomicrones residuales (3), que contienen principalmente proteína y colesterol, son captados por el hígado

(4). En la ruta endógena (flechas rojas) los lípidos sintetizados o empaquetados en el hígado se envían a los tejidos periféricos con la VLDL (5). En los capilares de estos tejidos, la lipoproteína lipasa cataliza la liberación de FFA, las VLDL se degradan a IDL al perder triglicéridos y se convierten en LDL que transportan el colesterol a tejidos como músculo, tejido adiposo y glándulas suprarrenales (7). Las LDL también suministran colesterol a los macrófagos, convirtiéndolos en ocasiones en células espumosas (8). Las LDL (9) no captadas por los tejidos periféricos retornan al hígado y son captadas por los receptores de LDL (10). En el transporte inverso del colesterol (flechas púrpuras) se sintetizan HDL en el hígado (10) y contienen poco colesterol y nada de sus ésteres, las HDL nacientes pueden captar colesterol de células extrahepáticas como macrófagos y células espumosas (11). La HDL madura, rica en colesterol, retorna al hígado donde descarga su contenido a través del receptor limpiador SR-BI (12). Parte de los ésteres de colesterol en las HDL también se pueden transferir a las LDL mediante la proteína convertidora de ésteres de colesterol (13). Las sales biliares producidas en el hígado ayudan a dispersar las grasas de la dieta y se vuelven a reabsorber en la ruta enterohepática (14) (flechas verdes). C: colesterol, CE: éster de colesterol, FFA: ácidos grasos libres.<sup>30</sup>

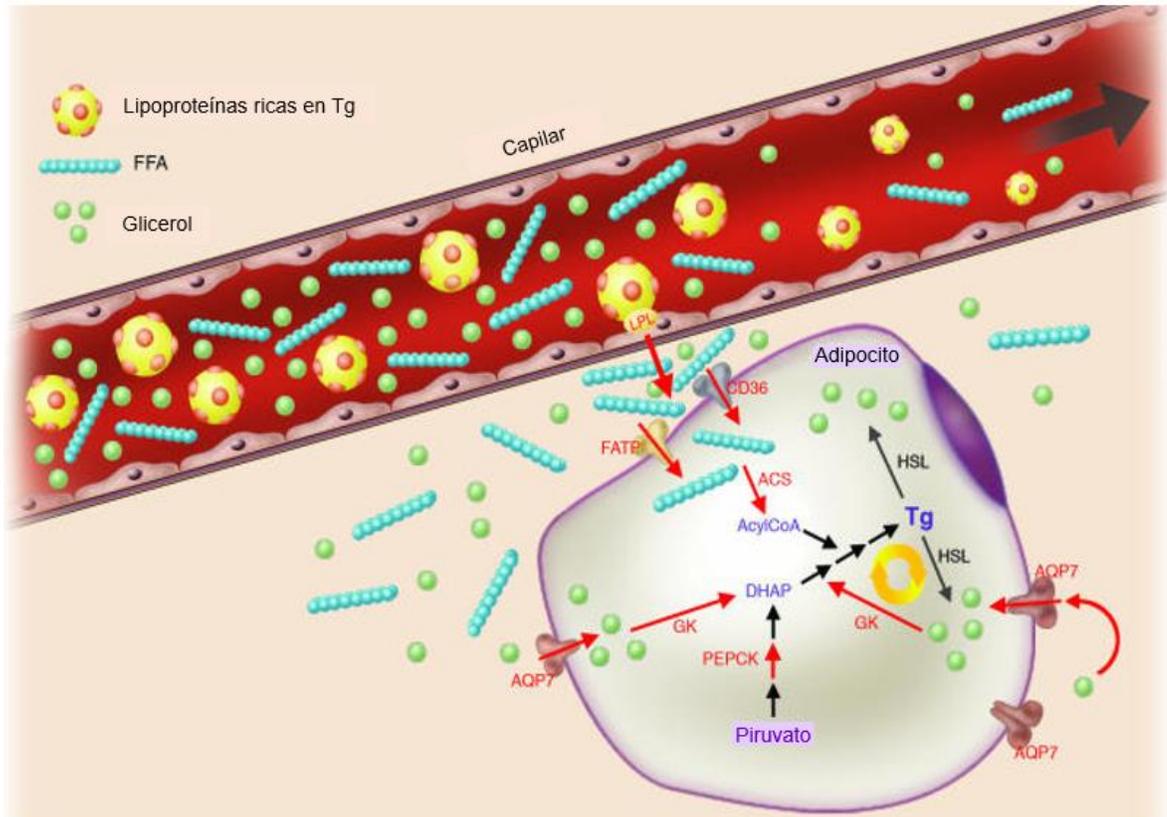


**Figura 3.** Lipoproteínas y transporte normal de lípidos. Para descripción de la imagen véase el texto. Modificado de: Nelson y Cox; 2014<sup>30</sup>

### 2.5.1 Participación de PPAR $\gamma$ en el metabolismo de lípidos.

PPAR $\gamma$  tiene una participación importante en el metabolismo de los lípidos del tejido adiposo. Se sabe que PPAR $\gamma$  regula positivamente la transcripción de genes involucrados en la mayoría de las etapas de la captación de ácidos grasos, entre estos genes se encuentran la lipoproteína lipasa endotelial (LPL, del inglés: lipoprotein lipase), la proteína transportadora de ácidos grasos (FATP, del inglés: fatty acid transport protein), CD36, la Acyl CoA sintasa (ACS, acyl-CoA synthetase), aquaporina 7 (AQP7, del inglés: aquaporin 7), el glicerol quinasa (GK, del inglés: glycerol kinase) y el fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK, del inglés: phosphoenolpyruvate carboxykinase). PPAR $\gamma$  incrementa la hidrólisis de triglicéridos de lipoproteínas mediante la LPL y la absorción de ácidos grasos libres (FFA, del inglés: free fatty acids) en los adipocitos a través de la FATP y CD36. PPAR $\gamma$  también modifica la síntesis de triglicéridos, comenzando con la esterificación de FFA por ACS. Las acciones de PPAR $\gamma$  reducen los niveles de FFA en el efluente venoso del tejido adiposo, limitando así la lipotoxicidad de otros tejidos sensibles a la insulina que podrían resultar de la exposición a FFA (figura 4).<sup>31</sup>

La utilización de fármacos, tales como tiazolidinedionas, agonistas de PPARs, favorecen su actividad al unirse a ellos, estudios realizados tanto en roedores como en humanos establecieron cuatro principales vías metabólicas afectadas por estos fármacos y describieron sus efectos sobre el metabolismo de las lipoproteínas: 1) inducción de la lipólisis de lipoproteínas como resultado de un aumento en la actividad intrínseca de la lipoproteína lipasa o una mayor accesibilidad de las partículas de lipoproteína ricas en triglicéridos para la lipólisis debido a un contenido reducido de lipoproteína apo C-III rica en triglicéridos, 2) limitación de la síntesis hepática de triglicéridos y la producción de VLDL debido a una mayor absorción de ácidos grasos, un eficiente catabolismo de ácidos grasos y reducción de su síntesis, 3) aumento de la eliminación de partículas de LDL como resultado de cambios en la composición de LDL en plasma y el consiguiente aumento de la afinidad de LDL por su receptor que conduce a un catabolismo mejorado de LDL y 4) aumento de la producción de HDL y estimulación del transporte inverso de colesterol.<sup>32,33</sup>



**Figura 4.** Lipogénesis mediada por genes blanco de PPAR $\gamma$  en el adipocito. PPAR $\gamma$  regula en la transcripción de genes que participan en el almacenamiento de FFA, algunos de estos se muestran en color rojo. PPAR $\gamma$  aumenta la hidrólisis de triglicéridos de las lipoproteínas mediante la expresión de LPL endotelial, los FFA son transportados a través de FATP y CD36 al interior del adipocito y el glicerol liberado es introducido por las proteínas AQP7. Dentro del adipocito, PPAR $\gamma$  facilita la síntesis de triglicéridos a través de la ACS que esterifica los FFA; además participa en la gliceroneogénesis, induciendo la actividad de la PEPCK para formar DHAP y favorece la expresión de GK para la síntesis de triglicéridos. Finalmente, la HSL facilita la liberación de glicerol de los triglicéridos dando lugar a un ciclo. De esta manera, PPAR $\gamma$  controla la gliceroneogénesis en el tejido adiposo y reduce la cantidad de FFA en la sangre.

Abreviaturas: LPL, lipoproteína lipasa endotelial; FATP, proteína transportadora de ácidos grasos; ACS, Acyl CoA sintasa; AQP7, aquaporina 7; GK, glicerol quinasa; PEPCK, fosfoenolpiruvato carboxiquinasa; HSL, lipasa sensible a las hormonas; DHAP, dihidroxiacetona fosfato; Tg, triglicéridos. Modificado de: Semple *et al.*, 2006<sup>31</sup>.

## 2.6. Polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en PPAR $\gamma$ .

Existen variaciones en la secuencia del gen de PPAR $\gamma$ , que consisten en el cambio de una sola base nucleotídica; comúnmente se refieren como polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, del inglés: Single Nucleotide Polimorphism), que para ser considerados como tales deben presentar una frecuencia de más del 1% en la población.<sup>34</sup>

Estos polimorfismos tienen una amplia distribución y pueden localizarse en cualquier parte de la estructura de los genes. Los SNP se dividen en tres grupos: 1) los SNPs codificantes (cSNP) sinónimos (en el cual el nucleótido no cambia el aminoácido) y no sinónimos (donde el nucleótido cambia el aminoácido) que se encuentran en los exones; 2) en SNPs reguladores (rSNP) que afectan a los elementos de respuesta que regulan la expresión génica, y 3) los SNP ARN estructurales (srSNP) que afectan a la estructura y función de los ARNm de genes que sintetizan proteínas.<sup>35</sup>

Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) conducen a un cambio en la secuencia de nucleótidos y en consecuencia es posible un cambio en la secuencia de aminoácidos que pueden afectar la estructura y/o función de la proteína, esto se asocia al desarrollo de enfermedades como dislipidemias, enfermedades cardiovasculares, obesidad y resistencia a la insulina.<sup>36,37</sup>

Existen herramientas automatizadas para predecir el posible impacto de la sustitución de aminoácidos en la estructura y función de una proteína humana que usan consideraciones físicas y comparativas directas, entre estos se encuentran el programa *PolyPhen-2*. Estas predicciones se basan en una serie de características secuenciales, filogenéticas y estructurales que caracterizan la sustitución. Clasifica la predicción en la proteína como: “probablemente dañino”, “posiblemente dañino” y “benigno”.<sup>38,39</sup>

## **2.7 Definición de dislipidemias.**

Las dislipidemias son un conjunto de enfermedades que se caracterizan por una concentración anormal de los lípidos, consisten en un incremento en ayuno o postprandial de la concentración sanguínea de triglicéridos, colesterol total, colesterol LDL, colesterol VLDL o la disminución en la concentración de HDL.<sup>40,41</sup> Estas enfermedades son el reflejo de alteraciones del proceso de transporte, almacenamiento o metabolismo de los lípidos necesarios para el adecuado funcionamiento de membranas biológicas y los requerimientos energéticos; por otra parte, las alteraciones en sus concentraciones se han vinculado con el desarrollo de aterosclerosis, diabetes, hipertensión y riesgo cardiovascular. Por ello es

conveniente estudiar cuáles con sus causas y los mecanismos involucrado en su desarrollo. Se consideran niveles sanguíneos normales de colesterol total a las concentraciones menores de 200 mg/dl, triglicéridos menores de 150 mg/dl, concentración de colesterol HDL mayor de 40 mg/dl en hombres y mayor de 50 mg/dl en mujeres.<sup>42,43</sup> La alteración de dichas concentraciones es lo que define a las diferentes dislipidemias.

### **2.7.1 Clasificación de dislipidemias.**

Las dislipidemias de acuerdo con la concentración y el tipo de lípido alterado pueden clasificarse en hipercolesterolemia (colesterol igual o mayor a 200 mg/dl), hipertrigliceridemia (trigliceridemia igual o mayor de 150 mg/dl), hipoalfalipoproteinemia (HDL menor de 40 mg/dl en hombres y menor de 50 mg/dl en mujeres) o dislipidemia mixta (colesterol total igual o mayor de 200 mg/dl, trigliceridemia igual o mayor de 150 mg/dl y LDL mayor o igual a 130 mg/dl).<sup>43,44</sup>

La hipercolesterolemia se determina por la concentración sanguínea elevada de colesterol total, puede ser también considerada como la elevación de partículas LDL, IDL y remanentes. Se ha demostrado que los niveles elevados de LDL muestran alto riesgo de desarrollar arterosclerosis y están asociados a cardiopatía isquémica.<sup>26</sup>

La hipoalfalipoproteinemia consiste en la concentración baja del colesterol presente en las HDL. Diversos estudios muestran que esta disminución tiene una relación inversa con las partículas de las VLDL, una afectación en la lipólisis de triglicéridos permite reducir los niveles de colesterol HDL, consecuencia del decremento de la transferencia de las apolipoproteínas y fosfolípidos al compartimiento de las HDL.<sup>41</sup> Niveles bajos de HDL son un poderoso factor de riesgo para enfermedades cardiovasculares aun en pacientes con colesterol LDL bajo.<sup>28</sup>

En la hipertrigliceridemia, la elevación de los triglicéridos es consecuencia del incremento en su producción y en la disminución de la eliminación de proteínas ricas en triglicéridos como son los quilomicrones y las VLDL, en estado o no de ayuno. Esta patología se considera

la anomalía lipídica preferente en la resistencia a la insulina, lo que puede deberse principalmente a que la insulina está involucrada en la producción y secreción de VLDL.<sup>40,41</sup> Por lo regular las dislipidemias son asintomáticas. En nuestro país, las más frecuentes son las relacionadas a niveles bajos de colesterol HDL y la elevación de triglicéridos.<sup>43</sup>

Un estudio realizado en México en 2008 dio a conocer que, en sujetos de apariencia sana de 35 a 65 años, la prevalencia de hipertrigliceridemia fue de 57.3%, de hipoalfalipoproteinemia 52.4% y de hipercolesterolemia de 48.7%; en sujetos con obesidad, 36.8% tenía hipertrigliceridemia/hipoalfalipoproteinemia, 35.2% dislipidemia mixta y 33.46% hipertrigliceridemia, observándose que su prevalencia en personas con resistencia a la insulina fue mayor.<sup>45</sup>

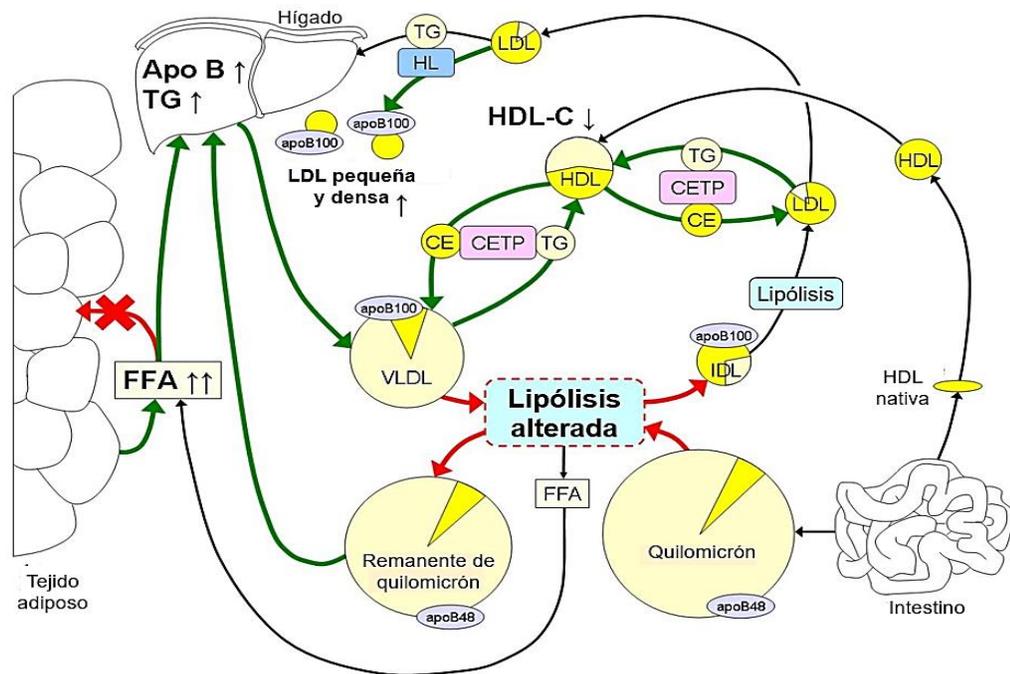
### **2.7.2 Prevalencia de dislipidemias en adultos jóvenes.**

En adultos mexicanos, la dislipidemia más frecuente es la hipoalfalipoproteinemia (estimada con HDL <40 mg/dl para hombres y mujeres) que tiene una prevalencia del 60.5%, seguida del LDL alto con una presencia del 46%; mientras que, la hipercolesterolemia se presenta en el 43.6% y la hipertrigliceridemia en el 31.5%. Las prevalencias son similares en los adultos jóvenes de 20 a 29 años, 61.9% para hipoalfalipoproteinemia (estimada con HDL <60 mg/dl para ambos sexos), 39.2 % para LDL alto, 36.8% para hipercolesterolemia y 22.3% para hipertrigliceridemia. Las dislipidemias agrupadas, es decir, la presencia conjunta de dos dislipidemias, pueden incrementar el riesgo cardiovascular, datos que se han observado también en personas jóvenes.<sup>46</sup> La elevación conjunta de colesterol y triglicéridos está asociada con el mayor riesgo aterogénico que se observó en el 10.6% y la presencia de hipertrigliceridemia con hipoalfalipoproteinemia incrementa el fenotipo aterogénico en el 16.9% de la población de entre 20 y 29 años.<sup>46</sup>

### 2.7.3. Factores de riesgo para el desarrollo de dislipidemias.

Entre los factores de riesgo se incluyen: presión arterial alta, tabaquismo, hiperglicemia, hábitos alimenticios no saludables, inactividad física, edad, sexo, etnicidad y genética.<sup>28</sup> La obesidad, especialmente la obesidad central, es probablemente una de las principales causas de dislipidemias.

Los cambios fisiopatológicos que participan en la disfunción del metabolismo de los lípidos favorecidos en la obesidad se muestran en la figura 5, con flechas verdes se indica el incremento de algún proceso metabólico, mientras que su reducción está indicada con flechas rojas.



**Figura 5.** Metabolismo de lípidos en obesidad. Explicación de la figura en el texto. Modificado de: Klop *et al.*, 2012.<sup>25</sup>

La hipertrigliceridemia es la causa mayor de hipertrigliceridemia en la obesidad y se debe al incremento en el retorno de FFA hacia el hígado, que da lugar al incremento de la acumulación hepática de triglicéridos (TG) y apolipoproteína B (Apo B). Por consecuencia se incrementa la síntesis hepática de VLDL, seguido de la imposibilidad de la lipólisis de

quilomicrones debido a la competencia por la lipoproteína lipasa (LPL) que permite un aumento de los triglicéridos remanentes que se transportan al hígado. La hipertrigliceridemia incrementa el cambio de ésteres de colesterol y triglicéridos entre las VLDL y las HDL y disminuye las LDL por la proteína transportadora de ésteres de colesterol (CETP), por lo cual hay una disminución en la concentración de HDL y la reducción de los triglicéridos contenidos en las LDL. Además, la lipasa hepática (HL) retira triglicéridos y fosfolípidos de las LDL para la formación final de pequeñas LDL empobrecidas de triglicéridos.<sup>25</sup>

La población mestiza mexicana es más susceptible a padecer concentraciones más bajas de HDL y más altas de triglicéridos en comparación con otros grupos étnicos, así como a padecer otros trastornos metabólicos como obesidad abdominal y diabetes.<sup>47</sup> Con respecto a las causas genéticas, en los estudios de asociación de todo el genoma (GWAS) y los consorcios de secuenciación del exoma se han identificado más de 175 loci implicados en el metabolismo de las lipoproteínas. En estos informes se identificaron variantes genéticas étnicas específicas localizadas en genes como ABCA1, MLXIPL, APOA5, APOC3, LPL, SIK3 y RORA, entre otros, que influyen en las concentraciones de triglicéridos y HDL. La variante étnica específica más estudiada es R230C de ABCA1, que tiene un efecto significativo sobre la concentración de lípidos en plasma y se asocia con una disminución del 30% del transportador ABCA1, que desempeña una función importante en la biogénesis de HDL.<sup>48</sup>

Entre las causas también participan los microRNA, encontrándose un total de 69 en un metaanálisis de GWAS para dislipidemias en más de 188,000 personas, localizados en regiones genómicas cercanas a los SNP identificados. Los estudios *in vitro* e *in vivo* evidenciaron que miR-130b y miR-301b influyen en el tráfico de lípidos mediante la modulación de la expresión de los genes LDLR y ABCA1.<sup>48</sup>

### 3.0 ANTECEDENTES

#### 3.1. Genes asociados a dislipidemias.

Existen más de cien genes que tienen un impacto directo en los niveles de lípidos y son capaces de establecer fenotipos complejos. Existe un grupo de genes conocido y bien caracterizado responsable del desarrollo de dislipidemias monogénicas, en la cual hay una variante en un solo gen que explica claramente el fenotipo.<sup>27</sup>

En estudios de GWAS se han identificado al menos 30 genes asociados a la hipertrigliceridemia, entre los que se incluyen genes de: la proteína 3 similar a la angiopoyetina (ANGPTL3, del inglés: Angiopietin-like 3), apolipoproteína B (APOB), LPL, APOA1, proteína de transferencia de fosfolípidos (PLTP, del inglés: Phospholipid transfer protein) y la familia de genes de la desaturasa de ácido graso (FADS1-FADS2-FADS3, del inglés: Fatty acid desaturase 1, 2 and 3). De igual forma, se han identificado por lo menos 27 genes asociados con niveles de HDL en sangre, entre ellos genes de: la cisteína peptidasa 4C relacionada con la autofagia (ATG4C, del inglés: Autophagy-related 4C, cysteine peptidase), la proteína reguladora de glucoquinasa (hexoquinasa 4) (GCKR, del inglés: Glucokinase (hexokinase 4) regulator), APOB, FADS1-FADS2-FADS3, ABCA1, lipasa hepática (LIPC, del inglés: Lipase hepatic), CETP y lipasa endotelial (LIPG).<sup>49</sup>

Entre los desórdenes monogénicos se encuentra la hipercolesterolemia familiar, es la dislipidemia monogénica más frecuente y causante de hipercolesterolemia severa, se caracteriza por un aumento moderado a severo de niveles de LDL debido a la disminución del aclaramiento de las partículas LDL secundario a mutaciones en los genes LDLR, Apo B, PCSK9 y LDLRAP1.<sup>27</sup> Las mutaciones en el gen LDLR son la causa más común de hipercolesterolemia familiar en México, entre los SNPs reportados se encuentran en las posiciones del gen: 682G> A (E228K), 1055G> A (C352Y) y 1090T> C (C364R).<sup>48</sup>

En la hipertrigliceridemia participan factores monogénicos y poligénicos que contribuyen a la elevación moderada (175 a 885 mg/dl) y severa (mayor de 885 mg/dl) de triglicéridos. El

nivel de triglicéridos depende de los remanentes de quilomicrones, VLDL y de las IDL.<sup>26,50</sup> La hipertrigliceridemia severa es un trastorno genético raro debido a mutaciones en los genes de LPL, APOCII, Apolipoproteína A-V (APOAV), proteína de unión a lipoproteína de alta densidad anclada a glucosilfosfatidilinositol 1 (GPIHBP1 del inglés: glycosylphosphatidylinositol anchored high density lipoprotein binding protein 1) o Factor 1 de maduración de la lipasa (LMF1, del inglés: Lipase maturation factor 1).<sup>26,51</sup> Ciertas investigaciones han identificado SNPs en genes causantes de hipertrigliceridemia severa. En LPL se identificaron tres mutaciones heterocigotas nuevas: G161E y V206A que fueron predichas como “probablemente dañinas” para la función de la proteína y A427T (rs5934) como “benigna”; en el gen GPIHBP1 se identificaron dos mutaciones sin sentido homocigóticas Q115P y C65Y con afectación en la función de la proteína al tener una ausencia completa de unión de LPL; y en el gen LMF1 se encontraron ocho nuevas variantes sin sentido, de estas, R264C, R354W, R364Q, R523H y P562R eran predichas como “probablemente dañinas”.<sup>51</sup>

La proteína APOA5 es un componente de las lipoproteínas HDL, VLDL y quilomicrones, activa la LPL para una eficiente lipólisis de triglicéridos; el alelo S19W (rs3135506) de este gen se ha asociado con un aumento de HDL y triglicéridos en pacientes con hipertensión arterial. La proteína FABP2 está implicada en la utilización de ácidos grasos en el intestino, y el alelo A54T (rs1799883) muestra una mayor afinidad por los ácidos grasos de cadena larga; por lo tanto, promueve la formación de quilomicrones y se ha asociado con el aumento de triglicéridos.<sup>52</sup>

Se ha examinado la asociación de SNP G2548A en la región promotora del gen de leptina, el SNP A223G localizado en el exón 4 del gen del receptor de leptina (LEPR, del inglés: Leptin receptor), el SNP T495G que se encuentra en el intrón 8 en el gen LPL y C34G localizado en el exón 8 del PPAR $\gamma$ , estos genes se han asociado a alteraciones en las concentraciones de lípidos en plasma como el incremento en la concentración de colesterol y triglicéridos.<sup>53</sup>

La hipoalfalipoproteinemia familiar se define como un nivel de colesterol HDL por debajo del percentil 10 sin una causa secundaria y asociado con antecedentes familiares-debida a mutaciones en genes como APOAI, LCAT y ABCA1; se sabe que más de 40 genes diferentes afectan los niveles de HDL.<sup>26,54</sup> Un estudio enfocado en la identificación de SNPs en ABCA1, encontró tres mutaciones nuevas (I659V, R2004K y A2028V) en sujetos con hipoalfalipoproteinemia; además, se identificó la variante R1068H (previamente reportada) en sujetos masculinos con HDL entre 11.6 y 30.2 mg/dl e hipertrigliceridemia quienes tenían enfermedad arterial coronaria.<sup>55</sup>

### **3.2. Polimorfismos reportados del gen de PPAR $\gamma$ .**

Diversas investigaciones en PPAR $\gamma$  lo han asociado a patologías metabólicas como obesidad, hipertensión, diabetes, resistencia a la insulina y dislipidemias. El SNP rs1801282 de PPAR $\gamma$  se asoció significativamente con Diabetes tipo 2 (OR = 1.64, IC95% 1.09–2.46, p= 0.01) en sujetos obesos de India mayores de 40 años.<sup>56</sup> Entre los polimorfismos que se han asociado con obesidad en voluntarios con diabetes tipo 2 están el rs8192673 encontrado en voluntarios femeninos (IC95%, p=0.008) y el polimorfismo rs1801282 (Pro12Ala) en población total caucásica (IC95%, p=0.015).<sup>57</sup>

Estudios previos demuestran que polimorfismos en los diferentes dominios de PPAR $\gamma$  se asocian a alteraciones en las concentraciones de lípidos. Una de las variantes más estudiada en PPAR $\gamma$  es rs1801282 (más conocida como Pro12Ala) que consiste en la sustitución de una citosina por una guanina (C>G) en el dominio de activación independiente del ligando, como resultado hay un intercambio de una prolina por una alanina en la posición 12 de la proteína que a su vez provoca una actividad transcripcional disminuida; esta variante es de importancia clínica debido a que se ha demostrado que puede aumentar el riesgo de enfermedad cardiovascular, diabetes tipo 2 y obesidad.<sup>58</sup>

En cuanto a las enfermedades cardiacas, el polimorfismo rs2933249 se asoció con mayor riesgo de hipertensión arterial (OR: 3.38, IC95%: 1.50–7.62) en una población china mayor

de 35 años y el SNP rs1152002 se asoció con susceptibilidad a enfermedad arterial coronaria en individuos con edad media de 62 años ( $P < 0.05$ ).<sup>59,60</sup>

Estudios previos han sugerido que PPAR $\gamma$  puede tener relación directa en el control del metabolismo de lípidos o relación indirecta al inducir la transcripción de genes blanco. Entre esos genes se incluyen el gen AP2 específico de tejido adiposo, de la lipoproteína lipasa (LPL), de la proteína transportadora de ácidos grasos (FATP) y el transportador con dominio de unión a ATP-A1 (ABC-A1). Existe asociación entre los polimorfismos 12351626 C/G y la 2415557 C/T con niveles altos de triglicéridos y colesterol total (IC95%,  $p=0.01$ ).<sup>58</sup>

### **3.2.1. Polimorfismos de PPAR $\gamma$ asociados a dislipidemias.**

Los polimorfismos de PPAR $\gamma$  se han identificado en sus diferentes dominios: NTD, DBD y LBD; además, se presentan en regiones intrónicas las cuales son no codificantes.<sup>58,61,62</sup> En el 2014, un estudio encontró asociación del polimorfismo ProAla con niveles altos de triglicéridos y colesterol, que tuvo una frecuencia de 26% en una población de 820 sujetos chinos; en el mismo estudio, se encontró el polimorfismo rs3856806 localizado en el dominio de unión al ligando (posición 96890 C>T) con una frecuencia del 15% y también asociado a hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia (IC95%,  $p=0.01$ ).<sup>58</sup>

Estudios previos con PPAR han identificado nuevos SNPs en el dominio AF1 que se asocian con dislipidemias en adultos aparentemente sanos del estado de Morelos, México. En una investigación hecha en el 2016 en voluntarios de 18 a 69 años, se identificaron 45 variantes alélicas, de las cuales solo cinco se habían reportados previamente. Algunas variantes estaban relacionadas con el aumento de lípidos, entre ellas la variante en la posición 97055 T>A, que contribuyó al aumento de triglicéridos en sangre, y la variante en la posición 97026 G>A, que se relacionó con el aumento de LDL. Simultáneamente, se encontraron variantes que se comportaron como protectoras al estar presentes en pacientes con valores más bajos de lípidos en sangre, como las variantes en las posiciones 96893 A>C y 96930 T>G, que se relacionaron con una disminución de triglicéridos. En este mismo estudio, se encontró que

24.8% de la población presentó hipercolesterolemia, 50% hipertrigliceridemia y 33.4% LDL elevado.<sup>63</sup>

Con respecto a los estudios realizados en el DBD de PPAR $\gamma$ , sitio de interés para nuestra investigación, están enfocadas a una enfermedad rara llamada Lipodistrofia Parcial Familiar (FPLD). Este padecimiento se caracteriza por la distribución anormal del tejido adiposo, las personas tienen acumulación de tejido adiposo en cara, cuello y abdomen y carecen de este tejido en brazos, piernas y caderas; su origen es genético con patrón de herencia autosómico dominante que se atribuye a mutaciones en siete genes, uno de ellos es PPAR $\gamma$  causante de FPLD tipo 3.<sup>17</sup> La variante rs12190925 (109852 T>A) que lleva a una sustitución de una cisteína por serina en el residuo 190 de la proteína (Cys190Ser) produce una pérdida de la capacidad de unión al ADN y por consiguiente presenta una disminución de la actividad transcripcional. Esta mutación se ha observado en casos de lipodistrofia parcial, donde las personas afectadas presentan pérdida de tejido adiposo en las extremidades y acumulación de grasa alrededor de la cara y cuello, además de diabetes tipo 2, hipertrigliceridemia, hipoalfalipoproteinemia y esteatosis hepática.<sup>64</sup> En el 2007 se analizó la variante en la posición 109864 C>T que condujo a la sustitución de Arg166Trp en la proteína de PPAR $\gamma$  isoforma 2; esta variante se identificó en una mujer turca de 31 años quien presentaba hipertrigliceridemia severa asociada a lipodistrofia parcial familiar, la mutación estuvo ausente en 100 voluntarios caucásicos sanos, y en este mismo estudio se observó que esta variante se encuentra en la región II del dedo de zinc donde interrumpe la unión al ADN y detiene la actividad transcripcional de la proteína, produciendo clínicamente las manifestaciones propias de la lipodistrofia.<sup>61</sup>

Hasta la fecha se han descrito 38 mutaciones en PPAR $\gamma$  asociadas a FPLD tipo 3: una en la región promotora, 16 en el DBD, tres en la región de la bisagra y 21 en el LBD.<sup>17</sup>

#### 4.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las dislipidemias son enfermedades multifactoriales, cuya importancia radica en que favorecen la aparición de alteraciones metabólicas como obesidad, resistencia a la insulina o diabetes y enfermedades cardiovasculares, las cuales representan serios problemas de salud pública. Mutaciones genéticas que favorecen estas enfermedades se han asociado con dislipidemias y su incidencia se ha incrementado a edades más tempranas.

La alteración de la actividad de genes como PPAR $\gamma$  proporcionada por variaciones alélicas, tiene impacto en el reclutamiento de cofactores que intervienen en la regulación de la transcripción de genes blanco que participan en la adipogénesis, el metabolismo de glucosa y lípidos. Si bien en diferentes partes del mundo se han hecho estudios enfocados en la búsqueda de polimorfismos en el gen de PPAR $\gamma$ , en el estado mexicano de Morelos no se han evaluado en dicho gen variantes alélicas propias de esa población. Por tal motivo, en este estudio se planteó la identificación de nuevos SNPs en el dominio de unión al ADN de PPAR $\gamma$ , región que estructuralmente es la más relevante para inducir la expresión de genes implicados en la adipogénesis y vías metabólicas, cuya alteración puede estar relacionada con la presencia de dislipidemias en población de 18 a 25 años. De acuerdo con lo anteriormente mencionado, se plantearon las siguientes preguntas:

- ✓ ¿Existen y cuáles son los nuevos SNPs en el dominio de unión al ADN de PPAR $\gamma$  en voluntarios estudiantes de Medicina de la UAEM con dislipidemias?
- ✓ ¿Cuál es la frecuencia de los nuevos SNPs en el dominio de unión al ADN de PPAR $\gamma$  en voluntarios estudiantes de Medicina de la UAEM con dislipidemias?

## **5.0 OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo general:**

Identificar la presencia. de nuevos SNPs en el dominio de unión a ADN de PPAR $\gamma$  y determinar su frecuencia en voluntarios estudiantes de Medicina de la UAEM con dislipidemias.

#### **5.1.1. Objetivos específicos:**

- ✓ Clasificar las dislipidemias en voluntarios estudiantes de Medicina de la UAEM.
- ✓ Identificar nuevos SNPs en el dominio de unión al ADN de PPAR $\gamma$  en los individuos participantes.
- ✓ Determinar la frecuencia de los nuevos SNPs en el dominio de unión al ADN de PPAR $\gamma$  en sujetos participantes.

## 6.0 HIPOTESIS

- ✓ En el dominio de unión al ADN del gen PPAR $\gamma$  hay dos nuevos polimorfismos de nucleótido único en voluntarios estudiantes de Medicina de la UAEM con dislipidemias.
- ✓ La frecuencia de los nuevos SNPs en el dominio de unión al ADN del gen PPAR $\gamma$  no será mayor al 5%.

## 7.0 METODOLOGIA

**Tipo de estudio:** Exploratorio de tipo transversal, de no intervención.

**Lugar y periodo:** Se realizó en Laboratorio de Biología Células Troncales de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, durante el periodo de septiembre de 2018 a noviembre de 2019.

**Población de estudio:** Esta investigación se enfocó en estudiantes de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

**Tamaño de muestra:** 50 voluntarios, dada la hipótesis de que se encontrarían dos nuevos SNPs en el fragmento del DBD de PPAR $\gamma$  que equivaldrían al 1% de la población incluida.

**Tipo de muestreo:** No probabilístico por conveniencia. Los voluntarios fueron invitados a participar en el estudio mediante pláticas de concientización.

**Criterios de inclusión, exclusión y eliminación:** Se incluyeron estudiantes de la Facultad de Medicina de la UAEM, con edades de 18 a 25 años, quienes tuvieran uno o más tipos de dislipidemia, que aceptaron participar voluntariamente y se sometieron al proceso de consentimiento informado. Los criterios de exclusión fueron: voluntarios que decidieran retirarse del estudio y aquellos con concentraciones de lípidos séricos normales. Y los criterios de eliminación fueron: muestras de voluntarios con insuficiente cantidad de ADN, mal etiquetadas y mal procesadas.

## Características de las variables.

| Nombre                                  | Tipología    | Definición conceptual   | Definición operacional  | Escala de medición | Unidad de medida |
|---|--------------|---|---|--------------------|------------------|
| Polimorfismo de un solo nucleótido, SNP | Cualitativa  | Es la variación en la secuencia de ADN que afecta una sola base (adenina, timina, citosina o guanina) de una secuencia del genoma, deben darse en al menos 1% en una población.   | Se realizó mediante secuenciación directa del ADN por la unidad de síntesis y secuenciación de ADN en el IBT de la UNAM, utilizando el secuenciador automático <i>Applied Biosystems</i> modelo 3130xl. | Nominal            | Presente/Ausente |
| Colesterol total                        | Cuantitativa | Es un esteroide que se encuentra en la membrana plasmática y los tejidos corporales de todos los animales y en el plasma sanguíneo de los vertebrados. Se sintetiza principalmente en el hígado y en la pared intestinal. | Se midió en suero por espectrofotometría automatizada, realizada en el laboratorio clínico Centro Hematológico de Morelos en el equipo Rx Imola de Randox.  | De razón           | mg/dl            |
| Lipoproteínas de alta densidad, HDL     | Cuantitativa | Son responsables del transporte inverso del colesterol de las células periféricas al hígado. Su concentración se relaciona inversamente con el riesgo de sufrir arterosclerosis.  | El colesterol unido a HDL se midió en suero por espectrofotometría automatizada, realizada en el laboratorio clínico Centro Hematológico de Morelos en el equipo Rx Imola de Randox.                    | De razón           | mg/dl            |
| Lipoproteínas de baja densidad, LDL     | Cuantitativa | Son responsables de transportar colesterol a tejidos con las mayores demandas de esteroide. Se derivan de las VLDL por acción de varias   | El colesterol unido a LDL se midió en suero por espectrofotometría automatizada, realizada en el laboratorio clínico Centro   | De razón           | mg/dl            |

|                          |              |   |  |          |                      |
|--------------------------|--------------|---|--|----------|----------------------|
|                          |              | enzimas lipolíticas y se sintetizan en el hígado.   | Hematológico de Morelos con el uso del equipo Rx Imola de Randox.  |          |                      |
| Triglicéridos            | Cuantitativa | Son un tipo de lípidos formados por glicerol y 3 ácidos grasos de cadenas largas, constituyen la principal forma de almacenamiento de energía del organismo.                | Los triglicéridos se midieron en suero por espectrofotometría automatizada, realizada en el laboratorio clínico Centro Hematológico de Morelos con el uso del equipo Rx Imola de Randox. | De razón | mg/dl                |
| Hipercolesterolemia      | Cualitativa  | Es la concentración alta de colesterol total en la sangre.  | Un valor mayor de 200 mg/dl <sup>42,44</sup>   | Nominal  | Presente/<br>Ausente |
| Hipoalfa-lipoproteinemia | Cualitativa  | Es la concentración baja de colesterol unido a HDL.   | Valor menor de 40 mg/dl en hombres y menor de 50 mg/dl en mujeres <sup>42,44</sup>   | Nominal  | Presente/<br>Ausente |
| LDL alto                 | Cualitativa  | Es la concentración alta de colesterol unido a LDL.   | Un valor mayor a 130 mg/dl <sup>42,44</sup>  | Nominal  | Presente/<br>Ausente |
| Hipertrigliceridemia     | Cualitativa  | Es la concentración alta de colesterol total en la sangre   | Una concentración mayor de 150 mg/dl <sup>42,44</sup>  | Nominal  | Presente<br>Ausente  |
| Sexo                     | Cualitativa  | Es el conjunto de características biológicas, físicas, fisiológicas y anatómicas que definen a los seres humanos como hombre o mujer, y a los animales como macho y hembra. | Se identificó en el registro de datos personales   | Nominal  | Hombre/<br>Mujer     |
| Edad                     | Cuantitativa | Tiempo que ha vivido una persona u otro ser vivo contando desde su nacimiento.  | Número de años cumplidos según fecha de nacimiento autorreportada.   | De razón | Años                 |

## **7.1 Consideraciones éticas.**

El presente proyecto atiende las declaraciones internacionales de la 18ª Asociación Médica Mundial realizada en Helsinki Finlandia y su última actualización de la 64ª Asamblea General, realizada en Fortaleza, Brasil en octubre del 2013. Asimismo, la ley General de Salud en su título primero disposiciones generales artículo 1, artículo 2 fracción 7, artículo 3 fracción 11 título 5º. Artículos 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102 y 103. Atendió el reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, la Norma Oficial Mexicana NOM-012-SSA3-2012 y el reglamento de la Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios.

Para asegurar los aspectos éticos de esta investigación, se solicitó a los estudiantes que aceptaran ser incluidos en el estudio. Se les entregó una carta de consentimiento informado (anexo 1) que fue leída en voz alta por el investigador principal y/o el investigador asociado, con la cual se les informó sobre los objetivos del estudio, los procedimientos a los que serían sometidos, los posibles riesgos, beneficios de su participación, la garantía de mantener su información de manera confidencial y privada, así como también su retiro voluntario y sin represalia alguna en caso de así desearlo en cualquier momento de la investigación. La firma de la carta del consentimiento informado se realizó en privado y en presencia de dos testigos elegidos por el voluntario, entregándose copia original al participante. Los datos personales de sexo, edad, dirección, correo electrónico y teléfono de contacto se obtuvieron a través de un cuestionario que no fue identificado con el nombre del participante, sino que se le asignó una clave única. Para mantener el anonimato de los participantes se utilizó el código E-UDMM seguido de cinco números únicos para cada uno de los voluntarios. Los participantes no recibieron ningún beneficio económico por participar, pero sí recibieron sus resultados de laboratorio y pruebas antropométricas realizadas, los datos de estas últimas no fueron incluidas en esta investigación. Además de que no hubo discriminación alguna entre los voluntarios. El resguardo de toda la información la realizó, de manera confidencial, el equipo de investigación.

Este proyecto de investigación forma parte de un proyecto más amplio titulado “Base de Datos para Identificar el Genoma Diabesogénico en Morelos”, registrado ante el Comité de Investigación de la Facultad de Medicina de la UAEM con el número de folio 2017-77; así mismo está incorporado al Estudio GEMM (Genética de Enfermedades Metabólicas de México): Bases Genómicas del Metabolismo Postprandial; registrado con el número 2017-75, por lo que fueron recolectados datos que no se incluyeron en el presente proyecto, pero serán utilizados para futuras investigaciones.

Los participantes identificados con dislipidemia recibieron orientación médica, para esto se contó con el apoyo de un médico general y un médico internista quienes dieron asesoría a los estudiantes que estuvieron problemas con la concentración sérica de lípidos.

## **7.2 Consideraciones de bioseguridad.**

Los materiales utilizados considerados como residuos peligrosos biológico-infecciosos, fueron manipulados y desechados de acuerdo con la NOM-087-ECOL-SSA-2002, Protección ambiental–Salud ambiental– Residuos Peligrosos Biológico- Infecciosos– Clasificación y especificaciones de manejo.

## **7.3 Recursos.**

La presente investigación contó con los siguientes recursos:

- **Recursos institucionales:** el presente estudio se realizó en el Laboratorio de Biología de Células Troncales de la Facultad de Medicina de la UAEM. Se contó con la participación del laboratorio de análisis clínicos “Centro Hematológico de Morelos” en donde se realizó el perfil lipídico. Adicionalmente se contó con la Unidad de Diagnóstico y Medicina Molecular del Hospital del Niño y el Adolescente Morelense.
- **Recursos humanos:** Se contó con la participación de siete personas para el desarrollo de este proyecto. 1) El jefe del laboratorio de Biología de Células Troncales quien

coordinó de todos los procedimientos, equipos, suministros y todo el personal que colabora en el laboratorio, además fue el investigador principal del proyecto. 2) El encargado del laboratorio quien fue responsable de que el espacio, reactivos y equipos se encontraran funcionando correctamente y fue la investigadora asociada de la presente investigación, encargada de contactar a los voluntarios, tomar las muestras sanguíneas, el proceso de éstas y la realización de la base de datos. 3) El encargado del cuarto de cultivo, quien fue el responsable del buen funcionamiento del área, incluyendo materiales, reactivos y equipos utilizados en la misma. 4) Una prestadora de servicio social, quien auxilió en la toma de muestra sanguínea y en su procesamiento y en la realización de la base de datos del proyecto. 5) Una estudiante de posgrado quien apoyó en el proceso del consentimiento informado, las citas y entrega de resultados de perfil de lípidos. 6) Un médico general y 7) un médico internista quienes dieron asesoría clínica a los estudiantes con alteración en la concentración sérica de lípidos.

- **Recursos materiales:** el Laboratorio de Biología de Células Troncales contó con el espacio, equipos, reactivos y materiales necesarios para el procesamiento del ADN. La técnica de secuenciación se realizó en la USSDNA del IBT. La determinación del perfil lipídico fue hecha por laboratorio de análisis clínicos “Centro Hematológico de Morelos”.
- **Recursos financieros:** el proyecto tuvo una inversión de aproximadamente \$56 500.00 (MXN), utilizados para proveer de insumos faltantes, como material para la toma de muestra sanguínea, la secuenciación de las 30 muestras de ADN y la determinación del perfil lipídico, independientemente de los reactivos y aparatos utilizados para biología molecular.

## **7.4. Procedimientos del laboratorio.**

### **7.4.1. Extracción de muestras sanguíneas.**

A los voluntarios que decidieron participar en el estudio, se les asignó una fecha para acudir a la toma de muestras sanguíneas. Se les indicó que acudieran con un ayuno nocturno de 9 a 12 horas, recomendación basada en la *Norma Oficial Mexicana NOM-037-SSA2-2012, Para la prevención, tratamiento y control de las dislipidemias*. Se recolectaron dos tubos (10 ml) de sangre venosa sin anticoagulante para obtener el suero utilizado en la determinación del perfil lipídico y dos tubos (8 ml) de sangre con EDTA para obtener los leucocitos utilizados en la extracción y purificación de ADN.

Una vez obtenida la sangre en los tubos sin anticoagulante, se dejaron 30 minutos en reposo para permitir la coagulación sanguínea y se centrifugaron a 300 rpm durante 10 minutos. Posteriormente se separó 1 ml de suero sanguíneo en un tubo secundario para el perfil lipídico y 500 µl en aproximadamente 5 microtubos que fueron almacenados en ultracongelación que serán utilizadas en posteriores investigaciones.

### **7.4.2. Determinación del perfil lipídico.**

El tubo secundario con suero se mantuvo en temperatura de 2 a 8 °C durante el traslado y entrega el mismo día al personal del laboratorio de análisis clínicos *Centro Hematológico de Morelos S. A. de C. V.*, donde fue realizada la determinación de las concentraciones de colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL y triglicéridos, cuantificados por espectrofotometría en el equipo automatizado *Rx Imola* de Randox.

### **7.4.3. Extracción y purificación del ADN.**

#### **Método de lisis de eritrocitos.**

Este procedimiento se realizó dentro de una campana de bioseguridad para evitar contaminación. Se realizó la lisis de los eritrocitos tomados al retirar la capa leucocitaria (“buffy coat”) del tubo de muestra sanguínea con anticoagulante. El procedimiento consistió en: colocar 400  $\mu$ l del “buffy coat” en un tubo de centrifuga de 15 ml, agregar 9 ml de solución de lisis de eritrocitos (cloruro de amonio 1X), centrifugar a 300 g durante 5 minutos a 24°C, posteriormente realizar dos lavados con PBS 1X, decantar el sobrenadante y la pastilla celular resultante (leucocitos) se resuspendió en 4 ml de PBS 1X para realizar el conteo celular. Al final se realizó el cálculo correspondiente para obtener el número de leucocitos por  $\mu$ l.

#### **Aislamiento de ADN.**

Se tomaron aproximadamente 5 millones de leucocitos libres de PBS para la extracción de ADN. Se agregaron 500  $\mu$ l de solución ETS y 12.5  $\mu$ l de proteinasa K y se incubó durante 16 horas a 65°C con una agitación de 50 rpm. Al término de la incubación, se realizaron dos extracciones con fenol/cloroformo que incluyeron centrifugaciones a 16000 g por 5 minutos a temperatura ambiente. Después se realizó una precipitación de ADN con etanol absoluto y NaCl 5M, después se incubó en hielo seco durante 30 minutos. Se centrifugó a 16000 g por 10 minutos a 4°C y se decantó el sobrenadante cuidando de no desprender el botón de ADN. Los tubos con las muestras se colocaron en una incubadora a 37°C para evaporar el mayor volumen de etanol residual, pero evitando que la muestra se seque por completo. El ADN fue resuspendido en solución TE a pH de 7.4. Las muestras se conservaron a 4°C hasta su posterior uso.

#### **7.4.4. Determinación del rendimiento y pureza del ADN.**

El rendimiento de las muestras se determinó mediante espectrofotometría en el equipo *BioDrop*, se midió la concentración de ADN en  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; para evaluar la pureza de las muestras, se consideró la relación de las absorbancias A260/280 y A260/230.

Un valor A260/280 igual o mayor a 1.8 indicó pureza del ADN adecuada, un valor de 1.7 indicó la pureza aceptable y valores iguales o menores a 1.6 fueron consideradas como muestras contaminadas con proteínas. En cuando a la lectura A260/230, un valor igual o mayor de 1.8 indicó pureza adecuada, de 1.7 pureza aceptable y un valor igual o menor de 1.6 significó que la muestra estaba contaminada con sales o fenol.

#### **7.4.5. Evaluación de la integridad del ADN.**

Se realizó la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 1.2% utilizando el intercalante bromuro de etidio ( $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), que permitió la valoración de la integridad del ADN purificado. Para cargar las muestras en el gel, en cada pocillo se utilizaron  $2 \mu\text{l}$  de muestra a una concentración de  $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ,  $8 \mu\text{l}$  de solución TE y  $3 \mu\text{l}$  del colorante azul de bromofenol, en un pocillo lateral se colocaron  $2 \mu\text{l}$  del marcador de peso molecular ADN Lambda digerido con HindIII. La corrida electroforética se realizó durante 45 min a 180V. El gel se visualizó en el transluminador de luz ultravioleta UVP.

#### **7.4.6. Evaluación de amplificación de ADN.**

Se utilizó la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, del inglés: Polymerase Chain Reaction), mediante la amplificación de una región de 307 pb del gen Gliceraldehído 3 Fosfato Deshidrogenasa (GAPDH, del inglés: (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase). Se observó en el gel el fragmento del tamaño esperado, que esto indicó que las muestras de ADN podían ser utilizadas como templado para pruebas posteriores de PCR con los oligonucleótidos del exón 5 de PPAR $\gamma$ .

Los reactivos para una reacción de 50  $\mu$ l se utilizaron en los siguientes volúmenes:

- Agua MilliQ filtrada: 28.5  $\mu$ l
- Buffer Taq ADN polimerasa 10 X: 5.0  $\mu$ l
- $MgCl_2$  30 mM: 3.0  $\mu$ l
- dNTPs 10 mM: 1.0  $\mu$ l
- Oligonucleótido sentido GAPDH (0.1  $\mu$ g/ $\mu$ l): 1.0  $\mu$ l
- Oligonucleótido anti sentido GAPDH (0.1  $\mu$ g/ $\mu$ l): 1.0  $\mu$ l
- Enzima Taq ADN pol (5 U/ $\mu$ l): 0.5  $\mu$ l
- Muestra de ADN (0.1  $\mu$ g/ $\mu$ l): 10  $\mu$ l

El control positivo que se utilizó fue una muestra de ADN genómico conocido y el control negativo fue agua MilliQ. La reacción de PCR de muestras y los controles se colocaron en un termociclador que se programó con los siguientes parámetros:

Desnaturalización inicial de la muestra a 94°C por 5 minutos; posteriormente 40 ciclos con 30 segundos a 94°C para la desnaturalización, 30 segundos a 62°C para el alineamiento de los oligonucleótidos y 30 segundos a 72°C para la elongación; por último 10 minutos a 72°C para elongación final.

Posteriormente para evaluar los productos de amplificación se utilizó la electroforesis en un gel de agarosa al 2%, se utilizó el “GeneRuler 100 pb DNA Ladder” como marcador de peso molecular y el gel se tiñó con bromuro de etidio para visualizar las bandas. La corrida electroforética se realizó durante 45 minutos a 250 V y posteriormente el gel se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta UVP.

#### **7.4.7. Diseño de oligonucleótidos**

Para realizar el diseño de oligonucleótidos, como primer paso, se descargó la secuencia del gen PPAR $\gamma$  (referencia NG\_011749) de la base de datos de nucleótidos de NCBI<sup>65</sup>. El dominio de unión a ADN se encuentra distribuido en los exones 4, 5 y 6 del gen, por razones estratégicas, se realizó el diseño de un par de oligonucleótidos para el exón 5 que abarca la mayor parte del DBD. El diseño se realizó en el programa “Oligo Calculator” de NCBI donde

se buscaron las mejores condiciones considerando las siguientes variables: tamaño del oligonucleótido de 24 o 25 nucleótidos, la temperatura de fusión ( $T_m$ ) de los oligonucleótidos que no variara más de 2 °C entre ellos y ésta estuviera entre 55°C y 72°C, que no presentara complementariedad ni formación de dímeros entre ellos mismos y el contenido de GCs fuera entre el 40 y 60% (anexo 2).

#### **7.4.8 Amplificación del exón 5 de PPAR $\gamma$ .**

Se realizó la amplificación del exón 5 de PPAR $\gamma$  de 52 muestras de ADN de los participantes de proyecto, las condiciones utilizadas fueron: una temperatura de alineamiento de 64.2 °C y una concentración de MgCl<sub>2</sub> de 1.5 mM.

Los reactivos para una reacción de 50  $\mu$ l se utilizaron en los siguientes volúmenes:

- Agua MilliQ filtrada: 29  $\mu$ l
- Buffer Taq ADN polimerasa 10 X: 5.0  $\mu$ l
- MgCl<sub>2</sub> 30 mM: 2.5  $\mu$ l
- dNTPs 10 mM: 1.0  $\mu$ l
- Oligonucleótido sentido GAPDH (0.1  $\mu$ g/ $\mu$ l): 1.0  $\mu$ l
- Oligonucleótido anti sentido GAPDH (0.1  $\mu$ g/ $\mu$ l): 1.0  $\mu$ l
- Enzima Taq ADN pol (5 U/ $\mu$ l): 0.5  $\mu$ l
- Muestra de ADN (0.1  $\mu$ g/ $\mu$ l): 10  $\mu$ l

El control positivo que se utilizó fue una muestra de ADN genómico conocido y el control negativo fue agua MilliQ. La reacción de PCR de muestras y los controles se colocaron en un termociclador que se programó con los siguientes parámetros:

- 1) Desnaturalización inicial de la muestra: 94°C por 5 minutos.
- 2) Desnaturalización: 40 ciclos con 30 segundos a 94°C.
- 3) Alineamiento de los oligonucleótidos: 30 segundos a 64.2°C.
- 4) Elongación: 30 segundos a 72°C.
- 5) Elongación final: 10 minutos a 72°C.

Posteriormente para evaluar los productos de amplificación se utilizó la electroforesis en un gel de agarosa al 2%, se utilizó el “GeneRuler 100 pb DNA Ladder” como marcador de peso molecular y el gel se tiñó con bromuro de etidio para visualizar los fragmentos de amplificación. La corrida electroforética se realizó durante 45 minutos a 250 V y posteriormente el gel se visualizó en un transluminador de luz ultravioleta UVP.

#### **7.4.9. Purificación de los productos de PCR.**

Para la secuenciación de los productos de PCR, se seleccionaron 30 muestras de los voluntarios con dislipidemias que tuvieron los resultados de lípidos más elevados. Una vez que se obtuvieron los productos de PCR, se purificaron mediante la técnica de purificación en gel. Estos se corrieron en un gel de agarosa al 1.5% durante 30 minutos a 80 V, con la luz UV se ubicaron las bandas del tamaño de producto de interés (455 pb), se cortó el fragmento del gel que correspondió a las bandas de las muestras, se colocó en una caja de Petri de vidrio y con ayuda del bisturí se cortó en pedazos muy pequeños, posteriormente se colocaron en un tubo de microcentrífuga. Se agregó fenol (el volumen se calculó con la diferencia del peso del tubo con el gel menos el peso del tubo de microcentrífuga vacío (pesado previamente) el resultado se multiplica por 1000 y fue la cantidad de  $\mu\text{l}$  agregada) y se colocó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos, se centrifugó el tubo a 12 000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Se colocó el sobrenadante transparente en un nuevo tubo de ensayo, se agregó 1 ml de etanol absoluto y NaCl 5M en un volumen correspondiente a una décima parte del volumen del sobrenadante. Se homogenizó y se colocó el tubo a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos para precipitar el producto de PCR, posteriormente se centrifugó a 12 000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. El pellet se lavó con 200  $\mu\text{l}$  de etanol al 70%, se centrifugó a 12 000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente, se decantó el sobrenadante cuidando de no desprender el pellet y se dejó secar la muestra por 10 minutos a  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  en el concentrador de muestras de ADN *miVac*. El pellet se resuspendió en 15  $\mu\text{l}$  de agua MilliQ filtrada, se dejó homogenizar durante 24 horas y posteriormente se cuantificó en *BioDrop*. Se determinó la concentración por microlitro y se realizaron los cálculos correspondientes para llevar las muestras a 20 y 50  $\text{ng}/\mu\text{l}$ , según la concentración de estas.

#### **7.4.10. Determinación del tamaño del producto de PCR purificado.**

Después de evaluar la pureza y el rendimiento de los productos de amplificación purificados, se comprobó el tamaño del producto de amplificación, para el cual se realizó un gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio (1 mg/ml). El tamaño esperado de la banda fue de 455 pb y se utilizó como marcador de peso molecular el “GeneRuler 100 pb DNA Ladder”. Se cargaron 50 ng del fragmento de amplificación obtenido de cada muestra, más 3 µl de azul de bromofenol y se ajustó el volumen a 12 µl con agua MilliQ filtrada. La corrida electroforética se realizó durante 45 minutos a 80 V y posteriormente el gel se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta UVP.

#### **7.4.11. Secuenciación del dominio de unión a ADN de PPAR $\gamma$ .**

La secuenciación de los productos de amplificación fue realizada por la Unidad de Síntesis y Secuenciación del ADN (USSDNA) del Instituto de Biotecnología de la UNAM, campus Morelos. Esta se realizó por el método de Sanger usando didesoxiterminadores fluorescentes y un secuenciador automático de ADN (Applied Biosystems, modelo 3130xl) que funciona a base de 16 capilares, en los cuales se realiza la separación electroforética. La calidad de la secuenciación dependió de la calidad del ADN utilizado como templado y de la especificidad del oligonucleótido.

#### 7.4.12. Evaluación de calidad de las secuencias del dominio de unión a ADN de PPAR $\gamma$ .

Una vez obtenido el orden de los nucleótidos en la secuenciación del exón 5 de PPAR $\gamma$ , se evaluó la calidad de la secuencia por medio de un electroferograma utilizando el programa *Sequence Scanner v.2*. El electroferograma consiste en una gráfica que arroja el secuenciador después de analizar la electroforesis y muestra el orden de las bases a partir de curvas de fluorescencia (una por cada base). Es importante revisar los electroferogramas antes de continuar con los análisis de muestras debido a que proporciona información fundamental incluyendo la calidad de la PCR, así como la confiabilidad de los datos obtenidos. Los parámetros que se tomaron en cuenta para evaluar la calidad de las secuencias son:

- Resolución de los picos bien definida.
- Uniformidad en la separación entre picos.
- RFUs (niveles de relativos de fluorescencia) de los picos con valores aceptables entre 500 y 1000 y óptimos mayores de 1000.
- Valor de Qv: es la estimación de la probabilidad de que una asignación sea un error, un  $Qv \geq 20$  indica que es una secuencia de buena calidad.
- Si en el 70% o más de la secuencia completa presenta bases con  $Qv \geq 20$ , la secuencia puede ser utilizada en análisis posteriores, como en un algoritmo de alineamiento de secuencias (BLAST).

| Código de nucleótidos IUPAC |           |
|-----------------------------|-----------|
| <b>R</b>                    | A o G     |
| <b>Y</b>                    | C o T     |
| <b>S</b>                    | G o C     |
| <b>W</b>                    | A o T     |
| <b>K</b>                    | G o T     |
| <b>M</b>                    | A o C     |
| <b>B</b>                    | C o G o T |
| <b>D</b>                    | A o G o T |
| <b>H</b>                    | A o C o T |
| <b>V</b>                    | A o C o G |



**Figura 6.** Código de nucleótidos de la secuenciación según la IUPAC.

Se utilizaron las reglas de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, del inglés: International Union of Pure and Applied Chemistry) para identificar más de una clase de nucleótidos en una posición de acuerdo con la figura 6.

#### **7.4.13. Alineamiento de secuencias con del dominio de unión a ADN de PPAR $\gamma$ .**

Después de comprobar la calidad de las secuencias, se realizó un alineamiento de cada una de las secuencias de los voluntarios con la secuencia de PPAR $\gamma$  ya reportada. Este se realizó en el programa BLAST<sup>66</sup> para confirmar que el fragmento fuera del dominio de unión al ADN del gen *Homo sapiens peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPARG)*, *RefSeqGene on chromosome 3* al que le corresponde el ID NG\_011749.<sup>65</sup> La posición en el genoma de las secuencias de los voluntarios fue de 109765 a 109903 pb, corresponde al exón 5 del gen y comprende 139 pb.

#### **7.4.14. Alineamiento múltiple de las secuencias de nucleótidos.**

Se realizó el alineamiento múltiple en el programa *CLC Sequence viewer 6.6.1*, alineando las secuencias de los voluntarios con la secuencia de referencia de PPAR $\gamma$  (NG\_011749). Este alineamiento permite identificar las diferencias entre secuencias como cambios en una sola base, inserción o supresión de bases. Se realizó el análisis de las 30 secuencias, identificando las posiciones de nucleótidos que no correspondan con la secuencia de referencia.

#### **7.4.15. Traducción nucleótido a proteína y alineamiento de aminoácidos.**

Se utilizó en programa *Blastx*<sup>66</sup> para traducir las secuencias de nucleótidos a proteína y posteriormente se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos con el fin de determinar las posiciones en donde hubo cambio de aminoácido.

#### **7.4.16. Predictor de daño a la estructura y función de la proteína.**

Se utilizó el software *PolyPhen-2* para predecir el posible impacto la sustitución de aminoácidos en la estructura y función de la proteína de PPAR $\gamma$ . De esta manera se predijo si los SNPs no sinónimos identificados eran: “probablemente dañinos”, “posiblemente dañinos” o “benignos”.<sup>67</sup>

## 7.5. Análisis estadístico

Se generó una base de datos que incluyó el código asignado al participante, edad, sexo y concentraciones séricas de lípidos; se generaron variables cualitativas dicotómicas para cada una de las dislipidemias (hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, hipoalfalipoproteinemia y LDL alto) colocando en la etiqueta “0” para ausencia y “1” para presencia. La misma base incluyó datos de calidad de la muestra ADN colocando “0” para contaminación de proteínas o fenol, “1” para pureza aceptable y “2” para pureza óptima, también se incluyeron los datos de concentración por  $\mu\text{l}$  del ADN purificado. Además, se generó una base de datos en el programa *Excel* para los polimorfismos de nucleótido único identificados, colocando código de muestra, número de polimorfismos, cambio de nucleótido y posición en el gen.

Se realizó el análisis descriptivo de las variables cuantitativas y cualitativas; se calcularon proporciones y medidas de tendencia central (media, mediana) y de dispersión (desviación estándar, rango, rango intercuartil) acordes con la distribución de las variables evaluadas. Se utilizó el programa *Stata v14.2*

## **8.0 RESULTADOS**

Se invitó a participar en el estudio a aproximadamente 200 estudiantes de la Facultad de Medicina de la UAEM; 70 de ellos aceptaron participar, y tenían entre 18 y 25 años. De los cuales, 52 voluntarios cumplieron los criterios de inclusión.

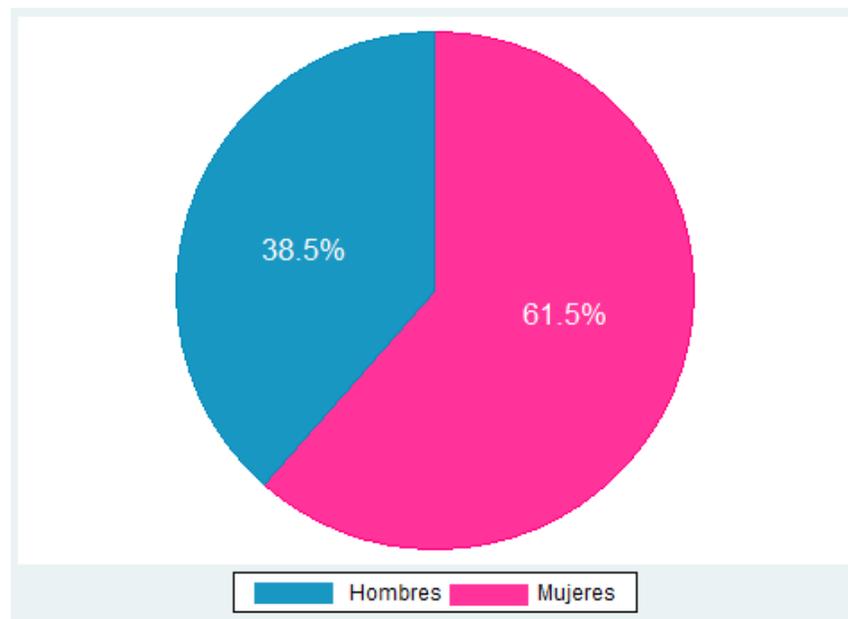
A continuación, se menciona el comportamiento general de las dislipidemias. Tomando en cuenta a los 70 estudiantes que decidieron participar en el estudio, a todos se les realizó el perfil de lípidos. Se identificó alteración en al menos un valor de lípidos en 52 voluntarios (74.3%) y éstos fueron los incluidos en la presente investigación. La hipoalfalipoproteinemia se presentó en el 75% en el total de 70 estudiantes siendo la dislipidemia más frecuente. La segunda dislipidemia más alta fue el LDL alto con 32.7%, seguida de hipercolesterolemia con 23.1% y la menos frecuente fue la hipertrigliceridemia presente en el 17.3% de los voluntarios participantes (datos no mostrados).

Los siguientes apartados corresponden únicamente a datos de la población que cumplió con los criterios de inclusión.

### 8.1 Características generales de la población de estudio.

La distribución por sexo de la población se muestra en el gráfico 1, se incluyeron 32 mujeres (61.5%) y 20 hombres (38.5%). La edad de los participantes fue de 18 a 25 años, con una media de 20.3 (DE=  $\pm 1.7$ ) y una mediana de 20 años.

**Gráfico 1.** Distribución de la población de estudio por sexo. Proyecto “Búsqueda de nuevos polimorfismos en el DBD de PPAR $\gamma$  en estudiantes de Medicina de la UAEM con dislipidemias”. Septiembre 2018 a noviembre 2019.



Con respecto a las concentraciones de lípidos séricos. La media de colesterol fue 170.6 mg/dl (DE=  $\pm 39.6$ ), con valores mínimo de 114 y máximo de 334, valor del cuartil 1 (Q<sub>1</sub>) de 140.5 y valor del cuartil 3 (Q<sub>3</sub>) de 175.5 mg/dl. En los triglicéridos la media fue 114.3 mg/dl (DE=  $\pm 78$  mg/dl), mínimo 50 y máximo 559.8, mediana 99.5, Q<sub>1</sub> de 75.6 y Q<sub>3</sub> de 116.3 mg/dl. El HDL en hombres, la media fue 41.2 mg/dl (DE=  $\pm 8.4$ ), con valor mínimo de 28.5 y máximo de 60.3, mientras que para mujeres la media fue de 42.8 mg/dl (DE=  $\pm 9.5$ ) y un rango de 31 a 81.9 (datos no mostrados). Finalmente, para LDL la media fue 116.1 mg/dl (DE=  $\pm 37.1$ ) con un mínimo de 69.4, máximo de 275.7, Q<sub>1</sub> de 88.2 y Q<sub>3</sub> de 142.9 mg/dl (cuadro 1).

**Cuadro 1.** Valores de lípidos en sangre. Proyecto “Búsqueda de nuevos polimorfismos en el DBD de PPAR $\gamma$  en estudiantes de Medicina de la UAEM con dislipidemias”. Septiembre de 2018 a noviembre del 2019.

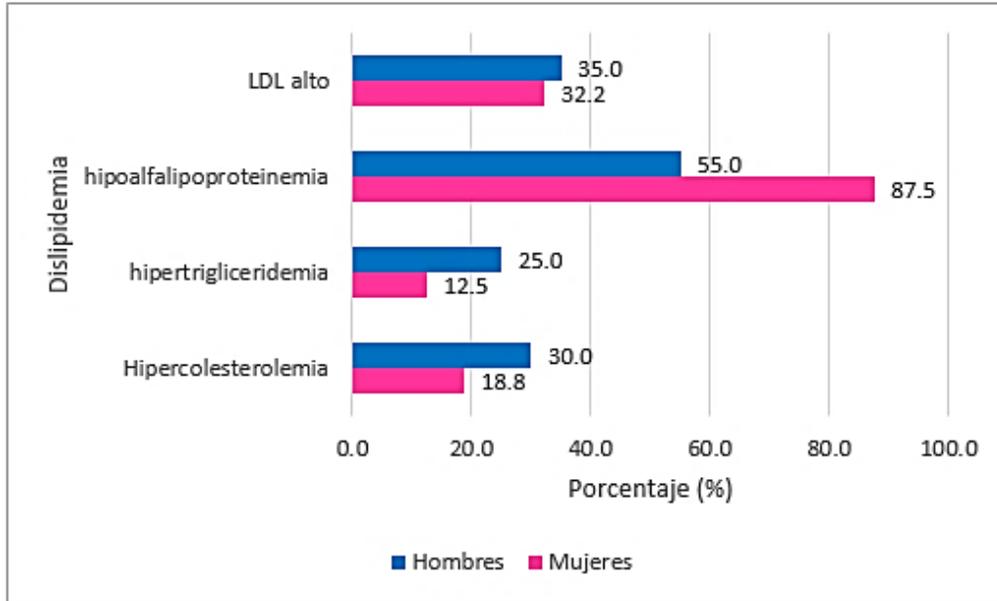
| <b>Lípido</b><br>(mg/dl) | <b>m</b> | <b>DE</b> | <b>Me</b> | <b>Mínimo</b> | <b>Máximo</b> | <b>Q<sub>1</sub></b> | <b>Q<sub>3</sub></b> |
|--------------------------|----------|-----------|-----------|---------------|---------------|----------------------|----------------------|
| <b>Colesterol</b>        | 170.6    | ±39.6     | 164.0     | 114.0         | 334.0         | 140.5                | 175.5.0              |
| <b>Triglicéridos</b>     | 114.3    | ±78.0     | 99.5      | 50.0          | 559.8         | 75.6                 | 116.3                |
| <b>HDL</b>               | 42.1     | ±9.8      | 40.7      | 28.5          | 81.9          | 35.6                 | 47.2                 |
| <b>LDL</b>               | 116.1    | ±37.1     | 104.2     | 69.4          | 275.7         | 88.2                 | 142.9                |

Los valores corresponden a mg/dl, se presentan en medias (m), desviación estándar (DE), mediana (Me), mínimo y máximo, primer cuartil (Q1) y tercer cuartil (Q3). HDL: lipoproteína de alta densidad, LDL: lipoproteína de baja densidad.

En general la media del grupo se encontró dentro de los valores normales. Sin embargo, como se puede observar en el rango hay una gran dispersión de los valores, en los que se puede demostrar que en todos los valores bioquímicos encontramos individuos dentro de los valores normales.

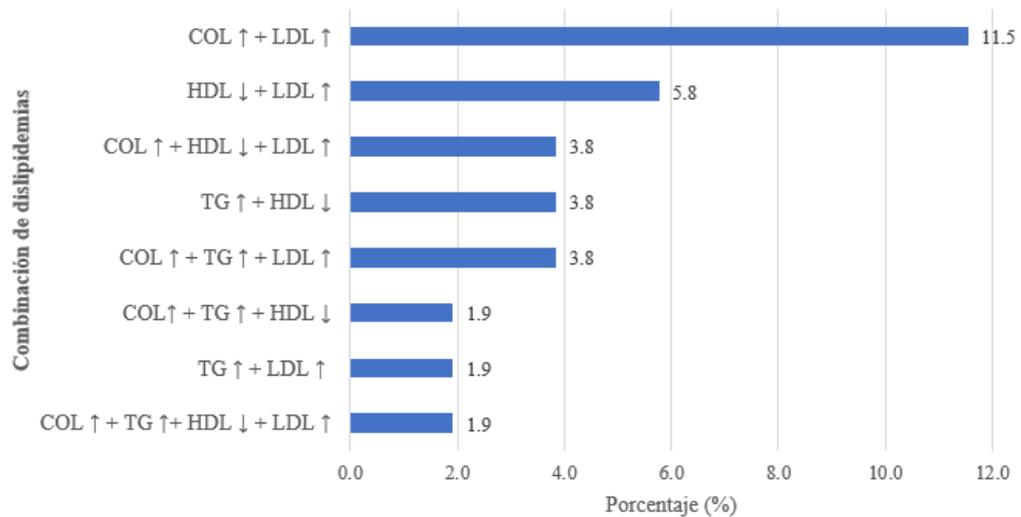
La distribución de las alteraciones de los lípidos de la población estudiada se presenta de la siguiente manera: en hombres, se identificó hipoalfalipoproteinemia en el 55%, mientras que en las mujeres se presentó con un porcentaje de 87.5%. En hombres y mujeres, el LDL alto se observó con frecuencias similares en un 35 y 32.2%, respectivamente. Por su parte, la hipercolesterolemia fue más frecuente en hombres (30%) que en mujeres (18.8%), de igual manera, la hipertrigliceridemia tuvo una presencia mayor en los hombres con un 25% a diferencia de las mujeres con solo el 12.5% (gráfico 2).

**Gráfico 2.** Prevalencia de tipos de dislipidemias por sexo. Proyecto “Búsqueda de nuevos polimorfismos en el DBD de PPAR $\gamma$  en estudiantes de Medicina de la UAEM con dislipidemias”. Septiembre 2018 a noviembre 2019.



También se identificaron más de un tipo de dislipidemia presente a la vez en ocho diferentes combinaciones, las cuales son presentadas en el gráfico 3. Las dos combinaciones más frecuentes fueron la hipercolesterolemia con LDL alto presente en el 11.5% de la población, seguida de la hipoalfalipoproteinemia con LDL alto en 5.8%.

**Gráfico 3.** Prevalencia de dislipidemias combinadas. Proyecto “Búsqueda de nuevos polimorfismos en el DBD de PPAR $\gamma$  en estudiantes de Medicina de la UAEM con dislipidemias”. Septiembre 2018 a noviembre 2019.



Abreviaturas: COL $\uparrow$ , hipercolesterolemia; TG $\uparrow$ , hipertrigliceridemia; HDL $\downarrow$ , hipoalfalipoproteinemia; LDL $\uparrow$ , LDL alto.

## 8.2 Extracción y purificación de ADN.

Se realizó la extracción y purificación de las 52 muestras de ADN de los participantes.

### 8.2.1 Determinación del rendimiento y pureza del ADN.

La media del rendimiento total del ADN purificado fue de 16.3  $\mu$ g en 300  $\mu$ l, siendo 1.8 y 35.1  $\mu$ g los valores mínimo y máximo, respectivamente. En el cuadro 2 se muestran las frecuencias del rendimiento total de ADN que, para su mejor evaluación se han clasificado en tres categorías: igual o menor de 9.99, de 10 a 19.99 e igual o mayor de 20  $\mu$ g. Más del 70% de las muestras tuvieron concentraciones de ADN mayores de 10  $\mu$ g; aunque en el 23% de las muestras se obtuvieron concentraciones menores de 9.99, la cantidad fue suficiente para continuar con los procedimientos.

**Cuadro 2.** Frecuencias del rendimiento total del ADN purificado. Proyecto “Búsqueda de nuevos polimorfismos en el DBD de PPAR $\gamma$  en estudiantes de Medicina de la UAEM con dislipidemias”. Septiembre de 2018 a noviembre del 2019.

| <b>Rendimiento total (<math>\mu\text{g}</math>)</b> | <b>f</b> | <b>%</b> |
|---|----------|----------|
| <b>Igual o menor de 9.99</b>                        | 12       | 23.0     |
| <b>De 10 a 19.99</b>                                | 20       | 38.5     |
| <b>Igual o mayor de 20</b>                          | 20       | 38.5     |
| <b>Total</b>  | 52       | 100.0    |

f= frecuencia absoluta.

Con respecto a la pureza del ADN, un valor de la relación 260/280 menor a 1.6 nos indicó contaminación por proteínas, el 63.5% de las muestras tenía una pureza adecuada (valor mayor de 1.8), 34.6% presentaron una pureza aceptable (valor 1.7) y solo el 1.9% de las muestras se consideraron contaminadas por proteínas (cuadro 3). Un valor menor a 1.5 en la relación 260/230 nos orientó a que la muestra se encontraba contaminada por sales o fenoles, como consecuencia, una cuarta parte de las muestras estuvieron contaminadas.

Finalmente, el 98.1% del total de las muestras no estaban contaminadas con proteínas y en el 75% no se detectó contaminación con sales o fenoles, esto nos refleja que la mayoría de las muestras fueron ideales para la amplificación por PCR.

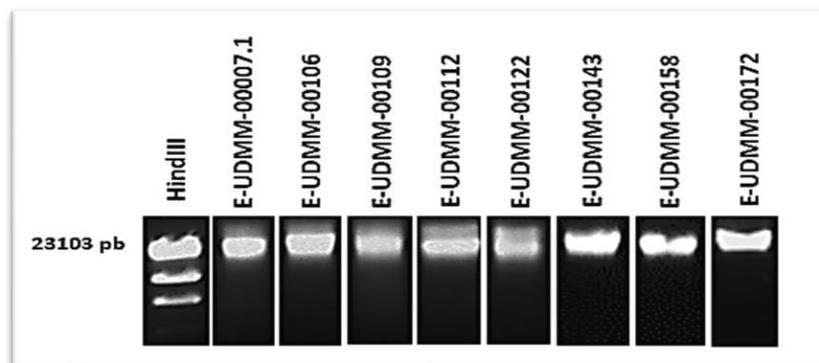
**Cuadro 3.** Frecuencias de los valores de pureza del ADN. Proyecto “Búsqueda de nuevos polimorfismos en el DBD de PPAR $\gamma$  en estudiantes de Medicina de la UAEM con dislipidemias”. Septiembre 2018 a noviembre 2019.

| A280/260                | f  | %     | A260/230                    | f  | %     |
|-------------------------|----|-------|-----------------------------|----|-------|
| Pureza adecuada         | 33 | 63.5  | Pureza adecuada             | 34 | 65.4  |
| Pureza aceptable        | 18 | 34.6  | Pureza aceptable            | 5  | 9.6   |
| Contaminación proteínas | 1  | 1.9   | Contaminación Sales o fenol | 13 | 25.0  |
| Total                   | 52 | 100.0 | Total                       | 52 | 100.0 |

f= frecuencia absoluta, % (porcentaje): frecuencia relativa.

### 8.2.2 Evaluación de la integridad del ADN purificado.

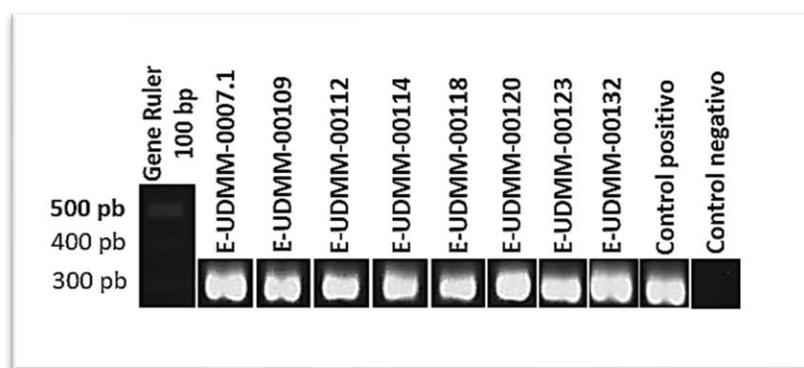
Se realizó la evaluación de la integridad de las 52 muestras de ADN purificadas. En la figura 7 se presentan 8 muestras de ADN de voluntarios en un gel de electroforesis. Las bandas se encuentran por arriba del fragmento de 23000 pares de bases del marcador de peso molecular y no muestran barrido en su parte inferior. No se observó degradación en el 100% de las muestras.



**Figura 7.** Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% de ocho muestras de ADN de voluntarios de la serie E-UDMM. No se observa degradación de ADN. Condiciones: 180 V durante 45 minutos, marcador ADN Lambda/HindIII.

### 8.2.3. Evaluación de la amplificación del ADN purificado.

Se realizó la evaluación de la amplificación de una región del gen GAPDH. En la figura 8 se observan ocho de las 52 muestras de ADN de los voluntarios participantes, se aprecia un fragmento de amplificación que corresponde al tamaño del control positivo y al tamaño esperado de 307 pb. El 100% de las muestras de ADN purificado presentó la calidad suficiente para realizar PCR, independientemente del nivel de contaminación de proteínas o sales y fenol.

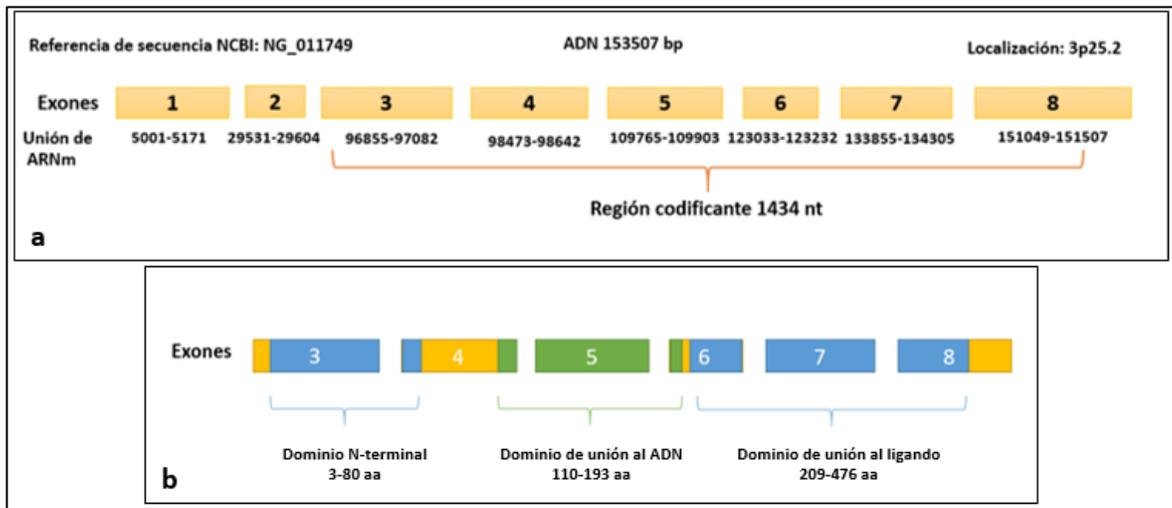


**Figura 8.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de amplificación para GAPDH de ocho muestras de ADN de la serie E-UDMM. Las bandas tienen un tamaño de 307 pb. Marcador de peso molecular “GeneRuler 100 pb DNA Ladder”. Control positivo: ADN de buffy coat conocido. Control negativo: H<sub>2</sub>O MilliQ. Condiciones: 250 V durante 45 minutos.

### 8.3 Diseño de oligonucleótidos.

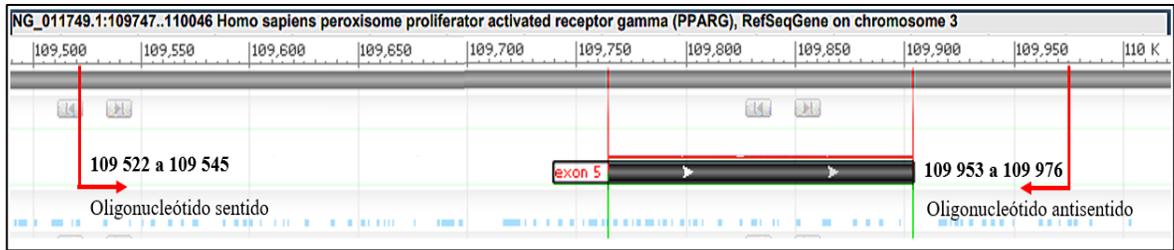
Se identificó el gen que codifica para PPAR $\gamma$  localizado en el cromosoma 3 en la región 3p25.2, la secuencia genómica abarcó 153 507 pb desde la posición 5001 hasta la 151 507 y estuvo conformada por 8 exones como se ilustra en la figura 9a. El análisis de la secuencia mostró que los exones 3 al 8 conformaron la región codificante de PPAR $\gamma$  y su tamaño fue de 1434 nucleótidos.

De acuerdo con la secuencia genómica de PPAR $\gamma$ , el dominio de unión al ADN se compone de los últimos 69 nucleótidos del exón 4, todo el exón 5 y los primeros 44 nucleótidos del exón 6 (figura 9b).



**Figura 9.** Organización de exones y dominios de PPAR $\gamma$ . **A)** Representación de los 8 exones del gen y su región codificante que incluye 1434 nucleótidos. **B)** Dominios conservados de la proteína PPAR $\gamma$ : Dominio N-terminal, Dominio de unión al ADN y Dominio de unión al ligando. El dominio de interés para esta investigación se muestra en verde. Gen PPAR $\gamma$  NCBI ID: NG\_011749<sup>65</sup>. Proteína PPAR $\gamma$  secuencia de referencia NCBI: NP\_619726.<sup>68</sup>

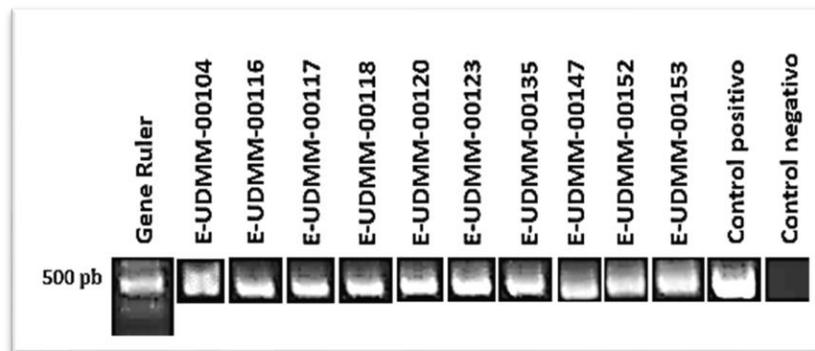
Se realizó el diseño de un par de oligonucleótidos de un tamaño de 24 nucleótidos cada uno para el exón 5, logrando abarcar la mayor parte del dominio de unión al ADN (figura 12b). Los oligonucleótidos fueron sintetizados en la USSDNA del IBT. El oligonucleótido sentido fue CAG CTG GAT GTG GTC AGT GTC TAA ubicado desde la posición 109 522 a 109 545 del intrón 4 del gen y el antisentido fue ATG GCT TTA GTG TCC ACT GGT CTG desde la posición 109 976 a 109 953 en el intrón 5, el fragmento amplificado tuvo un tamaño de 455 pb. De esta manera se logró amplificar completamente la región codificante para el exón 5 de PPAR $\gamma$  que inicia en la posición 109765 y termina en la posición 109903 gen (figura 10).



**Figura 10.** Ubicación de los oligonucleótidos para amplificar el exón 5 de PPAR $\gamma$ . El fragmento de amplificación comprende 455 pb desde la posición 109522 a 109976. Se identificaron las posiciones de los oligonucleótidos sentido y antisentido, así como la ubicación del exón 5.

#### 8.4 Amplificación del exón 5 de PPAR $\gamma$ .

Se realizó la amplificación del exón 5 de PPAR $\gamma$  en las 52 muestras de ADN de los voluntarios. En el gel de electroforesis se observó una banda de 455 pb que correspondió al tamaño del producto esperado. En la figura 11 se muestra un gel de electroforesis con 10 de estas muestras de ADN, todas presentaron capacidad de amplificación del exón 5.

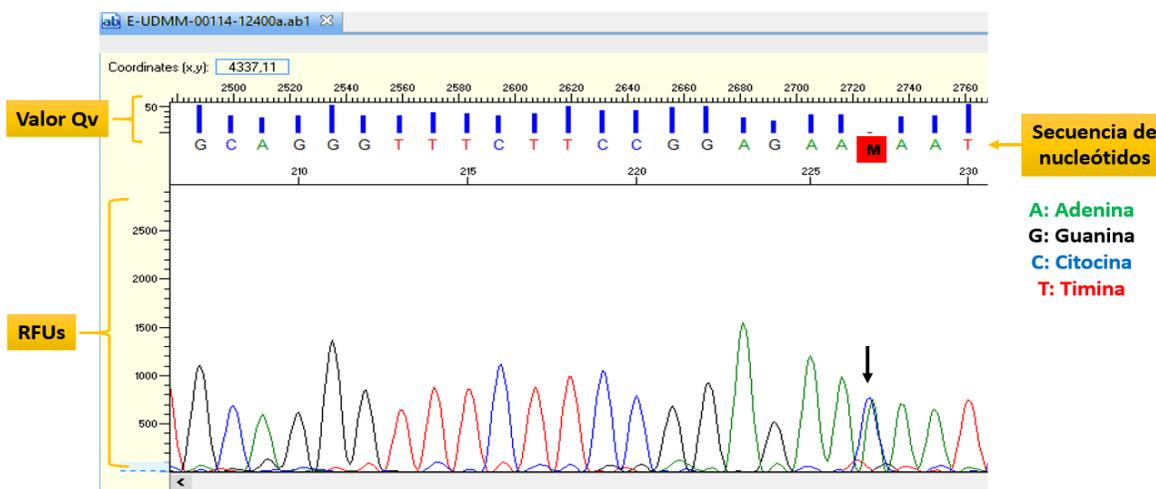


**Figura 11.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% de productos de amplificación para el exón 5 de PPAR $\gamma$  de 10 muestras de ADN de la serie E-UDMM. Las bandas tienen un tamaño de 455 pb. Marcador “GeneRuler 100 pb DNA Ladder”. Control positivo: ADN de buffy coat conocido. Control negativo: H<sub>2</sub>O MilliQ. Condiciones: 250 V durante 45 minutos.

## 8.5 Análisis de las secuencias de ADN.

Por razones estratégicas y económicas, se decidió realizar únicamente secuenciación a 30 de las 52 muestras de ADN. De las secuencias de ADN analizadas, todas presentaron un porcentaje superior al 80% con valores  $Q_v > 20$ , RFUs mayores a 500, resolución bien definida y uniformidad en los picos.

Se identificaron más de una clase de nucleótido en algunas posiciones de las secuencias por lo que fue necesario utilizar el código de nucleótidos de la IUPAC. En la figura 12 se presenta un ejemplo del electroferograma, parte de la secuencia E-UDMM-00114 en el programa *Sequence Scanner v.2*; se muestran picos que corresponden a la lectura de los nucleótidos con resolución bien definida, el valor  $Q_v > 20$  y las RFUs mayores de 500. Además, se observa una letra “M” en donde se sobreponen 2 picos de nucleótidos diferentes, corresponden una citocina que comparte la misma posición con una adenina; éste se consideró el SNP C > A.



**Figura 12.** Electroferograma de la secuencia E-UDMM-00114. Se muestra parte de la secuencia analizada que incluye el exón 5 de PPAR $\gamma$ . La flecha negra indica un polimorfismo C > A con código IUPAC “M”. Las barras  $Q_v$  con valores  $>20$  se presentan en color azul. Los colores de los picos corresponden a un nucleótido: verde para Adenina, negro para Guanina, azul para Citocina y rojo para Timina. Las RFUs (Unidades Relativas de Fluorescencia) tienen valores mayores de 500. El programa utilizado fue *Sequence Scanner v.2*.

Las 30 secuencias analizadas fueron: E-UDMM-00007.1, E-UDMM-00008.1, E-UDMM-00014.1, E-UDMM-00104, E-UDMM-00105, E-UDMM-00106, E-UDMM-00107, E-UDMM-00109, E-UDMM-00112, E-UDMM-00114, E-UDMM-00116, E-UDMM-00117, E-UDMM-00120, E-UDMM-00122, E-UDMM-00125, E-UDMM-00135, E-UDMM-00136, E-UDMM-00138, E-UDMM-00139, E-UDMM-00143, E-UDMM-00144, E-UDMM-00145, E-UDMM-00146, E-UDMM-00147, E-UDMM-00151, E-UDMM-00153, E-UDMM-00155, E-UDMM-00158, E-UDMM-00160 y E-UDMM-00167.

### **8.6 Alineamiento múltiple de las secuencias de nucleótidos.**

Se realizó el alineamiento múltiple de cada una de las secuencias de los voluntarios con la secuencia de referencia de PPAR $\gamma$  ID: *NG\_011749* (Anexo 3). De las 30 secuencias analizadas, 11 (37%) tuvieron al menos un cambio de nucleótido.

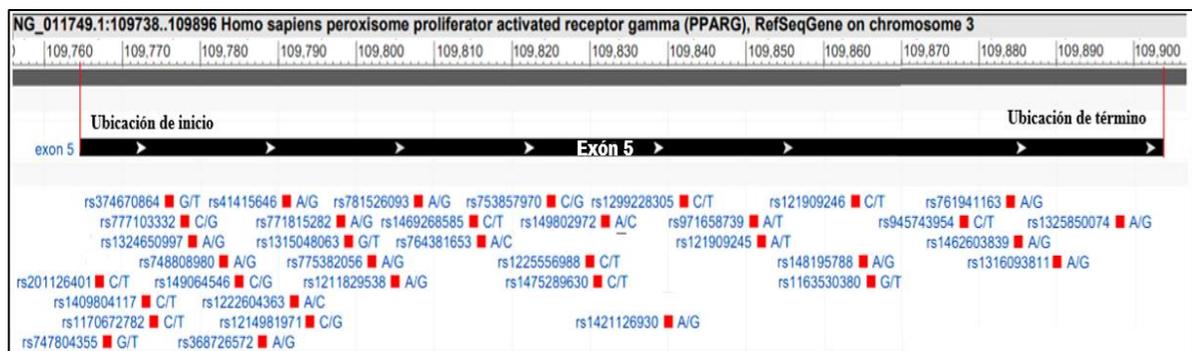
En el cuadro 4 se enlistan las secuencias y los SNPs identificados, la secuencia E-UDMM-00014.1 tuvo 3 cambios de nucleótidos en las posiciones 109844 G>A, 109881 T>C y 109888 G>C; la secuencias E-UDMM-00107, E-UDMM-00109, E-UDMM-00112 y E-UDMM-00114 tuvieron 2 cambios de nucleótidos y en el resto de las secuencias sólo se identificó un SNP. En las secuencias E-UDMM-00014.1, E-UDMM-00106, E-UDMM-00109 y E-UDMM-00158 se identificó el SNP G>A ubicado en la posición 109844, mientras que en el SNP 109888 G>C se identificó en las secuencias E-UDMM-00014.1 y E-UDMM-00114.

Se analizaron los SNPs reportados en la base de datos de NCBI, en el Dominio de Unión al ADN de PPAR $\gamma$  se han reportado 61 variantes, 36 de las cuales se encuentran en el exón 5 (figura 13). En este estudio, se identificaron 13 variantes diferentes en el exón 5.

**Cuadro 4.** Identificación de SNPs en el exón 5 de PPAR $\gamma$  de las secuencias de la serie E-UDMM. Proyecto “Búsqueda de nuevos polimorfismos en el DBD de PPAR $\gamma$  en estudiantes de Medicina de la UAEM con dislipidemias”. Septiembre 2018 a noviembre 2019.

| Clave USSDNA | Clave UDMM     | No. SNPs | Posición 1            | Posición 2   | Posición 3   | Tipo de dislipidemia |
|--------------|----------------|----------|-----------------------|--------------|--------------|----------------------|
| 11148        | E-UDMM-00007.1 | 1        | 109854 T>C            | -----        | -----        | HDL↓                 |
| 11151        | E-UDMM-00014.1 | 3        | <b>109844 G&gt;A*</b> | 109881 T>C   | 109888 G>C** | HDL↓                 |
| 11153        | E-UDMM-00104   | 1        | 109793 A>C            | -----        | -----        | TG↑                  |
| 11155        | E-UDMM-00106   | 1        | <b>109844 G&gt;A*</b> | -----        | -----        | HDL↓                 |
| 11156        | E-UDMM-00107   | 2        | 109844 G>C            | 109873 A>C   | -----        | COL↑, LDL↑           |
| 11157        | E-UDMM-00109   | 2        | <b>109844 G&gt;A*</b> | 109864 C>G   | -----        | COL↑, LDL↑           |
| 12399        | E-UDMM-00112   | 2        | 109798 A>C            | 109852 T>C   | -----        | HDL↓                 |
| 12400        | E-UDMM-00114   | 2        | 109781 C>A            | 109888 G>C** | -----        | HDL↓                 |
| 12401        | E-UDMM-00116   | 1        | 109826 G>C            | -----        | -----        | HDL↓                 |
| 12406        | E-UDMM-00147   | 1        | 109872 G>C            | -----        | -----        | TG↑, LDL↑            |
| 12408        | E-UDMM-00158   | 1        | <b>109844 G&gt;A*</b> | -----        | -----        | COL↑, LDL↑           |

\*SNP común en cuatro secuencias, sombreado azul. \*\*SNP común en dos secuencias, sombreado verde. Abreviaturas: COL↑, hipercolesterolemia; TG↑, hipertrigliceridemia; HDL↓, hipoalfalipoproteinemia; LDL↑, LDL alto.



**Figura 13.** SNPS reportados en el exón 5 de PPAR $\gamma$ . De acuerdo con la base de datos del NCBI, se han reportado 36 variantes en esta región que comprende desde la posición 109765 a la 109903. Las variantes se identifican con el código “rs” seguido de una serie única de números.<sup>69</sup>

Las frecuencias de los nuevos SNPs identificados van del 3.3 al 13.3%, la variante en la posición 109844 G>A tiene la frecuencia más alta (13.3%), otra variante en la misma posición, pero con cambio de G>C se encontró con una frecuencia de solo 3.3%; la segunda variante con mayor frecuencia fue identificada en la posición 109888 G>C con el 6.7%. El resto de los SNPs se presentaron en el 3.3% de las secuencias (cuadro 5).

## **8.7. Traducción nucleótido a proteína y predictor de daño a la estructura y función de la proteína.**

Con el fin de saber si estos cambios de nucleótidos afectaban la traducción hacia la proteína de PPAR $\gamma$ , se realizó la traducción de nucleótido a proteína de las 30 secuencias analizadas, y se realizó su alineamiento (Anexo 4). El exón 5 de PPAR $\gamma$  consta de 46 aminoácidos que van de la posición 133 a 178 en la proteína que tiene la secuencia de referencia NCBI: *NP\_619726*.<sup>68</sup>

En el cuadro 6 se enlistan la posición de las variantes identificadas y su cambio de aminoácido cuando aplica. El 85% de los SNPs fueron no sinónimos, es decir, que el cambio en el nucleótido cambió el aminoácido de la proteína; 15% restante fueron SNPs sinónimos, no presentan cambio en la secuencia de aminoácidos y correspondieron a las variantes en las posiciones 109854 T>C y 109881 T>C.

Cambios importantes se vieron en los grupos R de los aminoácidos, que pudieran estar implicados en el funcionamiento, plegamiento o estabilidad de la proteína PPAR $\gamma$ . Entre las variantes más importante tenemos la primera en la posición 153 que implicó un cambio de arginina (Arg) perteneciente al grupo R con carga positiva por una prolina (Pro) con grupo R alifático; en la posición 159 se observó la sustitución de una Arg (grupo R con carga positiva) por una treonina (Thr) del grupo polar sin carga; en la posición 162 hubo un cambio de una cisteína (Cys) del grupo R polar sin carga por una Arg (grupo R con carga positiva); en la posición 166 se encontró la sustitución de una Arg (grupo R con carga positiva) por una glicina (Gly) del grupo R alifático; y en la posición 174 se identificó la sustitución de una Gly con grupo polar alifático por una Arg con carga positiva). Se encontraron dos variantes de nucleótidos que no afectan la cadena de aminoácidos de la proteína, la primera en la posición 162 Cys> Cys y la segunda en la posición 171 Leu> Leu. Y se observa un solo cambio de aminoácido perteneciente al mismo grupo R, esto es, en la posición (Ile>Leu).

**Cuadro 5.** Frecuencias de las nuevas variantes identificadas en el exón 5 de PPPAR $\gamma$  de las secuencias E-UDMM. Proyecto “Búsqueda de nuevos polimorfismos en el DBD de PPPAR $\gamma$  en estudiantes de Medicina de la UAEM con dislipidemias”. Septiembre 2018 a noviembre 2019.

| <b>Posición</b> | <b>Cambio</b> | <b>% VAR</b> | <b>% WT</b> |
|-----------------|---------------|--------------|-------------|
| <b>109781</b>   | C>A           | 3.3          | 96.7        |
| <b>109793</b>   | A>C           | 3.3          | 96.7        |
| <b>109798</b>   | A>C           | 3.3          | 96.7        |
| <b>109826</b>   | G>C           | 3.3          | 96.7        |
| <b>109844</b>   | G>A           | 13.3         | 86.7        |
| <b>109844</b>   | G>C           | 3.3          | 96.7        |
| <b>109852</b>   | T>C           | 3.3          | 96.7        |
| <b>109854</b>   | T>C           | 3.3          | 96.7        |
| <b>109864</b>   | C/T           | 3.3          | 96.7        |
| <b>109872</b>   | G>C           | 3.3          | 96.7        |
| <b>109873</b>   | A>C           | 3.3          | 96.7        |
| <b>109881</b>   | T>C           | 3.3          | 96.7        |
| <b>109888</b>   | G>C           | 6.7          | 93.3        |

VAR: variante, WT: tipo silvestre. Se muestran 13 cambios de nucleótidos identificados en 11 de 30 secuencias analizadas.

Los resultados arrojados por el software *PolyPhen-2* indicaron que la predicción del efecto de la estructura y función de la proteína era "probablemente dañino" en los casos en donde se presentó cambio de aminoácido, a excepción del cambio 144 Ile>Leu que se predijo como "benigno".

Las regiones intrónicas también se analizaron, aun cuando son regiones no codificantes, y se encontraron cambios de nucleótidos en 11 de las 30 secuencias. Se identificaron entre uno y tres SNPs en ambos intrones; en la secuencia E-UDMM-00014.1 hubo tres cambios de nucleótidos, uno en la posición 109588 A>C en el intrón 4 y dos cambios en las posiciones 109916 C>T y 109935 T>C del intrón 2; en la secuencia E-UDMM-00109 también se encontraron tres variantes, en la posición 109575 G>C del intrón 4 y 109918 A>C y 109924

A>T en el intrón 5; y en la secuencia E-UDMM-00112 de igual manera, hubo tres cambios de nucleótidos, en el intrón 4 se encontraron las variantes en las posiciones 109587 T>C y 109587 T>C y una en el intrón 5 en la posición 109940 T>C. Las secuencias con dos variantes localizadas en el intrón 4 fueron la E-UDMM-00107, E-UDMM-00143 y E-UDMM-00160. En las secuencias intrónicas E-UDMM-00104, E-UDMM-00122 y E-UDMM-00167 se encontró un solo SNP (cuadro 7).

En total se identificaron 19 variantes en ambos intrones, el SNP en la posición 109575 G>A tuvo una frecuencia del 6.7%, mientras que los 18 restantes se encontraron con una frecuencia del 3.3% (datos no mostrados).

**Cuadro 6.** Cambio de nucleótido a aminoácido en PPAR $\gamma$  de las variantes identificadas en las secuencias E-UDMM. Proyecto “Búsqueda de nuevos polimorfismos en el DBD de PPAR $\gamma$  en estudiantes de Medicina de la UAEM con dislipidemias”. Septiembre 2018 a noviembre 2019.

| <b>Gen PPAR<math>\gamma</math></b> | <b>Proteína PPAR<math>\gamma</math></b> | <b>Efecto en estructura y función de proteína*</b> |
|------------------------------------|---|--|
| <b>Posición/ cambio nt</b>         | <b>Posición /cambio aa</b>              |  |
| 109781 C>A                         | 138 Thr> Lys                            | Probablemente dañino                               |
| 109793 A>C                         | 142 Lys> Thr                            | Probablemente dañino                               |
| 109798 A>C                         | 144 Ile> Leu                            | Benigno  |
| 109826 G>C                         | 153 Arg> Pro                            | Probablemente dañino                               |
| 109844 G>A                         | 159 Arg> Lys                            | Probablemente dañino                               |
| 109844 G>C                         | 159 Arg> Thr                            | Probablemente dañino                               |
| 109852 T>C                         | 162 Cys> Arg                            | Probablemente dañino                               |
| 109854 T>C                         | 162 Cys> Cys                            | -----  |
| 109864 C>T                         | 166 Arg> Gly                            | Probablemente dañino                               |
| 109872 G>C                         | 168 Gln> His                            | Probablemente dañino                               |
| 109873 A>C                         | 169 Lys> Gln                            | Probablemente dañino                               |
| 109881 T>C                         | 171 Leu> Leu                            | -----  |
| 109888 G>C                         | 174 Gly> Arg                            | Probablemente dañino                               |

nt: nucleótido, aa: aminoácido. A: Adenina, G: Guanina, C: Citocina, T: Timina. Los aminoácidos se presentan en abreviaturas. Gen PPAR $\gamma$  NCBI ID: NG\_011749. Proteína PPAR $\gamma$  secuencia de referencia NCBI: NP\_619726. \*Software PolyPhen-2.

**Cuadro 7.** Identificación de SNPs en los intrones 4 y 5 de PPAR $\gamma$  de las secuencias E-UDMM. Proyecto “Búsqueda de nuevos polimorfismos en el DBD de PPAR $\gamma$  en estudiantes de Medicina de la UAEM con dislipidemias”. Septiembre 2018 a noviembre 2019.

| Clave<br>USSDNA | Clave UDMM     | No. SNPs | Intrón 4   |            | Intrón 5   |            |
|-----------------|----------------|----------|------------|------------|------------|------------|
|                 |                |          | Posición 1 | Posición 2 | Posición 1 | Posición 2 |
| 11148           | E-UDMM-00007.1 | 1        | 109703 T>C | -----      | -----      | -----      |
| 11151           | E-UDMM-00014.1 | 3        | 109588 A>C | -----      | 109916 C>T | 109935 T>C |
| 11153           | E-UDMM-00104   | 1        | -----      | -----      | 109661 A>C | -----      |
| 11155           | E-UDMM-00106   | 1        | 109594 G>C | -----      | -----      | -----      |
| 11156           | E-UDMM-00107   | 2        | 109575 G>C | 109612 A>C | -----      | -----      |
| 11157           | E-UDMM-00109   | 3        | 109675 G>C | -----      | 109918 A>C | 109924 A>T |
| 12399           | E-UDMM-00112   | 3        | 109587 T>C | 109587 T>C | 109940 T>C | -----      |
| 19348           | E-UDMM-00122   | 1        | 109728 A>C | -----      | -----      | -----      |
| 22262           | E-UDMM-00143   | 2        | 109565 G>C | 109620 A>G | -----      | -----      |
| 12409           | E-UDMM-00160   | 2        | 109575 G>A | 109605 G>C | -----      | -----      |
| 12410           | E-UDMM-00167   | 1        | 109575 G>A | -----      | -----      | -----      |

Mismo SNP en dos secuencias diferentes, sombreado azul.

## 9.0 DISCUSION

El presente trabajo tuvo el objetivo de identificar SNPs en el dominio de unión al ADN del gen que codifica para PPAR $\gamma$ . Se determinó que la media del grupo se encuentra dentro de los valores normales. Sin embargo, se identificaron dislipidemias en el 71.4% de los hombres y el 76.2% de las mujeres. Si bien, en población adulta mexicana se ha reportado alta frecuencia en dislipidemias<sup>48</sup>, se destaca que esta frecuencia es en adultos jóvenes. Conocer los factores que predispongan a la presencia de dislipidemias es un gran reto, principalmente considerando la diversidad de factores que participan en su desarrollo.

Nuestros resultados muestran que en el dominio de unión al ADN se encuentran al menos 13 nuevos SNPs, además de 19 en los intrones 4 y 5, lo cual deja ver que este gen muestra una alta variabilidad alélica., en vista de que en promedio deberíamos de haber encontrado 2 SNPs (1 cada 200 a 300 pb aproximadamente<sup>70</sup>) para un producto de 455. De esta manera, será necesario realizar una caracterización más exhaustiva del gen que tiene una longitud de 153 507 pb, lo que pone en perspectiva la diversidad que pudiera ser encontrada y sobre todo la necesidad de conocer sus variantes para identificar otros eventos adversos, como hiperglucemiantes y el desarrollo de síndrome metabólico en donde se han reportado alelos que predisponen al desarrollo de estas patologías, pero que al buscarse en nuestra población, no han mostrado asociaciones significativas. Por lo que, teniendo en mente nuestros resultados, se comprende que al realizar la búsqueda de SNPs reportados en poblaciones anglosajonas, estos no se encuentren presentes al menos en el fragmento analizado por nosotros, debido a que existen SNPs propios de la población mexicana.

### **Las dislipidemias problema de salud pública.**

La prevalencia de dislipidemias es alta en jóvenes mexicanos aparentemente sanos.<sup>71</sup> En nuestro estudio, el 74.3% de los jóvenes tenía al menos un tipo de dislipidemia (datos no mostrados)

Se sabe que para el desarrollo de dislipidemias es necesaria la participación de diversos factores, tales como, los hábitos alimenticios, la inactividad física y la presencia de mutaciones en genes que participan en la regulación de la concentración circulante de los lípidos. En nuestro país según datos de la ENSANUT 2018 en la población mayor de 20 años, es evidente el alto consumo de alimentos no recomendables, entre los más frecuentes se mencionan: la ingesta de bebidas no-lácteas endulzadas en el 85.8%, botanas dulces y postres en el 35.4%, y comida rápida y antojitos mexicanos en el 20.3%.<sup>72</sup> La alta ingesta de carbohidratos está asociada con el aumento en los niveles de triglicéridos y la disminución del HDL.<sup>73</sup> Otros factores de riesgo para la presencia de dislipidemias son el sobrepeso y la obesidad, presente en 75.2% de los mexicanos (73% hombres y 76.8% mujeres).<sup>72</sup> Zhang y cols en el 2019 evidenció en su estudio que participantes de China con obesidad tenían niveles de triglicéridos, colesterol total y LDL significativamente más altos y HDL significativamente más bajo en comparación con los participantes no obesos ( $P < 0.001$ ).<sup>74</sup> En lo que respecta a la inactividad física el 57.9% de la población mexicana declaró ser inactiva físicamente, las prevalencias para jóvenes de entre 18 y 24 años fueron del 62.1% para hombres y 46.9% mujeres;<sup>75</sup> se ha demostrado que personas inactivas tienen niveles de triglicéridos y HDL significativamente más alto y más bajos respectivamente, en comparación con personas físicamente activas ( $P < 0.001$ ).<sup>74</sup> Nuestra investigación se limita a la comparación con los factores de riesgo ya mencionados debido a que no tenemos datos antropométricos ni información sobre el estilo de vida. Sin embargo, se pone en evidencia la presencia de condiciones que puedan estar participando en la desregulación de los niveles de lípidos en sangre.

La presencia de dislipidemia aterogénica, que incluye reducción de HDL, triglicéridos, colesterol y LDL elevados incrementan el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares y aterosclerosis en personas aparentemente sanas.<sup>76,77</sup> En nuestra investigación, encontramos la presencia de más de un tipo de dislipidemia en ocho diferentes combinaciones, la más frecuente con el 11.5% fue el colesterol y el LDL elevados, en segundo lugar, se encontró la combinación de HDL bajo con LDL alto con el 5.8% y solo un voluntario de sexo femenino presentó la combinación de las cuatro dislipidemias. Estudios previos demuestran que las lipoproteínas aterogénicas, como las partículas LDL y otras

lipoproteínas que contienen apo B, se acumulan lentamente en la pared arterial conforme avanza la edad, siendo la población adulta mayor la más expuesta a presentar enfermedades cardiovasculares.<sup>78</sup> Si bien, en los jóvenes se tiene menos riesgo de presentar placa arterosclerótica, es altamente conveniente la detección y control temprano de dislipidemias con el fin de disminuir el riesgo de enfermedad cardiovascular arterosclerótica en edades tardías o inclusive en adultos jóvenes. Como se mencionó anteriormente, el LDL alto fue la segunda dislipidemia más alta identificada en una quinta parte de nuestra población, lo que expone la necesidad de acciones preventivas para disminuir las dislipidemias en los grupos etarios analizados en este estudio.

### **El Dominio de unión al ADN de PPAR $\gamma$ presenta una diversidad alélica grande.**

El objetivo principal de este estudio se cumplió, al identificar nuevas variantes en el DBD de PPAR $\gamma$ . Se encontraron 13 variantes en el exón 5 que abarca la mayor parte del DBD, sin que alguna de estas variantes haya sido reportada previamente en las bases de datos del NCBI. Tres variantes identificadas coincidieron con tres posiciones ya reportadas, pero difirieron en el nucleótido sustituido, estas variantes fueron: 109864 C>T (rs121909246), identificada con el nucleótido C>G; 109798 A>G (rs771815282) identificada con A>C y 109852 T>A (rs121909245) identificado en la sustitución T>C.<sup>69</sup> Las variantes en la secuencia pueden conducir a manifestaciones clínicas a través de la pérdida de función, la ganancia de función o la actividad dominante-negativa; la variante rs121909246 localizada en la posición 109864 C>T se ha reportado clínicamente patógena asociada a lipodistrofia parcial familiar tipo 3, es una mutación no sinónima que conlleva al cambio Arg166Trp. Estudios previos han observado que esta variante interrumpe la unión al ADN y detiene la actividad transcripcional de la proteína, produciendo clínicamente las manifestaciones propias de la lipodistrofia<sup>61</sup>. El SNP rs771815282 (109798 A>G) no se ha vinculado con alguna patología clínica. Mientras que la variante rs121909245 (109864 C>T) se encuentra asociada a lipodistrofia parcial familiar tipo 3; investigaciones previas han demostrado que las consecuencias de esta mutación son pérdida de la capacidad de unión al ADN y disminución de su actividad transcripcional<sup>47</sup>. Aunque tres de los SNPs identificados por nuestra investigación coincidieron con la posición de tres SNPs reportados, no coincidieron

en el nucleótido sustituido; las dos variantes mencionadas anteriormente fueron clínicamente patológicas, por lo que es posible que nuestros SNPs tengan alguna repercusión en la actividad transcripcional de la proteína o en la capacidad de unión de PPAR $\gamma$  al ADN, los que no han sido identificados en nuestras poblaciones de manera amplia. El total de variantes identificadas en el fragmento de 455 fue de 32 nuevos SNPs. Lo que resalta que aproximadamente por cada 14 nucleótidos una variante, lo que coloca a PPAR $\gamma$  en un gen con una gran diversidad genética.

### **Alteraciones estructurales en PPAR $\gamma$ relacionadas con SNPs.**

Las sustituciones de aminoácidos pueden aumentar o disminuir la velocidad de plegamiento de una proteína, afectar la estabilidad, flexibilidad e interacción proteína-ADN, dependiendo principalmente de la ubicación y el tipo de variante.<sup>79</sup> En nuestros resultados, identificamos la sustitución en la posición 153 Arg>Pro, sustitución muy relevante debido a que se ha visto que el aminoácido prolina interrumpe la estructura secundaria regular de la proteína, por lo que su sustitución conduce a la pérdida de actividad.<sup>80</sup>

En el año 2008 Chandra y cols realizaron un trabajo estructural del complejo PPAR $\gamma$ -RXR $\alpha$  en el elemento de respuesta del PPRE; en dicha estructura se estableció que el aminoácido 160 asparagina (Asn) del DBD de PPAR $\gamma$  interactúa con la secuencia del PPRE surco menor del ADN blanco.<sup>81</sup> Si bien en nuestra investigación no se localizaron SNPs en el aminoácido 160 Asn, sí se encontraron variantes en las posiciones cercanas, entre éstas se encuentran 156 Arg>Pro, 159 Arg>Thr (variante más frecuente encontrada en el 13.3 % de la población), 159 Arg>Lys, 162 Cys>Arg, 166 Arg>Gly, 168 Lys>His, 169 Lys>Gln y 174 Gly>Arg. De acuerdo con la secuencia de aminoácidos de la proteína NP\_619726 reportada en NCBI, el sitio de unión al ADN comprende 23 aminoácidos localizados entre la posición 119 a la 186 de la proteína, entre estos se encuentra la Arg 159 con grupo R de carga positiva que en nuestro estudio de encontró sustituida por una Thr que pertenece al grupo R polar sin carga y la 166 Arg encontrada en nuestro estudio sustituida por Gly del grupo R alifático, siendo dos posiciones que coinciden con el sitio de unión al ADN reportado y en las cuales hay dos sustituciones de aminoácidos con grupos R diferentes. En diversas investigaciones se han

analizado mutaciones sin sentido (C114R, C131Y, C162W) dentro del DBD de PPAR $\gamma$  que codifican proteínas que no son capaces de unirse al ADN.<sup>82</sup> Bibliotecas de construcciones genómicas de PPAR $\gamma$  muestran que muchas variantes en DBD y LBD alteran la función de la proteína.<sup>83</sup> Por lo que tratamos de estudiar si los SNPs reportados por nosotros presentaban alguna predicción desfavorable. El software PolyPhen-2 permitió predecir el posible impacto de la sustitución de los aminoácidos en la estructura y función de proteína, en el cual se utilizan ocho características predictivas basadas en la secuencia y tres basadas en estructura de la proteína,<sup>38</sup> de los 11 SNPs no sinónimos identificadas en nuestra investigación, diez predijeron como probablemente dañinos y una única variante se identificó como benigna (144 Ile> Leu). Datos similares se encontraron en la identificación de nuevos SNPs en la proteína LPL entre estos están Gly161Glu y Val206Ala predichas como “probablemente dañinas”, mientras que la sustitución Ala427Thr fue “benigna”; en la proteína APOA5 se encontró la mutación nueva Thr133Arg predicha como “probablemente maligna”; y en la proteína LMF1 se predijo que las variantes Arg264Cys, Arg354Trp, Arg364Gln, Arg523His y Pro562Arg eran “probablemente dañinas” por PolyPhen.<sup>51</sup> Sin embargo, no se ha demostrado que las variantes identificadas en la presente investigación, puedan afectar la transcripción de genes implicados en el metabolismo lipídico que estuvieran participando en el desarrollo de las dislipidemias a edades tempranas.

### **Variantes alélicas de PPAR $\gamma$ y su relación con obesidad y dislipidemias.**

PPAR $\gamma$  tiene participación en el desarrollo de dislipidemias características de la obesidad, las cuales son: aumento de triglicéridos y FFA, disminución del HDL con alteración en su función y LDL ligeramente alto con aumento de partículas LDL pequeñas y densas. El aumento posprandial de la insulina produce la inhibición de la lipasa sensible a las hormonas, (enzima clave para la hidrólisis de los lípidos intracelulares), de esta manera la resistencia a la insulina tiene un gran impacto en el metabolismo de las lipoproteínas ricas en triglicéridos y FFA. La expresión de LPL puede ser afectada por mutaciones en PPAR $\gamma$ . La lipólisis de las lipoproteínas ricas en triglicéridos se ve afectada en la obesidad por los niveles reducidos de expresión de ARNm de LPL en el tejido adiposo las reducciones en la actividad de LPL

en el músculo esquelético y la competencia por la lipólisis entre VLDL y quilomicrones. La expresión del receptor de LDL se reduce en la obesidad.<sup>25</sup>

La variabilidad en el gen PPAR $\gamma$  puede incrementar el riesgo de dislipidemia y esto lo demostraron Shu-Jun Gu y cols en el 2014, quienes encontraron en una población de 820 sujetos de una provincia china, una frecuencia del polimorfismo 12AAla del 0.26 y el 1431T de 0.15, el primer alelo asociado con un incremento significativo de triglicéridos (IC95%,  $p < 0.01$ ) y el segundo asociado con niveles altos de colesterol total, triglicéridos y colesterol no HDL (IC95%,  $p < 0.01$ ), sugiriendo que los polimorfismos pueden afectar la regulación del metabolismo de los lípidos.<sup>58</sup> Debido a que PPAR $\gamma$  es un factor de transcripción, muy probablemente la primera consecuencia de una variante genética sería una alteración de los niveles de expresión de sus genes diana.<sup>84</sup> Se mencionan algunos polimorfismos como Pro12Ala asociados con reducción de la actividad y niveles de LPL así como niveles reducidos de adiponectina y resistina; la variante C1431T asociada con el incremento del IMC y masa grasa y el aumento de leptina y resistina; el Pro115Gln implicado en el aumento del IMC de personas obesas; las variantes Pro495Leu y Val318Me asociadas con resistencia a la insulina, diabetes tipo 2, dislipidemias y disminución de los niveles plasmáticos de adiponectina; las variantes Cys114Arg, Cys131Tyr y Cys162Trp asociadas con la reducción de la grasa corporal, lipodistrofia parcial de las extremidades, dislipidemia severa con aumento de triglicéridos y HDL bajo; y las variantes C-689T y C-681G implicadas en el aumento del IMC y los niveles de LDL.<sup>6</sup>

PPAR $\gamma$  tiene un papel importante en la regulación de la adipogénesis, el almacenamiento de lípidos, el metabolismo de la glucosa y la regulación transcripcional de genes, tales como el gen que codifica la proteína ligante de ácidos grasos (*aP2*), lipoproteína lipasa (*LPL*), transporte de ácidos grasos, proteína transportadora de ácidos grasos (*FABP*), entre otros.<sup>13</sup> En el 2016, un reporte de China de los polimorfismos rs1805192 y rs3856806 infirió que podían influir en la actividad del receptor, la capacidad de transactivar los promotores sensibles y finalmente regular los genes blanco de PPAR $\gamma$  que podrían influir en el metabolismo de los lípidos. En el estudio, estos polimorfismos fueron considerados factores de riesgo para el desarrollo de dislipidemias.<sup>58</sup>

En esta investigación también se logró identificar SNPs en un fragmento de los intrones 4 y 5. Se sabe que los intrones no codifican para una proteína, pero pueden aumentar los niveles de transcripción al afectar la velocidad de ésta, el procesamiento, la exportación nuclear y la estabilidad de la transcripción<sup>85</sup>. Se tiene evidencia de que mutaciones intrónicas pueden causar enfermedades como el cáncer, además, las mutaciones intrónicas profundas (100 pb alejadas de límite con el exón) pueden alterar los motivos reguladores de la transcripción y los genes de ARN no codificantes<sup>62</sup>. De las 19 variantes intrónicas identificadas en la presente investigación, cinco han sido reportadas en la base de datos del NCBI, estas son rs980219251 (109565 G>C), rs1345499644 (109575 G>C), rs1378259597 (109594 G>C), rs984816779 (109605 G>C) y rs4135334 (109924 A>T). Ninguna de las variantes antes mencionadas ha sido reportada clínicamente patógena, y únicamente el SNP rs4135334(109924 A>T) se ha asociado con una conectividad cerebral anormal en recién nacidos prematuros.<sup>86</sup> El impacto de estos polimorfismo establece llevar a cabo cinéticas de transcripción y estabilidad del ARNm, que sin duda serán interesantes para estudios futuros.

## **10.0 FORTALEZAS Y LIMITACIONES**

Nuestro estudio tuvo una gran fortaleza debido a que, a pesar de tener una población de estudio pequeña, se caracterizaron factores genéticos en una población joven con dislipidemias. Además, se documentó una alta prevalencia de dislipidemias en jóvenes aparentemente sanos. Entre las limitaciones tenemos la falta de datos como peso, talla, Índice de Masa Corporal (IMC), presión arterial, actividad física y factores dietéticos. Sin embargo, este estudio da pauta para establecer el diseño de estudios que permitan profundizar en el papel de los factores genéticos en estas patologías.

## 11.0 CONCLUSIONES.

Nuestro estudio demostró 13 nuevos SNPs en el exón 5 que comprende la mayor parte del dominio de unión al ADN de PPAR $\gamma$ , con frecuencias que van del 3.3 al 13.3%, hasta el momento fueron consideradas como variantes propias de nuestra población debido a que no han sido reportadas anteriormente. Dos SNPs son los más frecuentes, 109888 G>C con el 6.7% y 109844 G>A con la frecuencia más alta (13.3%); esta última se encuentra en la proteína en la posición 159 Arg>Thr, fue identificada en el sitio de unión al ADN reportado, junto con 166 Arg>Lys. La mayoría de los SNPs fueron predichos como potencialmente dañinos para la estructura y función de la proteína de PPAR $\gamma$ .

## **12.0 PERSPECTIVAS**

- Realizar la identificación de nuevos SNPs en PPAR $\gamma$  en población sin dislipidemias y elegir variantes candidatas que puedan impactar en la estructura o función de PPAR $\gamma$ .
- Realizar un estudio de asociación entre los nuevos SNPs detectados por nuestro grupo y la presencia de dislipidemias.

### 13.0 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kim T-H, Kim M-Y, Jo S-H, Park J-M, Ahn Y-H. Modulation of the transcriptional activity of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by protein-protein interactions and post-translational modifications. *Yonsei Med J.* 2013;54(3):545-559. doi:10.3349/ymj.2013.54.3.545
2. Zardi EM, Navarini L, Sambataro G, Piccinni P, Sambataro FM, Spina C, et al. Hepatic PPARs: their role in liver physiology, fibrosis and treatment. *Curr Med Chem.* 2013;20(27):3370-3396. doi:10.2174/09298673113209990136
3. Duan SZ, Ivashchenko CY, Russell MW, Milstone DS, Mortensen RM. Cardiomyocyte-specific knockout and agonist of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma both induce cardiac hypertrophy in mice. *Circ Res.* 2005;97(4):372-379. doi:10.1161/01.RES.0000179226.34112.6d
4. Lai M-C, Teng T-H, Yang C. The natural PPAR agonist linoleic acid stimulated insulin release in the rat pancreas. *J Vet Med Sci.* 2013;75(11):1449-1454. doi:10.1292/jvms.13-0189
5. Hiji AK, Michalik L, Wahli W. PPARs: transcriptional effectors of fatty acids and their derivatives. *Cell Mol Life Sci.* 2002;59(5):790-798. doi:10.1007/s00018-002-8467-x
6. Costa V, Gallo MA, Letizia F, Aprile M, Casamassimi A, Ciccodicola A. PPARG: Gene Expression Regulation and Next-Generation Sequencing for Unsolved Issues. *PPAR Res.* 2010;2010. doi:10.1155/2010/409168
7. Capelli D, Cerchia C, Montanari R, Loiodice F, Tortorella P, Laghezza A, et al. Structural basis for PPAR partial or full activation revealed by a novel ligand binding mode. *Sci Rep.* 2016;6:34792. doi:10.1038/srep34792
8. Zárata A, Saucedo R HM. El receptor de peroxisoma-proliferador-activado gamma (PPAR $\gamma$ ) es un factor de transcripción multigénico de versatilidad metabólica. *Acta Médica Grup Ángeles.* 2005;3(1):53-54.
9. Tyagi S, Sharma S, Gupta P, Saini A, Kaushal C. The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. *J Adv Pharm Technol Res.* 2011;2(4):236. doi:10.4103/2231-4040.90879

10. Kieæ-Wilk, B, Dembińska-kieæ, A, Olszanecka, A, Bodzioch, M, Kawecka-Jaszcz K. The selected pathophysiological aspects of PPARs activation. *J Physiol Pharmacol.* 2005;56(2):149-162.
11. Kvandová M, Majzúnová M, Dovinová I. The role of PPARgamma in cardiovascular diseases. *Physiol Res.* 2016;65(Suppl 3):S343-S363. doi:10.33549/physiolres.933439
12. Poulsen L la C, Siersbæk M, Mandrup S. PPARs: fatty acid sensors controlling metabolism. *Semin Cell Dev Biol.* 2012;23(6):631-639. doi:10.1016/j.semcdb.2012.01.003
13. Zieleniak A, Wójcik M, Woźniak LA. Structure and physiological functions of the human peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ . *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2008;56(5):331-345. doi:10.1007/s00005-008-0037-y
14. Sokkar S, El-sharnouby JA, Helmy A. Gene Polymorphism in Type 2 Diabetes Mellitus. *Eur J Gen Med.* 2009;2(6):78-86.
15. Lefterova MI, Haakonsson AK, Lazar MA, Mandrup S. PPAR $\gamma$  and the global map of adipogenesis and beyond. *Trends Endocrinol Metab.* 2014;25(6):293-302. doi:10.1016/j.tem.2014.04.001
16. Boughanem H, Cabrera-Mulero A, Millán-Gómez M, Garrido-Sánchez L, Cardona F, Tinahones FJ, et al. Transcriptional Analysis of FOXO1, C/EBP- $\alpha$  and PPAR- $\gamma$ 2 Genes and Their Association with Obesity-Related Insulin Resistance. *Genes (Basel).* 2019;10(9). doi:10.3390/genes10090706
17. Broekema MF, Savage DB, Monajemi H, Kalkhoven E. Gene-gene and gene-environment interactions in lipodystrophy: Lessons learned from natural PPAR $\gamma$  mutants. *Biochim Biophys acta Mol cell Biol lipids.* 2019;1864(5):715-732. doi:10.1016/j.bbalip.2019.02.002
18. Amber-Vitos O, Chaturvedi N, Nachliel E, Gutman M, Tsfadia Y. The effect of regulating molecules on the structure of the PPAR-RXR complex. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1861(11):1852-1863. doi:10.1016/j.bbalip.2016.09.003
19. Mota de Sá P, Richard AJ, Hang H, Stephens JM. Transcriptional Regulation of Adipogenesis. *Compr Physiol.* 2017;7(2):635-674. doi:10.1002/cphy.c160022
20. Weikum ER, Liu X, Ortlund EA. The nuclear receptor superfamily: A structural perspective. *Protein Sci.* 2018;27(11):1876-1892. doi:10.1002/pro.3496

21. Ahmadian M, Suh JM, Hah N, Liddle C, Atkins AR, Downes M, et al. PPAR $\gamma$  signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat Med*. 2013;19(5):557-566. doi:10.1038/nm.3159
22. Gupta D. The role of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  in pancreatic  $\beta$  cell function and survival: therapeutic implications for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes, Obes* 2010;12(12):1036-1047. doi:10.1111/j.1463-1326.2010.01299.x.The
23. Dammone G, Karaz S, Lukjanenko L, Winkler C, Sizzano, Jacot G, et al. PPARgamma Controls Ectopic Adipogenesis and Cross-Talks with Myogenesis During Skeletal Muscle Regeneration. *Int J Mol Sci*. 2018;19(7):1-17. doi:10.3390/ijms19072044
24. Inoue M, Ohtake T, Motomura W, Takahashi N, Hosoki Y, Miyoshi S, et al. Increased expression of PPARgamma in high fat diet-induced liver steatosis in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;336(1):215-222. doi:10.1016/j.bbrc.2005.08.070
25. Klop B, Elte JWF, Cabezas MC. Dyslipidemia in obesity: mechanisms and potential targets. *Nutrients*. 2013;5(4):1218-1240. doi:10.3390/nu5041218
26. Ramasamy I. Update on the molecular biology of dyslipidemias. *Clin Chim Acta*. 2016;454:143-185. doi:10.1016/j.cca.2015.10.033
27. Errico TL, Chen X, Martin Campos JM, Julve J, Escolà-Gil JC, Julve J, et al. [Basic mechanisms: structure, function and metabolism of plasma lipoproteins]. *Clin Investig Arterioscler*. 2013;25(2):98-103. doi:10.1016/j.arteri.2013.05.003
28. Brunzell JD, Davidson M, Furberg CD, Goldberg RB, Howard B. V, Stein JH, et al. Lipoprotein Management in Patients With Cardiometabolic Risk. Consensus Conference Report From the American Diabetes Association and the American College of Cardiology Foundation. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51(15):1512-1524. doi:10.1016/j.jacc.2008.02.034
29. Tosheska Trajkovska K, Topuzovska S. High-density lipoprotein metabolism and reverse cholesterol transport: strategies for raising HDL cholesterol. *Anatol J Cardiol*. 2017;18(2):149-154. doi:10.14744/AnatolJCardiol.2017.7608
30. Nelson LD CM. *Lehninger Principios de Bioquímica*. Sexta. (Omega, ed.). Barcelona, España; 2014.

31. Semple RK, Chatterjee VKK, O’Rahilly S. PPAR gamma and human metabolic disease. *J Clin Invest.* 2006;116(3):581-589. doi:10.1172/JCI28003
32. Gervois P, Torra IP, Fruchart JC, Staels B. Regulation of lipid and lipoprotein metabolism by PPAR activators. *Clin Chem Lab Med.* 2000;38(1):3-11. doi:10.1515/CCLM.2000.002
33. Kersten S. Peroxisome proliferator activated receptors and lipoprotein metabolism. *PPAR Res.* 2008;2008:132960. doi:10.1155/2008/132960
34. Chanock S. Candidate genes and single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the study of human disease. *Dis Markers.* 2001;17(2):89-98. doi:10.1155/2001/858760
35. Ramírez-Bello J, Vargas-Alarcón G, Tovilla-Zárate C, Fragoso JM. [Single nucleotide polymorphisms (SNPs): functional implications of regulatory-SNP (rSNP) and structural RNA (srSNPs) in complex diseases]. *Gac Med Mex.* 2013;149(2):220-228.
36. Li Q, Chen R, Bie L, Zhao D, Huang C, Hong J. Association of the variants in the PPARG gene and serum lipid levels: a meta-analysis of 74 studies. *J Cell Mol Med.* 2015;19(1):198-209. doi:10.1111/jcmm.12417
37. Yates CM, Sternberg MJE. The effects of non-synonymous single nucleotide polymorphisms (nsSNPs) on protein-protein interactions. *J Mol Biol.* 2013;425(21):3949-3963. doi:10.1016/j.jmb.2013.07.012
38. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods.* 2010;7(4):248-249. doi:10.1038/nmeth0410-248
39. Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet.* 2013;Chapter 7:Unit7.20. doi:10.1002/0471142905.hg0720s76
40. Wu L, Parhofer KG. Diabetic dyslipidemia. *Metabolism.* 2014;63(12):1469-1479. doi:10.1016/j.metabol.2014.08.010
41. Ruotolo G, Howard B V. Dyslipidemia of the metabolic syndrome. *Curr Cardiol Rep.* 2002;4(6):494-500. doi:10.1007/s11886-002-0113-6
42. Cleeman JI. *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) Final Report.* Vol 285.; 2001. doi:

- 10.1001/jama.285.19.2486.
43. Secretaría de salud. Diagnóstico y tratamiento de dislipidemias (hipercolesterolemia) en adultos. Catálogo Maestro de Guías de Práctica Clínica: IMSS-233-09. 2016. México.
  44. Norma Oficial Mexicana NOM037-SSA2-2012, Para La Prevención, Tratamiento y Control de Las Dislipidemias. Diario Oficial de la Federación (13-07-2012).
  45. Munguía-Miranda C, Sánchez-Barrera RG, Hernández-Saavedra D, Cruz-López M. [Dyslipidemia prevalence and its relationship with insulin resistance in a population of apparently healthy subjects]. *Salud Publica Mex.* 2008;50(5):375-382. doi:10.1590/s0036-36342008000500010
  46. Aguilar-Salinas CA, Gomez-Perez FJ, Rull J, Villalpando S, Barquera S, Rojas R. Prevalence of dyslipidemias in the Mexican National Health and Nutrition Survey 2006. *Salud Publica Mex.* 2010;52 Suppl 1:S44-53. doi:10.1590/s0036-36342010000700008
  47. Ko A, Cantor RM, Weissglas-Volkov D, Nikkola E, Linga Reddy PMV, Sinsheimer JS, et al. Amerindian-specific regions under positive selection harbour new lipid variants in Latinos. *Nat Commun.* 2014;5:3983. doi:10.1038/ncomms4983
  48. Rivas-Gomez B, Almeda-Valdes P, Tussie-Luna MT, Aguilar-Salinas CA. Dyslipidemia in Mexico, a call for action. *Rev Invest Clin.* 2018;70(5):211-216. doi:10.24875 / RIC.18002573
  49. Abou Ziki MD, Mani A. Metabolic syndrome: genetic insights into disease pathogenesis. *Curr Opin Lipidol.* 2016;27(2):162-171. doi:10.1097/MOL.0000000000000276
  50. Dron JS, Hegele RA. Genetics of Triglycerides and the Risk of Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep.* 2017;19(7):31. doi:10.1007/s11883-017-0667-9
  51. Surendran RP, Visser ME, Heemelaar S, Wang J, Peter J, Defesche JC, et al. Mutations in LPL, APOC2, APOA5, GPIHBP1 and LMF1 in patients with severe hypertriglyceridaemia. *J Intern Med.* 2012;272(2):185-196. doi:10.1111/j.1365-2796.2012.02516.x
  52. Ríos-González BE, Ibarra-Cortés B, Ramírez-López G, Sánchez-Corona J, Magaña-Torres MT. Association of polymorphisms of genes involved in lipid metabolism with

- blood pressure and lipid values in mexican hypertensive individuals. *Dis Markers*. 2014;2014:150358. doi:10.1155/2014/150358
53. Nikolaev I V, Mulyukova R V, Kayumova LR, Vorobieva E V, Gorbunova VY. Analysis of interactions of lipid metabolism alleles in dyslipidemia. *Russ J Genet Appl Res*. 2015;5(4):313-321. doi:10.1134/S2079059715040103
54. Oldoni F, Sinke RJ, Kuivenhoven JA. Mendelian disorders of high-density lipoprotein metabolism. *Circ Res*. 2014;114(1):124-142. doi:10.1161/CIRCRESAHA.113.300634
55. Slatter TL, Jones GT, Williams MJA, van Rij AM, McCormick SPA. Novel rare mutations and promoter haplotypes in ABCA1 contribute to low-HDL-C levels. *Clin Genet*. 2008;73(2):179-184. doi:10.1111/j.1399-0004.2007.00940.x
56. Phani NM, Vohra M, Rajesh S, Prabha A, Nagri SK, D'Souza SC, et al. Implications of critical PPAR $\gamma$ 2, ADIPOQ and FTO gene polymorphisms in type 2 diabetes and obesity-mediated susceptibility to type 2 diabetes in an Indian population. *Mol Genet Genomics*. 2016;291(1):193-204. doi:10.1007/s00438-015-1097-4
57. Kruzliak P, Haley AP, Starcevic JN, Gaspar L, Petrovic D. Polymorphisms of the peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (rs1801282) and its coactivator-1 (rs8192673) are associated with obesity indexes in subjects with type 2 diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol*. 2015;14:42. doi:10.1186/s12933-015-0197-0
58. Gu S-J, Guo Z-R, Zhou Z-Y, Hu X-S, Wu M, Zhang N. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  polymorphisms as risk factors for dyslipidemia. *Mol Med Rep*. 2014;10(5):2759-2763. doi:10.3892/mmr.2014.2553
59. Qian X, Guo D, Zhou H, Qiu J, Wang J, Shen C, et al. Interactions Between PPARG and AGTR1 Gene Polymorphisms on the Risk of Hypertension in Chinese Han Population. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2018;22(2):90-97. doi:10.1089/gtmb.2017.0141
60. Tian J, Hu S, Wang F, Yang X, Li Y, Huang C. PPARG, AGTR1, CXCL16 and LGALS2 polymorphisms are correlated with the risk for coronary heart disease. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(3):3138-3143.
61. Monajemi H, Zhang L, Li G, Jenning EH, Cao H, Maas M, et al. Familial partial lipodystrophy phenotype resulting from a single-base mutation in deoxyribonucleic

- acid-binding domain of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(5):1606-1612. doi:10.1210/jc.2006-1807
62. Vaz-Drago R, Custodio N, Carmo-Fonseca M. Deep intronic mutations and human disease. *Hum Genet.* 2017;136(9):1093-1111. doi:10.1007/s00439-017-1809-4
  63. Salgado BK. Identificación de polimorfismos en el gen PPAR $\gamma$  y su relación con las dislipidemias en sujetos mexicanos con obesidad [Tesis de maestría]. México: Universidad Autónoma de Morelos. Facultad de Medicina; 2016. p.85
  64. Lüdtke A, Buettner J, Wu W, Muchir A, Schoroeter A, Zinn-Justin S, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma C190S mutation causes partial lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(6):2248-2255. doi:10.1210/jc.2005-2624
  65. Homo sapiens peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPARG), RefSeqGene on chromosome 3. NCBI Reference Sequence: NG\_011749.1. [base de datos en Internet]. USA: National Center for Biotechnology Information. 2019 [Último acceso 15 de noviembre de 2019] [1 página]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/226061859>
  66. BLAST Basic Local Alignment Search Tool [base de datos en Internet]. USA. National Center for Biotechnology Information. 2019 [Último acceso 15 de noviembre de 2019] [1 página]. Disponible en: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
  67. Prediction of functional effects of human nsSNPs [Sede Web]. PolyPhen-2 [Último acceso 20 de febrero del 2020]. <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>
  68. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma isoform 1 [Homo sapiens]. NCBI Reference Sequence: NP\_619726.2 [base de datos en Internet]. USA: National Center for Biotechnology Information. 2019 [Último acceso 15 de noviembre de 2019] [1 página]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/116284370>
  69. dbSNP [Sede Web]. USA. National Center for Biotechnology Information. 2020 [Último acceso 27 de febrero de 2020] [1 página]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>
  70. Pérez JLA. *Sinsinio de Castro. Manual de Patología General.* 8<sup>a</sup>. (Elsevier, ed.). Barcelona, España; 2020.
  71. Hernández-Alcaraz C, Aguilar-Salinas CA, Mendoza-Herrera K, Pedroza-Tobías A, Villalpando S, Shamah-Levy T, et al. Dyslipidemia prevalence, awareness, treatment

- and control in Mexico: results of the Ensanut 2012. *Salud Publica Mex.* 2020;62(2):137-146. doi:10.21149/10520
72. Secretaría de Salud. INEGI. Instituto Nacional de Salud Pública. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018 Presentación de resultados. Disponible en: [https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/doctos/informes/ensanut\\_2018\\_presentacion\\_resultados.pdf](https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/doctos/informes/ensanut_2018_presentacion_resultados.pdf)
  73. Ma Y, Li Y, Chiriboga DE, Olendzki Bc, Hebert JR, Li W, et al. Association between carbohydrate intake and serum lipids. *J Am Coll Nutr.* 2006;25(2):155-163. doi:10.1080/07315724.2006.10719527
  74. Zhang Y, Yang J, Ye J, Guo Q, Wang W, Sun Y, et al. Separate and combined associations of physical activity and obesity with lipid-related indices in non-diabetic and diabetic patients. *Lipids Health Dis.* 2019;18(1):49. doi:10.1186/s12944-019-0987-6
  75. INEGI. *Resultados Del Módulo de Práctica Deportiva y Ejercicio Físico 2019.*; 2020. Disponible: <https://www.inegi.org.mx/programas/moprade/>
  76. Duran EK, Aday AW, Cook NR, Buring JE, Ridker PM, Pradhan AD. Triglyceride-Rich Lipoprotein Cholesterol, Small Dense LDL Cholesterol, and Incident Cardiovascular Disease. *J Am Coll Cardiol.* 2020;75(17):2122-2135. doi:10.1016/j.jacc.2020.02.059
  77. Aday AW, Lawler PR, Cook NR, Ridker PM, Mora S, Pradhan AD. Lipoprotein Particle Profiles, Standard Lipids, and Peripheral Artery Disease Incidence. *Circulation.* 2018;138(21):2330-2341. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.118.035432
  78. Ference BA, Graham I, Tokgozoglul, Catapano AL. Impact of Lipids on Cardiovascular Health: JACC Health Promotion Series. *J Am Coll Cardiol.* 2018;72(10):1141-1156. doi:10.1016/j.jacc.2018.06.046
  79. George Priya Doss C, Chakraborty C, Narayan V, Thirumal Kumar D. Computational approaches and resources in single amino acid substitutions analysis toward clinical research. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2014;94:365-423. doi:10.1016/B978-0-12-800168-4.00010-X
  80. Parker J. Amino Acid Substitution. *Encycl Genet.* 2001:57-58.

doi:10.1006/rwgn.2001.0042

81. Chandra V, Huang P, Hamuro Y, Raghuram S, Wang Y, Burris TP, et al. Structure of the intact PPAR-gamma-RXR- nuclear receptor complex on DNA. *Nature*. 2008;456(7220):350-356. doi:10.1038/nature07413
82. Agostini M, Schoenmakers E, Mitchell C, Szatmari I, Savage V, Smith A, et al. Non-DNA binding, dominant-negative, human PPARgamma mutations cause lipodystrophic insulin resistance. *Cell Metab*. 2006;4(4):303-311. doi:10.1016/j.cmet.2006.09.003
83. Majithia AR, Tsuda B, Agostini M, Gnanapradeepan K, Rice R, Peloso G, et al. Prospective functional classification of all possible missense variants in PPARG. *Nat Genet*. 2016;48(12):1570-1575. doi:10.1038/ng.3700
84. Broekema MF, Massink MPG, Donato C, Ligt J, Schaarschmidt J, Borgman A, et al. Natural helix 9 mutants of PPAR $\gamma$  differently affect its transcriptional activity. *Mol Metab*. 2019;20:115-127. doi:10.1016/j.molmet.2018.12.005
85. Shaul O. How introns enhance gene expression. *Int J Biochem Cell Biol*. 2017;91(Pt B):145-155. doi:10.1016/j.biocel.2017.06.016
86. Krishnan ML, Wang Z, Aljabar P, Ball G, Mirza G, Saxena A, et al. Machine learning shows association between genetic variability in PPARG and cerebral connectivity in preterm infants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(52):13744-13749. doi:10.1073/pnas.1704907114

## 14.0 ANEXOS

### Anexo 1. Carta de consentimiento informado.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS  
FACULTAD DE MEDICINA  
Laboratorio "Biología de Células Troncales"  
ESTUDIO DOEM  
BASE DE DATOS PARA IDENTIFICAR EL GENOMA  
DIABESOGÉNICO DEL ESTADO DE MORELOS

Clave L11-F-CCI-01

|               |            |
|---------------|------------|
| Edición       | 1          |
| Emisión       | 09 07 2018 |
| Página 1 de 4 |            |
| Código:       |            |

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

**ESTUDIO DOEM  
BASE DE DATOS PARA IDENTIFICAR EL GENOMA DIABESOGÉNICO DEL  
ESTADO DE MORELOS**

### **CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO**

**Elaboró**  
*QBP Gabriela Salgado Cortez*  
*Facultad de Medicina(UAEM)*

**Revisó**  
*Dra. Luz María González Robledo*  
*PITC Facultad de Medicina (UAEM)*

**Autorizó**  
*Dr. Jesús Santa Olalla Tapia*



Estimado participante:

Se le está pidiendo que participe en un estudio de investigación. Antes de que tome una decisión, es importante que entienda por qué se está realizando la investigación, lo que ésta involucrará, así como los posibles beneficios, riesgos y malestares. Por favor tómese su tiempo para leer detalladamente la siguiente información y discutirla con el investigador asociado, si así lo desea.

Se está realizando un estudio cuyo título es: "Identificación de nuevos polimorfismos en el dominio de unión al ADN de PPAR $\gamma$  y su frecuencia en dislipidemias en voluntarios jóvenes del Estado de Morelos" el cual forma parte de un proyecto más amplio titulado "Base de Datos para Identificar el Genoma Diabesogénico en Morelos" estudio registrado y aprobado ante el Comité Local de Investigación del Instituto Mexicano del Seguro Social con el número R-2007-1701-12, y registrado en la Facultad de Medicina con el número 2017-77. La finalidad del estudio es identificar variantes de genes para ser empleados como marcadores de riesgo bioquímico, somatométrico y/o genético para el desarrollo de enfermedades metabólicas, como la obesidad, dislipidemias, diabetes, hipertensión, síndrome metabólico y/o enfermedad cardiovascular, o las que en el futuro se determinen. La obesidad y resistencia a la insulina, entre otros parámetros bioquímicos, están asociadas a anomalías cardiovasculares por lo que es importante conocerlas.

Si decide participar en el estudio, usted autoriza lo siguiente:

- Que se le realice una somatometría completa la cual consiste en la medición de: peso, talla, diámetro de cadera, diámetro de cintura, diámetro de brazo, de muñeca y de cuello y composición corporal.
- Que se tomen muestras de sangre por venopunción, con un total de 20 ml, para cuantificar: glucosa sérica en ayuno y perfil de lípidos que incluye colesterol total, triglicéridos, colesterol HDL y LDL. Además se utilizará para purificación de ácidos nucleicos para estudios genéticos.
- Que responda un cuestionario con preguntas sobre sus datos personales, sociodemográficos, antecedentes hereditarios de la familia, preguntas relacionadas a enfermedades actuales o previas, hábitos y estilos de vida.
- Que se conserven sus muestras de sangre o sus fracciones para futuros estudios, bioquímicos ó genéticos, cuyos hallazgos le serán notificados en su oportunidad.



CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Los riesgos e inconvenientes que representa el estudio son mínimos y están asociados a la toma inicial de las muestras sanguíneas. Éstas pueden llegar a causar un ligero dolor que desaparecerá inmediatamente, sensación de mareo que generalmente es causado por nerviosismo o estrés, por lo cual se recomienda mantenerse tranquilo y permanecer sentado y, en algunos casos, puede presentarse un moretón en el sitio de punción que no pone en peligro su brazo y no requiere de tratamiento, éste desaparecerá entre 1 y 2 semanas. En cuanto a las preguntas de los cuestionarios, si alguna le hace sentir incómodo(a), tiene el derecho de no responderla.

Los investigadores le entregarán los resultados de las pruebas realizadas en la fecha que sea señalada por el personal de la Facultad de Medicina. En el caso de encontrar valores alterados en las pruebas bioquímicas, se le indicará para que acuda con su médico familiar o de preferencia, para su valoración, diagnóstico y toma de decisiones.

Su participación es voluntaria y si bien no recibirá ninguna remuneración económica, usted obtendrá como beneficio los resultados de las pruebas bioquímicas, genéticas y somatométricas. Además usted conserva el derecho de negarse a participar en el estudio o retirarse del mismo en cualquier momento, sin que ello afecte el proceso de entrevista médica y control de su salud o situación académica en la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

El investigador le asegura que sus datos serán manejados en forma confidencial mediante la asignación de un código único que será utilizado tanto en las pruebas bioquímicas, como en las mediciones somatométricas, genéticas y cuestionarios para evitar que sus datos personales aparezcan. De esta manera, se mantendrá su anonimato en las presentaciones o publicaciones que se realicen del presente estudio respetando en todo momento su privacidad.

En caso de duda podrá realizar todas las preguntas para lo cual se le proporcionará el número telefónico para cualquier duda del Investigador Responsable 777 3 29 70 00 ext. 3469 con el Dr. Jesús Santa Olalla Tapia o al correo electrónico [jsa@uaem.mx](mailto:jsa@uaem.mx).

Antes de firmar le pedimos que nos manifieste cualquier duda o pregunta referente a este estudio.



|                                   |               |            |
|-----------------------------------|---------------|------------|
|                                   | Edición       | 1          |
|                                   | Emisión       | 09/07/2018 |
| CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO | Página 4 de 4 |            |
|                                   | Código:       |            |

Su firma indica su aceptación a participar voluntariamente en la presente investigación.

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del participante  
Número de teléfono: \_\_\_\_\_  
Correo electrónico: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Dr. Jesús Santa Olalla Tapia  
Investigador Principal

\_\_\_\_\_  
QBP. Gabriela Salgado Cortez  
Investigador Asociado

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del testigo 1  
Número de teléfono: \_\_\_\_\_  
Correo electrónico: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del testigo 2  
Número de teléfono: \_\_\_\_\_  
Correo electrónico: \_\_\_\_\_

## Anexo 2. Parámetros del diseño de oligonucleótidos para amplificar el exón 5 de PPAR $\gamma$ .

| VARIABLES | RESULTADO  | NOTAS                    |
|-----------|--|--------------------------|
| 1         | El fragmento para amplificar debe estar comprendido en las últimas 2,500 pb de su DNA.   |                          |
|           | Fragmento para amplificar: <u>455</u> pb   |                          |
| 2         | Tamaño del oligonucleótido: 24 nucleótidos, pero con la posibilidad de ajustarlos entre 23 a 25, lo anterior para favorecer una Tm similar entre los oligonucleótidos, la Tm a considerar debe ser la proporcionada en el análisis del producto por el programa Primer BLAST, en la cual no debe existir una diferencia mayor de 2° C. |                          |
|           | Sentido: 24 nucleótidos  | Posición: #              |
|           | CAGCTGGATGTGGTCAGTGTCTAA   | 109 522 a 109 545        |
|           | Antisentido: 24 nucleótidos  | Posición: #              |
|           | ATGGCTTTAGTGTCCACTGGTCTG   | 109 976 a 109 953        |
| 3         | Temperatura de fusión (Tm): 72° C, la Tm entre ambos oligos debe ser muy similar, puede variar un par de grados (no más de 2° C)   |                          |
|           | Sentido: 62.37 °C  | 0.25 °C de diferencia    |
|           | Antisentido: 62.62 °C  |                          |
| 4         | Porcentaje de G/C: la secuencia de los oligonucleótidos debe tener entre 50 a 60% de G/C   |                          |
|           | -Sentido: 50 %   |                          |
|           | Antisentido: 50 %  |                          |
| 5         | Formación de dímeros: se debe evitar la complementariedad de los oligonucleótidos consigo mismos (AUTO-DIMER). El valor $\Delta G$ del AUTO-DIMER debe ser mayor de -8 kcal/mol, ideal lo más cercano a 0.   |                          |
|           | Sentido 3' $\Delta G = -6.85$ kcal/ mol  |                          |
|           | Antisentido 3' $\Delta G = -6.85$ kcal/ mol  |                          |
| 6         | No debe haber formación de horquillas (HAIRPIN) con valor $\Delta G$ menor de -8 kcal/mol. Ideal lo más cercano a 0.   |                          |
|           | Sentido: -0.78 kcal/ mol   |                          |
|           | Antisentido: -1.78 kcal/ mol   |                          |
| 7         | Presencia de G/C: debe omitirse la presencia de G/C en el extremo 3', así como la existencia de tres o más G/C contiguas en el oligonucleótido.  |                          |
|           | Upper: No hay más de dos G/C contiguas   | CAGCTGGATGTGGTCAGTGTCTAA |
|           | Lower: <b>SI</b> hay más de dos G/C contiguas ni en 3'   | ATGGCTTTAGTGTCCACTGGTCTG |



**Anexo 4. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la serie E-UDMM con la proteína PPAR $\gamma$ .**

|                                | 133   | 178 |
|--------------------------------|---|-----|
| <b>PPAR<math>\gamma</math></b> | GFFRRTIRLKLIIYDRCDLNCRIHKKSRNKCYCRFQKCLAVGMSHN  |     |
| E-UDMM-00007.1                 | GFFRRTIRLKLIIYDRCDLNCRIHKKSRNKCYCRFQKCLAVGMSHN  |     |
| E-UDMM-00008.1                 | GFFRRTIRLKLIIYDRCDLNCRIHKKSRNKCYCRFQKCLAVGMSHN  |     |
| E-UDMM-00014.1                 | GFFRRTIRLKLIIYDRCDLNCRIHKKSKNKCYCRFQKCLAVRMSHN  |     |
| E-UDMM-00104                   | GFFRRTIRLTIIYDRCDLNCRIHKKSRNKCYCRFQKCLAVGMSHN   |     |
| E-UDMM-00105                   | GFFRRTIRLKLIIYDRCDLNCRIHKKSRNKCYCRFQKCLAVGMSHN  |     |
| E-UDMM-00106                   | GFFRRTIRLKLIIYDRCDLNCRIHKKSKNKCYCRFQKCLAVGMSHN  |     |
| E-UDMM-00107                   | GFFRRTIRLKLIIYDRCDLNCRIHKKSTNKCQYCRFQCLAVGMSHN  |     |
| E-UDMM-00109                   | GFFRRTIRLKLIIYDRCDLNCRIHKKSKNKCYCGFQKCLAVGMSHN  |     |
| E-UDMM-00112                   | GFFRRTIRLKLIIYDRCDLNCRIHKKSRNKRQYCRFQKCLAVGMSHN |     |
| E-UDMM-001146                  | GFFRRTIRLKLIIYDRCDLNCRIHKKSRNKCYCRFQKCLAVRMSHN  |     |
| E-UDMM-00116                   | GFFRRTIRLKLIIYDRCDLNCRIHKKSRNKCYCRFQKCLAVGMSHN  |     |
| E-UDMM-00117                   | GFFRRTIRLKLIIYDRCDLNCRIHKKSRNKCYCRFQKCLAVGMSHN  |     |
| E-UDMM-00120                   | GFFRRTIRLKLIIYDRCDLNCRIHKKSRNKCYCRFQKCLAVGMSHN  |     |
| E-UDMM-00122                   | GFFRRTIRLKLIIYDRCDLNCRIHKKSRNKCYCRFQKCLAVGMSHN  |     |
| E-UDMM-00125                   | GFFRRTIRLKLIIYDRCDLNCRIHKKSRNKCYCRFQKCLAVGMSHN  |     |
| E-UDMM-00135                   | GFFRRTIRLKLIIYDRCDLNCRIHKKSRNKCYCRFQKCLAVGMSHN  |     |
| E-UDMM-00136                   | GFFRRTIRLKLIIYDRCDLNCRIHKKSRNKCYCRFQKCLAVGMSHN  |     |
| E-UDMM-00138                   | GFFRRTIRLKLIIYDRCDLNCRIHKKSRNKCYCRFQKCLAVGMSHN  |     |
| E-UDMM-00139                   | GFFRRTIRLKLIIYDRCDLNCRIHKKSRNKCYCRFQKCLAVGMSHN  |     |
| E-UDMM-00143                   | GFFRRTIRLKLIIYDRCDLNCRIHKKSRNKCYCRFQKCLAVGMSHN  |     |
| E-UDMM-00144                   | GFFRRTIRLKLIIYDRCDLNCRIHKKSRNKCYCRFQKCLAVGMSHN  |     |
| E-UDMM-00145                   | GFFRRTIRLKLIIYDRCDLNCRIHKKSRNKCYCRFQKCLAVGMSHN  |     |
| E-UDMM-00146                   | GFFRRTIRLKLIIYDRCDLNCRIHKKSRNKCYCRFQKCLAVGMSHN  |     |
| E-UDMM-00147                   | GFFRRTIRLKLIIYDRCDLNCRIHKKSRNKCYCRFHKCLAVGMSHN  |     |
| E-UDMM-00151                   | GFFRRTIRLKLIIYDRCDLNCRIHKKSRNKCYCRFQKCLAVGMSHN  |     |
| E-UDMM-00153                   | GFFRRTIRLKLIIYDRCDLNCRIHKKSRNKCYCRFQKCLAVGMSHN  |     |
| E-UDMM-00155                   | GFFRRTIRLKLIIYDRCDLNCRIHKKSRNKCYCRFQKCLAVGMSHN  |     |
| E-UDMM-00158                   | GFFRRTIRLKLIIYDRCDLNCRIHKKSKNKCYCRFQKCLAVGMSHN  |     |
| E-UDMM-00160                   | GFFRRTIRLKLIIYDRCDLNCRIHKKSRNKCYCRFQKCLAVGMSHN  |     |
| E-UDMM-00167                   | GFFRRTIRLKLIIYDRCDLNCRIHKKSRNKCYCRFQKCLAVGMSHN  |     |

La posición de la secuencia de aminoácidos analizada fue de la 133 a la 178 en la proteína de PPAR $\gamma$ . Los aminoácidos se identificaron por su símbolo y se sombreado de color amarillo aquellos donde hubo cambio.

Proteína PPAR $\gamma$  con secuencia de referencia NCBI: *NP\_619726*.

## Anexo 5. Cronograma de actividades

**Proyecto:** Búsqueda de nuevos polimorfismos en el dominio de unión al ADN de PPAR $\gamma$  en voluntarios estudiantes de medicina de la UAEM con dislipidemias

| Actividad  | 2018 |     |     |      |     |     | 2019 |     |     |     |     |     | 2020 |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |  |  |
|--|------|-----|-----|------|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|--|--|
|  | Jun  | Jul | Ago | Sept | Oct | Nov | Dic  | Ene | Feb | Mar | Abr | May | Jun  | Jul | Ago | Sept | Oct | Nov | Dic | Ene | Feb | Mar | Abr | May | Jun | Jul | Sept |  |  |
| Integración del grupo de estudio                                       |      |     |     |      |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |  |  |
| Recolección de muestras  |      |     |     |      |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |  |  |
| Determinación de perfil lipídico                                       |      |     |     |      |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |  |  |
| Purificación de ADN  |      |     |     |      |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |  |  |
| Diseño y evaluación de oligonucleótidos                                |      |     |     |      |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |  |  |
| Estandarización de técnicas PCR  |      |     |     |      |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |  |  |
| Realizar PCR con oligos específicos en DNA                             |      |     |     |      |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |  |  |
| Purificación de productos de PCR                                       |      |     |     |      |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |  |  |
| Secuenciación de DBD de PPAR $\gamma$                                  |      |     |     |      |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |  |  |
| Análisis y evaluación de calidad de secuencias de DBD de PPAR $\gamma$ |      |     |     |      |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |  |  |
| Determinación de SNPs con alineamiento múltiple                        |      |     |     |      |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |  |  |
| Determinación de frecuencias de SNPs                                   |      |     |     |      |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |  |  |
| Análisis de resultados   |      |     |     |      |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |  |  |
| Conclusiones   |      |     |     |      |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |  |  |
| Revisión de tesis  |      |     |     |      |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |  |  |
| Aprobación de tesis  |      |     |     |      |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |  |  |
| Defensa de tesis   |      |     |     |      |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |  |  |