

**ESTUDIO POBLACIONAL DE LOS POLIMORFISMOS: SER19TRP DEL GEN
APOA5, PRO12ALA DEL GEN PPAR-GAMMA, SNP276 DEL GEN DE LA
ADIPONECTINA Y TRP64ARG DEL GEN DEL RECEPTOR BETA 3-
ADRENÉRGICO ASOCIADOS CON SÍNDROME METABÓLICO EN UNA
POBLACIÓN DE BUCARAMANGA, COLOMBIA**

VIVIANA LUCIA PÉREZ FORERO

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BUCARAMANGA**

2015

**ESTUDIO POBLACIONAL DE LOS POLIMORFISMOS: SER19TRP DEL GEN
APOA5, PRO12ALA DEL GEN PPAR-GAMMA, SNP276 DEL GEN DE LA
ADIPONECTINA Y TRP64ARG DEL GEN DEL RECEPTOR BETA 3-
ADRENÉRGICO ASOCIADOS CON SÍNDROME METABÓLICO EN UNA
POBLACIÓN DE BUCARAMANGA, COLOMBIA**

VIVIANA LUCIA PÉREZ FORERO

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR EL TÍTULO DE
MAGISTER EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS**

DIRECTOR

**CLARA INÉS VARGAS CASTELLANOS
MD CIRUJANO MSC GENÉTICA**

CODIRECTOR

**GERARDO MANTILLA MORA
BAC. MSC. BIOQUÍMICA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BUCARAMANGA**

2015

A mi esposo José Luis a mis hijitos
Luis Ángel y Juan José, a mis padres
y a toda mi familia con todo mi amor.

AGRADECIMIENTOS

A mis directoras de tesis la Dra. Clara Inés Vargas Castellanos y a la Dra. Adriana Castillo Pico por valiosos conocimientos y por manifestarme su interés en dirigir mi trabajo de grado.

A mi codirector de tesis el Dr. Gerardo Mantilla Mora por permitirme iniciar este proceso en mi formación profesional, por su confianza, colaboración, paciencia y apoyo.

A la Dra Leonor Gusmao por sus valiosos conocimientos, amistad y apoyo incondicional durante el desarrollo de este trabajo.

A Adrianita Gil y Adrianita Pico, por su amistad, cariño y consejos los cuales permitieron que mi trabajo se realizara de manera satisfactoria.

A Fernando Rondón y Rui Pereira por su gran apoyo y su enseñanza.

A todos ustedes mis más sinceros agradecimientos pues sin sus consejos y apoyo no habría sido posible cumplir este objetivo.

CONTENIDO

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	18
2. JUSTIFICACION.....	20
3. PREGUNTA.....	21
4. HIPÓTESIS.....	22
5. OBJETIVOS.....	23
5.1. OBJETIVO GENERAL.....	23
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
6. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE.....	24
6.1 SÍNDROME METABÓLICO SM.....	24
6.2. APOLIPOPROTEINA A5 (APOA5).....	27
6.3. RECEPTORES ACTIVADOS POR PROLIFERADORES DE PEROXISOMAS (PPARS).....	29
6.4 GEN DE ADIPONECTINA.....	31
6.5 RECEPTOR BETA 3-ADRENÉRGICO.....	33
6.6 POLIMORFISMOS DE UN SOLO NUCLEÓTIDO (SINGLE NUCLEOTICPOLIMORPHISMSNP).....	34
7. TIPO DE ESTUDIO.....	36
8. ÁREA DE ESTUDIO.....	37
9. MUESTRA.....	38

10. CALCULO DEL TAMAÑO DE MUESTRA	39
11. VARIABLES	40
12. PROCEDIMIENTO METODOLOGICO	41
12.1 FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA.....	41
12.1.1 Diseño de primers.....	42
12.1.2 Extracción de ADN con el kit de PrpFiler®Forensic DNA	43
12.1.3 Cuantificación del material genético	44
12.1.4 Amplificación del material génico por medio de PCR	44
12.1.5 Verificación de la Amplificación de las muestras:	45
12.1.6 Limpieza de los productos de la PCR	45
12.1.7 Minisequenciación.....	46
12.1.8 Limpieza de los productos del SNaPshot.....	46
12.1.9 Montaje en el Analizador Genético ABI PRISM 310	47
12.1.10 Análisis de los Electroferogramas.....	47
12.1.11 Secuenciación.....	48
13. CONTROLES DE CALIDAD	50
14. ANALISIS ESTADISTICOS.....	51
15 CONSIDERACIONES BIOÉTICAS.....	52
16. RESULTADOS.....	53
16.1 CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS.....	54
16.2 POLIMORFISMOS.....	54
16.2.1 Ser19Trp del gen APOA5	57
16.2.2. Pro12Ala del Gen PPAR-Gamma	58
16.2.3. SNP276 del Gen de la Adiponectina.....	60

16.2.4. Trp64Arg del Gen del Receptor Beta 3-Adrenérgico	62
16.3. FRECUENCIAS HAPLOTÍPICAS	65
16.4. ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS CON SÍNDROME METABÓLICO	66
17. DISCUSION	67
18. CONCLUSIONES	72
BIBLIOGRAFIA.....	74
ANEXOS.....	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Representación esquemática del cromosoma 11 en la región 11q23.3 en donde se ubica el gen del APOA5.	28
Figura 2.	Representación esquemática del gen del APOA5, relacionando la ubicación de los polimorfismos.	29
Figura 3.	Representación esquemática del cromosoma 3 en la región 3p25 en donde se ubica el gen del PPAR γ	29
Figura 4.	Representación esquemática del dominio distal de la proteína PPARG2 y la localización de la mutación Pro12A	31
Figura 5.	Representación esquemática del cromosoma 3 en la región 3q27.3 en donde se ubica el gen del Adiponectina	32
Figura 6.	Representación esquemática del gen de la Adiponectina en donde se muestra el SNP276.....	33
Figura 7.	Representación esquemática del cromosoma 8 en la región 8p11.23 en donde se ubica el gen del Receptor B3 Adrenergico.	33
Figura 8.	Asignación de las bases nitrogenadas de acuerdo al fluorocromo con el que están marcadas. * Fluorocromo amarillo (Citosina) se observa en color negro.....	48
Figura 9.	Gel de agarosa en donde se muestran las bandas correspondientes a los amplificados de cada uno de los polimorfismos.	50
Figura 10.	Total de muestras analizadas para los cuatro polimorfismos.....	53
Figura 11.	Electroferograma en donde muestra el marcador de peso molecular GeneScan TM 120 LIZ TM	56
Figura 12.	Electroferograma en donde muestra el control positivo. Se observa el perfil genético de los polimorfismos Trp64Arg del Gen del Receptor Beta 3-Adrenérgico C/T, Ser19Trp del Gen APOA5 C/C, SNP276 del Gen de la Adiponectina C/A y Pro12Ala del Gen PPAR-Gamma G/G.	56

Figura 13.	Electroferograma en donde muestra el control negativo.....	57
Figura 14.	Electroferograma de tres muestras en donde se resalta el polimorfismo Ser19Trp del Gen APOA5 (APOA5): A) Perfil GG; B) Perfil G/C; C)Perfil CC.	57
Figura 15.	Frecuencia genotípica del polimorfismo Ser19Trp del Gen APOA5..	58
Figura 16.	Secuenciación de tres muestras del polimorfismo Ser19Trp del Gen APOA5 (APOA5): A) Perfil GG; B) Perfil G/C; C)Perfil CC.	58
Figura 17.	Electroferograma del polimorfismo Pro12Ala del Gen PPAR-Gamma, en donde se observa: A) Perfil CC; B) Perfil C/G; C) Perfil GG.	59
Figura 18.	Frecuencia genotípica del polimorfismo Pro12Ala del Gen PPAR-Gamma.....	59
Figura 19.	Secuenciación de tres muestras del polimorfismo Pro12Ala del Gen PPAR-Gamma: A) Perfil CC; B) Perfil C/G; C)Perfil GG.....	60
Figura 20.	Electroferograma del polimorfismo SNP276 del Gen de la Adiponectina, en donde se observa: A) Perfil CC; B) Perfil C/A;C) Perfil AA.....	61
Figura 21.	Frecuencia genotípica del polimorfismo SNP276 del Gen de la Adiponectina.....	61
Figura 22.	Secuenciación de tres muestras del polimorfismo Pro12Ala del Gen PPAR-Gamma: A) Perfil CC, B) Perfil C/G y C)Perfil GG.....	62
Figura 23.	Electroferograma del polimorfismo Trp64Arg del Gen del Receptor Beta 3-Adrenérgico (ADBR) en donde se observa: A) Perfil CC; B) Perfil CT; C) Perfil TT.....	63
Figura 24.	Frecuencia genotípica del polimorfismo Trp64Arg del Gen del Receptor Beta 3-Adrenérgico.	63
Figura 25.	Secuenciación de tres muestras del polimorfismo Trp64Arg del Gen del Receptor Beta 3-Adrenérgico (ADBR): A) Perfil CC, B) Perfil C/T y C) Perfil TT.	64

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Protocolo para el montaje de la PCR	45
Tabla 2.	Programa de Amplificación.....	45
Tabla 3.	Programa Exosap.....	45
Tabla 4.	Programa SNaPshot.....	46
Tabla 5.	Programa SAP.....	46
Tabla 6.	Identificación de las bases nitrogenadas de los polimorfismos.	48
Tabla 7.	Información general de los cuatro polimorfismos,* identificación del SNP con sonda reverse.....	55
Tabla 8.	Frecuencias genotípicas, alélicas y Equilibrio de Hardy Weinberg (EHW) para los cuatro polimorfismos. † Polimorfismo por fuera de EHW.	55
Tabla 9.	Frecuencias haplotípicas de los cuatro polimorfismos	65
Tabla 10.	Frecuencias haplotípicas de los cuatro polimorfismos para los grupos de afectados y no afectados con Síndrome Metabólico. * Frecuencia más alta, ** frecuencia más baja.....	66
Tabla 11.	Valor de Chi ² y p para los cuatro polimorfismos.....	66

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Especificaciones técnicas de Primers	89
Anexo B. Consentimiento informado del estudio CARMEN e INEFAC.....	90
Anexo C. Consentimiento informado del proyecto por parte del comité de Ética de la Universidad Industrial de Santander.	96
Anexo D. Frecuencias genotípicas reportadas por la NCBI para el polimorfismoSer19Trp del Gen APOA5.	98

GLOSARIO DE SIGLAS

µg: Microgramos

A: Adenina

aa: Aminoácido

AACE: American Association of Clinical Endocrinologists

ADN: Acido desoxirribonucleico

ADRB3: Receptor Beta 3 adrenérgico

APOA5: Alipoproteína A5

ASO: Allelic Specific Oligonucleotide

ATP III: Adult Treatment Panel

C: Citosina

cHDL: Colesterol de lipoproteína de alta densidad

ddNTP: Didesoxinucleotipotri-fosfato

DM: Diabetes mellitus

ECV: Enfermedad cardio vascular

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EGIR: Grupo Europeo para el Estudio de la Resistencia a la Insulina

G: Guanina

HDL: Lipoproteína de alta densidad

HTA: Hipertensión arterial

IDF: Federación internacional de Diabetes

IMC: Índice de masa corporal

LDL: Lipoproteína de baja densidad

LPL: Lipoproteína lipasa

OLA: Oligonucleotide Ligation Assay

pb: Pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

Pro12Ala: Prolina 12 Alanina

RI: Resistencia a la insulina
RNAm: RNA mensajero
RXR: receptor del ácido 9- cisretionico
s: Segundo
SBE: Single Base Extension
Ser19Trp: Serina 19 Triptófano
SM: Síndrome Metabólico
SNP: Polimorfismos de un solo nucleótido
T: Timina
TG: Triglicéridos
Trp64Arg: Triptófano 64 Arginina
UCP1: proteína desacoplante
VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad

RESUMEN

TÍTULO:

Estudio Poblacional de los Polimorfismos: SER19TRP del gen APOA5, PRO12ALA del gen PPAR-GAMMA, SNP276 del gen de la Adiponectina y TRP64ARG del Gen del Receptor Beta 3-Adrenérgico asociados con Síndrome Metabólico en una población de Bucaramanga, Colombia *

AUTOR: Viviana Lucia Pérez Forero **

PALABRAS CLAVES:

Ser19Trp, Pro12Ala, SNP276, Trp64Arg, Frecuencias alélicas, Frecuencias genotípicas, Haplotipos, Síndrome metabólico.

DESCRIPCION

Objetivo: Realizar el estudio poblacional de los polimorfismos Ser19Trp del gen APOA5, Pro12Ala del gen PPAR-Gamma; SNP276 del gen de la Adiponectina y Trp64Arg del gen del Receptor Beta 3-Adrenérgico, asociados con la presencia del Síndrome Metabólico, en una población de Bucaramanga, Colombia.

Materiales y métodos: Se realizará un estudio Cross Seccional con un total de 2436 muestras. Se empleará la técnica SNaPshot proceso en el que los polimorfismos son inicialmente amplificados por PCR usando primers específicos no marcados que permitirán amplificar segmentos de Ácido Desoxiribonucleico (ADN) específicos para contar con múltiples copias para identificar los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) de interés, los resultados fueron posteriormente analizados con el software Arlequín v 3.5 y Stata v 12.0.

Resultados, discusión y conclusión: Se obtuvo el perfil de 1274 individuos para los cuatro polimorfismos. Los polimorfismos PPAR Y ADBR están en equilibrio de Hardy Weinberg (p: 0.1501 y 0,9079 respectivamente), APOA5 Y ADIPOQ están por fuera del equilibrio (p: 0.0030 y 0.0072 respectivamente) después de hacer la corrección de Bonferroni. Se observó que el haplotipo con mayor frecuencia fue TGCC (43,57%) y el menor fue TCAG (0,12%). No hay evidencia de estructura genética F_{st} : -0.0009, ni asociación con la presencia de los polimorfismos y Síndrome Metabólico.

* Proyecto de grado

** Facultad de Salud, Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas Director: Clara Inés Vargas, MSc.

ABSTRACT

TITLE:

POPULATION-BASED STUDY OF POLYMORPHISMS SER19TRP OF THE APOA5 GENE, PRO12ALA OF THE PPAR-GAMMA GENE, SNP276 OF THE ADIPONECTIN GENE AND TRP64ARG OF THE BETA 3- ADRENERGIC RECEPTOR GENE. ASSOCIATED WITH METABOLIC SYNDROME IN BUCARAMANGA POPULATION, COLOMBIA *

AUTHOR:

Viviana Lucia Pérez Forero**

KEYWORDS:

Ser19Trp, Pro12Ala, SNP276, Trp64Arg, Allele frequency, Genotype frequency, Haplotype, Metabolic syndrome.

DESCRIPTION

AIM: To carry out a population-based study of polymorphisms Ser19Trp of the APOA5 gene, Pro12Ala of the PPAR-Gamma gene, SNP276 of the Adiponectin gene and Trp64Arg of the Beta 3-adrenergic receptor gene, associated with the presence of metabolic syndrome in Bucaramanga population, Colombia

MATERIALS AND METHODS: Cross sectional study with 2436 samples from study CARMEN and INEFAC. The SNaPshot assay was used, in this technique, polymorphism are initially amplified using PCR with unlabeled specific primers, that will allow amplify specific segments of Dextrinucleic Acid (DNA) having many copies of each Single Nucleotide Polymorphism (SNPs) of the interest within the genes involved in the study . All results performed by direct sequencing were analyzed by Arlequín v 3.5 y Stata v 12.0 software's.

RESULTS, DISCUSSION AND CONCLUSION: The profile of 1274 individuals were obtained for the four polymorphisms. PPAR Y ADBR polymorphism were in Hardy-Weinberg equilibrium (p: 0.1501 y 0,9079 respectively), APOA5 Y ADIPOQ were in Hardy-Weinberg disequilibrium (p: 0.0030 y 0.0072 respectively) after Bonferroni correction. Most frequent haplotype was TGCC (43,57%) and the one with lowest frequency was TCAG (0,12%). We did not find genetic structure F_{st} : -0.0009, or any association with the presence of the polymorphism and metabolic syndrome.

* Project degree

** . Faculty of Health, Master of Basic Biomedical Sciences Director: Clara Ines Vargas, MSc.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El Síndrome Metabólico (SM) es una entidad poligénica caracterizada por varios factores de riesgo como obesidad abdominal, dislipidemia (altos niveles de triglicéridos TG y bajos niveles de colesterol de la lipoproteína de alta densidad cHDL), hipertrigliceridemia, hipertensión arterial hiperglicemia (Anagnostis, 2012), bajo grado de inflamación, disfunción endotelial, intolerancia a los hidratos de carbono y predisposición a presentar diabetes mellitus DM (Gundogan et al., 2013) y enfermedad cardiovascular ECV (Yadav et al., 2013).

Presenta una alta prevalencia en nuestra población, con tendencia creciente en los últimos años; los estudios epidemiológicos han determinado que una cuarta parte de la población Americana mayor de 20 años presenta los criterios para el diagnóstico del SM según el AdultTreatment Panel (ATP III).

La prevalencia del SM varía ampliamente entre los grupos étnicos y la población; está asociado con factores genéticos, la edad, el índice de masa corporal, el estado posmenopáusico, el estilo de vida, la demografía, el estado socioeconómico, fumar, consumir dietas ricas en grasas saturadas y carbohidratos (Gundogan et al., 2013) y por la definición de SM que se emplee (Anagnostis, 2012); en Estados Unidos la prevalencia del SM se estima en un 23.7%, en Corea 14.4%, en Grecia 23,6%, en Italia 25,9, en pacientes hispanos con DM 89,5%, en pacientes con hipertensión 59%, en población con síndrome agudo coronario 51% y en pacientes con hipertrigliceridemia 79% (Anagnostis, 2012). En Australia se ha reportado una prevalencia del 30,7%(Cameron 2007), en China del 13,8%, en Japón del 12,8% (The Decada, 2007), en Méjico del 42% (Ramirez, 2007) y para Perú del 28%(Soto, 2005). Para el caso de Colombia, aunque no son muchos los estudios publicados al respecto, se han reportado prevalencias que oscilan entre el 23% y el 33%(Pinzón, 2007, Villegas, 2003). Los criterios clínicos y

los parámetros utilizados para realizar el diagnóstico pueden ser los responsables de la variabilidad en las prevalencias observadas, sin embargo en los últimos años se tiene un aumento en las prevalencias a nivel mundial, generando un problema de salud pública importante (Zimmet 2005, Dean 2003).

El SM está asociado con un incremento en el riesgo tanto para la diabetes tipo 2 (Hanson 2002, Laaksonen 2002) como para la enfermedad cardiovascular (ECV) (Solymoss, 2003, Girman, 2004); convirtiéndose en un factor de riesgo para presentar enfermedad crónica no transmisible, con un alto impacto económico para el sistema de salud; adicionalmente el SM está influenciado por factores ambientales relacionados con un componente genético, el cual puede variar entre diferentes grupos étnicos. En algunos estudios se han identificado regiones cromosómicas que podrían estar relacionadas con la presencia de SM (Girman, 2004, Langefeld, 2004), sin embargo aún no se tienen evidencias de una asociación génica específica, por lo tanto es necesario realizar este tipo de estudios en nuestra población, con el objeto de identificar los polimorfismos genéticos asociados con esta patología y detectar tempranamente los pacientes con una posible asociación de presentar SM y así poder diseñar programas de salud pública que impliquen menos costos en la atención al paciente, garantizando una mejor calidad de vida para ellos, generando así un menor impacto en la comunidad y en el sistema de salud.

2. JUSTIFICACION

La genotipificación de los polimorfismos Ser19Trp del gen APOA5, Pro12Ala del gen PPAR-Gamma, SNP276 del gen de la Adiponectina y Trp64Arg del gen del Receptor Beta 3 –Adrenérgico, permitirá evaluar si cada gen se encuentran en equilibrio de Hardy Weinberg en la población estudiada, de esta manera se podrá validar posteriormente los posibles hallazgos de asociación de uno o todos los polimorfismos combinados, con el desarrollo de SM en la población estudiada, ampliando así el conocimiento sobre el posible riesgo de presentar esta enfermedad. Esta información será de utilidad para las autoridades de salud en el país, podrán diseñar y reforzar nuevas políticas de salud pública, enfocadas en la implementación de estrategias que disminuya el efecto de los factores medioambientales desencadenantes de esta patología en la población a riesgo, disminuyendo así la tasa de morbilidad y mortalidad asociada al SM y conllevando a la reducción de los costos en la atención de pacientes.

Adicionalmente las bases de datos creadas con las frecuencias alélicas y haplotípicas generadas de la genotipificación de cada uno de los polimorfismos de estudio, favorecerá el conocimiento de esta patología y servirán como punto de partida para impulsar otras investigaciones relacionadas con el tema e involucrar nuevas estrategias metodológicas que permitan dilucidar la totalidad de genes involucrados en el desarrollo de esta enfermedad.

3. PREGUNTA

¿Existe estructura genética en la muestra poblacional de Bucaramanga, Colombia para los polimorfismos Ser19Trp del gen APOA5, Pro12Ala del gen PPAR-Gamma, SNP276 del gen de la Adiponectina y Trp64Arg del gen del Receptor Beta 3 –Adrenérgico, asociados en la presentación de SM?

4. HIPÓTESIS

Los polimorfismos Ser19Trp del gen APOA5, Pro12Ala del gen PPAR-Gamma, SNP276 del gen de la Adiponectina y Trp64Arg del gen del Receptor Beta 3-Adrenérgico, no presentan estructura genética en la muestra poblacional de Bucaramanga - Colombia, analizada.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Realizar el estudio poblacional de los polimorfismos Ser19Trp del gen APOA5, Pro12Ala del gen PPAR-gamma; SNP276 del gen de la Adiponectina y Trp64Arg del gen del Receptor Beta 3-Adrenérgico, asociados con la presencia del Síndrome Metabólico, en una población de Bucaramanga, Colombia.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estimar las frecuencias alélicas de los SNPs Ser19Trp del gen APOA5, Pro12Ala del gen PPAR-Gamma; SNP276 del gen de la Adiponectina y Trp64Arg del gen del Receptor Beta 3-Adrenérgico, en de una población de Bucaramanga, Colombia.

Estimar las frecuencias haplotípicas con respecto a los polimorfismos de los SNPs Ser19Trp del gen APOA5, Pro12Ala del gen PPAR-Gamma; SNP276 del gen de la Adiponectina y Trp64Arg del gen del Receptor Beta 3-Adrenérgico, en de una población de Bucaramanga, Colombia.

Determinar la presencia de fuerzas de cambio evolutivo y subestructura para los polimorfismos Ser19Trp del gen APOA5, Pro12Ala del gen PPAR-Gamma; SNP276 del gen de la Adiponectina y Trp64Arg del gen del Receptor Beta 3-Adrenérgico, en de una población de Bucaramanga, Colombia.

6. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

6.1 SÍNDROME METABÓLICO SM

El síndrome metabólico SM se caracteriza por la presencia de insulinoresistencia e hiperinsulinismo, aumento de la presión arterial, alteraciones lipídicas (hipertrigliceridemia, descenso del colesterol de la lipoproteína de alta densidad cHDL, presencia de lipoproteína de baja densidad LDL, aumento de ácidos grasos libres y lipemia postprandial), obesidad, con un incremento de la morbimortalidad de origen aterosclerótico (P.J. Miranda 2005). Este síndrome tiene una etiología compleja la cual está influenciada por factores genéticos y ambientales tales como el tabaquismo el sedentarismo y las dietas hipercalóricas (Alonso 2006, Martínez 2002, Groop 2000, Park 2003).

En 1923 se describió el primer paciente con anormalidades metabólicas, pero solo hasta 1988 Reaven, acuñó el término de síndrome "X" refiriéndose a esta entidad caracterizada por resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia, aumento de TG y VLDL, disminución del colesterol HDL e HTA. A partir de esto se inició el trabajo para unificar una definición.

La Organización Mundial de la Salud OMS sugirió que el SM se caracterizaba por: intolerancia a la glucosa, Diabetes Mellitus DM tipo 2 o Resistencia a la Insulina RI, junto con dos o más criterios como:

- HTA > 140/90 mmHg,
- Hipertrigliceridemia (>150 mg/dl) o descenso de cHDL (<35 mg/dl en hombres y <39 mg/dl en mujeres)
- Obesidad central (cociente cintura-cadera >0,9 cm en hombres y >0,85cm en mujeres)

- Índice de masa corporal IMC ($>30 \text{ Kg/m}^2$)
- Microalbuminuria ($\geq 20 \mu\text{g/min}$ o cociente albúmina/creatinina $\geq 30 \mu\text{g/mg}$).

El Grupo Europeo para el Estudio de la Resistencia a la Insulina EGIR, sugirió que el SM se caracterizaba por la elevada insulina en plasma (>75 percentil) más dos otros factores como:

- Obesidad abdominal (diámetro de la cintura $\geq 94 \text{ cm}$ en hombres y $\geq 80 \text{ cm}$ en mujeres),
- Hipertensión ($\geq 140/90 \text{ mmHg}$) o tratamiento con antipertensivos, Hipertrigliceridemia ($\geq 150 \text{ mg/dl}$), y/o cHDL ($<39 \text{ mg/dl}$).
- glucemia basal ($>110 \text{ mg/dl}$).

EL grupo The Third Report National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults ATP III, sugirió que el SM se caracterizaba por presentar tres o más criterios como:

- Obesidad abdominal (diámetro de la cintura $\geq 102 \text{ cm}$ en hombres y $\geq 88 \text{ cm}$ en mujeres).
- Hipertrigliceridemia ($\geq 150 \text{ mg/dl}$ 1.695 mmol/L , cHDL $<40 \text{ mg/dl}$ en hombres y $<50 \text{ mg/dl}$ en mujeres).
- Hipertensión ($\geq 130/85 \text{ mmHg}$).
- Glucemia basal ($>110 \text{ mg/dl}$).

La asociación American Association of Clinical Endocrinologists AACE define el SM como:

- Intolerancia a la glucosa.
- Metabolismo anormal de ácido úrico.
- Dislipidemia, cambios hemodinámicos.
- Factores protombóticos.

- Marcadores de inflamación (Proteína C reactiva).
- Disfunción endotelial.

La Federación Internacional de Diabetes IDF sugirió definir el SM a partir de la relación con la obesidad central basados en la raza y el género, además de incluir dos o más factores como:

- Hipertrigliceridemia (>150 mg/dl), o tratamiento específico para este tipo de dislipidemia.
- Disminución de cHDL (<40 mg/dl en hombres ó <50 mg/dl en mujeres) o tratamiento específico para este tipo de dislipidemia.
- Hipertensión arterial (sistólica ≥ 130 mmHg ó diastólica ≥ 85 mmHg), o tratamiento de hipertensión arterial diagnosticada previamente.
- Glucemia plasmática en ayunas (>100 mg/dl), o diagnóstico previo de diabetes mellitus tipo 2 (Rakesh 2012).

Se considera que la definición propuesta por la IDF es la mejor opción puesto que se ha demostrado mejor sensibilidad en la detección del síndrome metabólico y mayor adaptabilidad a los valores de algunas variables antropométricas como es el perímetro cintura/cadera a los valores obtenidos en estudios realizados en nuestra población (López, 2006).

Algunos estudios mostraron que la prevalencia del SM en mujeres posmenopáusicas de nacionalidad china, india y brasilera fue del 33.5%, 55%, y 34.7%, respectivamente (X Ruan 2010, J A D F Neto 2010). Se han identificado más de 200 polimorfismos en cerca de 100 genes con asociación significativa a los diversos componentes del SM, permitiendo relacionar la presencia del SM con estos polimorfismos (Kissebah 2000, Chung 2008, Yammada 2007); sin embargo hasta el momento no se conoce un estudio de asociación génica de esta patología en población latinoamericana, con el agravante de la dificultad que se presenta al

tratar de extrapolar resultados de estudios hechos en otras poblaciones como consecuencia de la gran variabilidad génica existente entre las diversas etnias, por lo tanto es indispensable realizar este tipo de estudios en nuestra población, para garantizar su aplicabilidad en nuestra sociedad. Por ello es necesario cuantificar la prevalencia de estos polimorfismos en nuestra población y determinar si existe subestructura poblacional puesto que esto modificaría la frecuencia de los alelos de estos polimorfismos, indicando que la población no se está mezclando al azar y favoreciendo la presencia de ciertos alelos con una mayor frecuencia, condición necesaria de ser establecida antes de realizar el estudio de asociación para evitar así hallar falsas asociaciones de estos polimorfismos con el síndrome metabólico en nuestra población y por tanto validar los resultados de asociación que se realizarán a continuación de este estudio.

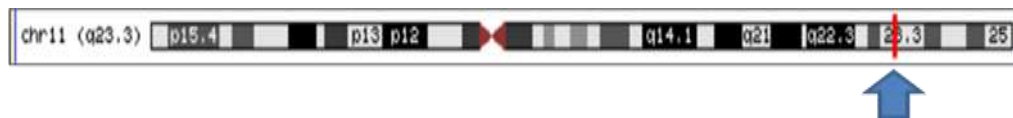
6.2. APOLIPOPROTEINA A5 (APOA5)

El gen de la APOA5 está localizado en la región 11q23.3, este tiene 4 exones, que codifican para una proteína de 369 aminoácidos secretada exclusivamente en el hígado, cumple funciones en la homeostasis de los triglicéridos en plasma (Pennacchio 2001, Ladeia 2011). La APOA5 está localizada en partículas ricas en triglicéridos como los quilomicrones, las lipoproteínas de muy baja densidad VLDL y las lipoproteínas de alta densidad HDL, esta se une y activa la enzima lipoproteinlipasa LPL que consecuentemente reduce los niveles de triglicéridos TG en las partículas de quilomicron y VLDL; la concentración en plasma es aproximadamente 100 $\mu\text{g/L}$ (Pennacchio 2001, Ladeia 2011).

Los genes involucrados en las apolipoproteínas A juegan un rol significativo en el perfil lipídico de los organismos, en donde alteraciones a nivel de estas moléculas ocasionan anormalidades, aumentando la susceptibilidad a presentar arteriosclerosis. El conjunto de genes de las apolipoproteínas hacen parte del clúster APOA1/CIII/AIV localizado en el cromosoma 11 en la región 11q23 (figura

1). Se han reportado diversos polimorfismos genéticos ubicados en esta región, los cuales están relacionados con la contribución severa de hipertrigliceridemia (Pennacchio 2001).

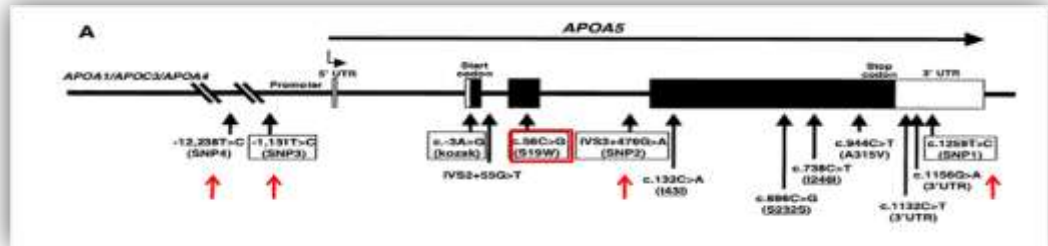
Figura 1. |Representación esquemática del cromosoma 11 en la región 11q23.3 en donde se ubica el gen del APOA5.



Fuente: Tomado de la paginaucscgenome browser disponible en <http://genome.ucsc.edu/cgi-hgTracks?db=hg19&hgFind=OmimGeneAcc&position=606368>

Se han identificado algunos polimorfismos como el SNP 1= 259 T>C, SNP 2= IVS3 + 476 G>A, SNP 3 = - 1131 T>C y el SNP 4 = -12,238T/C. El SNP S19W, se caracteriza por la sustitución de una citosina por una guanina ubicada en el nucleótido 56 del codón 19, sustituyendo la presencia de una serina por un triptófano (figura 2), (Pennacchio 2001, Ladeia 2011, Schaap 2004), este evento ocasiona la disminución de la actividad de la APOA5 causando una hipertrigliceridemia marcada así como la predisposición a desarrollar de arteriosclerosis en pacientes con hiperlipidemia tipo III; de tal forma que este tipo de patología este modulada por la variación en el gen del APOA5 (Pennacchio 2002, Evan 2011). La prevalencia de este polimorfismo se ha estimado en diferentes estudios de un 6% en caucásicos, 7% en afroamericanos y un 15% en hispanos (Oliver 2004, Kisfali 2008, Singmann 2009).

Figura 2. Representación esquemática del gen del APOA5, relacionando la ubicación de los polimorfismos.

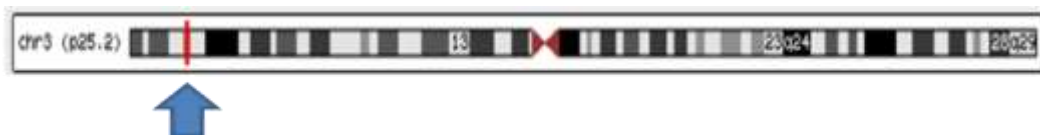


Fuente: Penacchio et al 2002

6.3. RECEPTORES ACTIVADOS POR PROLIFERADORES DE PEROXISOMAS (PPARS)

Los Receptores Activados por Proliferadores de Peroxisomas (PPARs) constituyen una subfamilia de receptores nucleares que tras la unión de su ligando funcionan como factores de transcripción, están ubicados en el cromosoma 3 en la región 3p25 (figura 3) y el gen está constituido por 9 exones con más de 100 Kb. Esta constituido estructuralmente por aproximadamente 500 aminoácidos (aa), con 5 o 6 regiones que conforman 4 dominios. La unión de este factor de transcripción al DNA requiere la formación de un heterodimero de PPAR con el receptor del ácido 9- cisretionico (RXR), el cual interactúa con un elemento de respuesta en el gen blanco, el cual modula la transcripción (Clarke 1999).

Figura 3. Representación esquemática del cromosoma 3 en la región 3p25 en donde se ubica el gen del PPARγ.



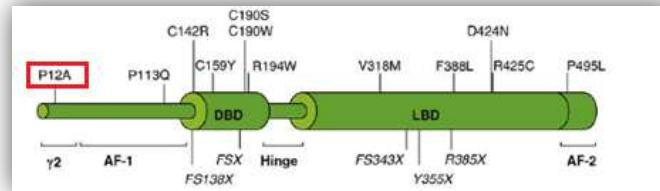
Fuente: Tomada de la página de Genome Browser disponible en: <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&hgFind=omimGeneAcc&Position=601487>

La subfamilia de los PPARs posee 3 isoformas, entre los que se pueden mencionar al PPAR α , los PPAR β y los PPAR γ , estos últimos poseen dos isoformas PPAR γ 1 y PPAR γ 2 obtenidos por esplicing alternativo de la región 5 terminal del gen (Rosen 2001, Zhu 1995), El PPAR γ 2 contiene 30 aminoácidos adicionales en la región amino terminal comparado con la isoforma del PPAR γ 1, sin embargo ambos se encuentran en el citoplasma y en el núcleo donde más tarde son heteromerizados con los miembros de la familia RXR. Estos receptores son activados por ácidos grasos poli- insaturados o derivados de estos, así como por las tiazolidinedionas (Zhu, 1995) y los fibratos; de tal forma que los ácidos grasos actúan como hormonas activando receptores que van a modular su propio metabolismo regulando así la biosíntesis lipídica, la diferenciación de los adipocitos, la sensibilidad a la insulina (Kawai, 2010).

Los receptores PPAR γ poseen algunas funciones como promover la diferenciación celular, especialmente la de los adipocitos, codificar proteínas para la captación de los ácidos grasos y realización de la lipogénesis, inducir la síntesis de GLUT-4, estimular la expresión de proteínas que intervienen en la termogénesis, inhibir la secreción de óxido nítrico sintetasa, regular la captación de LDL oxidadas y reducir la secreción de citoquinas del monocito (Clarke, 1999).

Se han identificado algunos polimorfismos en el exón B del receptor PPAR γ 2, el cual se caracteriza por un cambio de una citosina por una guanina, generando la sustitución de una prolina por una alanina (figura 4), este evento se ve asociado a alteraciones metabólicas relacionadas con el SM como el riesgo de presentar Diabetes tipo II y obesidad (Rey, 2010).

Figura 4. Representación esquemática del dominio distal de la proteína PPARG2 y la localización de la mutación Pro12A

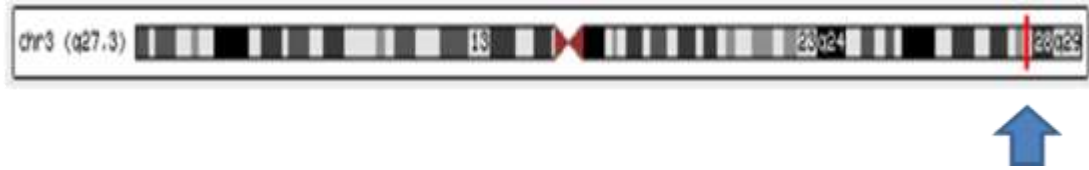


Fuente: Jeninga, 2009.

6.4 GEN DE ADIPONECTINA.

La Adiponectina es una proteína sintetizada principalmente en el tejido adiposo (Viengchareun, 2002), codificada por el gen localizado en el cromosoma 3 en la región 3q27.3 (figura 5), una región asociada con susceptibilidad a desarrollar síndrome metabólico y diabetes tipo II (Ruan, 2003), este gen codifica para una proteína de 244 aminoácidos y 30 KDa; poseen 4 dominios un péptido señal de 20 aminoácidos, una región N-terminal variable sin homología conocida, una región colágena y un dominio globular C-terminal (Viengchareun, 2002, Ruan, 2003). La Adiponectina puede existir en el plasma de forma completa o en fragmentos globulares, las concentraciones normales en plasma están en promedio de 5 a 10 $\mu\text{g/ml}$ (Chandran 2003), esta proteína cumple varias funciones como aumentar la fosforilación de la tirosina del receptor de insulina, aumentar la captación de glucosa por estimulación del GLUT-4, aumentar la actividad de los PPAR α , inhibe las enzimas encargadas de la gluconeogénesis como la fosfoenol piruvato carboxikinasa y la glucosa 6 fosfatasa, el cual produce descensos en los niveles de glucosa, regula la LPL y adicionalmente tienen efecto sobre el metabolismo lipídico.

Figura 5. Representación esquemática del cromosoma 3 en la región 3q27.3 en donde se ubica el gen del Adiponectina

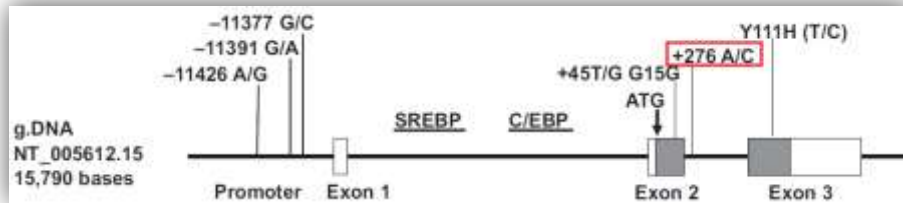


Fuente: Tomada de la página de Genome Browser disponible en: <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?position=chr3:186570873-186571373&hgsid=311156747&snp135Common=pack&hgFind.matches=rs1501299>

Estudios in vivo en modelos animales sugieren que la Adiponectina aumenta la oxidación de ácidos grasos y el consumo de energía, muy probablemente a través de la activación de los receptores PPAR α , lo que produce una disminución del contenido de TG tanto en el hígado como en el músculo esquelético, y adicionalmente mejora la sensibilidad a la insulina in vivo (Mantzoros, 2005).

En el gen de la Adiponectina se han descrito algunos SNPs, uno de ellos se ubican en el exón 2 el cual se caracteriza por la sustitución de una timina por una guanina y otro en el intrón 2 en la posición 276, el cual se caracteriza por la sustitución de una citosina por una adenina (figura 6), este evento se han asociado con disminución en los niveles plasmáticos de Adiponectina, aumento en el riesgo para presentar DMII y RI, sugiriendo que la hipoadiponectinemia pueda estar asociados a alteraciones del SM (Giocabino, 2002).

Figura 6. Representación esquemática del gen de la Adiponectina en donde se muestra el SNP276.

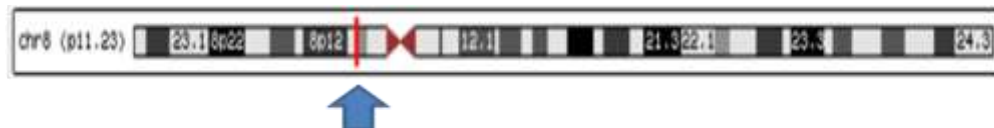


Fuente: Gu 2009

6.5 RECEPTOR BETA 3-ADRENÉRGICO

El gen Receptor Beta 3-Adrenergico está localizado en el cromosoma 8 en la región 8p12-p11.2 (figura 7), este juega un papel importante en el gasto energético a través de la estimulación de la termogénesis mediada por la proteína desacoplante (UCP1) en el tejido adiposo marrón de roedores (Large 1998) así como en la lipólisis en el tejido adiposo blanco tanto de roedores como de humanos (Strobel 1998). Los agonistas del receptor β_3 activan la termogénesis *in vivo* así como en experimentos *in vitro*.

Figura 7. Representación esquemática del cromosoma 8 en la región 8p11.23 en donde se ubica el gen del Receptor B3 Adrenergico.



Fuente: Tomada de la página de Genome Browser disponible en: <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?position=chr8:37823548-37824048&hgsid=311156747&snp135Commonpack&hgFind.Matches=rs4994>

Se ha descrito una mutación localizada en el codón 64 del dominio intracelular de este receptor, el cual produce una sustitución de triptófano por arginina en esa posición 64 (Trp64Arg), se ha demostrado una asociación entre este polimorfismo con la obesidad visceral y otras alteraciones del SM (Arner 1999, Evan 2000). El ADRB3 podría ser un gen candidato debido a que la mutación altera la lipólisis estimulada por catecolaminas en las células grasas de humanos causando una disminución en la tasa metabólica basal (Evan 2000).

6.6 POLIMORFISMOS DE UN SOLO NUCLEÓTIDO (SINGLE NUCLEOTICPOLIMORPHISMSNP)

Las sustituciones de un nucleótido por otro en la cadena de ADN dan como resultado los SNPs. Este evento puede presentarse con una frecuencia de aproximadamente 1 en 1.000 pares de bases (pb) constituyéndose en el tipo de polimorfismo más frecuente en el genoma humano (Sengel 2005); Estos polimorfismos puede cambiar el marco de lectura del RNAm y alterar la proteína recién sintetizada, generando sinonimia (adición del mismo aminoácido) o no sinonimia (adición de un aminoácido diferente)(Carlton, 2006).

Los SNPs pueden ser identificados por diversas metodologías como la hibridación con sondas alelo-específicas (AllelicSpecificOligonucleotide ASO) (Hacia, 1999), minisequenciación (Single Base Extensión SBE) (Pastinen, 1997), y ligamiento de oligonucleótidos alelo-específicos (OligonucleotideLigationAssay OLA) (Gerry, 1999); esta genotipificación permite emplear los SNP como marcadores estables debido a la baja tasa de mutación y a la tendencia de no cambiar de generación en generación (Carracedo 2004); la información recopilada a partir de estudios poblacionales que tuvieran como objetivo identificar el nucleótido mutado en genes candidatos, son útiles para entender el comportamiento de la población estudiada a partir del cálculo de frecuencias alélicas, la evaluación del equilibrio de ligamiento, la heterocigosidad, variabilidad y ancestría geográfica (Hacia, 1999).

Adicionalmente la caracterización de un conjunto de SNPs pueden ser empleados como una herramienta de estudios de asociación relacionándolos con el riesgo de desarrollar algún tipo de patologías (Borstein, 2003), por lo tanto la detección de la base polimórfica es importante para el diagnóstico genético y la farmacogenética (Carracedo 2004).

7. TIPO DE ESTUDIO

Se realizará un estudioCross Seccional.

8. ÁREA DE ESTUDIO

Bucaramanga. Santander, Colombia

9. MUESTRA

La muestra estará conformada por 2436 individuos adultos con edades entre los 19–69 años, que participaron en los estudios CARMEN (Conjunto de Acciones para la Reducción Multifactorial de Enfermedades Crónicas no Trasmisibles) e INEFAC (Incidencia de Enfermedades Cardiovasculares y de sus Factores de Riesgo) (Orostegui, 2006).

10. CALCULO DEL TAMAÑO DE MUESTRA

Se utilizó el programa interactivo “Power and Size Sample Calculation” disponible en <http://biostat.mc.vanderbilt.edu/wiki/Main/PowerSampleSize> (Dupont, 1999). Para determinar las razones de prevalencias mínimas que se podrán determinar a partir de la muestra establecida, teniendo en cuenta que la menor prevalencia reportada para los polimorfismos de interés en individuos sanos fue del 6% correspondiente al polimorfismo Pro12Ala del gen PPAR- Gamma. Se trabajó con un alfa de 0,05 y un poder del 90%.

11. VARIABLES

Para la construcción de la base de datos se tuvieron en cuenta las variables sociodemográficas como edad (años cumplidos), género (hombre/mujer), perfil lipídico, Síndrome Metabólico y los polimorfismos genéticos Ser19Trp del Gen APOA5, Pro12Ala del Gen PPAR-Gamma, SNP276 del Gen de la Adiponectina y Trp64Arg del Gen del Receptor Beta 3-Adrenérgico.

12. PROCEDIMIENTO METODOLOGICO

12.1 FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA

En esta investigación se analizarán algunas regiones polimórficas de los genes APOA5, PPARG, Adiponectina y el Receptor Beta 3-Adrenérgico, los polimorfismos son de tipo Single Nucleotide Polymorphism (SNP) y para su detección se utilizó la metodología del SNaPshot, proceso en el que los polimorfismos son inicialmente amplificados usando primers específicos no marcados que permitirán amplificar segmentos específicos para contar con múltiples copias de cada uno de los SNPs de interés dentro de estos genes. El diseño permite realizar la amplificación simultánea de los 4 SNPs incluidos en esta investigación (Ser19Trp del gen APOA5, Pro12Ala del gen PPARG, SNP276 del gen de la Adiponectina Trp64Arg del gen del receptor beta 3-adrenérgico), en una PCR multiplex.

Posteriormente estos amplificados se purificaron mediante el uso de las enzimas SAP y EXO SAP para eliminar el ADN no amplificado, a continuación se realizó la tipificación de los SNPs por minisequenciación con la técnica de SNaPshot, para ello se incubaron los amplificados purificados con una sonda que reconoce la región inmediatamente aledaña al SNP o a la base nitrogenada de la hebra de enfrente del SNP, permitiendo de esta forma la identificación del polimorfismo; una vez el ddNTP se incorpore, a continuación de la sonda, por minisequenciación.

El SNaPshot es una técnica de minisequenciación, que tiene como propósito realizar una extensión de una sola base (SBE) que incorpora un dideoxinucleótido (ddNTP), marcado con un fluorocromo que emite fluorescencia, al templete de ADN en el lugar donde está el polimorfismo, permitiendo así detectarlo; este proceso requiere la presencia de la ADN polimerasa, el cloruro de magnesio y los ddNTPs marcados, cada uno con un fluorocromo de diferente color. A cada ddNTP le falta el grupo hidroxilo del carbono 3' de la desoxirribosa y esto genera

un bloqueo de la polimerización bloqueando la formación del enlace fosfodiéster entre este ddNTP y el grupo fosfato del siguiente nucleótido (Cristofaro, 2010).

Al finalizar la miniselección, los productos de ella se corren en una electroforesis capilar en el equipo ABI PRISM 310 de Applied Biosystems donde a medida que avanzan por el capilar reciben la señal del láser que excita los fluorocromos de los ddNTPs y estos emiten una señal fluorescente de un color determinado: verde para la adenina, amarillo para la citosina, azul para la guanina y rojo para la timina. Esta señal fluorescente es captada y analizada por el software GeneMapper del equipo, permitiendo así la identificación de la base nitrogenada (SNP) que está allí ubicado.

12.1.1 Diseño de primers. No se emplearon los primers reportados en la literatura para los polimorfismos analizados debido a que algunas de las secuencias descritas no podían ser incluidas en una PCR multiplex, por lo tanto fue necesario realizar el diseño de los primers que pudieran amplificar en una PCR multiplex.

Se diseñaron 12 primers para la identificación de los polimorfismos Ser19Trp del Gen APOA5, Pro12Ala del Gen PPAR-Gamma, SNP276 del Gen de la Adiponectina y Trp64Arg del Gen del Receptor Beta 3-Adrenérgico (Anexo 1). Se buscaron los genes y SNPs de interés clínico relacionado con la enfermedad de Síndrome metabólico en la base de datos dbSNP de la NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>). Se seleccionaron solo los SNPs que cumplieran por lo menos con un criterio de inclusión. Dentro de estos criterios se contemplaron:

- La ubicación del SNP en una región codificante
- Generar una mutación no sinónima
- Estar validado; lo cual implica cumplir con los criterios para validación por Clúster, validación por frecuencia de datos genotípicos (teniendo en cuenta

el alelo de menor frecuencia) y por ultimo haber sido secuenciado en el proyecto de los Mil Genomas.

Para obtener la secuencia de oligonucleótidos se empleó el programa Primer 3 v 0.4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>), utilizandolos parámetros de una temperatura de anillamiento de 60°C y un producto de 80 a 350 pb (Untergrasser, 2012, Koressaar 2007).

Para determinar la presencia de secuencias de anillamiento repetidas en el genoma, se alinearon los oligonucleótidos con la secuencia de la base de datos NCBI empleando la herramienta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

La presencia de interacciones no específicas de los oligonucleótidos como dímeros de primers y hairpin se evaluó por medio del programa AutoDimer (<http://www.cstl.nist.gov/strbase/NIJ/AutoDimer.htm>) (Vallone, 2004). Una vez obtenida las secuencias definitivas para la identificación de cada uno de los SNPs fueron enviados a sintetizar por la compañía Integrated DNA Technologies IDT® la cual realizo purificación de los primers por Cromatografía Liquida de Alta Eficacia HPLC.

12.1.2 Extracción de ADN con el kit de PrpFiler®Forensic DNA. *Para una muestra de 3 mL de sangre con anticoagulante EDTA o una mancha de sangre en papel FTA de 3mm x 3mm.*

- En un tubo eppendorf de 1,5 colocar 300ul de buffer de lisis I.
- Colocar la mancha dentro del tubo e Incubar a temperatura de 70° por 40 min en agitación suave.
- Colocar las partículas magnéticas a una temperatura de 37 ° por 30 min.
- Retirar el papel filtro y colocar 15 µL de partículas magnéticas y 180 µL de isopropanol.

- Mezclar en vortex suave por 5 s.
- Mezclar en vortex lento por 10 min.
- Mezclar en vortex rápido por 10 s.
- Colocar la muestra en el soporte magnético por 1 a 2 min.
- Remover el sobrenadante sin retirar el eppendorf del soporte magnético, adicionar 300 μ L de solución buffer de lavado.
- Retirar el eppendorf del soporte magnético y dar un vortex suave por 5 s.
- Colocar el eppendorf nuevamente en el soporte magnético por 1 a 2 min, y repetir los lavados 2 veces más.
- Adicionar 5ul de buffer de elución e incubar a 70° en agitación suave por 5 min.
- Mezclar en vortex suave por 2 s.
- Colocar la muestra en el soporte magnético por 1 min.
- Transferir el líquido del eppendorf a un nuevo tubo estéril

12.1.3 Cuantificación del material genético . Para calcular la concentración de ADN genómico se tomó 1 μ L de ADN y se ubicó en el espectrofotómetro NanoDrop 1000 ThermoScientific® el cual midió la concentración y calidad del ADN.

12.1.4 Amplificación del material génico por medio de PCR. Para una muestra preparar la siguiente mezcla de PCR:

- QIAGEN Multiplex PCR kit (www.qiagen.com)
- 10X Primer Mix. (incluidos todos los *primers* a una concentración de 1 μ M-3 μ M) tabla 1 y se amplifica con el protocolo descrito en la tabla 2.

Tabla 1. Protocolo para el montaje de la PCR

Reactivo	Volume por muestra
2x Qiagen Multiplex PCR Master Mix	5 μ L
10x Primer mix	1 μ L
H ₂ O	3 μ L
ADN (0,5 – 5 ng/ μ l)	1 μ L

Tabla 2. Programa de Amplificación

PASO INICIAL	30 CICLOS			EXTENSION FINAL	PASO FINAL
	DENATURACIÓN	ANILLAMIENTO	EXTENSIÓN		
95°C 15 minutos	94°C 30 segundos	60°C 90 segundos	72°C 60 segundos	72°C 60 minutos	4°C ∞

12.1.5 Verificación de la Amplificación de las muestras:. Se verifico la amplificación de los SNPs mediante el montaje de electroforesis en geles de agarosa coloreados con bromuro de etidio, con el objetivo de asegurar la presencia de los amplificados de las muestras que se minisequenciaron.

12.1.6 Limpieza de los productos de la PCR. En un eppendorf de 0,2 ml montar:

Amplificado	2,5 μ L
Exosap – IT Amersham	1 μ L

Dar un pulso en vortex y llevar al termociclador para correr el programa Exosap (tabla 3):

Tabla 3. Programa Exosap.

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	INACTIVACION DE LA ENZIMA	4 °C ∞
37 °C 45 minutos	85 °C 15 minutos	

12.1.7 Minisecuenciación. Se realiza con el kit SNaPshot™ (AppliedBiosystems). El kit trae una mix de la que se pueden preparar alícuotas que se guardan a -20 °C. En un eppendorf de 0,2 ml preparar para cada muestra:

SNaPshot reaction mix	2,5 µL
Primer mix	1,5 µL
Producto amplificado purificado	2,0 µL

Llevar al termociclador para correr el programa SNaPshot (tabla 4).

Tabla 4. Programa SNaPshot.

30 CICLOS			4 °C ∞
DENATURACION	ANILLAMIENTO	EXTENSION	
96 °C 10 segundos	55 °C 5 segundos	60 °C 30 segundos	

12.1.8 Limpieza de los productos del SNaPshot. En el eppendorf de 0,2 ml que se saca del termociclador y que contiene 6 µL de la reacción del SNaPshot adicionar 1 µL de enzima fosfatasa SAP de concentración 1 U/ µL.

Mezclar en vortex con un pulso y llevar al termociclador para correr el programa SAP (tabla 5).

Tabla 5. Programa SAP.

ACTIVIDAD ENZIMATICA	INACTIVACION DE LA ENZIMA	4 °C ∞
37 °C 80 minutos	85 °C 15 minutos	

12.1.9 Montaje en el Analizador Genético ABI PRISM 310. Prepara una placa o una tira de tubos para realizar el montaje de las muestras en el equipo. Para cada muestra montar:

Formamida 12 μ L

Genescan Liz 120 0,3 μ L

Se preparó esta mezcla para el número de muestras a montar, más una adicional por el error de pipeteo. Se mezcló en un vortex y se sirvió 12 μ L de la mezcla preparada, en cada tubo y se adiciono 3 μ L del producto minisequenciado purificado. Mezclar en vortex y centrifugar por 1 min a 1000 rpm para llevar al fondo de cada tubo la mezcla preparada.

Llevar los tubos con la mezcla a 94°C durante 3 minutos, antes de ser ubicados en el equipo ABI 310.

Se creó en el equipo la samplesheet incluyendo los controles (positivo y negativo) y cada muestra con las siguientes especificaciones de corrida de la electroforesis capilar: RUN MODULE: SNP36POP4 DYE SET E5, RUN VOLTAGE: 15KV, RUN TIME 1000sg INJECTION TIME 20sg, INJECTION VOLTAGE 2.

12.1.10 Análisis de los Electroferogramas. Una vez terminada la electroforesis capilar, se observaron y analizaron los electroferogramas de cada una de las muestras y de los controles (negativo y positivo) identificando el patrón de ddNTPs agregados en el lugar de los SNPs.

Se estableció el genotipo respectivo de cada una de las muestras, el cual fue asignado según el color que emita la señal fluorescente, verde para la adenina, amarillo para la citosina, azul para la guanina y rojo para la timina, permitiendo identificar la base nitrogenada del SNP graficada en un plano cartesiano en donde el eje de las X corresponde al peso en pares de bases (pb) y el eje de las Y a las unidades de fluorescencia relativa (rfu), figura 8. Se emplearon primers en sentido 5'-3' para los polimorfismos SNP276 del Gen de la Adiponectina y Trp64Arg del

Gen del Receptor Beta 3-Adrenérgico y primers antisentido 3'-5' para los polimorfismos Ser19Trp del Gen APOA5 y Pro12Ala del Gen PPAR-Gamma (tabla 6), a partir de estos perfiles genéticos se construyó una base de datos en Excel con la información de cada uno de los cuatro polimorfismos, registrando la base complementaria solo para los polimorfismos Ser19Trp y Pro12Ala debido a que se detectó en el electroferograma la base de la hebra complementaria del ADN (sentido 3'-5'), toda la información se digitalizó por duplicado y se validó con el Software EpilInfo versión 3.5. (65).

Figura 8. Asignación de las bases nitrogenadas de acuerdo al fluorocromo con el que están marcadas. * Fluorocromo amarillo (Citosina) se observa en color negro.

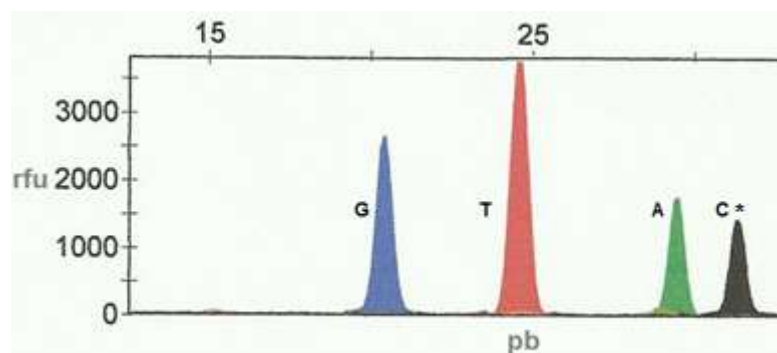


Tabla 6. Identificación de las bases nitrogenadas de los polimorfismos.

<i>Polimorfismo</i>	<i>pb</i>	<i>Sentido</i>	<i>Detección</i>		<i>Mutación</i>	<i>Producto pb</i>
APOA5	23	3'-5'	C	G	G	268
PPARG	34	3'-5'	G	C	G	186
ADIPONECTINA	29	5'-3'	C	A	A	196
RECEPTOR B3	15	5'-3'	C	T	T	263

12.1.11 Secuenciación. Como parte del control de calidad se realizó la secuenciación de los primers (anexo 1), así como de 50 de las muestras de ADN amplificado para cada polimorfismos, secuenciados con el kit BigDyeTerminator

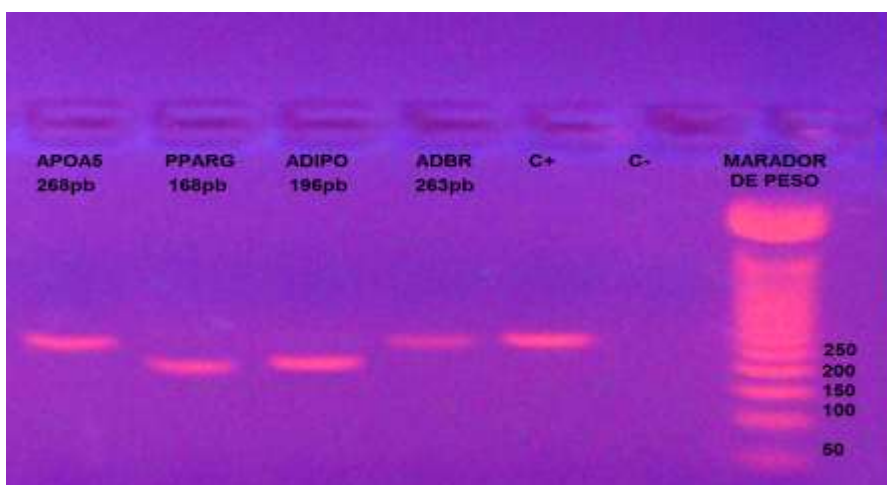
(AppliedBiosystems®) y purificadas con el kit BigDye® X TerminatorPurification Kit (AppliedBiosystems®). Posteriormente se realizó la electroforesis capilar en el equipo ABI Prims 310; una vez obtenida la secuencia de los nucleótidos se confirmó con el softwarePrimer 3.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) (Untergrasser 2012, Koressaar 2007) la concordancia de los resultados entre las muestras minisequenciadas y secuenciadas.

13. CONTROLES DE CALIDAD

Se realizó control de calidad, el operador que proceso las muestras no conocía la identidad de las muestras ni la condición de los pacientes de tener o no Síndrome Metabólico.

Antes de realizar la minisequenciación a cada una de las muestras, se identificaron los primers forward y reverse para cada uno de los polimorfismos por medio de una electroforesis de agarosa, en esta se observaron tamaños de amplificadas de: 268 pb para el polimorfismo Ser19Trp, 168 pb para Pro12Ala, 196 pb para SNP276 y 263 pb para Trp64Arg (figura 9).

Figura 9. Gel de agarosa en donde se muestran las bandas correspondientes a los amplificados de cada uno de los polimorfismos.



Se incluyeron controles positivos y negativos en cada uno de los montajes realizados en el equipo ABI Prims 310.

Se realizó la minisequenciación y secuenciación de muestras seleccionadas aleatoriamente.

14. ANALISIS ESTADISTICOS

Se realizó un estudio CrossSectional, en donde se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas empleando el software de análisis genético poblacional Arlequin 3.5.1.2 (Excoffier, 2010), con el objeto de identificar las diferencias significativas entre los cuatro polimorfismos.

Para determinar si la población está bajo equilibrio, se aplicó el test de Hardy-Weinberg utilizando software Arlequin 3.5.1.2 (Excoffier, 2010); se empleó la prueba de χ^2 ($p \leq 0,05$), para comparar las frecuencias alélicas observadas y las esperadas de cada uno de los cuatro polimorfismos. La presencia del estado de equilibrio indica que la población estudiada es homogénea con respecto a la frecuencia y distribución de distintos alelos y no es una mezcla de sub-poblaciones con distintas frecuencias y distribución de alelos para los genes estudiados.

Se calculó el coeficiente de endogamia o estadístico de F_{st} con el software Arlequin 3.5.1.2 (Excoffier, 2010) con el objeto de evaluar la estructura genética poblacional a partir de los datos genotípicos de cada uno de los polimorfismos los cuales estaban agrupados en afectados y no afectados por la presencia de síndrome metabólico.

Se calcularon las frecuencias haplotípicas de los grupos de individuos afectados y no afectados para síndrome metabólico a partir del software Arlequin 3.5.1.2 (Excoffier, 2010) se comparó si existían diferencias significativas en las frecuencias haplotípicas analizadas.

15 CONSIDERACIONES BIOÉTICAS

Desde el punto de vista ético, la presente investigación se fundamenta en los principios establecidos en la declaración de Helsinki (v. octubre 2013) (Declaración de Helsinki, 2013) que la Asociación Médica Mundial ha promulgado. Dicha declaración es una propuesta de principios éticos que sirven para orientar a los médicos y a otras personas que realizan investigación médica en seres humanos, incluyendo la investigación del material humano o de información identificable. En el contexto establecido anteriormente, en el presente estudio se tendrá en cuenta, además de los principios en la declaración de Helsinki, lo contemplado en la resolución 8430 de 1993 expedida por el Ministerio de Salud de Colombia. De acuerdo con la resolución 8430 de 1993, se considera a éste proyecto una investigación con riesgo mínimo, dado que se emplean técnicas de investigación sin realizar alguna modificación intencionada de las variables identificadas.

Los principios éticos que se aplican para este estudio están centrados en el criterio de confidencialidad para con los datos obtenidos, solo se suministrarán resultados del análisis de los datos, y no se proporcionaran los datos particulares. La información será utilizada para el beneficio de la comunidad fortaleciendo en conocimiento sobre esta patología en pro del desarrollo de actividades de promoción y prevención de la salud.

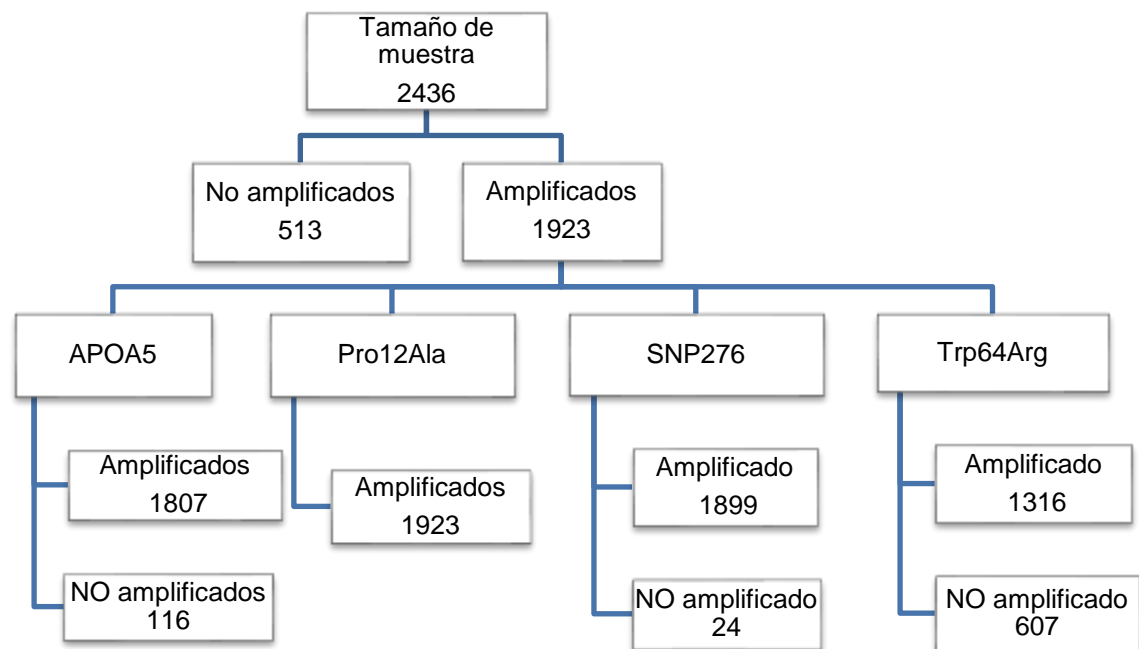
Se tendrá en cuenta la normatividad internacional para estudios genéticos por ello se realizará firma de consentimiento informado por parte de la paciente (anexo 2). Se cuenta con la aprobación del comité de Ética de la Universidad Industrial de Santander (anexo 3)

Los programas, Primer 3, Dimer, Blast y Arlequin V3.5.1.2, tienen licencia de uso libre en la web y las licencias del software Stata 12 y EndNote fueron adquiridas por el grupo de Genética Humana de la Universidad Industrial de Santander.

16. RESULTADOS

En la base de datos se encontraron 2996 individuos de los cuales se extrajo ADN a 2436; se amplificaron 1923 muestras y se obtuvo el perfil genético de los cuatro polimorfismos a 1274 individuos; no fue posible realizar la identificación de los SNPs en 513 muestras (figura 10).

Figura 10. Total de muestras analizadas para los cuatro polimorfismos



La diferencia en el tamaño de muestra puede ser atribuida a interferencias en cualquiera de los pasos de la técnica como la extracción de ADN, la amplificación

por PCR y la electroforesis capilar. En la extracción de ADN la muestra de sangre puede tener Inhibidores que bloqueen la lisis celular provocando que la cantidad de ADN que se extraiga no sea la suficiente para obtener un perfil genético; por otra parte la hemoglobina pueden bloquear la actividad enzimática de la ADN polimerasa disminuyendo de esta forma la concentración de amplificado de la PCR. Al realizar una PCR multiplex cada uno de los cebadores hibridan a una temperatura de anillamiento específica; las variaciones de estas temperaturas pueden ocasionar uniones erróneas entre estos cebadores y la hebra de ADN. Otro factor que puede contribuir a disminuir la probabilidad de anillamiento, es el tamaño de la secuencia de ADN que identifica el SNP del polimorfismo de ADBR (15 pb)(anexo1).

16.1 CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS

Se analizaron 1274 individuos del proyecto CARMEN e INEFAC, con edades comprendidas entre 15 y 66 años de ambos géneros, compuestos por 465 hombres y 809 mujeres con promedio de edad de 40 años, provenientes de Bucaramanga Colombia.

16.2 POLIMORFISMOS

Se identificaron los polimorfismos (tabla 7) y las frecuencias alélicas y genotípicas de cada uno de ellos (tabla 8). Se empleó el marcador interno GeneScan™ 120 LIZ™ (figura 11) para asignar los pesos de los picos fluorescentes según la unión de los ddNTPs incluidos en el polimorfismo. Se incluyeron los controles positivos (figura 12) y negativos (figura 13) para cada grupo de muestras montadas en el ABI PRIMS 310.

Tabla 7. Información general de los cuatro polimorfismos,* identificación del SNP con sonda reverse.

<i>RS</i>	<i>POLIMORFISMO</i>	<i>ALELO ANCESTRAL</i>	<i>MUTACION</i>	<i>ALELO DE MENOR FRECUENCIA</i>
3135506	Ser19Trp del Gen APOA5 (APOA5)*	G	C>G	C=0.046/100
1801282	Pro12Ala del Gen PPAR-Gamma (PPARG)*	C	C>G	G=0.066/144
1501299	SNP276 del Gen de la Adiponectina (ADIPOQ)	C	C>A	A=0.320/697
4994	Trp64Arg del Gen del Receptor Beta 3-Adrenérgico (ADBR)	C	C>T	C=0.100/218

Tabla 8. Frecuencias genotípicas, alélicas y Equilibrio de Hardy Weinberg (EHW) para los cuatro polimorfismos. † Polimorfismo por fuera de EHW.

<i>Polimorfismo</i>	<i>Genotipo</i>	<i>N</i>	<i>Frecuencia Genotípica</i>	<i>Frecuencia Alélica</i>	<i>EHW[†] P=</i>
3135506/ APOA5	GG	1326	0,7326	G: 0,8559	0.0030†
	CG	420	0,2465	C: 0,1440	
	CC	61	0,0207		
1801282/PPARG	CC	1531	0,7929	C: 0,8905	0.1501
	CG	373	0,1950	G: 0,1095	
	GG	17	0,0119		
1501299/ADIPOQ	CC	555	0,4524	C: 0,6726	0.0072†
	CA	604	0,4403	A: 0,3273	
	AA	115	0,1071		
4994/ADBR	CC	27	0,0199	C: 0,1412	0,9079
	CT	317	0,2426	T: 0,8587	
	TT	972	0,7373		

Figura 11. Electroferograma en donde muestra el marcador de peso molecular GeneScan™ 120 LIZ™

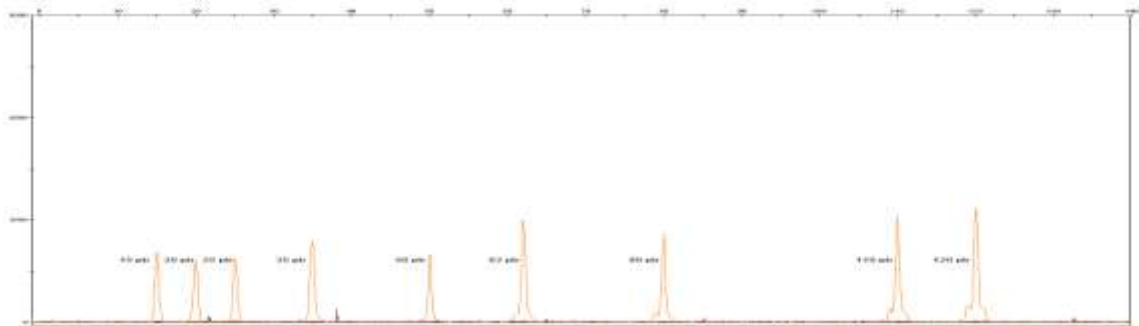


Figura 12. Electroferograma en donde muestra el control positivo. Se observa el perfil genético de los polimorfismos Trp64Arg del Gen del Receptor Beta 3-Adrenérgico C/T, Ser19Trp del Gen APOA5 C/C, SNP276 del Gen de la Adiponectina C/A y Pro12Ala del Gen PPAR-Gamma G/G.

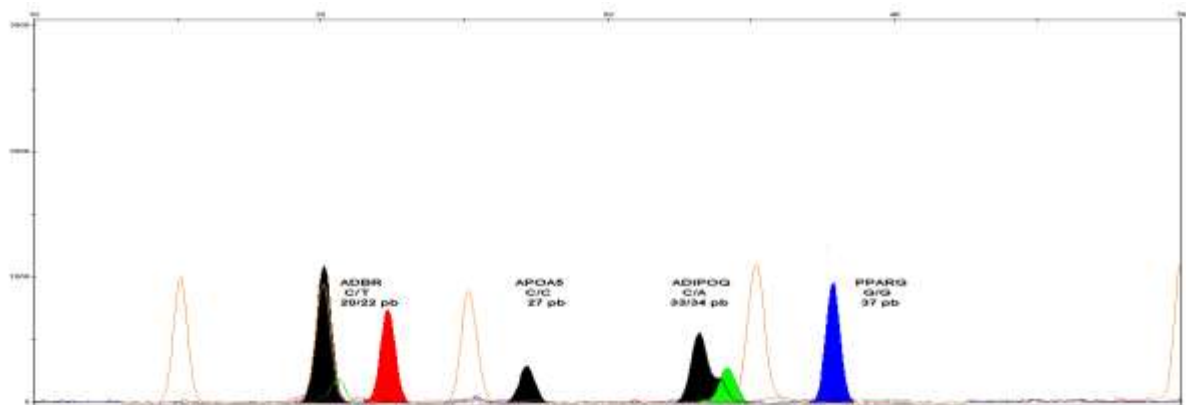
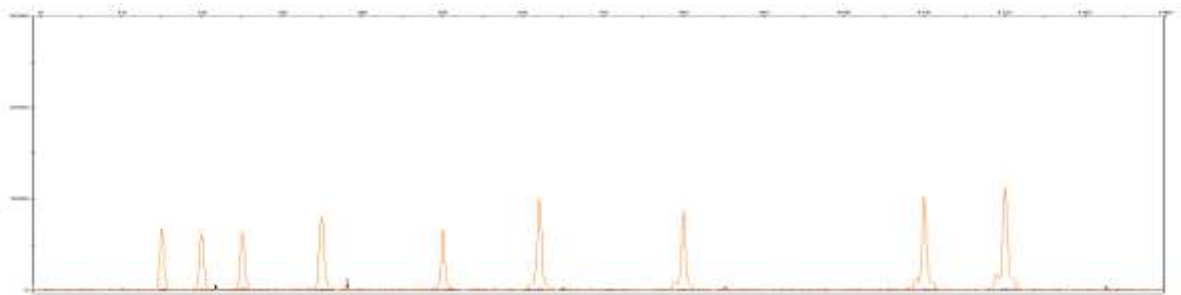


Figura 13. Electroferograma en donde muestra el control negativo.



16.2.1. Ser19Trp del gen APOA5. El alelo ancestral del polimorfismo Ser19Trp del gen APOA5 corresponde al pico CC (negro) y la mutación al pico CG (negro y azul) y GG (azul) (figura 14). En la tabla 8 el polimorfismo Ser19Trp del Gen APOA5 mostro a G como el alelo más común con un 85,59% y a GG como el genotipo de mayor frecuencia con 73,26%. El porcentaje de heterocigotos correspondió al 24,65%(figura 15) y C fue el alelo menos representativo en la población con 14,40%. Se confirmó la presencia de los perfiles CC, CG y GG por la técnica de secuenciación (figura 16). La población para este polimorfismo esta por fuera del equilibrio de Hardy Weinberg con un $p=0.003$.

Figura 14. Electroferograma de tres muestras en donde se resalta el polimorfismo Ser19Trp del Gen APOA5 (APOA5): A) Perfil GG; B) Perfil G/C; C) Perfil CC.

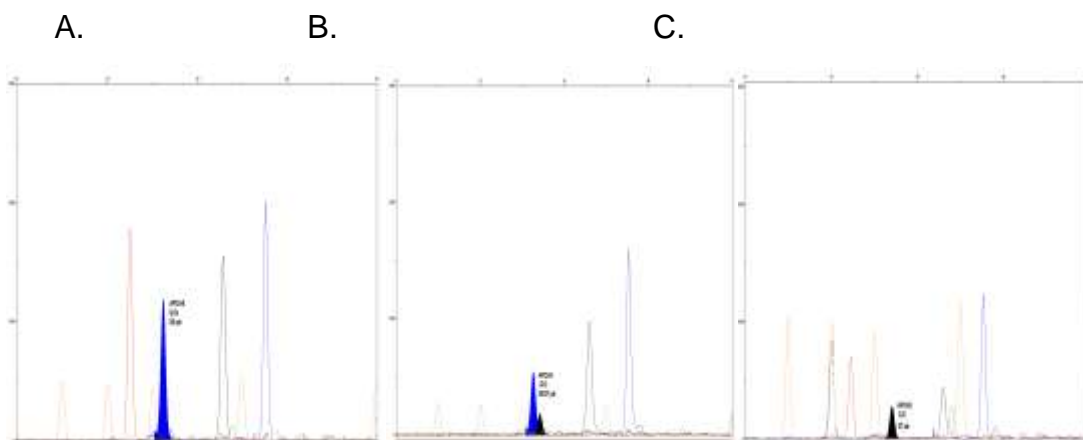


Figura 15. Frecuencia genotípica del polimorfismo Ser19Trp del Gen APOA5.

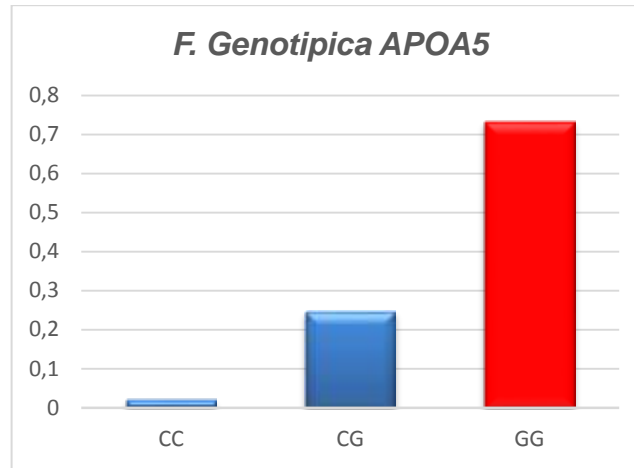
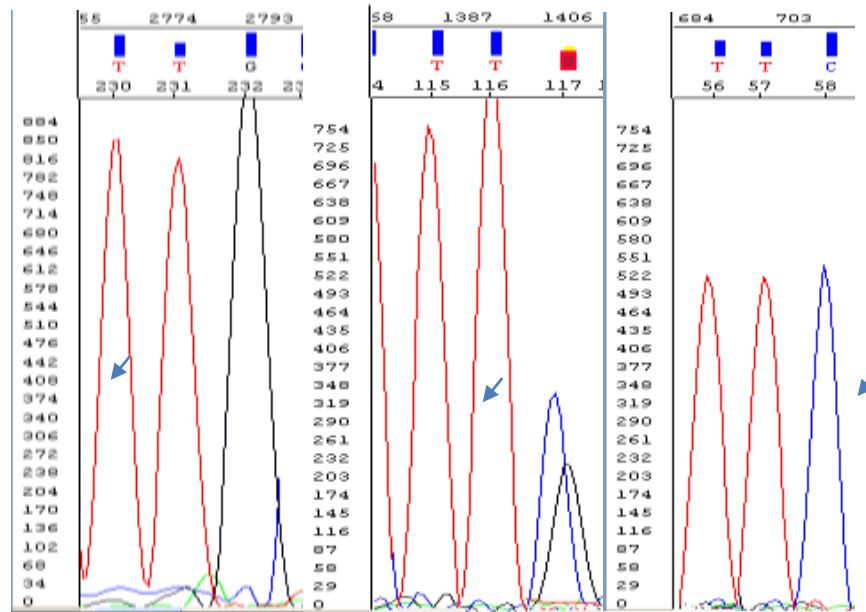


Figura 16. Secuenciación de tres muestras del polimorfismo Ser19Trp del Gen APOA5 (APOA5): A) Perfil GG; B) Perfil G/C; C) Perfil CC.



16.2.2. Pro12Ala del Gen PPAR-Gamma. El alelo ancestral del polimorfismo Pro12Ala del Gen PPAR-Gamma correspondió al pico GG (azul) y la mutación al pico GC (azul y negro) y CC (negro) (se reportan las bases complementarias debido a que se identificó el SNP con un primer reverso) (figura 17). En la tabla

El polimorfismo Pro12Ala muestra a C como el alelo más común con un 89,05% y a CC como el genotipo de mayor frecuencia con 79,29%. El porcentaje de heterocigotos correspondió al 19,50% (figura 18) y G fue el alelo menos representativo en la población con 10,95%. Se confirmó la presencia de los perfiles GG, GC y CC por la técnica de secuenciación (figura 19). La población para este polimorfismo está en equilibrio de Hardy Weinberg con un $p=0.15$.

Figura 17. Electroferograma del polimorfismo Pro12Ala del Gen PPAR-Gamma, en donde se observa: A) Perfil CC; B) Perfil C/G; C) Perfil GG.

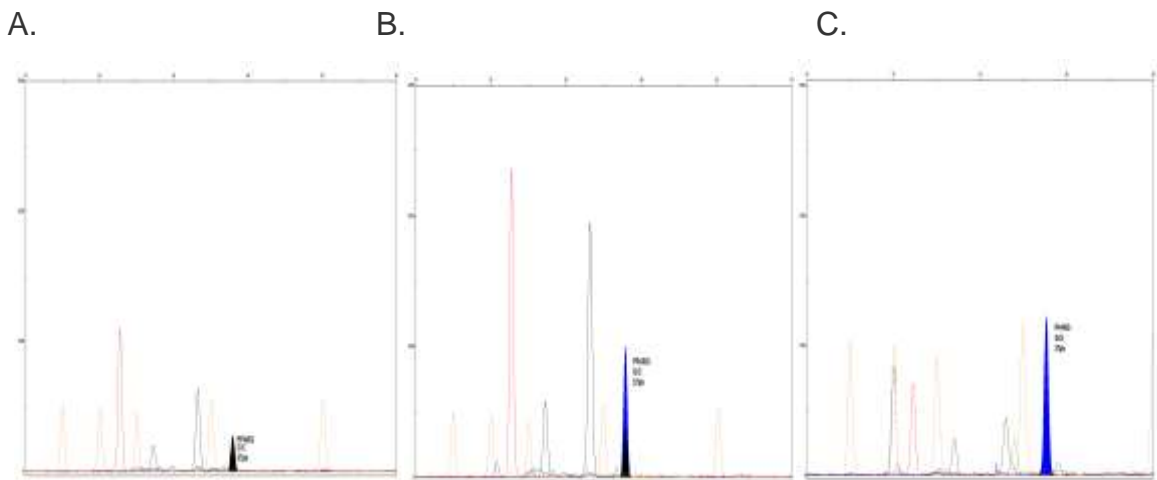


Figura 18. Frecuencia genotípica del polimorfismo Pro12Ala del Gen PPAR-Gamma.

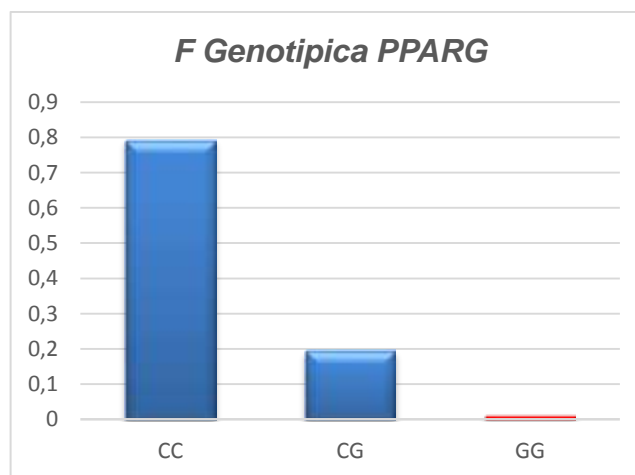
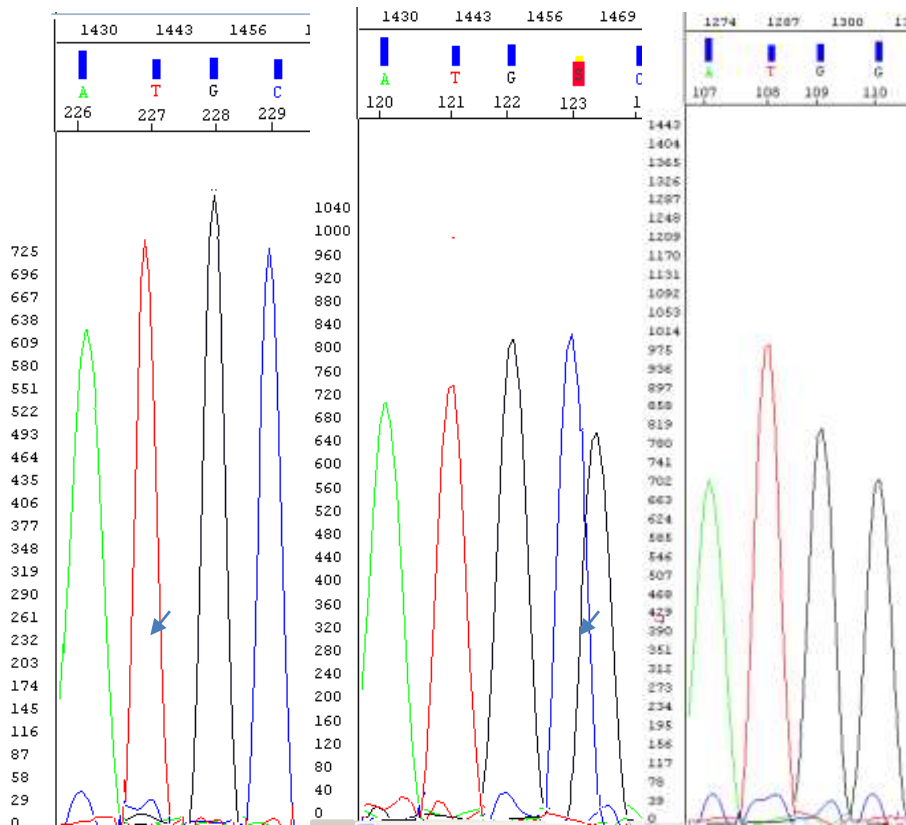


Figura 19. Secuenciación de tres muestras del polimorfismo Pro12Ala del Gen PPAR-Gamma: A) Perfil CC; B) Perfil C/G; C) Perfil GG.



16.2.3. SNP276 del Gen de la Adiponectina. El alelo ancestral del polimorfismo SNP276 del Gen de la Adiponectina correspondió al pico CC (negro) y la mutación al pico CA (negro, verde) y AA (verde) (figura 20). En la tabla 8 el polimorfismo SNP276 mostro a C como el alelo más común con un 67,26% y a CC como el genotipo de mayor frecuencia con 45,24%. El porcentaje de heterocigotos correspondió al 44,03% (figura 21) y A fue el alelo menos representativo en la población con 32,73%. Se confirmó la presencia de los perfiles CC, CG y GG por la técnica de secuenciación (figura 22). La población para este polimorfismo esta por fuera del equilibrio de Hardy Weinberg con un $p=0.0072$.

Figura 20. Electroferograma del polimorfismo SNP276 del Gen de la Adiponectina, en donde se observa: A) Perfil CC; B) Perfil C/A; C) Perfil AA.

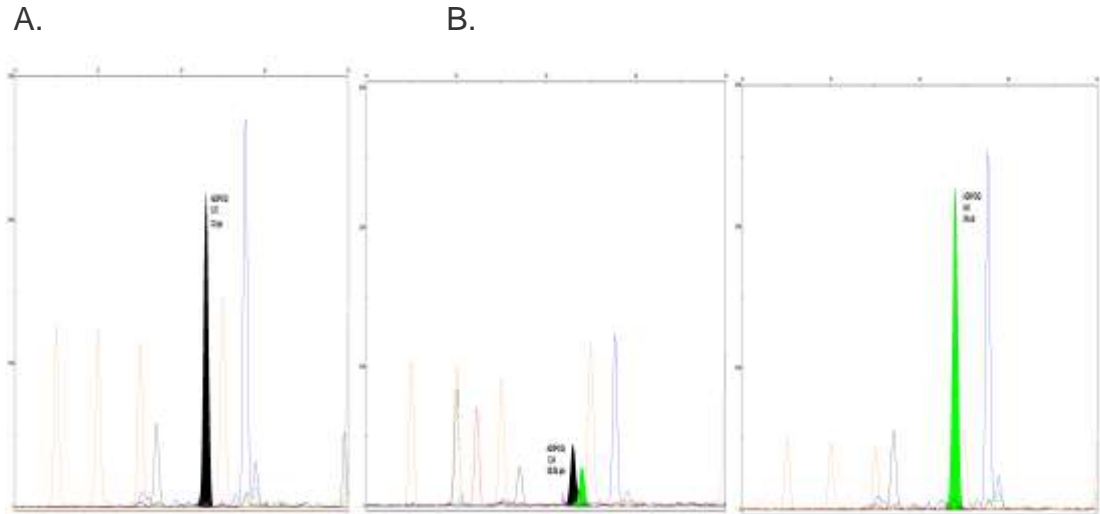


Figura 21. Frecuencia genotípica del polimorfismo SNP276 del Gen de la Adiponectina.

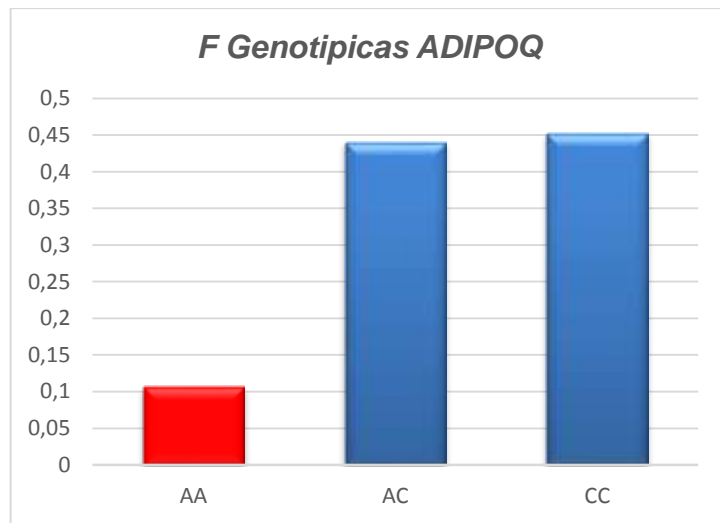
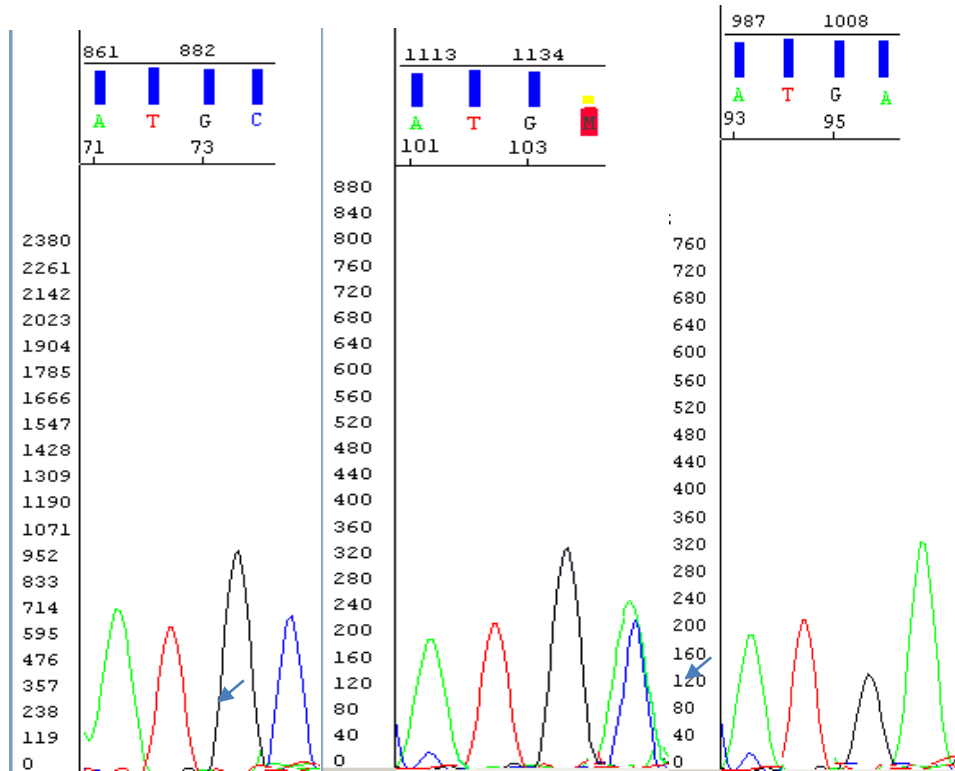


Figura 22. Secuenciación de tres muestras del polimorfismo Pro12Ala del Gen PPAR-Gamma: A) Perfil CC, B) Perfil C/G y C) Perfil GG.



16.2.4. Trp64Arg del Gen del Receptor Beta 3-Adrenérgico. El pico CC (negro) corresponde al alelo ancestral del polimorfismo Trp64Arg del Gen del Receptor Beta 3-Adrenérgico y la mutación al pico CT (negro, rojo) y TT (rojo) (figura 23). En la tabla 8 el polimorfismo Trp64Arg muestra a T como el alelo más común con un 85,87% y a TT como el genotipo de mayor frecuencia con 73,73%. El porcentaje de heterocigotos correspondió al 24,26% (figura 24) y C fue el alelo menos representativo en la población con 14,12 %. Se confirmó la presencia de los perfiles CC, CT y TT por la técnica de secuenciación (figura 25). La población para este polimorfismo está en equilibrio de Hardy Weinberg con un $p=0.9079$.

Figura 23. Electroferograma del polimorfismo Trp64Arg del Gen del Receptor Beta 3-Adrenérgico (ADBR) en donde se observa: A) Perfil CC; B) Perfil CT; C) Perfil TT.

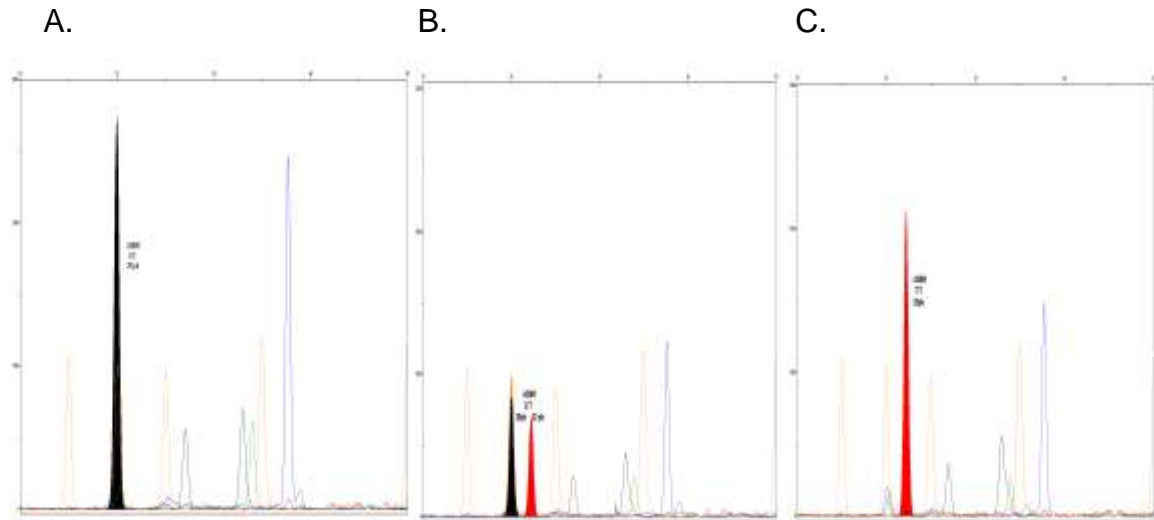


Figura 24. Frecuencia genotípica del polimorfismo Trp64Arg del Gen del Receptor Beta 3-Adrenérgico.

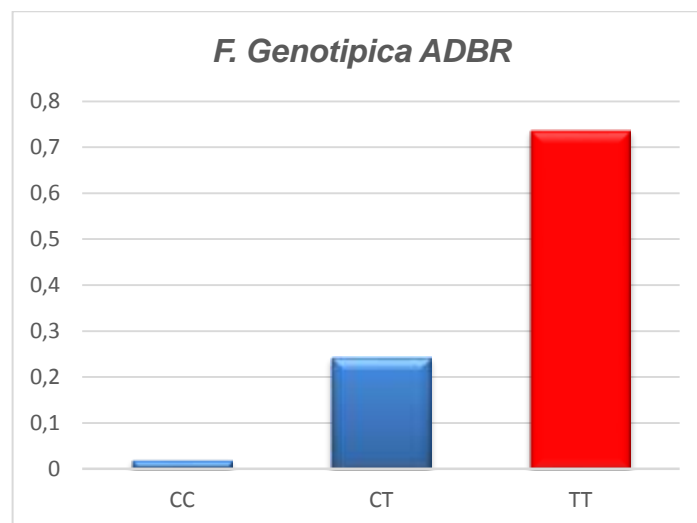
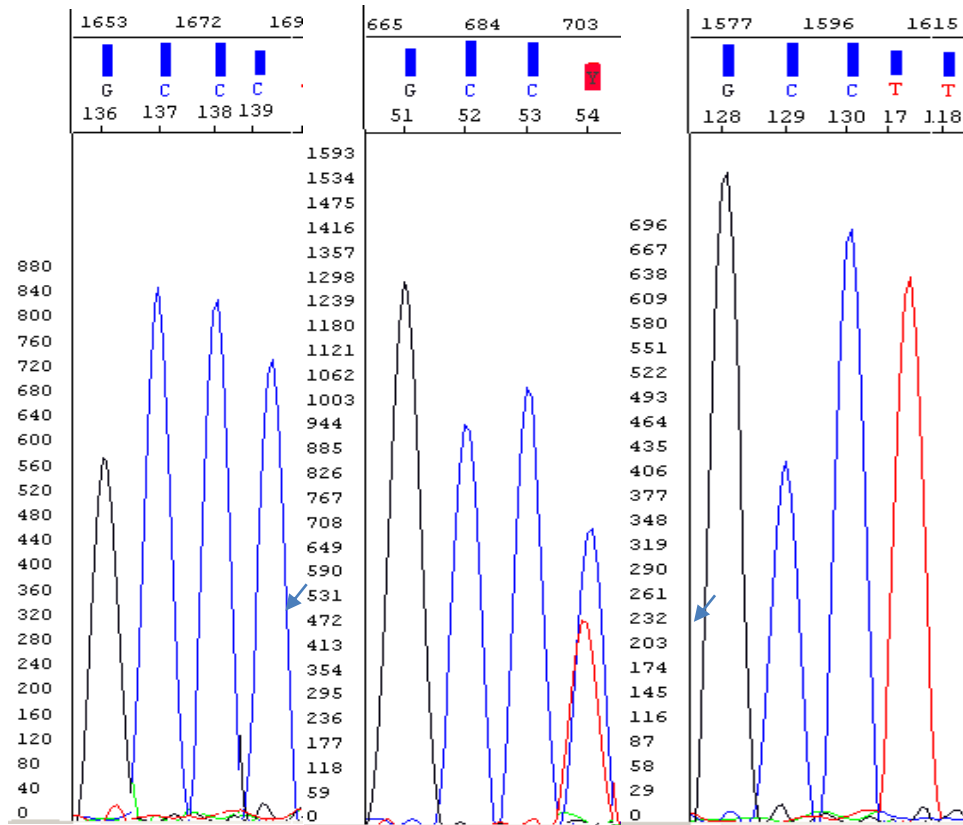


Figura 25. Secuenciación de tres muestras del polimorfismo Trp64Arg del Gen del Receptor Beta 3-Adrenérgico (ADBR): A) Perfil CC, B) Perfil C/T y C) Perfil TT.



No se observó ligamiento en los polimorfismos estudiados a partir del test de linkage disequilibrium.

No hay evidencia de estructura genética F_{st} : -0.0009 en los grupos con presencia y ausencia de SM de la poblacional de Bucaramanga para los polimorfismos Ser19Trp del Gen APOA5, Pro12Ala del Gen PPAR-Gamma, SNP276 del Gen de la Adiponectina y Trp64Arg del Gen del Receptor Beta 3-Adrenérgico, debido a que los valores reportados están dentro del rango de 0 a 0,005 en donde se relaciona poca diferenciación genética (Hulsinger, 2009).

16.3. FRECUENCIAS HAPLOTÍPICAS

Se mezclaron los genotipos de los cuatro polimorfismos para cada uno de individuos arrojando 14 combinaciones posibles. Se observó que el haplotipo con mayor frecuencia fue TGCC con 43,57% y el menor fue TCAG con 0,12%(tabla 9).

Tabla 9. Frecuencias haplotípicas de los cuatro polimorfismos

#	Frecuencia	Haplotipo
1	0.005977	CCAC
2	0.012478	CCCC
3	0.034703	CGAC
4	0.006230	CGAG
5	0.070991	CGCC
6	0.010909	CGCG
7	0.037742	TCAC
8	0.001250	TCAG
9	0.073119	TCCC
10	0.013468	TCCG
11	0.219744	TGAC
12	0.021670	TGAG
13	0.435749	TGCC
14	0.055970	TGCG

Se mezclaron los genotipos de los cuatro polimorfismos de cada uno de individuos; se construyeron dos grupos para la variable Síndrome Metabólico en afectados y no afectados, se originaron 14 combinaciones posibles para cada uno de los grupos (tabla 10). Se observó que el haplotipo con mayor frecuencia fue TGCC con 43,32% y 43,62% respectivamente, el haplotipo menos frecuente fue CCCG para el grupo de los afectados con 0,093% y CCAC para el grupo de los no afectados con 0,32% el haplotipo CCCG no aparece en el grupo de los no afectados. No se encontraron diferencias significativas entre los haplotipos de los grupos de afectados con síndrome metabólico y no afectado con síndrome metabólico (p: 0,233).

Tabla 10. Frecuencias haplotípicas de los cuatro polimorfismos para los grupos de afectados y no afectados con Síndrome Metabólico. * Frecuencia más alta, ** frecuencia más baja.

AFECTADOS CON SÍNDROME METABÓLICO			NO AFECTADOS CON SÍNDROME METABÓLICO	
#	Frecuencia	Haplotipo	Frecuencia	Haplotipo
1	0.012002	CCAC	0.003215	CCAC**
2	0.002836	CCCC	0.017686	CCCC
3	0.000933	CCCG **	0.034007	CGAC
4	0.036024	CGAC	0.007308	CGAG
5	0.003703	CGAG	0.070361	CGCC
6	0.071240	CGCC	0.010670	CGCG
7	0.009498	CGCG	0.033948	TCAC
8	0.043522	TCAC	0.003638	TCAG
9	0.069648	TCCC	0.074494	TCCC
10	0.011509	TCCG	0.012444	TCCG
11	0.218968	TGAC	0.223571	TGAC
12	0.010220	TGAG	0.022744	TGAG
13	0.436209	TGCC*	0.433241	TGCC*
14	0.073689	TGCG	0.052673	TGCG

16.4. ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS CON SÍNDROME METABÓLICO

No se observaron diferencia significativa entre la presencia del cambio de aminoácido de cada uno de los polimorfismos evaluados y el Síndrome Metabólico (tabla 11).

Tabla 11. Valor de Chi² y p para los cuatro polimorfismos.

RS	POLIMORFISMO	Chi ²	P
3135506	Ser19Trp del Gen APOA5 (APOA5)*	3.8270	0.148
1801282	Pro12Ala del Gen PPAR-Gamma (PPARG)*	0.0238	0.988
1501299	SNP276 del Gen de la Adiponectina (ADIPOQ)	0.2375	0.888
4994	Trp64Arg del Gen del Receptor Beta 3-Adrenérgico (ADBR)	0.3320	0.847

17. DISCUSION

Revisando la literatura disponible existen pocos artículos que se enfocan en la tipificación de los polimorfismos y la posible asociación con Síndrome Metabólico (Tellechea, 2009). Uno de estos trabajos fue realizado por Tellechea donde reporta asociación del polimorfismo Pro12Ala y SM en una población 487 argentinos, donde no se encontraron genotipos Ala12Ala del gen PPAR pero si genotipo heterocigoto Pro/Ala con una frecuencia de 14,9% (Tellechea, 2009). Hasta la fecha no hay ningún artículo en donde relacione los cuatro polimorfismos Ser19Trp del Gen APOA5, Pro12Ala del Gen PPAR-Gamma, SNP276 del Gen de la Adiponectina y Trp64Arg del Gen del Receptor Beta 3-Adrenérgico tipificados para una población de Bucaramanga, es por esto que este estudio se convierte en el primero de este tipo para la población del oriente Colombiano.

Se han realizado otros estudios en donde abordaron uno o dos polimorfismos relacionados con alguno de los criterios para el diagnóstico de SM como son diabetes, hipertensión y obesidad (Schaap 2004, pennacchio 2002, Rey 2010, Evan 2000). Uno de estos autores fue Penachio el cual encontró que en Norteamericanos e Hispanos la frecuencia del alelo mutado del polimorfismo Ser19Trp del gen APOA5 fue de 15%, para caucásicos del 6%, para africanos y americanos del 7% (Andrade, 2011). Ruiz y Narváez reportaron que para poblaciones costarricenses la frecuencia 19Trp es del 10,02% y autores como Lai reportaron frecuencias bajas en chinos, malayos e hindús de 0,1%, 1% y 3% respectivamente. Por otra parte Andrade reportó que en poblaciones brasileras la frecuencia del polimorfismo fue de 13,7% (Andrade, 2011). Los resultados de esta investigación no son semejantes a las frecuencias anteriormente reportadas (Ser19Trp 73,26%), sin embargo concuerdan con los datos reportados por el NCBI en una población de Estados Unidos (ESP) con 87.4% (<https://esp.gs.washington.edu/drupal/>) (anexo 4).

Tellechea reportó que la frecuencia del alelo mutado del polimorfismo Pro12Ala del gen PPAR en Caucásicos fue del 5.9% al 21.6% con un promedio de 12.7%. Hsieh reportó que en chinos con diabetes tipo 2 la frecuencia fue de 26% (Hsieh, 2010), Gouda encontró en una población asiática frecuencias de 1.7% a 9.3% con un promedio de 4.5% (Gouda 2010). Rey informó que en Alemanes las frecuencias fueron de 3% para pacientes con hígado graso y 1,5% en controles y en pacientes Japoneses con diabetes tipo 2 valores de 2.39% (casos) y 4.13% (controles) (Rey, 2010), Pattanayak reportó para poblaciones belgas e hindúes que la frecuencia de la mutación fue del 12% (Pattanayak, 2014), en suizos obesos y con diabetes tipo 2 de 0,9% (Stefanski, 2010) y en pacientes mongoles con hipertensión de 1.3%(casos) y de 3.6% (control) (Gao, 2010). Los resultados de esta investigación muestran que la frecuencia de 12Ala fue del 1,19%, lo cual nos deja ver que estos resultados son similares a los reportados en otras poblaciones.

Jung reportó que la frecuencia del alelo mutado del polimorfismo SNP276 del Gen de la Adiponectina en coreanos fue del 7,7% (Jung, 2006). Por otra parte Hashemi informó frecuencias en iraníes de 2,4% (Hashemi, 2013), Rowida reportó que en árabes las frecuencias fueron de 30% (Rowida, 2011) y Yuan encontró que en chinos con enfermedad obstructiva pulmonar frecuencias de 17,2% (casos) y 10,6%(controles) (Yuan, 2012). En estadounidenses con cáncer de próstata se observó una frecuencia de 7,7% (casos) y 8,4% (controles) (Kaklamani, 2011) y en poblaciones con cáncer de seno mostraron que en africanos la frecuencia fue de 16,5% (casos) y 12,5% (controles) y en hispanos con la misma patología se encontró 6,5% (casos) y 7,6% (controles) (Kaklamani, 2013). Los resultados de esta investigación muestran que la frecuencia del polimorfismo SNP276 del gen de la Adiponectina fue de 10,71%, lo cual nos deja ver que estos resultados son similares a los reportados en otras poblaciones.

Saliba reporto que la frecuencia del alelo mutado del polimorfismo Trp64Arg del Gen del Receptor Beta 3-Adrenérgico en brasileños fue del 22,7% (Saliba, 2014), Likanonsakul informo en tailandeses un 78,5% (Likanonsakul, 2013) y Takeuchi observo que en una poblaciones de japoneses la frecuencia fue del 3% (Takeuchi 2012); Karasaki reporto que para poblaciones bolivarianas se reportó frecuencias del 18% y en población japonesa 19%(Karasaki, 2004), Anshika reporto que para una población de indígenas americanos la frecuencia del alelo mutado fue del 31%, para mexicanos del 13%, africanos del 12% y estadounidenses del 8%. Adicionalmente en un estudio en una población en el norte de India con colelitiasis reportaron una frecuencia de 68,7% (casos) y 80,9% (controles) (Sirvastava 2013). Entre pacientes que presentan resistencia a la insulina o diabetes mellitus, oscila entre el 26% y un 41,4% en diversas poblaciones (Walston 1995, Kawamura 1999). Los resultados de esta investigación muestran que la frecuencia del polimorfismo Trp64Arg del Gen del Receptor Beta 3-Adrenergico fue de 73,73% en la población de Bucaramanga, siendo esta una de las más alta según las reportadas para las demás poblaciones. Sin embargo la prevalencia del polimorfismo Trp64Arg puede variar en población sana según el tipo de etnia (Karasaki, 2004).

Los polimorfismos Pro12Ala del Gen PPAR-Gamma y Trp64Arg del Gen del Receptor Beta 3-Adrenérgico se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) permitiendo inferir que la población analizada no estaba influenciada por factores externos como deriva genética, mutación o consanguinidad de los individuo (Hartl, 1997); adicionalmente a esto se considera que los controles de calidad implementados en la ejecución del trabajo permiten inferir que el hecho de la ausencia de Equilibrio de Hardy Weinberg no sea atribuido a errores técnicos. Sin embargo se puede inferir que los polimorfismos Ser19Trp del Gen APOA5 y el SNP276 del gen de la Adiponectina están por fuera del Equilibrio de Hardy Weinberg dejando ver que no cumplen con la hipótesis nula de uniformidad genética, corregida por el método de Bonferroni ($p < 0.0125$). De esta forma cuando

las poblaciones no cumplen algunos de los principios del EHW se puede asumir que hay algunas fuerzas de cambio evolutivo que actúen en la población y ejerza una influencia que las saca del equilibrio (Hartl, 1997). Esto probablemente podría deberse a que el cambio de frecuencias alélicas está siendo presionado por factores como selección, en donde los individuos no están contribuyendo con igual número de gametos al conjunto de genes heredado. Sin embargo se podría suponer que los individuos homocigotos GG del polimorfismo Ser19Trp y CC del SNP 276 probablemente tengan una mayor probabilidad de heredar sus alelos a las siguientes generaciones (Hartl, 1997).

La evaluación de la estructura genética poblacional a partir de datos genotípicos polimórficos, se realiza con los estimadores de sub-estructura poblacional F_{ST} . Este estimador se ha implementado para medir la diferenciación entre poblaciones, debido a que evalúa el déficit en la proporción de genotipos heterocigotos, que determina la presencia de subestructuras (Coedell, 2005). El F_{st} (-0.0009) sugiere que no se observó subdivisión en las subpoblaciones cercano a cero sugiere incremento del flujo genético en las poblaciones y ausencia de deriva genética (Hartl, 1997).

Una vez clasificados los individuos se encontró que en esta población mestiza no hay asociación entre los cuatro polimorfismos y la presencia de Síndrome Metabólico sin embargo algunos estudios reportan asociación entre los polimorfismos y los criterios clínicos de diagnóstico de Síndrome Metabólico. Andrade demostró que la presencia del polimorfismo Ser19Trp del Gen de APOA5 influye significativamente en los niveles de triglicéridos y es un factor de riesgo independiente para desarrollar enfermedad coronaria (Andrade 2011), adicionalmente Soter encontró asociación entre la presencia de polimorfismo Ser19Trp con los altos niveles de TG en pacientes diabéticos (Soter, 2011) y ha sido asociado a hipertriglicidemia y riesgo de desarrollar S.M. (Martin 2003, Singmann 2009, Oliver 2004, Szalai 2004). Mori reporto que la presencia del

polimorfismo Pro12Ala del gen PPAR Gama puede estar asociado con factores de riesgo de insulino deficiente e individuos diabéticos (Mori 2001).Adicionalmente diversos autores han sugerido la asociación entre la presencia del polimorfismo y criterios para el diagnóstico de SM (Frederiksen 2002, Beamer 1998).Yuan demostró la asociación entre el polimorfismo SNP276 del gen ADIPOQ y el riesgo de presentar enfermedad obstructiva pulmonar crónica (Yuan, 2012), Kaklamani encontró asociación entre el polimorfismo SNP276 y la presencia de cáncer de seno en mujeres africanas y americanas (Kaklamani 2011) y Zhang encontró asociación entre este polimorfismo y la presencia de enfermedad cardiovascular (Zhang 2012). Takeuchi sugirió asociación entre la presencia del polimorfismo Trp64Arg del gen ADBR y el índice de masa corporal (ganancia o reducción) en una población Japonesa. (Takeuchi, 2012). Adicionalmente Srivastava informo la presencia de asociación del polimorfismo Trp64Arg y enfermedad de cálculos biliares de colesterol (Srivastava, 2013). Sin embargo algunos autores concuerdan con los resultados de este estudio, reportado que no hay asociación entre los polimorfismos y la presencia de SM o de los criterios para el diagnóstico de esta entidad (Hashemi 2013, Saliba 2014).

18. CONCLUSIONES

Los alelos de mayor frecuencia para los cuatro polimorfismos fueron: Ser19Trp del Gen APOA5 G (85,59%), Pro12Ala del Gen PPAR-Gamma C (89,05%), SNP276 del Gen de la Adiponectina C (67,26%) y Trp64Arg del Gen del Receptor Beta 3-Adrenérgico T (85,87%).

Los genotipos de mayor frecuencia para los cuatro polimorfismos fueron: Ser19Trp del Gen APOA5 GG con 73,26%, Pro12Ala del Gen PPAR-Gamma CC con 79,26%, SNP276 del Gen de la Adiponectina CC con 45,24% y Trp64Arg del Gen del Receptor Beta 3-Adrenérgico TT con 73,73%.

El polimorfismo con mayor número de heterocigotos fue el SNP276 del Gen de la Adiponectina con 44,03%.

El polimorfismo con menor número de heterocigotos fue Pro12Ala del Gen PPAR-Gamma con 19,50%.

Se encontraron en Equilibrio de Hardy Weinberg los polimorfismos Pro12Ala del Gen PPAR-Gamma ($p=0,1501$) y Trp64Arg del Gen del Receptor Beta 3-Adrenérgico ($p=0,9079$).

Se encontraron por fuera del Equilibrio de Hardy Weinberg los polimorfismos Ser19Trp del Gen APOA5 ($p=0,003$) y SNP276 del Gen de la Adiponectina ($p=0,0072$).

El haplotipo con mayor frecuencia fue TGCC con 43,57% y el de menor frecuencia fue TCAG con 0,12%.

No se observó estructura poblacional en los dos grupos de individuos afectados y no afectados con Síndrome Metabólico $F_{ST} = -0,0009$.

No se encontró asociación significativa entre la presencia de la mutación de cada uno de los polimorfismos y la presencia de Síndrome Metabólico en la muestra poblacional analizada.

BIBLIOGRAFIA

ALONSO AA. Síndrome Metabólico. Fistera [on line] (2005) [15 de diciembre de 2006].

ANAGNOSTIS, P. Metabolic syndrome in the Mediterranean region: Current status. *Indian J Endocrinol Metab.* 2012 16(1), 72-80. doi: 10.4103/2230-8210.91195.

ANDRADE, S.W. MALUF, J.B. SCHUCH, F. VOIGT., BARROS, J.F. LUCATELLI, M.H. HUTZ. The influence of the S19W SNP of the APOA5 gene on triglyceride levels in southern Brazil: Interactions with the APOE gene, sex and menopause status. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* 2011. 21, 584e590

ARNER P, HOFFSTED F. Adrenoreceptor genes in human obesity. 1999. *J Intern Med.* 6: 667-72.

BEAMER B, YEN C, ANDERSEN R, MULLER D, ELAHI D, CHESKIN L, ANDRES R, ROTH J, SCHULDINER A. Association of the Pro12Ala variant in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 gene with obesity in two Caucasian populations. 1998. *Diabetes* 47:1806-08.

BOTSTEIN, D. AND RISCH, N. 'Discovering genotypes underlying human phenotypes: Past successes for Mendelian disease, future approaches for complex disease', 2003. *Nat. Genet.* Vol. 33, pp. 228 – 237.

CAMERON, A., MAGLIANO, D., ZIMMET, P., WELBORN, T., SHAW, J. The metabolic syndrome in Australia: prevalence using four definitions. 2007. *Diabetes research and clinic practice*:77:471-78.

CARLTON, V, IRELAND J, USECHE, F AND FAHAM M, Functional single nucleotide polymorphism-based association studies, Human Genomics. 2006. VOL 2. NO 6. 391–402 JUNE.

CARRACEDO A, PHOLLIPS C, SOBRINO B, TORRES M, BRION M. Genotipado de SNPS de cromosoma Y con DNA microarrays, Ciencia forense. 2004. Revista aragonesa de medicina legal, ISSN 1575-6793, Nº 5-6, 2003-

CHANDRAN M, PHILLIPS SA, CIARALDI T, HENRY RR. Adiponectin: more than just another fat cell hormone?. 2003. Diabetes Care.26:2442-50.

CHUNG LM. Humangenetics of the metabolic syndrome. 2008. AsianPac J Clin Nutri;17suppl 1: 43-6.

CLARKE S D, THUILLIER P, BAILLIE R, AND SHA X. Peroxisome proliferator-activated receptors: a family of lipid-activated transcription factors. 1999. Am J Clin Nutr.70:566–71.

CORDELL HJ, CLAYTON DG. Genetic association studies. Lancet. 2005; 366: 1121-31.

CRISTOFARO J D, JACQUES M S, AND BAILLY P. Single PCR Multiplex SNaPshot Reaction for Detection of Eleven Blood Group Nucleotide, Polymorphisms. Optimization, Validation, and One Year of Routine Clinical Use. 2010. Journal of Molecular Diagnostics, Vol. 12, No. 4.

DEAN J. KEREIAKES AND JAMES T. WILLERSON. Metabolic syndrome epidemic.2003. Circulation; 108 : 1552-53.

DECLARACIÓN DE HELSINKI: Principios Éticos ara la Investigación Médica Sobre Sujetos Humanos. Disponible en: <http://www.wma.net/es/30publications/10policies/b3/>

DUPONT WD, PLUMMER WD: 'Power and Sample Size Calculations: A Review and Computer Program', 1990. *Controlled Clinical Trials* 11:116-28.

EVANS D, MINOUCHEHR S, HAGEMANN G, MANN WA, WENDT D, WOLF A, BEISIEGEL U. Frequency of and interaction between polymorphisms in the beta3-adrenergic receptor and in uncoupling proteins 1 and 2 and obesity in Germans. 2000 *Int J Obes Relat Metab Disord* . 24:1239-45.

EVANS D, BODE A, LIPPE G V D, BEIL F U, MANN W A. Cerebrovascular atherosclerosis in type III hyperlipidemia is modulated by variation in the apolipoprotein a5 gene. 2011. *eur J Med Res*. 16: 79-84.

EXCOFFIER, L. AND H.E. L. LISCHER. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. 2010. *Molecular Ecology Resources*. 10: 564-567.

FREDERIKSEN L, BRODBAEK K, FENGER M, JORGENSEN T, BORCH-JOHNSEN K, MADSBAD SURHAMMER SACOMMENT: Studies of the Pro12Ala polymorphism of the PPAR-gamma gene in the Danish MONICA cohort: homozygosity of the Ala allele confers a decreased risk of the insulin resistance syndrome. 2002. *J Clin Endocrinol Metab* 87:3989-92.

GAO, L., WANG, L., YUN, H., SU L., AND SU X. Association of the PPAR γ 2 gene Pro12Ala variant with primary hypertension and metabolic lipid disorders in Han Chinese of Inner Mongolia. 2010. *Genet. Mol. Res.* 9 (3): 1312-1320.

GERRY N, et. al. Universal DNA microarray method for multiplex detection of low abundance point mutations. 1999. J Mol Biol., Vol 292, N° 2, páginas 251-262,

GIACOBINO JP. .Uncoupling proteins, leptin and obesity: an updated review. 2002. Ann N Y AcadSci 967:398-402.

GIRMAN CJ, RHODES T, MERCURI M, et al. The metabolic syndrome and risk of major coronary events in the Scandinavian simvastatin survival study (4S) and the Air Force/Texas coronary atherosclerosis prevention study (AFCAPS/ TexCAPS. 2004. Am J Cardiol;93:136-141.

GOUDA, GURDEEP S. SAGOO, ANNE-HELEN HARDING, JAN YATES, MANJINDER S. SANDHU, AND JULIAN P. T. HIGGINS. The Association Between the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-g2 (PPARG2) Pro12Ala Gene Variant and Type 2 Diabetes Mellitus: A HuGE Review and Meta-Analysis. 2010. American Journal of Epidemiology Vol. 171, No. 6.

GROOP L. Genetics of the metabolic syndrome. 2000 Br J Nutr: 83:S39-48.

GU, H. Biomarkers of Adiponectin: Plasma Protein Variation and Genomic DNA Polymorphisms, 2009, *Biomarker Insights* 2009:4 123–133

GUNDOGAN, BAYRAM, F. GEDIK, V., KAYA, A.,KARAMAN, A.,DEMIR, O.,SABUNCU, T.,KOCER,D., COSKUN, R. Metabolic syndrome prevalence according to ATP III and IDF criteria and related factors in Turkish adults. Arch 2013. Med Sci 2013; 9, 2: 243-253.

HACIA, J. Resequencing and mutational analysis using oligonucleotide microarrays.1999. Nat Genet., Vol 21, N° 1, páginas 42-47.

HANSON RL, IMPERATORE G, et al. Components of the metabolic syndrome and incidence of type 2 diabetes. 2002. *Diabetes*;51:3120-3127.

HARTL, D; CLARK, AC. [ed.] Publishers Sunderland. 3^a. Massachusetts : Sinauer associates, 1997. Charper 1.

HASHEMI M, HANAFIBOJD H, ESKANDARINASAB E, BAHARI A, HASHEMZEHI NA, SHAFIEIPOUR S, NAROUIE B, TAHERI M, et al. Association of Adiponectin rs1501299 and rs266729 Gene Polymorphisms With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. 20013. *mHepat Mon*. 2013;13(5):e9527. DOI: 10.5812/hepatmon.9527.

HSIEHA, KUN-DER LINA, KAI-JEN TIENB, SHIH-TETUC, JENG-YUEHHSIAOA, SHUN-JEN CHANGD, SHIU-RU LINE, SHIH-JANG SHINGA, HUNG-CHUN CHENF. Common polymorphisms of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ (Pro12Ala) and peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 (Gly482Ser) and the response to pioglitazone in Chinese patients with type 2 diabetes mellitus. 2010. *Metabolism Clinical and Experimental* 59-1139–1144.

HULSINGER KE. WEIR B. Genetic in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting *FST*. 2009. *Nat Rev Genet*. 2009; 10: 639-50.

J. A. D. F. NETO, E.D. FIGUER^EDO, J. B. BARBOSA et al., "Metabolicsyndromeandmenopause: cross-sectionalstudy in gynecologyclinic," 2010. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, vol. 95, no. 3, pp. 339–345.

JUNG, C., RHEE, E., KIM, S., SHIN, H., KIM, B., SUNG., KIM, B., LEE, W., OH, J., LEE, M., KIM, S. AND PARK, J.. Association between Two Single Nucleotide Polymorphisms of Adiponectin Gene and Coronary Artery Diseases. 2006 *Jung. Endocrine Journal* 2006, %3 (5), 671-677.

KAKLAMANI, V., HOFFMANN, T., THORNTON T., HAYES, G., CHLEBOWSKI, R., HORN, L. AND MANTZOROS C. Adiponectin pathway polymorphisms and risk of breast cancer in African Americans and Hispanics in the Women's Health Initiative. 2013 Breast Cancer Res Treat June ; 139(2): 461–468. doi:10.1007/s10549-013-2546-6.

KAKLAMANI, V., YI N., ZHANG, K., SADIM, M., OFFIT, K., ODDOUX, C., OSTRER, C., MANTZOROS, C., AND PASCHE, B. Polymorphisms of ADIPOQ and ADIPOR1 and prostate cancer risk. Metabolism. 2011 September ; 60(9): 1234–1243. doi:10.1016/j.metabol.2011.01.005.

KARASAKI Y¹, KASHIWAZAKI H. Polymorphism of Trp64Arg in beta3-adrenergic receptor gene among Bolivian people in rural areas at high and low altitudes. Ann ClinBiochem. 2004 Jan;41(Pt 1):57-60

KAWAI M, SOUSA K M, MACDOUGALD O A, ROSEN C J. The many facets of PPAR: novel insights for the skeleton. 2010. Am J PhysiolEndocrinolMetab 299:E3-E9.

KAWAMURA T, EGUSA G, OKUBO M, IMAZU M, YAMAKIDO M. Association of beta3-adrenergic receptor gene polymorphism with insulin resistance in Japanese-American men. 1999 Metabolism; 48(11):1367-70.

KISFALI P, MOHAS M, MAASZ A, HADARITS F, MARKO L, HORVATOVICH K, et al. Apolipoprotein A5 IVS3 + 476A allelic variant associates with increased triglyceride levels confers risk for development of metabolic syndrome in Hungarians. 2008 Cir J. 72(1);40 -3.

KISSEBAH AH, SONNENBERG GE, MYKLEBUST J, et al. Quantitative trait loci on chromosomes 3 and 17 influence phenotypes of the metabolic syndrome. 2002. ProcNatlAcadSci USA: 97; 14478 -83.

KORESSAAR T, REMM M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3 . 2007. Bioinformatics 23(10):1289-91

LAAKSONEN DE, LAKKA H-M, NISKANEN LK, KAPLAN GA, SALONEN JT, LAKKA TA. Metabolic Syndrome and development of diabetes mellitus: Application and validation of recently suggested definitions of the metabolic syndrome in a prospective cohort. 2002. Am J Epidemiol; 156:1070-1077

LADEIA M, CURTI P J, BORGES M C, ROGERO M M, FERREIRA S R. Studies of Gene Variants Related to Inflammation, Oxidative Stress, Dyslipidemia, and Obesity: Implications for a Nutrigenetic Approach. 2011. Journal of Obesity. ID 49740.

LANGFELD CD, WAGENKNECHT LE, ROTTER JI, et al. Linkage of the metabolic syndrome to 1q23-q31 in Hispanic families: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study Family Study. 2004. Diabetes:53;1170-4.

LARGE V, ARNER P. Regulation of lipolysis in humans. Pathological modulation in obesity, diabetes, and hyperlipidaemia. 1998. DiabetesMetab. 24:409-18.

LIKANONSAKUL, S., RATTANATHAM, T., FEANGVAD, S., UTTAYAMAKUL, S., PRASITHSIRIKUL, W., SRISOPHA, S., NITIYANONTAKIJ, R., TENGTRAKULCHAROEN, P., TARKOWSKI, M., RIVA, A., NAKAYAMA, E., SHIODA, T. Polymorphisms in Fas Gene Is Associated with HIV-Related Lipotrophy in Thai Patients. 2013. AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES Volume 29, Number 1.

LÓPEZ P, SILVA F, CAMACHO P, PRADILLA L, GARCÍA R, RUEDA C, BRACHO Y, SILVA S, RUEDA L, RODRÍGUEZ N, ZARRUK J, MENDOZA M, ARENAS M, ARENAS W, BOLÍVAR. Síndrome metabólico y preeclampsia: los aportes realizados por el Instituto de Investigaciones de la Fundación Cardiovascular de Colombia, 2006. Revista Colombiana de Cardiología, Septiembre/Octubre Vol. 13 No. 2 ISSN 0120-5633.

MANTZOROS CS, LI T, MANSON JE, MEIGS JB, HU FB. Circulating adiponectin levels are associated with better glycemic control, more favorable lipid profile, and reduced inflammation in women with type 2 diabetes. 2005. J Clin Endocrinol Metab. 90:4542–8.

MARTIN S, NICAUD V, HUMPHRIES SE, TALMUD PJ; EARS group. Contribution of APOA5 gene variants to plasma triglyceride determination and to the response to both fat and glucose tolerance challenges. 2003. Biochim Biophys Acta; 7:1637(3):217-25..

MARTÍNEZ LARRAD MT, GONZÁLEZ SÁNCHEZ JL, SERRANO RÍOS M. INSULIN RESISTANCE: A GENETIC APPROACH. OVERVIEW. Nutrition and Aging. 2002. Nestlé Nutrition Workshop Series Clinical & Performance Program; 6:79-95.

MORI, H., IKEGAMI, H., KAWAGUCHI, Y., SEINO, S., YOKOI, N., TAKEDA, J., INOUE, I., SEINO, Y., YASUDA, K., HANAFUSA, T., YAMAGATA, K., AWATA, T., KADOWAKI, T., HARA, K., YAMADA, N., GOTODA, T., IWASAKI, N., IWAMOTO, Y., SANKE, T., NANJO, K., OKA, Y., MATSUTANI, A., MAEDA, E AND KASUGA1, M. The Pro123Ala Substitution in PPAR-g Is Associated With Resistance to Development of Diabetes in the General Population. 2001. DIABETES, VOL. 50, APRIL.

OLIVIER M, WANG X, COLE R, GAU B, KIM J, RUBIN EM, PENNACCHIO LA. Haplotype analysis of the apolipoprotein gene cluster on human chromosome 11. 2004. *Genomics*. May;83(5): 912-23.

OPS-OMS.EPIDAT 3.1 Análisis Epidemiológico de Datos Tabulados. Barcelona : s.n., 2006.

OROSTEGUI, M., VERA LM., VELANDIA, L., LOPEZ., N BAUTISTA, L. Prevalencia de factores de Riesgo para enfermedad Cardiovascular en la Población de 18 y más años de Bucaramanga. Bucaramanga : s.n., CIE. 2006. Sin publicar.

P. J. MIRANDA, R. A. DEFRONZO, R. M. CALIFF, AND J. R. GUYTON. "Metabolic syndrome: definition, pathophysiology, and mechanisms," 2005. *American Heart Journal*, vol. 149, no. 1, pp. 33– 45.

PARK Y-W, ZHU S, PALANIAPPAN L, et al. The metabolic syndrome: prevalence and associated risk factor findings in the US population from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. 2003. *Arch Intern Med*;163:427-36.

PASTINEN T, et. al. Minisequencing: a specific tool for DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide arrays. 1997. *Genome Res*. Vol 7, N° 6, páginas 606-61,4

PATTANAYAK B.,BANKURA, B., BALMIKI1, N., DAS, T.,CHOWDHURY, S. Role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene polymorphisms in type 2 diabetes mellitus patients of West Bengal, India. 2014. *J Diabetes Invest*; 5: 188– 191

PENNACCHIO L A, OLIVIER M, HUBACEK J, KRAUSS R M, RUBIN E M, COHEN J C. Two independent apolipoprotein A5 haplotypes influence human plasma triglyceride levels. 2002. Human Molecular Genetics. Vol.11, No. 24.

PENNACCHIO L, OLIVIER M, HUBACEK J A, COHEN J C, COX D R, FRUCHART J C, KRAUSS R M, RUBIN, E M. An Apolipoprotein Influencing Triglycerides in Humans and Mice Revealed by Comparative Sequencing. 2001. Science 294, 169; DOI: 10.1126/science.

PINZÓN, J., SERRANO, N., DÍAZ, L., MANTILLA, G., VELASCO, H., MARTÍNEZ, L., MILLÁN, P., ACEVEDO, S., MORENO, D. Impacto de las nuevas definiciones en la prevalencia del síndrome metabólico en una población adulta de Bucaramanga. 2007. Biomedica:27:172 -9.

RAKESH M, P, VISWANATHAN M. Changing definitions of metabolic syndrome. 2012. Indian Journal of Endocrinology and Metabolism, Vol 1.

RAMÍREZ, E., ARNAUD, M., ELISLE E. Prevalence of metabolic syndrome and associated lifestyles in adult males from Oaxaca Mexico. 2007. Salud pública de México: 49(2) 94-102.

REY J, NOETEL A, HARDT A, CANBAY A, ALAKUS H, HAUSEN, A, DIENES H, DREBBER U, ODENTHAL M. Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor γ 2 in patients with fatty liver diseases, 2010. World J Gastroenterol 2010 December 14; 16(46): 5830-5837 ISSN 1007-9327 (print) ISSN 2219-2840 (online).

REY, J., ANDREA NOETEL, ALINE HARDT, ALI CANBAY, HAKANALAKUS, AXEL ZURHAUSEN, HANS PETER DIENES, UTADREBBER, MARGARETE ODENTHAL. Pro12Ala polymorphism of the peroxisome

proliferator-activated receptor γ 2 in patients with fatty liver diseases. 2010. ISSN 1007-9327 (print) ISSN 2219-2840

ROSEN ED, SPIEGELMAN BM. PPAR α : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. 2001. *J Biol Chem* 276: 37731–37734.

ROWYDA N. AL-HARITHY AND MARYAM H. AL-ZAHRANI. The adiponectin gene, ADIPOQ, and genetic susceptibility to colon cancer. 2011. *ONCOLOGY LETTERS* 3: 176-180, 2012

RUAN H, LODISH HF. Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor- α . 2003. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14:447–55.

SALIBA, L., REIS, R., BROWNSON, R., HINO, A., TURECK, L., VALKO, C., DE SOUZA, R AND FURTADO, L. Obesity-related gene ADRB2, ADRB3 and GHRL polymorphisms and the response to a weight loss diet intervention in adult women. 2014. *Genetics and Molecular Biology*, 37, 1, 15-22.

SCHAAP F G, RENSEN P C N, VOSHOL P J , VRINS C, VLIET H N V D, CHAMULEAU R A F M, HAVEKES L M, GROEN A K, DIJK K W V. ApoAIV reduces plasma triglycerides by inhibiting very low density lipoprotein-triglycerides (VLDL-TG) production and stimulating lipoprotein lipase-mediated VLDL-TG hydrolysis. 2004. *The Journal of Biological Chemistry*. DOI 10.1074/jbc.M403240200 vol. 279, no. 27, pp. 27941–27947.

SENIGE, T, JUNGE, A, MADEA B. The development of three SNP assays for forensic casework,. 2005. *International congress series* 1288, Elsevier B.V. 0531-5131.

SINGMANN P, BAUMERT J, HERDER C, MEISINGER C, et al. Gene-gene interaction between APOA5 and USF1: two candidate genes for the metabolic syndrome. 2009. *Obes Facts.*; 9;2(4):235-42.

SOLYMOSS BC, BOURASSA MG, LESPERANCE J, et al. Incidence and clinical characteristics of the metabolic syndrome in patients with coronary artery disease. 2003. *Coronary Artery Disease*;14:207-212.

SOTER, M., GOMES, K., FERNANDES, A., CARVALHO, M., PINHEIRO, P., BOSCO, A., SILVA, D., MARINEZ. 21131T>C and SW19 polymorphisms in APOA5 gene and lipid levels in type 2 diabetic patients. 2011. *MolBiol Rep* DOI 10.1007/s11033-012-1588-x

SOTO, V., VERGARA, E., NECIOSUP, E. Prevalencia y factores de riesgo de Síndrome Metabólico en Población Adulta del Departamento del Lambayeque, Peru. 2005. *RevPeruMedExp Salud Publica*: 22(4); 254 - 26.

SRIVASTAVA A, MISHRA A, SINGH R, RAI R, SRIVASTAVA N, et al. Multi-Analytic Approach Elucidates Significant Role of Hormonal and Hepatocanalicular Transporter Genetic Variants in Gallstone Disease in North Indian Population. 2013. *PLoS ONE* 8(4): e59173. doi:10.1371/journal.pone.0059173

STEFANSKI, A., MAJKOWSKA, L., CIECHANOWICZ, A., FRANKOW, M., SAFRANOW, K., PARCZEWSKI, M., AND PILARSKA, K,. Lack of Association between the Pro12Ala Polymorphism in PPAR-g2 Gene and Body Weight Changes, Insulin Resistance and Chronic Diabetic Complications in Obese Patients with Type 2 Diabetes. 2010. *Archives of Medical Research* 37 (2006) 736–743

STROBEL A, ISSAD T, CAMOIN L, OZATA M, STROSBURG AD. A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. 1998. *Nat Genet.* 18:213-5.

SZALAI C, KESZEI M, DUBA J, PROHASZKAZ, KOZMA GT, CSAAZAR A, BALOGH S, ALMASSY Z, FUST G, CZINNER A. Polymorphism in the promoter. Region of the apolipoprotein A5 gene is associated with increased susceptibility for coronary artery disease. 2004. *Atherosclerosis*; 173(1):109 -14,

TAKEUCHI, S., KATOH, T., YAMAUCHI, T AND KURODA Y. ADRB3 Polymorphism Associated with BMI Gain in Japanese Men. 2012 Hindawi Publishing Corporation *Experimental Diabetes Research* Volume 2012, Article ID 973561, 5 pages doi:10.1155/2012/973561.

TELLECHEA, M., ARANGUREN, F., PÉREZ, M., CERRONE, G., FRECHTEL, G., TAVERNA, M.,. Pro12Ala Polymorphism of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Gene is Associated With Metabolic Syndrome and Surrogate Measures of Insulin Resistance in Healthy Men Interaction With Smoking Status. 2009 *Circ J*; 73: 2118 – 2124

THE DECADA STUDY GROUP. Prevalence of the metabolic syndrome in populations of Asian origin Comparison of the IDF definition with the NCEP definition. 2007. *Diabetes Research and Clinical Practice*: 76; 57-67.

UNTERGRASSER A, CUTCUTACHE I, KORESSAAR T, YE J, FAIRCLOTH BC, REMM M, ROZEN SG. Primer3 - new capabilities and interfaces. 2012. *Nucleic Acids Research* 40(15):e115

VALLONE, P.M., AND BUTLER, J.M. AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures. 2004. *Biotechniques* 37(2): 226-231.

VIENGCHAREUN S, ZENNARO MC, PASCUAL-LE TALLEC L, LOMBES M. BROWN. adipocytes are novel sites of expression and regulation of adiponectin and resistin. 2002. FEBS Lett. 532:345–50.

VILLEGAS, A., BOTERO, J., ARANGO, I., ARIAS, S., TORO, M. Prevalencia Del síndrome metabólico em El Retiro, Colombia. 2003. IATREA16 (4):291-297.

WALSTON J, SILVER K, BOGARDUS C, KNOWLER WC, CELI FS, AUSTIN S, MANNING B, STRSBERG AD, et al. Time onset of non -insulin-dependent diabetes mellitus and genetic variations in the beta 3 adrenergic-receptor gene. 1995. N Engl J Med:333(6)382-3.

X. RUAN, J. JIN, L. HUA, Y. LIU, J. WANG, AND S. LIU. The prevalence of metabolic syndrome in chinese postmenopausal women and the optimum body composition indices to predict it Menopause, 2010. vol. 17, no. 3, pp. 566–570.

YADAV, D., MAHAJAN, S., SUBRAMANIAN, S., BISEN, P., CHUNG, C., & PRASAD. Prevalence of Metabolic Syndrome in Type 2 Diabetes Mellitus Using NCEP-ATPIII, IDF and WHO Definition and Its Agreement in Gwalior Chambal Region of Central India Global Journal of Health Science; 2013. Vol. 5, No. 6; 2013 ISSN 1916-9736 E-ISSN 1916-

YAMADAA Y, KATO K, HIBINO T, YOKOI K, MATSUO H, SEGAWA T, WATANABE S, ICHIHARA S, YOSHIDA H, SATOH K, NOZAWA K. Predictor of geneticrisk metabolic syndrome. 2007 Atherosclerosis: 191; 298-304.

YUAN Y, JIANG H, KUANG J, HOU X, FENG Y, et al. Genetic Variations in ADIPOQ Gene Are Associated with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. 2012. PLoS ONE 7(11): e50848. doi:10.1371/journal.pone.0050848.

ZHANG, H., MO, X., HAO, Y AND GU, D. Association between polymorphisms in the adiponectin gene and cardiovascular disease: a meta-analysis. Zhang et al. 2012. BMC Medical Genetics 13:40

ZHU Y, QI C, KORENBERG JR, CHEN XN, NOYA D, RAO MS, REDDY JK. Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor α (mPPAR α) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR α isoforms. 1995 ProcNatlAcadSci USA 92: 7921–7925.

ZIMMET, P., MAGLIANO, D., MATSUZAWA, Y., JONATHAN, J., SHAW. The metabolic syndrome: a global public health problem and a new definition. 2005 J. atheroscler thromb:12: 295 -300.

ANEXOS

Anexo A. Especificaciones técnicas de Primers

RS	Polimorfismo	Gen	Secuencias de Primers	Tm °C†	% GC‡
rs3135506	Ser19Trp	APOA5	5'-CCAGCTGTCTCCTCCCTTC-3'(F) 5'-TCTCCGACCCTGACTTCAAC-3'(R)	59,9 60,2	63,1 55,0
rs1501299	SNP276	ADIPOQ	5'-AGATGCAGCAAAGCCAAAGT-3'(F) 5'-GGCCTCTTTCATCACAGACC-3'(R)	60,0 59,6	45,0 55,0
rs1801282	Pro12Ala	PPARG	5'-TCCATGCTGTTATGGGTGAA-3'(F) 5'-CAAACACAACCTGGAAGACAAA-3'(R)	59,9 60,0	45,0 40,9
rs4994	Trp64Arg	ADRB3	5'-CCTTCCTTCYTTCCCTACCG-3'(F) 5'-AACACGTTGGTCATGGTCTG-3'(R)	60,0 59,4	55,0 50,0
rs3135506_SR	Ser19Trp	APOA5	5'-tgacaaCCTCTCCACAGCGTTTT-3'(R)	54,5	52,9
rs1501299_SF	SNP276	ADIPOQ	5'-acaaTCTAGGCCTTAGTTAATAATG AATG-3'(F)	55,4	32,0
rs1801282_SR	Pro12Ala	PPARG	5'-gtgaaagtctgacaaGTGAAGGAATCG CTTTCTG-3'(R)	55,9	47,3
rs4994_SF	Trp64Arg	ADRB3	5'-ATCGTGGCCATCGCC-3'(F)	60,12	66,6

SNPs. F, primer Forward. R, primer Reverse, †Primersmismatched. †Tm, Temperatura de Melting. ‡ %GC Porcentaje de Guaninas y citosinas.

Anexo B. Consentimiento informado del estudio CARMEN e INEFAC

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
ENCUESTA DE FACTORES DE RIESGO PARA ENFERMEDADES CRÓNICAS NO TRANSMISIBLES EN LA POBLACION DE BUCARAMANGA

FORMA B. Consentimiento Informado Individual

Bucaramanga, Septiembre 213 de 2001

COMITÉ DE ETICA
FACULTAD DE SALUD

" PREVALENCIA DE FACTORES DE RIESGO PARA ENFERMEDADES CRÓNICAS NO TRANSMISIBLES EN LA POBLACION DE BUCARAMANGA ENCUESTA BASAL BASAL CARMEN "

Investigador principal: Dr. Leonelo Bautista
Enf. Myrian Oróstegui
Departamento de Salud Pública

Al analizar este protocolo de investigación se informa lo siguiente

Contiene un apartado que contempla en forma minuciosa el manejo ético del estudio, el cual concuerda con la Resolución 008430 de 1993 en su Capítulo II referido a las investigaciones en comunidades

Presenta copia del instrumento con el cual se obtendrá el consentimiento informado. Considero que éste debe ser revisado en algunos terminos de difícil comprensión para las personas:

Maria Victoria Orozco Vargas
MARIA VICTORIA OROZCO VARGAS
Coordinadora Comité de Etica

Anexo Protocolo de investigación



UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

Código del Participante



INEFAC 21

INCIDENCIA DE ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES Y DE SUS FACTORES DE RIESGO EN LA POBLACION DE 19 A 59 AÑOS DE EDAD EN LOS ESTRATOS SOCIOECONOMICOS 2 Y 3 DE BUCARAMANGA - INEFAC

Bucaramanga, junio 17 de 2005 INFORMADO INDIVIDUAL

Respetable señor/a participante del estudio

FACULTAD DE SALUD

COMITÉ DE ÉTICA

Título Proyecto INCIDENCIA DE ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES Y DE SUS FACTORES DE RIESGO EN LA POBLACION DE 19 A 59 AÑOS DE EDAD EN LOS SOCIOECONÓMICOS 2 Y 3 DE BUCARAMANGA

Usted fue seleccionado/a para participar en el estudio INEFAC ya que hace parte de la población de estudio y está en un estrato socioeconómico 2 y 3.

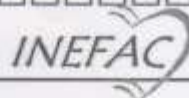
MYRIAM GROSTEGUERRA ARENAS

El Comité de Ética de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander en reunión del día de hoy consideró este protocolo de investigación y se aprobó por cumplir con las normas vigentes.

Flor de María Caceres
FLOR DE MARIA CACERES
Coordinadora (C) - Comité de Ética
Facultad de Salud - UIS



Código del Participante



INCIDENCIA DE ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES Y DE SUS FACTORES DE RIESGO EN LA POBLACIÓN DE 20 A 70 AÑOS DE ESTRATOS SOCIOECONÓMICOS 2 Y 3 DE BUCARAMANGA - INEFAC

CONSENTIMIENTO INFORMADO INDIVIDUAL

1. Introducción y Propósito del estudio

La Universidad Industrial de Santander, a través del Centro de Investigaciones Epidemiológicas, está haciendo un estudio sobre problemas de salud en Bucaramanga. El objetivo del estudio es conocer la cantidad de personas afectadas por enfermedades como las del corazón y la cantidad de personas que tienen características que las hacen más o menos susceptibles a adquirir este tipo de enfermedades. Esta información será usada para identificar nuevos casos de enfermedad y medir los cambios en los factores de riesgo.

2. Por qué ha sido usted seleccionado

Ud. fue seleccionado para participar en el estudio INEFAC ya que hace más o menos 6 años Ud. participó en un estudio similar y este es un primer seguimiento.

3. Procedimientos del estudio

Si decide participar nuevamente, lo invitaremos a asistir a una evaluación médica en la que le tomaremos la presión arterial, mediremos su peso, su talla y los perímetros de su cintura y cadera. También le tomaremos una muestra de sangre de aproximadamente 20 cc. (4 cucharadas) en varios tubos pequeños. Ese día tendrá que asistir en ayunas (sin tomar nada diferente al agua desde la noche anterior) para tomarse la muestra de sangre. Las muestras se tomarán mediante una punción venosa y se usarán agujas nuevas y equipo estéril para su seguridad. Las muestras se usarán ahora para medir su nivel de azúcar, colesterol, triglicéridos, HDL y LDL y creatinina en sangre. Además, una parte de las muestras se guardarán y en un futuro, podrían usarse para hacer otras investigaciones incluyendo pruebas bioquímicas (es decir, medición de sustancias en la sangre) y genéticas (para establecer predisposiciones genéticas para las enfermedades y factores de riesgo). En tal caso, dichos estudios tendrían que ser autorizados por un comité de ética en investigación. También le entregaremos antes de su cita, un frasco para recolectar una muestra de orina en la cual se determinará la presencia o ausencia de proteínas en su orina.



Código del Participante



Una vez terminado el examen médico, le haremos una encuesta en la que le preguntaremos sobre algunas enfermedades que Ud. o sus familiares podrían haber padecido, sobre algunos comportamientos como hacer ejercicio, fumar y tomar alcohol, sobre sus hábitos alimenticios, sobre su estado de ánimo y la calidad del sueño.

Es probable que este estudio se repita dentro de cinco años, para conocer la evolución de estas condiciones en las personas que participen.

4. Confidencialidad o a abandonar el estudio

Nosotros haremos todos los esfuerzos razonables para proteger su privacidad. A usted se le asignará un número de código y su nombre no aparecerá en los formatos utilizados para la recolección de datos. Sólo los investigadores tendrán acceso al archivo en el cual se vincula su nombre con su número de código. Los datos obtenidos en este estudio serán usados sólo para los fines del estudio. Los resultados del estudio se presentarán en la forma de promedios y porcentajes y usted no será identificado de forma individual en ningún caso.

Si su muestra de sangre almacenada es usada para futuras pruebas, estas pruebas serán anónimas y tendrán que ser aprobadas por un Comité de Ética en Investigación en Sujetos Humanos.

5. Riesgos y beneficios

Los riesgos derivados de su participación en este estudio son mínimos. Sin embargo, Ud. podría beneficiarse directa e indirectamente. Si participa en el estudio los resultados de las pruebas de sangre y orina que se van a hacer actualmente y los datos de su presión arterial le serán entregados a fin de que pueda utilizarlos en su cuidado médico regular. Además, si alguna de sus pruebas es anormal, Ud. recibirá consejería médica sobre dónde y cuándo buscar asistencia. Por otra parte, los resultados del estudio podrán servir para desarrollar programas de prevención de enfermedades cardiovasculares que serán de beneficio para toda la comunidad.

Tomar una muestra de sangre resulta en dolor ligero y transitorio, algunas personas pueden desarrollar un hematoma o morado (una pequeña cantidad de sangre debajo de la piel) que desaparece en una semana aproximadamente, y hay también una pequeña probabilidad de infección. Sin embargo, como los resultados de este estudio nos podrían ayudar a entender mejor y a prevenir el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares, usted y personas como usted podrían beneficiarse de su participación.



Código del Participante



En el caso de futuros estudios en los cuales se hagan otras pruebas bioquímicas o genéticas que tengan implicaciones directas para su salud, usted tendrá la opción de decidir que le enviemos o no los resultados.

6. Costos y compensación

Usted no recibirá pago alguno por su participación en este estudio, pero todas las pruebas se le harán de forma gratuita.

7. Derecho a rehusar o a abandonar el estudio

Usted debe estar consciente de que su participación en este estudio es completamente voluntaria. Aún después de dar su aceptación para participar, usted tendrá derecho a retirarse del estudio, de negarse a contestar una pregunta o de proveer una muestra de sangre en el momento en que usted así lo desee. Más aún, si usted decide no participar en el estudio o si usted se niega a seguir participando, usted recibirá la misma atención y los mismos beneficios que usted hubiese recibido si nunca se le hubiese invitado a participar.

8. Preguntas

Por favor, siéntase en la libertad de hacerme cualquier pregunta si hay algo que no haya entendido. Si tiene alguna pregunta adicional acerca del estudio más adelante, usted puede contactar a las doctoras: Myriam Oróstegui Arenas, Lina María Vera Cala, Laura Isabel Valencia Ángel o Isis Rey Moreno en el Centro de Investigaciones Epidemiológicas de la Universidad Industrial de Santander, al teléfono 6345781, en el Departamento de Salud Pública al teléfono 6454726 o en la Sede Bucarica de la Universidad Industrial de Santander al teléfono 6708901.

9. Declaración del participante

Nosotros le entregaremos una copia de este formato. Al firmar esta forma, usted está aceptando que entiende la información que se le ha dado y que está de acuerdo en participar como un sujeto de Investigación en este estudio. Usted está de acuerdo en:

- Contestar a las preguntas de una entrevista verbal Sí No
- Dejar que le tomen la presión arterial, el peso, la talla, los perímetros de cintura y cadera Sí No
- Dar una muestra de sangre Sí No



Código del Participante

INEFAC

- Permitir que su muestra de sangre sea almacenada y usada en estudios futuros, incluyendo la realización de pruebas genéticas.
 Sí No
- Permitir ser contactado para estudios posteriores Sí No

¿Acepta usted participar en este estudio voluntariamente? Sí No

¿Desea usted conocer los resultados de sus pruebas realizadas en estudios futuros? Sí No

Si usted ha aceptado participar, por favor escriba su nombre y firme en el espacio de más abajo.

Nombre del participante: _____

Firma del participante: _____ Cédula _____

Fecha: Día ___ Mes ___ Año _____

Nombre del testigo 1: _____

Firma del testigo 1: _____ Cédula _____

Fecha: Día ___ Mes ___ Año _____

Nombre del testigo 2: _____

Firma del testigo 2: _____ Cédula _____

Fecha: Día ___ Mes ___ Año _____

10. Declaración del Investigador



Certifico que yo o algún miembro de mi grupo de investigación le ha explicado a la persona de más arriba sobre esta investigación, y que esta persona entiende la naturaleza y propósito del estudio y los posibles riesgos y beneficios asociados con su participación en el mismo. Todas las preguntas que esta persona ha hecho le han sido contestadas.

Nombre del Investigador / Encuestador: _____

Firma del Investigador / Encuestador: _____

Fecha: Día ___ Mes ___ Año _____

Anexo C. Consentimiento informado del proyecto por parte del comité de Ética de la Universidad Industrial de Santander.

Código 7083 *P.11.02*

Bucaramanga, **16 ENE 2014** *DH- 00019*

Estudiante
VIVIANA LUCIA PÉREZ FORERO
Candidata Maestría en Ciencias Básicas
Departamento de Ciencias Básicas
UIS Presente

Asunto: AVAL Comité de Ética proyecto: "Estudio poblacional de los polimorfismos: Ser19Trp del Gen APOA5, Pro12Ala del Gen PPAR- Gamma, SNP276 del Gen de la adiponectina y Trp64Arg del Gen del receptor Beta 3-adrenérgico asociados con síndrome metabólico en una población de Bucaramanga, Colombia"

Cordial Saludo, El Comité de Ética en Investigación Científica de la Universidad Industrial de Santander (CEINCI-UIS) en reunión realizada el 12 diciembre de 2013, según consta en el acta No. 19 de 2013, evalúo los ajustes realizados al proyecto del asunto y al respecto conceptúa:

En consideración a que el proyecto cumple con todos los requerimientos del CEINCI, el Comité acuerda por consenso AVALAR el documento en versión digital.

Se recomienda asegurar los mecanismos necesarios para mantener el anonimato, la privacidad y la confidencialidad de la información personal, según la Ley Estatutaria No. 1581 de 2012 del Congreso de la República y el Decreto 1377 de 2013, así como la Resolución de Rectoría de la UIS No. 1227 de Agosto 22 de 2013 que regulan los asuntos de protección de datos personales. Adicionalmente se recomienda aplicar según corresponda a la investigación, la normatividad del Sistema de gestión Integral de la Universidad, que está disponible en el enlace: <https://www.uis.edu.co/intranet/calidad/calidad.htm>, especialmente lo relacionado con el Manual de Gestión Integrado.

Se solicita que se remita al correo del comité, información de las siguientes circunstancias, cuando lleguen a ocurrir:

- Reporte de mala práctica científica por parte de cualquier miembro del equipo investigador.
- Notificación previa de las modificaciones realizadas al protocolo.
- Reporte de cualquier eventualidad que usted considera deba conocer el CEINCI-UIS.
- Informe de avance, haciendo énfasis en los aspectos éticos y en los científico-técnicos que puedan afectar la debida ejecución de la investigación. Este informe debe enviarse a la mitad del desarrollo de la investigación.
- Informe final.



Código 7083

Le informamos que el Comité programará acciones de seguimiento, las cuales le serán comunicadas en su debido momento.

Le agradecemos dar respuesta a esta comunicación mediante una carta fechada en la que manifieste la aceptación a lo aquí enunciado.

Le deseamos muchos éxitos en el desarrollo del proyecto. Igualmente en nombre del CEINCI-UIS le ofrecemos el apoyo que usted considere necesario, para la aplicación y salvaguarda de los asuntos éticos durante la investigación.

Atentamente,

FRANCISCO ESPINEL CORREAL
Presidente (e)
CEINCI- UIS

DORA INES PARRA
Secretaria Técnico Científica
CEINCI- UIS

Copia: Dra. Clara Inés Vargas Castellanos, Directora de Trabajo de Investigación.
Dr. Gerardo Mantilla Mora, Codirector de Trabajo de Investigación.
Dra. Lina María Vera Cala, Directora de Investigación y Extensión de la Facultad de Salud
Archivo Comité de Ética- CEINCI-UIS

Omaira M

Anexo D. Frecuencias genotípicas reportadas por la NCBI para el polimorfismoSer19Trp del Gen APOA5.

www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=3135506

Population Diversity (in rs orientation)

ss#	Sample Ascertainment				Genotype Detail				Alleles	
	Population	Individual Group	Chrom. Sample Cnt.	Source	C/C	C/G	G/G	HWP	C	G
rs115965525 YRI			2	IG	1.000				0.500	0.500
rs132856995 ENSEMBL_Watson			2	IG	1.000				0.500	0.500
rs225483263 pilot_1_YRI_low_coverage_panel			118	AF					0.025	0.975
rs235734785 pilot_1_CEU_low_coverage_panel			120	AF					0.042	0.958
rs342340971 ESP_Cohort_Populations			4238	GF	0.004	0.122	0.874	1.000	0.065	0.935
rs48408190 AGI_ASP_population		multiple	78	IG	0.128	0.872		1.000	0.064	0.936
Ensembl_Venter			2	IG			1.000			1.000
rs491654454 CSAgilent			441	GF	0.864	0.113	0.023		0.920	0.079
rs66536763 B24			46	AF					0.020	0.980
rs69330211 HapMap-CEU		European	120	IG	0.117	0.883		1.000	0.058	0.942
HapMap-HCB		Asian	90	IG			1.000			1.000
HapMap-JPT		Asian	90	IG			1.000			1.000
HapMap-YRI		Sub-Saharan African	120	IG	0.017	0.067	0.917	0.025	0.050	0.950