

República Bolivariana de Venezuela
Universidad del Zulia
Facultad de Medicina
Escuela de Bioanálisis



**ALTERACIONES EN LA SECUENCIA NUCLEOTÍDICA DEL GEN QUE CODIFICA
FABP2 EN PACIENTES CON FENOTIPO DE SÍNDROME METABÓLICO**

Trabajo de investigación para optar al título de licenciadas en Bioanálisis

Tutora:

MgSc. Carem Prieto

Co-tutora:

Dra. Nailet Arraiz

Autoras:

Univ. Barrios Yotsimar
Univ. Bermúdez Yineska
Univ. Parody Nuris

Maracaibo, mayo 2014

**ALTERACIONES EN LA SECUENCIA NUCLEOTÍDICA DEL GEN QUE CODIFICA
FABP2 EN PACIENTES CON FENOTIPO DE SÍNDROME METABÓLICO**

Trabajo de investigación para optar al título de licenciadas en Bioanálisis

**“Alteraciones en la secuencia nucleotídica del gen que codifica FABP2 en
pacientes con fenotipo de Síndrome Metabólico”**

Autoras

Univ. Barrios Yotsimar
CI: 19.573.970
Dirección: AV. Delicias.
Ed. Urimare 1, Piso 2,
Apartamento 2b.
Tlf. 0412-660.96.93
yo.t.s@gmail.com

Univ. Bermúdez Yineska
CI: 20. 860.029
Dirección: Av. 26, calle 55,
casa No 53-250.
El bajo, San Francisco.
Tlf: 0414-382.04.71
yineskabm92@gmail.com

Univ. Parody Nuris
CI: 20. 442.915
Dirección: mara la sierrita.
Sector Ana María Campos
detrás del liceo Elio Valmore
Castellanos.
Tlf: 0416-343.26.09
nurisa_parody@hotmail.com

Tutora

Msc. Prieto Carem
Tlf: 0412-072.73.57
caremprieto@gmail.com

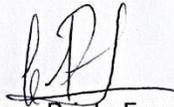
Co-Tutora

Dra. Arraiz Naillet
Tlf: 0426-567.06.26
narraiz1@yahoo.com

VEREDICTO

Nosotros los abajo firmantes miembros principales del jurado, designados por el Consejo de la Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia, en su sesión ordinaria N° 179-2014 de fecha 27-05-2014 para conocer el Trabajo de investigación para optar al título de licenciadas en Bioanálisis, elaborado por las Estudiantes Universitarias Yotsimar Barrios C.I.: 19.573.970; Yneska Bermudez C.I.: 20.860.029; Nuris Parody C.I.: 20.442.915, Titulado: **“ALTERACIONES EN LA SECUENCIA NUCLEOTÍDICA DEL GEN QUE CODIFICA FABP2 EN PACIENTES CON FENOTIPO DE SÍNDROME METABÓLICO”**, luego de revisado el trabajo y reunidos el día 03 de junio del 2014 en la sala de conferencias del Centro de Investigaciones Endocrino-Metabólicas “Dr. Félix Gómez” para su presentación y discusión con los autores y visto que cumple con los requisitos exigidos, le impartimos su nota de aprobación de 20 puntos, Mención Publicación.

Maracaibo, 03 de junio de 2014.



MgSc. Carem Prieto Fuenmayor
Categoría Asistente. Activo. Ordinario
Dedicación Exclusiva
Coordinadora del Jurado
C.I. 17.545.659



MgSc. Anyelo Durán Mojica
Categoría Agregado. Activo. Ordinario
Dedicación Medio Tiempo
Miembro del Jurado
C.I. 16.351.693



MgSc. Tania Molero
Categoría Asociado. Activo. Ordinario
Dedicación Exclusiva
Miembro del Jurado
C.I. 6.791.414

DEDICATORIA

A Dios

A los que viven como ejemplos para la humanidad.

A todos los que necesitan avances para mejorar su calidad de vida.

AGRADECIMIENTOS

A Dios nuestro creador por sus bendiciones.

A nuestros padres por su apoyo incondicional en cada etapa de nuestras vidas, y ser siempre ejemplo de perseverancia y compromiso.

A nuestros hermanos por su tolerancia y comprensión en todo momento.

A nuestras profesoras Carem y Nailet por ser nuestras amigas, guías y maestras en este proceso tan importante, y a su vez por su constante ejemplo y dedicación.

A todos nuestros familiares cercanos, abuelos, tíos, primos y demás amigos por su apoyo en nuestra vida universitaria.

A Aliden por su gran apoyo moral, físico y espiritual.

A Carlos y Dariela por ser dictadores de ejemplos desde la escuela.

A Oscar y Eduardo por su amor incondicional, motivación constante, y su inmensa paciencia en este gran camino.

A ti Tío Alexander por tu gran amor y apoyo mientras estuviste a mi lado y a ti Tío Heraclio por ser mi segundo Padre.

Al Centro de Investigaciones Endocrino Metabólicas “Dr. Félix Gómez” por prestar sus instalaciones y facilitarnos el contacto con los pacientes para la realización del trabajo práctico, por habernos acogido con gran calidad humana, permitiéndonos abrir un surco como investigadoras.

Mil gracias.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
Dedicatoria	5
Agradecimiento	6
Índice de tablas	8
Índice de ilustraciones	9
Resumen	10
Abstract	11
Introducción	12
Objetivos de la investigación	19
Materiales y Métodos	20
Resultados y Discusión	25
Conclusiones	38
Recomendaciones	39
Índice de referencias	40

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla .1 Componentes del Síndrome Metabólico.	13
Tabla 2. Características de la reacción de PCR para la amplificación del exón 2 del gen FABP2.	23
Tabla 3. Características antropométricas y metabólicas por sexo de la población objeto de estudio.	26
Tabla 4. Características antropométricas y metabólicas de Individuos con alteraciones nucleotídicas en el gen de FABP2.	28
Tabla 5. Medias y desviaciones estándar de individuos con y sin el polimorfismo A54T.	29
Tabla 6. Asociación entre criterios diagnósticos del SM y el polimorfismo A54T.	32
Tabla 7. Comparación de medias de las características bioquímicas y antropométricas entre Individuos homocigotos y heterocigotos con la alteración c. 6415 A>G; p. A54T.	33

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1. Estructura de la proteína FABP2.	Pág. 16
Figura 2. Productos amplificados del peso molecular esperado.	26
Figura 3. Análisis del polimorfismo conformacional de simples cadenas en gel no desnaturizante de acuerdo al patrón electroforético de los productos de PCR.	28
Figura 4. Comparación de secuencias normal y del paciente Jv143 con las alteraciones en la secuencia de nucleótidos c.6415 A>G; p. A54T y c. 6468 T>C; p. N71N en el gen de FABP2. Detectadas en 8 individuos no relacionados.	29
Figura 5. Muestra 3 electroferogramas y 1 alineamiento de la secuencia proteica de individuos anormales con secuencias normales del genbank.	32
Figura 6. Muestra 3 electroferogramas y 1 alineamiento de la secuencia proteica de individuos anormales con secuencias normales del genbank.	33

Barrios Y; Bermúdez Y; Parody N. **“Alteraciones en la secuencia nucleotídica del gen que codifica Fabp2 en pacientes con fenotipo de Síndrome Metabólico.** Trabajo de investigación para optar al título de Licenciadas en Bioanálisis. La Universidad del Zulia, Facultad de Medicina, Escuela de Bioanálisis. Venezuela. 2014. p 44.

RESUMEN

La proteína de unión a ácidos grasos intestinal o FABP2, se ha involucrado en la absorción de ácidos grasos de cadena larga por parte del enterocito, se ha propuesto que las variaciones en la secuencia de nucleótidos del gen que codifica FABP2 se han relacionado con desordenes metabólicos tales como: Resistencia a la Insulina, Síndrome Metabólico, Diabetes Mellitus tipo II. El objetivo del presente estudio fue determinar alteraciones en la secuencia nucleotídica del gen que codifica a la Fabp2 y su relación con el fenotipo de Síndrome Metabólico en individuos del Municipio Maracaibo. Se evaluaron 134 individuos, 102 del grupo con Síndrome Metabólico y 32 del grupo control, por medio de la amplificación del exón 2 del gen FABP2 por PCR, análisis conformacional de este por SSCP y secuenciación. Se identificaron dos polimorfismos previamente reportados el (c. 6415 A>G, p. A54T) y el (c. 6468 G>C, p N71N), el primero relacionado a alteraciones metabólicas y el segundo una variación silente. No hubo asociación estadísticamente significativa entre el fenotipo de Síndrome Metabólico con respecto a la presencia del polimorfismo A54T (OR. 0,314 IC(0,083-1,184), p.0,074), se encontró asociación de este polimorfismo con hipertensión arterial; el estudio de este gen permitió caracterizar en esta región a este gen asociado con el Síndrome Metabólico factor de riesgo de enfermedad cardiovascular.

Palabras clave: Síndrome Metabólico, Polimorfismo, FABP2.

Correos electrónicos: yotsibg@gmail.com, yineskabm92@gmail.com,
nurisa_parody@hotmail.com

Barrios Y; Bermudez Y; Parody N. " **Alterations in the nucleotide sequence of the gene encoding FABP2 phenotype in patients with metabolic syndrome.** Research work for the title of Lawyers in Bioanalysis. La Universidad Del Zulia, Faculty of Medicine, School of Bioanalysis. Venezuela. 2014. p 44.

ABSTRACT

The binding protein intestinal fatty acids or FABP2, has been involved in the absorption of long-chain fatty acids by the enterocyte, the variations in the sequence of nucleotides in a gene which encodes FABP2 have been associated with metabolic disorders such as: Insulin resistance, metabolic syndrome, Diabetes Mellitus type II. The objective of the present study was to determine alterations in the nucleotide sequence of the gene that encodes the FABP2 and its relationship with the phenotype of the metabolic syndrome in individuals of the Municipality of Maracaibo. 134 individuals, 102 of the group with the metabolic syndrome and 32 in the control group were assessed by the amplification of exon 2 of the FABP2 gene by PCR, this conformational SSCP analysis and sequencing. Two polymorphisms were identified previously reported (c. 6415 A>G, p. A54T) and (c. 6468 G>C, p N71N), the first related to metabolic alterations and the second a variation silent. There was no statistically significant association between the metabolic syndrome phenotype with respect to the presence of the A54T polymorphism (OR. 0,314 IC(0,083-1,184), p.0,074) an association of this polymorphism was found with hypertension; the study allowed the characterization of this gene in this region in this gene associated with metabolic syndrome risk factor for cardiovascular disease.

Keywords: Metabolic Syndrome, polymorphism, FABP2.

e-mail: yotsibg@gmail.com, yineskabm92@gmail.com, nurisa_parody@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) hoy en día, constituyen la principal causa de morbimortalidad en el mundo entero; encontrándose para el 2008 7,3 millones de muertes debidas a la cardiopatía coronaria, y 6,2 millones a los accidentes cerebro vascular (ACV). Se calcula que para el 2030 morirán cerca de 23,3 millones de personas por ECV, sobre todo por cardiopatías y ACV, (1). Según las estadísticas venezolanas se refleja que las enfermedades del corazón ocupan el primer lugar entre las causas de muerte diagnosticadas para el 2010, con un 20,99 %; así mismo, se puede observar un comportamiento similar en el estado Zulia, donde se encuentra la enfermedad cardiovascular como la primera causa de muerte, representando un 24,13 % (2).

El Síndrome Metabólico (SM) contribuye al reconocimiento conjunto de diferentes factores que contribuyen a identificar sujetos con un riesgo incrementado de desarrollar ECV y Diabetes Mellitus tipo II (DM-2) (3,4).

La prevalencia de SM en América Latina es del 24,9 % según el estudio CARMELA, en donde se encontró que la ciudad de Barquisimeto se encuentra paralela con ciudad de México por tener la mayor prevalencia de SM en América Latina para 2009, por consecuencia el SM actualmente es considerado uno de los principales problemas de salud pública de Venezuela (5).

Los principales factores de riesgo para el desarrollo de SM son obesidad abdominal, hipertensión, hiperglicemia y dislipidemias, además de esto, las características del SM incluyen un estado protrombotico y proinflamatorio, hiperuricemia, gota, microalbuminuria y un desbalance electrolítico (2,4-6).

Tabla 1. Componentes del Síndrome Metabólico

Parámetro	Rango indicativo
Circunferencia de cintura	Hombre: 101cm de cintura Mujer: 89 cm
HDL-c (colesterol bueno)	Hombre: menor de 40mg/dl Mujer: menor de 50mg/dl
Triacilglicéridos	150mg/dl o más
Presión sanguínea	135/85 mmHg o más O disminuida por medicamentos
Glicemia	100mg/dl en ayunas

Fuente: referencia (4)

En este mismo orden de ideas, las causas del SM hasta este momento son debatidas por expertos. Sin embargo, la resistencia a la insulina (RI) y la obesidad abdominal son postulados como componentes clave de este síndrome. La predisposición genética, inactividad física, tabaquismo, alta ingesta calórica, envejecimiento, estado proinflamatorio (EP) y cambios hormonales también ejercen efectos causales en la aparición del SM, (6,7). Su rol, puede depender del grupo étnico, el origen de todos estos desordenes metabólicos se explican a partir del EP derivado de la excesiva ingesta calórica y sobrenutrición; esta hipótesis acerca del EP, se caracteriza por el incremento de mediadores inflamatorios, RI , conduciendo a estrés oxidativo, potencialmente dañino para las vías de señalización de la insulina induciendo a la RI, actuando como vínculo común en todos los componentes del SM (7).

Numerosas alteraciones genéticas han sido involucradas en el desarrollo del SM. Los genes responsables del metabolismo y transporte de los lípidos; la regulación de la presión arterial; transporte, regulación y metabolismo de la glucosa; regulación hormonal y otros factores pueden contribuir a la patogénesis del SM (3,7–10).

Entre los genes candidatos, se encuentran los genes que codifican a la familia de proteínas transportadoras de ácidos grasos (FABPs), miembros de la familia de proteínas de unión a lípidos, involucradas en la unión intracelular reversible de ligandos hidrofóbicos con alta afinidad a la unión de moléculas simples de ácidos grasos (AG) de cadena larga, es expresada en todos los tejidos, teniendo isoformas tejido específicas; funcionan como reguladores centrales del control metabólico en el organismo (11–13).

La falta de regulación o alteraciones en la secuencia nucleotídica en los genes que codifican a las diferentes FABPs han sido asociados con numerosas enfermedades metabólicas como obesidad, hígado graso no alcohólico y SM (FABP1, FABP2, FABP4); riesgo cardiovascular (FABP3) y cáncer (FABP5, FABP7), las FABPs pueden representar un nuevo biomarcador para diferentes blancos terapéuticos (11,13).

Por lo antes expuesto en la presente investigación se estudiaron las alteraciones en la secuencia nucleotídica en el exón 2 del gen que codifica a FABP2 (I-FABP) en individuos con fenotipo de SM, ya que en esa región del gen se encuentra el polimorfismo A54T descrito ampliamente en diferentes publicaciones y relacionado en muchas de estas con la predisposición de la aparición en los individuos portadores de obesidad, SM y riesgo cardiovascular (14–19).

Proteína Transportadora de Ácidos Grasos

Las FABPs constituyen una familia de proteínas citoplasmáticas involucradas en el transporte y metabolismo intracelular de AG de cadena larga, coordinan respuestas de los lípidos en las células, participando así en respuestas metabólicas e inflamatorias; la unión a los AG es reversible puesto que se une a la región hidrofóbica de AG saturados e insaturados de cadena larga, eicosanoides y otros lípidos. Las FABPs se encuentran en las especies, de *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans*, en ratones y seres humanos, lo que demuestra una conservación evolutiva fuerte. Sin embargo, poco se sabe sobre sus funciones biológicas y mecanismos de acción exactos (20).

La familia de las FABPs está formada por más de veinte proteínas que han sido identificadas y numeradas de acuerdo a su tejido de expresión, encontrándose en hígado (H-FABP), intestino (I-FABP), corazón (C-FABP), adipocito (A-FABP), epidermis

(E-FABP), íleon (IL-FABP), cerebro (CE-FABP), mielina (M-FABP), estas diferentes isoformas fueron primero nombradas según el órgano en el cual fueron identificado o donde su expresión es predominante, pero sus perfiles de expresión no son exclusivos de ese órgano, por lo tanto se ha pasado a una nomenclatura con números (11,13,20).

La expresión de las FABPs, es regulada por factores hormonales, factores de transcripción y factores ambientales como la composición de la dieta. Se han identificado en el genoma humano 9 genes que codifican a las FABPs. Estudios recientes han demostrado la intervención de los diferentes tipos de FABPs en los diferentes tejidos, por ejemplo; en el intestino participa en la asimilación de los lípidos provenientes de la dieta; en el hígado interviene en las vías catabólicas y anabólicas, y en los adipocitos permite el almacenamiento de lípidos y otro de sus principales roles es mediar la expresión de genes y macrófagos (12,20).

La función de FABPs no está completamente dilucidada; sin embargo, existen varias hipótesis que consideran el patrón fisiológico de esta proteína. Un rol potencial de la FABPs es la neutralización citosólica de los AG y minimizar sus efectos tóxicos dentro de la célula, la FABPs hacen que no se encuentren disponibles los AG que puedan tener interacciones deletéreas con solutos celulares, membranas u otros componentes de la célula; esta hipótesis también menciona que la FABPs sirve como molécula transportadora para los AG entre organelos donde tienen importantes funciones, disminuyendo la energía termodinámica requerida para mantener los AG en el medio acuoso del citosol. Otra hipótesis señala que indirectamente regulan la expresión génica, como transportador intracelular envía de manera regulada lípidos al núcleo donde pueden influenciar mediante receptor activador-proliferador del peroxisoma la expresión génica. Por último se ha mencionado que las FABPs interactúan con lípidos incluyendo los de la membrana plasmática jugando un papel fundamental en la interiorización de los AG por parte de las células (21).

FABP2

Consiste en una proteína de 131 aminoácidos, con un peso molecular de 15kDa. La estructura terciaria está compuesta por 10 bandas laterales beta hidrofóbicas asemejando a un cilindro semiaplanado abierto por un extremo y cerrado en el otro

opuesto por 2 hélices alfa. Aproximadamente en medio de las cadenas laterales de residuos se alinean formando una cavidad, que da la especificidad de proteínas para su unión con AG de cadena larga. Estas fuerzas de unión proteína-ligando consisten en interacciones hidrofóbicas y electrostáticas variando la afinidad según sea el ligando (15, 18,21–24).

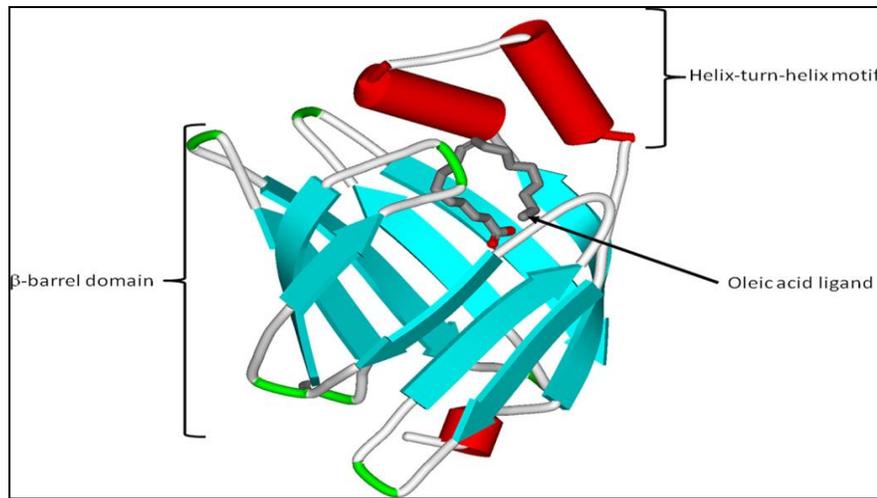


Figura 1. Estructura de la proteína FABP2

Fuente: Referencia (11)

Función de la FABP2

En los enterocitos diferenciados del intestino delgado proximal, se expresan altos niveles de los FABPs, IL-FABP y la forma específica intestinal, FABP2 (I-FABP) (11). Al parecer no hay una sobreexpresión de una o la otra lo que sugiere roles funcionales únicos para cada una (22). La FABP2 está involucrada en el particionamiento de AG de cadena larga para la síntesis de triacilgliceridos (TG); en estudios *in vitro* de dos líneas celulares intestinales transfectadas con el gen de FABP2, Caco-2 y HIEC-6, se reportó una disminución de la secreción de TG o ningún cambio en la síntesis/secreción de TG, respectivamente (23,24). Se observó un pequeño efecto en la oxidación del ácido oleico (AO); También se encontró en las células HIEC-6 células con una sobreexpresión de 90 veces de FABP2 mostrando un aumento del 65 % en la oxidación del AO (13,24).

Bajo ciertas condiciones relacionadas con la edad, el sexo, o la dieta, los ratones con una FABP2 nula parecen ser más propensos a desarrollar obesidad,

hipertriacilgliceridemia, y aumento de la acumulación de TG hígado (19,22), características del síndrome metabólico. Un posible papel de FABP2 en el desarrollo del síndrome metabólico (13).

Gen de FABP2

El gen que codifica a la FABP2 consiste en una secuencia de 3.4 Kb de longitud y se encuentra localizado en la región cromosomal 4q28-4q31. El gen presenta 4 exones de alrededor 700pb y tres intrones que contienen 2650pb. La región promotora contiene 2 sitios de iniciación de la transcripción (25).

Estudios realizados en el gen que codifica a FABP2, han contribuido a entender sus posibles relaciones con enfermedades metabólicas. Varios polimorfismos de simple nucleótido (SNPs) en el gen FABP2 se han identificado, pero sólo uno ha sido asociado a las patologías atribuidas a los componentes del SM (13,15,18,21).

Tres SNPs han sido identificadas en regiones codificantes del gen FABP2, dos son de tipo silente y ocurren cuando se presenta un cambio de C>T en el codón 71 y un canje de G>A en el codón 118. El tercer polimorfismo de FABP2 se presenta en el exón 2 en humanos está localizado en el codón 54 en un cambio del aminoácido alanina (A) por treonina (T) en la traducción del producto siendo una variable de pérdida de sentido que por lo tanto altera la estructura y posible función de FABP2 y está asociada con dislipidemias, RI y obesidad (13,14,21).

Los portadores del SNP A54T en FABP2 tienen el doble de afinidad por los AG de cadena larga que aquellos con la forma nativa de la FABP2. El aumento del flujo de AG dietarios en la circulación puede llevar a una alteración de la sensibilidad a la insulina, lo que avalaría el papel de la variante A54T de la FABP2 en la etiología de desórdenes metabólicos (15).

Sin embargo, la asociación entre el alelo T54 y la resistencia a la insulina en varias poblaciones ha sido modesta y a veces controversial. Una vez más, esto indica la necesidad de examinar estas variaciones genéticas en las poblaciones grandes, para así poder confirmar los efectos metabólicos de esta variación génica (20).

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Objetivo general

Determinar alteraciones en la secuencia nucleotídica del gen que codifica a la Fabp2 y su relación con el fenotipo de SM en individuos del Municipio Maracaibo.

Objetivos Específicos

1. Determinar las características bioquímicas y antropométricas en individuos con fenotipo de SM del Municipio Maracaibo.
2. Identificar las alteraciones en la secuencia nucleotídica del gen que codifica a la Fabp2 en individuos con fenotipo de SM, mediante técnicas de biología molecular.
3. Correlacionar las alteraciones en la secuencia nucleotídica del gen que codifica a la Fabp2 y su relación con el fenotipo de SM en individuos del Municipio Maracaibo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de investigación

Se realizará un estudio de tipo transversal ya que los pacientes serán examinados en un solo momento, en un periodo corto, estudiándose las variables simultáneamente. La investigación será de tipo descriptiva correlacional teniendo como propósito mostrar o examinar la relación entre variables o resultados de variables. En ningún momento el autor explica, que una sea la causa de la otra. En otras palabras, la correlación examina asociaciones pero no relaciones causales, donde un cambio en un factor influye directamente en el otro. Por lo tanto se pretende describir la relación entre las alteraciones en la secuencia nucleotídica del gen codifica a FABP2 con el fenotipo de síndrome metabólico en individuos del Municipio Maracaibo (26).

En cuanto a su diseño, la presente investigación se caracteriza como no experimental, toda vez que tanto la variable “Alteraciones en la secuencia nucleotídica del gen codifica a FABP2”, como fenotipo síndrome metabólico no fueron manipuladas por el investigador (26).

Población y Muestra

La población, es el universo de la investigación, sujetos u objetos de estudio. A su vez, estos también son los sujetos sobre el cual se pretende generalizar los resultados (26).

En la presente investigación se estudiaron 134 individuos pertenecientes al proyecto de prevalencia de SM en la población de Municipio Maracaibo que se desarrolla en el Centro de Investigaciones Endocrino-Metabólicas (CIEM) “Dr. Félix Gómez”, desde el año 2007 hasta la actualidad, (27) de estos individuos, 102 pertenecen al grupo de SM y 32 integran el grupo control en edades comprendidas entre 18 y 82 años, el grupo de individuos con SM tenían que cumplir con al menos tres criterios de los referidos para el diagnóstico de SM según la Federación Internacional de Diabetes (IDF) (4); los

integrantes del grupo de individuos control no tenían los criterios necesarios para diagnóstico de SM y tampoco presentaban antecedentes personales ni familiares de patologías metabólicas.

Estos pacientes fueron evaluados de acuerdo al siguiente protocolo:

- Elaboración de historia clínica exhaustiva: edad, sexo, antecedentes clínicos personales y familiares, hábitos dietéticos, actividad física, tabaquismo, consumo de alcohol y antecedentes de parientes con cardiopatía isquémica y/o hiperlipidemias.
- Valoración clínica: registro de tensión arterial, circunferencia de cintura
- Valoración bioquímica de laboratorio:
 - Glicemia e insulina en ayunas y cálculo de Homa-IR.

calculo de HOMA-IR: $\frac{\text{Insulina en ayunas (UI/ml)} \times \text{glicemia en ayunas (mmol/L)}}{22.5}$

22.5

- Perfil lipídico: determinación de:
 - Triacilglicéridos (TG).
 - Colesterol total (CT).
 - LDL-c
 - HDL-c

A cada paciente se le tomo 10 ml de sangre venosa periférica obtenida por venopunción, la cual se distribuyó en dos tubos, 5 ml se colocaron en un tubo sin anticoagulante para la valoración bioquímica, teniendo en cuenta los parámetros pre-analíticos; un ayuno de 10 a 12 horas para la determinación de los niveles séricos basales de los lípidos, glicemia e insulina en ayunas, los 5 ml restantes se colocaron en tubo con ácido etilendiamino tetracético (EDTA) para el aislamiento del ADN genómico a partir de los leucocitos.

Extracción de ADN genómico de muestras de sangre

Se realizará según la técnica combinada de extracción de ADN “Salting out” (28), con algunas modificaciones del laboratorio de Genética Molecular de la Unidad de Genética Médica de la Facultad de Medicina de La Universidad del Zulia.

Las muestras de sangre periférica, anticoagulada con EDTA 5mM pH 7,4 de los pacientes, se mezcló con 15ml de solución de lisis (cloruro de amonio 155mM, bicarbonato de sodio 10mM, EDTA 0,1mM a pH 7,4). Se incubó en hielo durante 15 minutos (min), agitando ocasionalmente de manera suave, luego se centrifugó durante 15 min a 3.000 rpm a 4°C y se descartó el sobrenadante. Se repitió este lavado con solución de lisis hasta obtener un sedimento de leucocitos completamente limpio.

Se resuspendió el sedimento de leucocitos en 6ml de TE 1X (Tris-base- HCL- EDTA) y se agregó 60 µl de proteinasa K (10mg/ml), y 600 µl de dodecil sulfato de sodio al 10%. Esta mezcla de lisis se incubó a 50°C por dos horas o durante toda la noche.

Las muestras se dejaron a temperatura ambiente durante 15 minutos y se les agregó 1ml de cloruro de sodio 5M, se mezcló con vortex por 1 min y se centrifugaran a 6000 rpm durante 15 min.

El sobrenadante se transfirió a un tubo de 50 ml conteniendo 7,5 ml de etanol absoluto frío, se mezcló suavemente por inversión del tubo hasta que se hizo visible la “malla” de ADN, la cual fue recuperada con una pipeta pasteur estéril. Se realizó un lavado con etanol 70 % frío, se dejó secar y el ADN se resuspendió en 500 a 1000 µl de buffer TE 1X.

Verificación de la calidad e integridad del ADN

Para medir la concentración y pureza del ADN de cada muestra se tomaron lecturas de absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 y 280 nm. La concentración se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$(\text{ng } /\mu\text{l}) = A_{260} \times 50 \times \text{FD}$$

(A₂₆₀ = Absorbancia generada a 260 nm; 50= Constante de 1 unidad de absorbancia, equivale a 50 ng//µl; FD = Factor de dilución donde el Vf= 1000/5 cantidad de ADN =200). La calidad o pureza del ADN se estimó a través de la relación A260/A280 nm,

para estimar la relación ADN/proteínas, y dicha relación debe generar un valor comprendido entre 1,8 y 2,0.

La integridad del ADN se evaluó por visualización en geles de electroforesis teñidos con bromuro de etidio en un transiluminador ultravioleta.

Amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se amplificó mediante la técnica de PCR, un método *in vitro* de síntesis de ADN con el que un segmento particular de éste es específicamente amplificado al ser delimitado por un par de cebadores o iniciadores que lo flanquean. Su copiado se logra en forma exponencial a través de repetidos ciclos de diferentes períodos y temperaturas de incubación en presencia de una enzima ADN polimerasa termoestable, Así se obtienen en cuestión de horas millones de copias de la secuencia deseada (29).

El exón 2 del gen del FABP2 se amplificó utilizando el protocolo para la técnica de PCR utilizado por Miller y colaboradores (30), utilizando pares de oligonucleótidos cebadores específicos descritos previamente para la obtención de los productos génicos a estudiar. En la tabla 2 se especifican las secuencias de los oligonucleótidos utilizados y longitud de los fragmentos de ADN obtenidos por amplificación.

Tabla 2. Características de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para la amplificación del exón 2 del gen FABP2

Fragmento a amplificar	Secuencia del oligonucleótido cebador (5' a 3')	Tamaño del fragmento (pb)	Programa de PCR
Exón 2	FABP2-S: CACTTCCTATGGGATTTGACT	270	94 (5min) 94 (1min) 55 (1min) 72 (1min)
	FABP2-AS: TTGGGTAGAAAAATCAAGAATG		72 (10min)

Análisis conformacional de ADN de cadena sencilla (SSCP)

Para el estudio del exón 2 del gen que codifica FABP2, se utilizó la técnica de análisis conformacional de ADN de cadena sencilla (SSCP) que permitió poner en evidencia las alteraciones en la secuencia nucleotídica del exón 2 del gen que codifica a

FABP2, según el protocolo utilizado por Baier y colaboradores (14). Los productos de PCR fueron desnaturalizados y corridos en un gel de poliacrilamida 10 % para visualizar la migración de las cadenas simples de ADN. Aquellos productos de PCR que mostraron un patrón de migración alterado, fueron seleccionados para secuenciación. El SSCP es un método capaz de identificar la variación de un solo nucleótido en un segmento de ADN, típicamente entre 150 a 200 nucleótidos de largo. En condiciones ideales el rango de sensibilidad del SSCP varía entre 80-90 % para detectar mutaciones en fragmentos menores de 200 pares de bases. El método del SSCP se basa en que bajo condiciones no desnaturalizantes una hebra individual de ADN adopta una conformación espacial que es específica de la composición de su secuencia nucleotídica. Esta conformación sería dependiente de la hibridación entre distintas regiones de un segmento de ADN replegado sobre sí mismo. La configuración diferente es provocada por el cambio de una sola base, entonces podría ser detectada en algunas condiciones de migración electroforética en una matriz de poliacrilamida. La técnica es simple, versátil y económica, pero exige la optimización de parámetros en la composición del gel para cada fragmento a evaluar.

Secuenciación nucleotídica de los productos alterados

Los productos de PCR que mostraron un patrón de migración alterado en el PCR-SSCP, fueron seleccionados para secuenciación, en donde mediante un protocolo de secuenciación automatizada, realizado en el equipo ABI PRIMS 310, utilizando el kit para secuenciación BigDye® Terminator v3.1; permitió la obtención de la secuencia de nucleótidos, las mismas fueron interpretadas en el Sequencing Analysis Software v5.3 y alineadas con secuencias de referencia en el programa BLAST, para la detección de las mutaciones en el exón 2 del gen que codifica a FABP2.

Análisis estadístico

Se utilizó el paquete estadístico SPSS para Windows, versión 21.0. Para la realización de este análisis se utilizó las medidas de tendencia central y dispersión (media y error estándar). Por otra parte se comprobaron la distribución normal de las variables mediante las pruebas de Kolmogorov – Smirnov. Las diferencias de las medias fueron analizadas mediante el T Student para muestras independientes, en variables

con distribución normal, y la prueba U de Mann-Whitney en aquellas variables que tuvieron una distribución no normal.

Se calculó la asociación del riesgo relativo de las alteraciones de la secuencia de nucleótidos en el gen FABP2 con SM y sus componentes, a través de tablas de contingencia. La Odds Ratio fue calculada para estimar el riesgo relativo con un intervalo de confianza de 95%. Un valor $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este estudio se determinaron las alteraciones en las secuencias nucleotídicas del gen FABP2 en pacientes con fenotipo de SM, a fin de relacionar las mismas con los componentes del SM.

De los 134 individuos estudiados, 102 pertenecen al grupo de SM que incluyó 58 pacientes del género femenino y 44 del género masculino en edades comprendidas entre 18 y 82 años con una media de $52,05 \pm 13,30$ años, mientras que el grupo control reunió 32 individuos de los cuales 18 eran del género femenino y 14 del género masculino en edades comprendidas entre 18 y 82 años con una media de $27,0 \pm 10,68$ años.

Se determinaron las medias de las variables normales y medianas de las no normales según sea el caso observados en la tabla 3 de los criterios para el diagnóstico del síndrome metabólicos entre los que se encuentran circunferencia abdominal, glicemia basal, niveles de triacilgliceridos en suero, niveles de HDL en suero y presión arterial, además de parámetros antropométricos y metabólicos que son considerados factores de riesgo para el desarrollo de Diabetes y enfermedades cardiovasculares como niveles séricos de insulina, Homa IR y niveles de colesterol total en suero.

Tabla 3. Características antropométricas y metabólicas por sexo de la población objeto de estudio.

Características Bioquímicas y Antropométricas	Sexo	N	Individuos con Síndrome Metabólico Media \pm DE	Comparación Entre Sexos entre Individuos con SM Sig	N	Individuos Control Media \pm DE	Comparación Entre Sexos entre Individuos control Sig	Comparación Entre Sexos de Individuos con SM y Control Sig
Circunferencia de Cintura (cm)	Femenino	58	96,02 \pm 11,42	0,000	18	72,77 \pm 5,26	0,000	0,000
	Masculino	44	108,06 \pm 11,48		14	80,71 \pm 4,77		0,000
	Todos	102	101,22 \pm 12,87		32	76,25 \pm 6,38		0,000
Triacilglicéridos (mg/dl) *	Femenino	58	182,30 \pm 107,26	0,023	18	72,76 \pm 33,33	0,454	0,000
	Masculino	44	212,33 \pm 90,60		14	61,65 \pm 25,42		0,000
	Todos	102	195,25 \pm 101,05		32	67,90 \pm 29,59		0,000
Colesterol Total (mg/dl)	Femenino	58	212,03. \pm 46,59	0,822	18	172 \pm 32,25	0,397	0,001
	Masculino	44	209,75 \pm 55,70		14	162 \pm 33,17		0,004
	Todos	102	211,04 \pm 50,47		32	167,62 \pm 32,21		0,000
Glicemia (mg/dl)ϕ	Femenino	58	102 RI. (94-113)	0,295	18	86,50 RI. (83-91,78)	0,251	0,000
	Masculino	44	106,60 RI. (97-118)		14	89,14 RI. (87-92)		0,000
	Todos	102	103 RI. (95-113)		32	89 RI. (85-95,89)		0,000
HDL-Colesterol (mg/dl)	Femenino	58	40,72 \pm 8,71	0,001	18	57,16 \pm 5,39	0,765	0,000
	Masculino	44	34,15 \pm 9,99		14	59,14 \pm 23,80		0,002
	Todos	102	37,89 \pm 9,80		32	58,03 \pm 15,95		0,000
LDL-Colesterol (mg/dl)	Femenino	58	136,48 \pm 43,16	0,771	18	100,28 \pm 28,83	0,288	0,001
	Masculino	44	133,65 \pm 53,72		14	90,52 \pm 19,72		0,005
	Todos	102	165,26 \pm 47,75		32	96,01 \pm 25,36		0,000
HOMA-IR	Femenino	54	2,45 \pm 0,95	0,045	16	1,87 \pm 0,99	0,071	0,039
	Masculino	42	2,98 \pm 1,44		12	1,29 \pm 0,44		0,000
	Todos	96	2,68 \pm 1,21		28	1,62 \pm 0,84		0,000
Insulina Basal (UI/ml)	Femenino	54	15,56 \pm 6,10	0,045	16	12,86 \pm 7,01	0,067	0,138
	Masculino	42	19,10 \pm 9,84		12	8,70 \pm 3,11		0,001
	Todos	96	17,11 \pm 8,11		28	11,08 \pm 5,97		0,000
Presión Arterial Sistólica (mmHg) *	Femenino	58	129,12 \pm 19,03	0,277	18	104,88 \pm 9,05	0,074	0,000
	Masculino	44	133,27 \pm 19,23		14	111 \pm 9,13		0,000
	Todos	102	130,91 \pm 19,13		32	107,56 \pm 9,45		0,000
Presión Arterial Diastólica (mmHg) *	Femenino	58	81,56 \pm 11,51	0,026	18	69,16 \pm 6,69	0,975	0,000
	Masculino	44	86,22 \pm 9,87		14	69,21 \pm 8,09		0,000
	Todos	102	83,57 \pm 11,02		32	69,18 \pm 7,21		0,000

* Prueba de T de Student (después de transformación logarítmica). ϕ Valores expresados en Medianas (rango intercuartilico). Comparación: Prueba de U de Mann-Whitney. **DE**: Desviación Estandar.

Se evidenciaron importantes hallazgos en los datos proporcionados por la tabla anterior, ya que se obtuvo diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las medias y las medianas de todas las variables estudiadas para el grupo con SM y el grupo control, lo cual valida la selección de los grupos de estudio.

Asimismo hay diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los valores medios de las variables circunferencia de cintura, triacilglicéridos, HDL-colesterol, Insulina basal, Homa-IR y presión arterial sistólica, entre los sexos masculino y femenino dentro del grupo con SM, encontrándose medias superiores para todas las variables en el sexo masculino en contraste con el femenino.

En investigaciones específicamente en Croacia, Estados Unidos e India (3,30), donde se evaluaron estas características antropométricas y metabólicas para relacionarlas con alteraciones en la secuencia nucleotídica del gen codificante de FABP2, coinciden con este estudio ya que obtuvieron diferencias en medias estadísticamente significativas entre un grupo con SM y otro grupo control de las variables HDL-colesterol, triacilglicéridos, circunferencia de cintura y presión arterial sistólica; pero a diferencia de estas investigaciones que presentaron diferencias significativas entre las medianas de glucosa basal, el presente estudio no mostró variaciones entre las medianas de los grupos estudiados.

Para la detección de las alteraciones en la secuencia del exón 2 del gen que codifica para FABP2, se utilizó la técnica de análisis conformacional de ADN de cadena sencilla (SSCP), para lo cual se analizó el producto amplificado por PCR de 270pb correspondiente al gen antes mencionado como se observa en la figura 2.

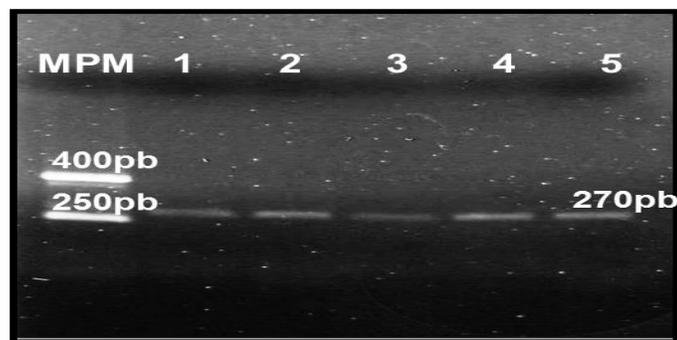


Figura 2. Productos amplificados del peso molecular esperado.

El gel 1 muestra al exón del gen que codifica FABP2 (270 pb) Se muestra el rendimiento general obtenido para la mayoría de muestras de ADN amplificadas. MPM: Marcador de peso molecular, especificando el tamaño de cada fragmento.

Asimismo en la figura 3 se muestra un gel de poliacrilamida utilizado para SSCP en donde se evidencian alguna de las muestras en donde se visualizaron alteraciones con relación al patrón de migración normal. De las 134 muestras procesadas en donde se incluía un grupo con SM y un grupo control, 19 muestras fueron seleccionadas para secuenciación automatizada ya que demuestran diferencias en la migración con respecto a un patrón normal aportado por la migración uniforme demostrada por el resto de las muestras.

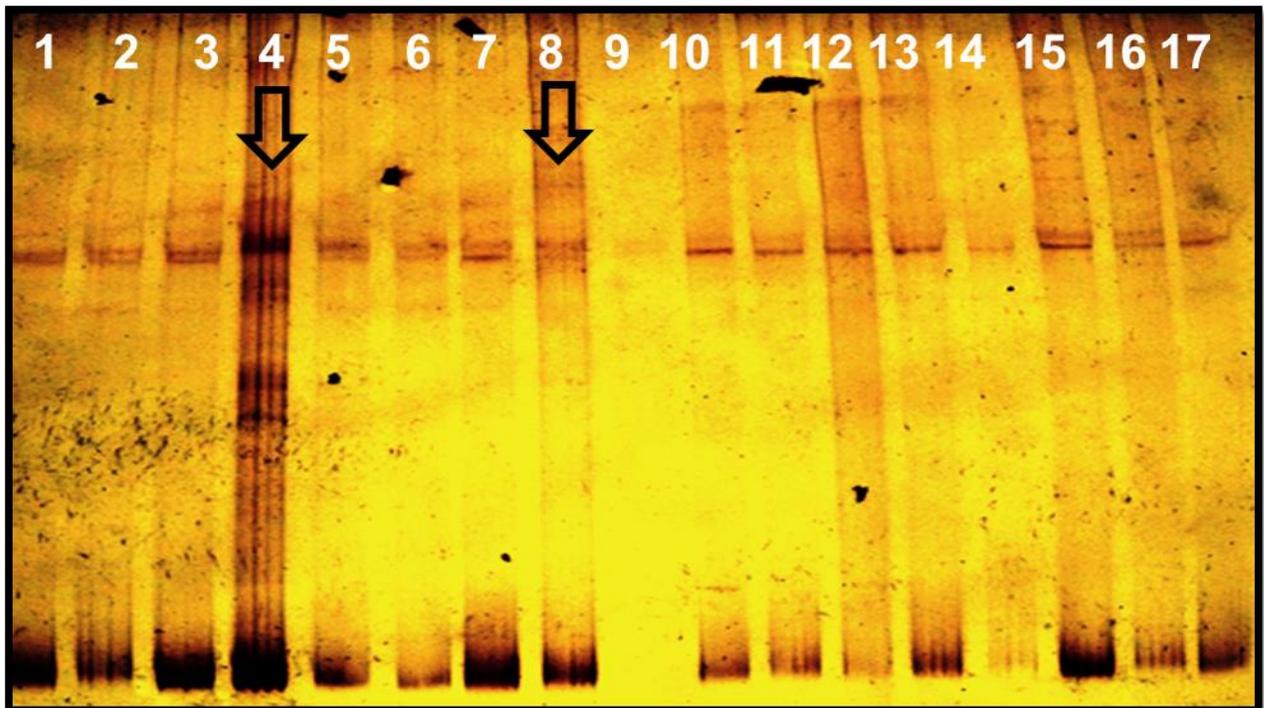


Figura 3. Análisis de polimorfismo conformacional de simples cadenas en gel no desnaturizante de acuerdo al patrón electroforético de los productos de PCR.

Gel del gen FABP2 de 17 pacientes con SM. Carriles 1: paciente control sin mutación, 9 y 14: Poca cantidad de ADN, 2, 3, 5, 6, 7, 10, 11, 12, 13, 15, 16 y 17: patrones de migración normal, 4 y 8: patrones de migración alterados.

Como resultado de lo antes expuesto según la alineación con la secuencia de referencia NCBI NG_011444.1, se detectaron 2 alteraciones en 8 individuos, Figura 4:

1. Sustitución de tipo transición (c. 6415 A>G; p. A54T). presente en 8 individuos, 4 del grupo de SM donde los 4 pacientes son homocigotos, y 4 del grupo control donde 2 son homocigotos y 2 heterocigotos.

2. Sustitución de tipo transición (c. 6468 T>C; p. N71N) presente en 8 individuos, 4 del grupo de SM donde 3 son homocigotos y 1 heterocigoto, y 4 del grupo control donde 2 son homocigotos y 2 heterocigotos.

Homo sapiens fatty acid binding protein 2, intestinal (FABP2), RefSeqGene on chromosome 4
Sequence ID: [reflNG_011444.1](#) Length: 11912 Number of Matches: 1

Range 1: 6333 to 6542 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
366 bits(198)	7e-98	207/211(98%)	1/211(0%)	Plus/Plus
Query 1	GAAAAGGAAGCTTGCTGCTCATGACAATTTGAAGCTGACAATTACACAAGAAGGAAATAA	60		
Sbjct 6333	GAAAAGGAAGCTTGCTGCTCATGACAATTTGAAGCTGACAATTACACAAGAAGGAAATAA	6392		
Query 61	ATTCACAGTCAAAGAATCAAGGATTTTCGAAACATTGAAGTTGTTTTGAACTTGGTGT	120		
Sbjct 6393	ATTCACAGTCAAAGAATCAAGGATTTTCGAAACATTGAAGTTGTTTTGAACTTGGTGT	6452		
Query 121	CACCTTTAATTACAACTTAGCAGACGGAACTGAACTCAGGGTAAGAAtttttttttttAT	180		
Sbjct 6453	CACCTTTAATTACAACTTAGCAGACGGAACTGAACTCAGGGTAAGAAATTTTTTTTTTAT	6512		

Figura 4. Comparación de secuencias normal y del paciente Jv143 con las alteraciones en la secuencia de nucleótidos c.6415 A>G; p. A54T y c. 6468 T>C; p. N71N en el gen de FABP2. Detectadas en 8 individuos no relacionados.

En este mismo orden de ideas en un estudio realizado en 1995 en indios Pima (13,14,21), que utilizó la misma metodología que la presente investigación para buscar alteraciones en la secuencia específicamente en el exón 2 de gen codificante de FABP2 reporto la presencia de las dos variaciones nucleotídicas encontradas en este estudio; además presento una tercera alteración que no se encontró en esta investigación un cambio de G>A en el codón 118 del gen.

Las variaciones nucleotídicas encontradas en el estudio son presentados en la tabla 4, junto con los valores correspondientes para los criterios de SM así como también de otros parámetros antropométricos y metabólicos de los individuos evaluados, observándose también a que grupo pertenecía cada uno, que para el grupo con SM representa el 3,92 % de los individuos evaluados de ese grupo y para el grupo control representó el 12,5 %.

Tabla 4. Características antropométricas y metabólicas de Individuos con alteraciones nucleotídicas en el gen de FABP2

Individuos con Presencia de Alteraciones Nucleotídicas								
Características	JV 143	JV 181	JV 449	JV 450	JV 892	JV 927	JV1238	JV 1833
Circunferencia de Cintura (cm)	63	120	106	102	86	78	79	92
Triacilglicéridos (mg/dl)	111	107	266	86	64,14	71	40	160
Colesterol Total (mg/dl)	158	184	207	130	143	159	188	219
Glicemia (mg/dl)	97	97	107	243	88	78	92	78
HDL-Colesterol (mg/dl)	54	36	25	34	55	58	80	43
LDL-Colesterol (mg/dl)	81,80	126,0	128,8	78,8	75,17	86,75	100	144
HOMA-IR	2,0	4,1	5,6	1,3	1,0	1,6	-----	-----
Insulina Basal (UI/ml)	13,60	2,6	38,5	5,8	6,5	11,5	-----	-----
Presión Arterial Sistólica (mmHg)	110	124	110	130	110	110	100	111
Presión Arterial Diastólica (mmHg)	70	85	70	80	64	65	70	80
Genotipo	A>G							
	T>C							
Grupo	GC	GSM	GSM	GSM	GC	GC	GC	GSM

GC: Grupo control, GSM: Grupo con SM.

La sustitución de tipo transición G por A presente en los 8 individuos, 4 del grupo de SM, donde los 4 son homocigotos y 4 del grupo control donde 2 son homocigotos y 2 heterocigotos, que se traduce en el cambio en el codón 54 de alanina por treonina (A54T) ampliamente descrito en otras poblaciones (14,13,31–33,3,19), Figura 4.

Se sugiere un cambio estructural de FABP2 en el sitio de unión al ligando (AG de cadena larga) cuando se encuentra presente el polimorfismo A54T, alterando la estabilidad general de la proteína, especificidad o afinidad del ligando y la cinética de

unión y liberación del AG. Se ha reportado que la presencia de alanina en vez de treonina en el sitio de unión al ligando mejora la afinidad de los AG de cadena larga, aumentándose la tasa de absorción intestinal de estos provenientes de la dieta, convirtiéndose entonces en triacilglicéridos, dejando el enterocito junto con los quilomicrones para la entrega a los tejidos periféricos, donde son hidrolizados por la lipoproteína lipasa en los capilares, oxidándose localmente o reesterificándose en el plasma. Un aumento de la tasa de la absorción de los ácidos grasos de la dieta podría aumentar las concentraciones de triacilglicéridos y resultar en un aumento de la tasa de oxidación de grasas en tejidos periféricos, compitiendo con los carbohidratos para la obtención de la energía llevando a RI (14).

La sustitución de C por T presente en 8 individuos figura 5, 4 del grupo de SM donde 3 son homocigotos y 1 heterocigoto, y 4 del grupo control donde 2 homocigoto y 2 heterocigoto, corresponde a una mutación silente ya que no hay cambio de aminoácido asparagina en el codón 71 en donde se da la alteración, descrita en indios Pima en 1995 (13,14,31).

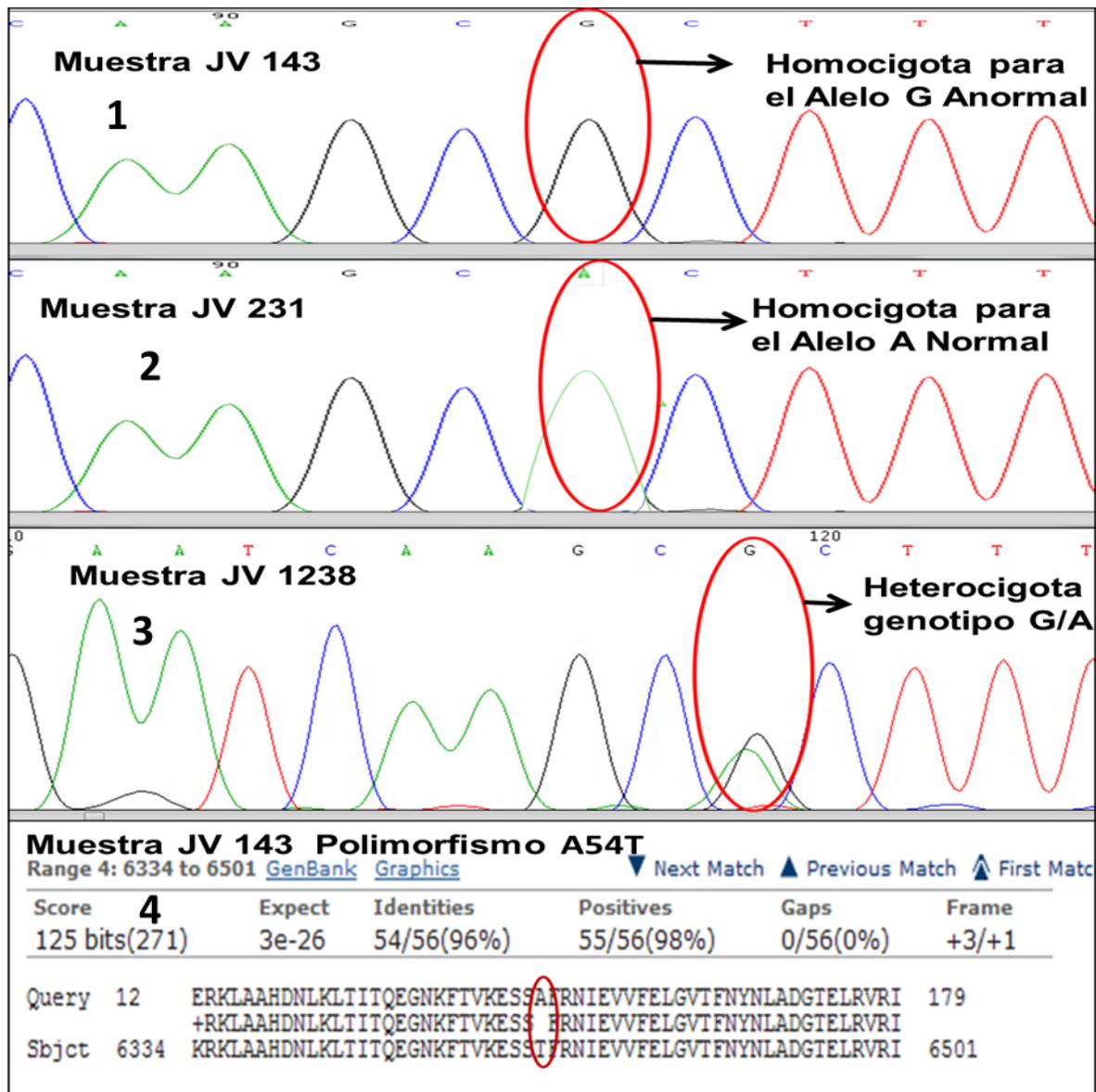


Figura 5. Muestra 3 electroferogramas y 1 alineamiento de la secuencia proteica de individuos anormales con secuencias normales del genebank.

1: Muestra JV 143 Homocigota para el alelo G anormal, 2: Muestra JV 231 Homocigota para el alelo A normal, 3: Muestra JV 1238 heterocigota para el genotipo G/A, 4: Muestra JV 143 cambio A54T a nivel de proteína.

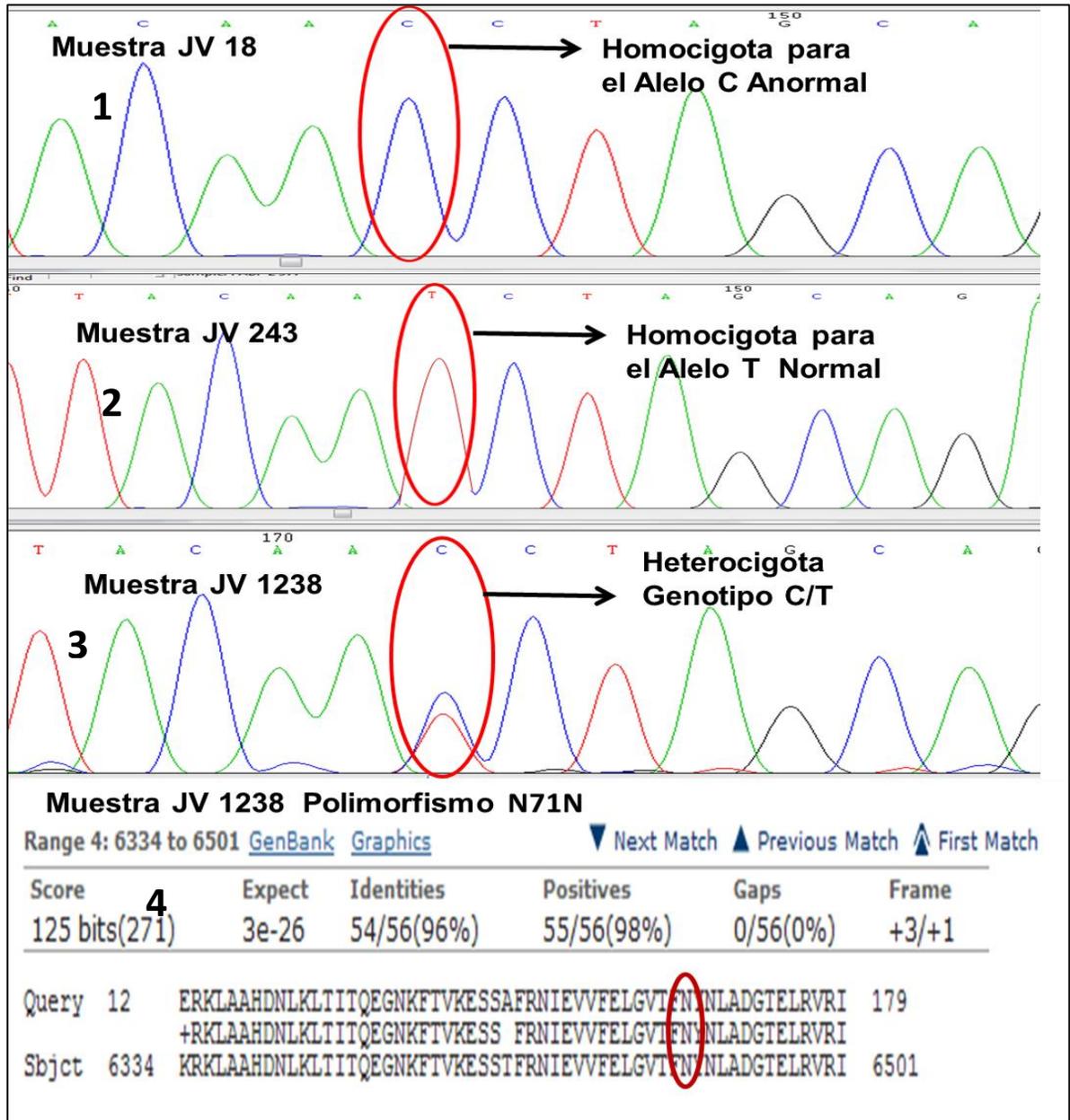


Figura 6. Muestra 3 electroferogramas y 1 alineamiento de la secuencia proteica de individuos anormales con secuencias normales del genebank.

1: Muestra JV 18 Homocigota para el alelo C anormal, 2: Muestra JV 231 Homocigota para el alelo T normal, 3: Muestra JV 1238 heterocigota para el genotipo C/T, 4: Muestra JV 143 sin cambio N71N a nivel de proteína.

En este sentido, en el presente estudio no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en la mayoría de características bioquímicas y antropométricas determinadas con respecto a la variante del polimorfismo A54T que presentaron los individuos evaluados, solo se presentó diferencia con el parámetro de presión arterial sistólica, cabe destacar que los valores medios de los no presentaron el polimorfismo A54T fueron superiores a los de los que sí lo portaban.

En numerosos estudios se evidencia también que no hay diferencias significativas entre las medias de las características bioquímicas y antropométricas con respecto al polimorfismo A54T presente en los individuos que estudiaron (34–36), esto puede ser debido a la interacción de múltiples factores génicos/ambientales tales como dieta, estilo de vida, ejercicio y composición corporal los cuales pudieron tener un efecto no evaluado en este estudio (37).

En un estudio realizado en México en 2007 se obtuvo diferencias significativa en dos parámetros criterios para diagnóstico de SM circunferencia de cintura y triacilgliceridos lo cual sugiere cuando se trata de hipertriacilgliceridemia que la presencia de un alelo para el polimorfismo A54T pueden incorporar mayor cantidad de ácidos grasos provenientes de la dieta condición que puede generar sobrepeso, aumento de la circunferencia de cintura, dislipidemia e RI, todos factores de riesgo de enfermedad cardiovascular (16).

No existen muchos reportes en donde las medias de presión arterial sistólicas hayan sido estadísticamente significativas, solo un estudio señaló una modesta elevación de presión arterial diastólica en los portadores de la variable alterada del polimorfismo (14).

Tabla 5. Medias y desviaciones estándar de individuos con y sin el polimorfismo A54T

Características Bioquímicas y Antropométricas		Polimorfismo A54T		Sig.
		Si (8)	No (126)	
Insulina Basal (UI/ml)	Media±DE	17,42±13,21	15,67±7,79	0,761
HOMA-IR	Media±DE	2,60±1,83	2,44±1,19	0,753
Circunferencia de Cintura (cm)	Media±DE	90,75±18,16	95,54±15,67	0,407
Glicemia Basal (mg/dl)	Media±DE	110,00±54,63	110,45±45,19	0,978
Colesterol Total (mg/dl)	Media±DE	173,50±31,70	202,40±50,83	0,115
Triacilglicéridos (mg/dl)	Media±DE	113,18±71,75	168,12±105,64	0,150
HDL-Colesterol (mg/dl)	Media±DE	48,13±17,33	42,36±42,35	0,273
LDL-Colesterol (mg/dl)	Media±DE	102,74±26,68	127,24±47,15	0,149
Presión Arterial Sistólica (mmHg)	Media±DE	113,13±90,40	126,11±20,23	0,005*
Presión Arterial Diastólica (mmHg)	Media±DE	73,00±7,69	80,60±12,03	0,081

DE: Desviación Estándar, * Diferencia de media es estadísticamente significativa ($p < 0.05$)

El polimorfismo A54T se ha relacionado con RI, DM2, obesidad, dislipidemia y enfermedad arterial coronaria y SM (14,38–41); el presente estudio se encontró asociación con hipertensión arterial con una significancia de 0.044, visualizados en la tabla 6; producto posiblemente del daño a nivel de vasos sanguíneo e incremento del riesgo coronario; no hay reportes de otras investigaciones que hayan coincidido con esta asociación. No se encontró asociación con SM, resultado similar a lo reportado en otras poblaciones (30,42); esto puede ser explicado ya que el SM es una entidad muy compleja y multifactorial desde el punto de vista genético y metabólico, la cantidad de genes involucrados hace muy difícil su evaluación, además, de su interacción con el medio ambiente, la dieta y el ejercicio.

Tabla 6. Asociación entre criterios diagnósticos del SM y el polimorfismo A54T

Componente del SM Alterado	OR	Sig.
Glicemia en Ayuno	3,091 IC(0,647-14,760)	0,133
Triacilglicéridos	3,814 IC(0,799-18,212)	0,699
Presión Arterial	4,309 IC(0,903-20,565)	0,044
Circunferencia abdominal	2,622 IC(0,691-9,940)	0,144
HDL-colesterol	2,116 IC(0,555-8,060)	0,263
SM**	0,314 IC(0,083-1,184)	0,074

* La correlación es significativa a nivel de 0,05; **Asociación entre la presencia de SM y la presencia del polimorfismo A54T.

De acuerdo a la presencia de uno o dos alelos del polimorfismo A54T, se obtuvo diferencia significativa entre las medias de HDL-colesterol que fueron superiores en los pacientes heterocigotos, que en los pacientes homocigotos, observados en la tabla 7, concordando con un estudio realizado por Auinger A. y colaboradores en donde encontraron que los individuos que portaban al menos un alelo A tenían niveles de HDL-colesterol significativamente menores que los que no lo tenían (43).

Tabla 7. Comparación de medias de las características bioquímicas y antropométricas entre Individuos homocigotos y heterocigotos con la alteración c. 6415 A>G; p. A54T

Características Bioquímicas y Antropométricas	Polimorfismo A54T	N	Media y DE	Sig*
Insulina	Homocigoto	5	18,60 ±14,41	-
	Heterocigoto	1	11,50	
HOMA2IR	Homocigoto	5	2,80 ±1,97	-
	Heterocigoto	1	1,60	
Circunferencia abdominal	Homocigoto	6	94,83 ± 19,53	0,305
	Heterocigoto	2	78,50 ± 0,70	
Glicemia basal	Homocigoto	6	118,33 ± 61,85	0,498
	Heterocigoto	2	85,00 ± 9,89	
Colesterol total	Homocigoto	6	173,50 ± 35,68	1,000
	Heterocigoto	2	173,50 ± 20,50	
Triacilglicéridos	Homocigoto	6	132,35 ± 72,83	0,211
	Heterocigoto	2	55,63 ± 22,10	
Presion Arterial Diastolica	Homocigoto	6	74,83 ± 8,01	0,274
	Heterocigoto	2	67,50 ± 3,53	
Presion Arterial Sistolica	Homocigoto	6	115,83 ± 8,86	0,173
	Heterocigoto	2	105,00 ± 7,07	
Concentración de HDL	Homocigoto	6	41,16 ± 11,82	0,035**
	Heterocigoto	2	69,00 ± 15,55	
Concentración de LDL	Homocigoto	6	105,86 ± 30,54	0,411
	Heterocigoto	2	93,37 ± 9,37	

DE: Desviación Estándar, * Diferencia de media es estadísticamente significativa (p<0.05)

En conclusión, el Polimorfismo A54T no tuvo una asociación significativa con respecto al fenotipo de SM de individuos del municipio Maracaibo, pero se obtuvieron datos interesantes en relación al riesgo que representa la presencia del polimorfismo

con la alteración de la presión arterial y las diferencias entre las medias entre individuos homocigotos y heterocigotos en correspondencia con la variable HDL-colesterol.

Esta falta de asociación pudo ser ocasionada por algunas limitaciones en el estudio como, la cantidad de individuos evaluados, la no evaluación en el presente estudio de factores como la etnia, estilo de vida, nutrición y actividad física. Asimismo solo se evaluaron las alteraciones nucleotídica del exón 2 de FABP2, que a pesar que es donde se encuentra la variación más frecuente, no representa todo el gen lo cual no descarta que el resto del gen no esté involucrado en la patogenia del SM.

CONCLUSIONES

1. Las alteraciones en la secuencia de nucleótidos encontradas en el gen que codifica para FABP2, fueron dos; (c. 6415 A>G; p. A54T) y (c. 6468 T>C; p. N71N) encontrándose tanto en grupo de individuos con SM como en el grupo de individuos control, en forma homocigota y heterocigota; las cuales han sido reportadas en estudios previos.
2. Se obtuvo diferencia significativa entre las medias de las variables de las características bioquímicas y antropométricas evaluadas en este estudio. Asimismo se encontró diferencias entre las medias por sexo dentro del grupo con SM solo para las variables circunferencia de cintura, triacilgliceridos, HDL-colesterol, Insulina basal, Homa-IR y Presión Arterial Sistólica, encontrándose medias superiores para estas variables en el sexo masculino en contraste con el femenino.
3. El polimorfismo A54T no tuvo una asociación significativa con respecto al fenotipo de SM de individuos del municipio Maracaibo, pero se obtuvieron datos interesantes en relación al riesgo que representa la presencia del polimorfismo con la alteración de la presión arterial y las diferencias entre las medias entre individuos homocigotos y heterocigotos en correspondencia con la variable HDL-colesterol.

RECOMENDACIONES

1. Es recomendable extender este estudio a un mayor número de pacientes con alteraciones en los demás exones del gen que codifica FABP2 y otros genes involucrados para conocer la prevalencia de mutaciones predisponentes de SM en nuestra población.
2. Se recomienda ampliar y dar conocimiento de este estudio a las diferentes regiones de nuestro país ya que es la continuación de los estudios de asociación de genes que en esta región han sido relacionados con patologías metabólicas realizados por la sección de Biología Molecular del CIEM, que pueden servir de punto de partida para despertar el interés de otros investigadores.
3. Participar en programas de prevención, reducción de riesgo y promoción de salud cardiovascular en las comunidades, para combatir este grave problema de salud pública.

ÍNDICE DE REFERENCIAS

1. OMS | Enfermedades cardiovasculares [Internet]. [Citado 12 de noviembre de 2012]. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/index.html>
2. Portal_MPPS [Internet]. [citado 12 de noviembre de 2012]. Recuperado a partir de: http://www.mpps.gob.ve/index.php?option=com_phocadownload&view=category&id=11:anuarios-de-mortalidad
3. Feher T y Collaborators. 2012. FABP 2 gene polymorphism and metabolic syndrome in elderly people of Croatian descent. *Biochem Medica*. 22(2). 217-24p.
4. Alberti KGM y Collaborators, 2009. Harmonizing the Metabolic Syndrome A Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*.120(16). 1640-5p.
5. Escobedo J y Collaborators. 2009. Prevalence of the metabolic syndrome in Latin America and its association with sub-clinical carotid atherosclerosis: the CARMELA cross sectional study. *Cardiovasc Diabetol*. 8(1). 52p.
6. De Carvalho V y Collaborators. 2013. Prevalence of metabolic syndrome in Brazilian adults: a systematic review. *BMC Public Health*.13. 1198p.
7. Taylor J y Collaborators. 2013. An Overview of the Genomics of Metabolic Syndrome. *J Nurs Scholarsh Off Publ Sigma Theta Tau Int Honor Soc Nurs Sigma Theta Tau*. 45(1). 52-9p.
8. Kraja AT, Vaidya D, Pankow JS, Goodarzi MO, Assimes TL, Kullo IJ, et al. A Bivariate Genome-Wide Approach to Metabolic Syndrome STAMPEED Consortium. *Diabetes*. 2011;60(4). 1329-39p.
9. STANĽCÁKOVÁ A y Collaborators. 2006. Effect of gene polymorphisms on lipoprotein levels in patients with dyslipidemia of metabolic syndrome. *Physiol Res*.55. 483-90p.
10. Kristiansson K y Collaborators. 2012. Genome-Wide Screen for Metabolic Syndrome Susceptibility Loci Reveals Strong Lipid Gene Contribution But No Evidence for Common Genetic Basis for Clustering of Metabolic Syndrome TraitsCLINICAL PERSPECTIVE. *Circ Cardiovasc Genet*. 5(2). 242-9p.
11. Storch J, y Collaborators. 2010. Tissue-specific Functions in the Fatty Acid-binding Protein Family. *J Biol Chem*. 285(43) 32679-83p.
12. Thumser AE y collaborator. 2014. Fatty acid binding proteins: tissue-specific functions in health and disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 17(2). 124-9p.

13. Smathers RL y collaborators. 2011. The human fatty acid-binding protein family: evolutionary divergences and functions. *Hum Genomics*. 5 (3). 170-91p.
14. Baier L y collaborators, 1995. An amino acid substitution in the human intestinal fatty acid binding protein is associated with increased fatty acid binding, increased fat oxidation, and insulin resistance. *J Clin Invest*. 95(3): 1281-7p.
15. Albala B y Collaborators. 2006. Polimorfismo de la proteína ligante de ácidos grasos intestinal (FABP2), obesidad e insulina resistencia. *Rev Médica Chile*. 134(3). 372-9p.
16. Martínez-López E Y Collaborators. 2007. Association of the T54 allele of the FABP2 gene with cardiovascular risk factors in obese Mexican subjects. *Diabetes Vasc Dis Res Off J Int Soc Diabetes Vasc Dis*.4(3). 235-6p.
17. Mansego M Collaborator. 2012. Common variants of the liver fatty acid binding protein gene influence the risk of type 2 diabetes and insulin resistance in Spanish population. *PloS One*. 7 (3). 318-53p.
18. Albala B y Collaborators. 2006. Fatty acid binding protein 2 (FABP-2) polymorphism, obesity and insulin resistance. *Rev Médica Chile*. 134(3) 372-9p.
19. Gomez L y Collaborators 2007. Polymorphism of the FABP2 gene: a population frequency analysis and an association study with cardiovascular risk markers in Argentina. *BMC Med Genet*. 8(1). 39p.
20. Furuhashi M y Collaborators. 2008. Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nat Rev Drug Discov*.7(6). 489p.
21. Weiss E y Collaborators. 2002. Fatty acid binding protein-2 gene variants and insulin resistance: gene and gene-environment interaction effects. *Physiol Genomics*. 10(3) 145-57p.
22. VASSILEVA G y Collaborators. 2000. The intestinal fatty acid binding protein is not essential for dietary fat absorption in mice. *FASEB J*. 14(13). 2040-6p.
23. Levy E y Collaborators. 2009. Localization, function and regulation of the two intestinal fatty acid-binding protein types. *Histochem Cell Biol*. 132(3) 351-67p.
24. Montoudis A y Collaborators. 2008. Intestinal fatty acid binding protein regulates mitochondrion β -oxidation and cholesterol uptake. *J Lipid Res*. 49(5). 961-72p.
25. Sweetser D y Collaborators 1987. The human and rodent intestinal fatty acid binding protein genes. A comparative analysis of their structure, expression, and linkage relationships. *J Biol Chem*.262(33). 16060-71p.
26. Bravo R. 2002. Tesis doctorales y trabajos de investigación científica: metodología general de su elaboración y documentación. International Thomson Editores Spain Paraninfo. 497 p.

27. Bermúdez V, Pacheco M, Rojas J, Córdova E, Velázquez R, Carrillo D, et al. Epidemiologic Behavior of Obesity in the Maracaibo City Metabolic Syndrome Prevalence Study. *PloS One*. 2012;7(4):e35392.
28. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 11 de febrero de 1988;16(3):1215.
29. SANCHEZ R, PABLO I, SALDAÑA B. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Cienc UANL [Internet]*. 2004 [citado 26 de mayo de 2014];7(3). Recuperado a partir de: <http://eprints.uanl.mx/610/>
30. Miller M, Rhyne J, Chen H, Beach V, Ericson R, Luthra K, et al. APOC3 Promoter Polymorphisms C-482T and T-455C Are Associated with the Metabolic Syndrome. *Arch Med Res*. mayo de 2007;38(4):444-51.
31. Weiss EP, Brown MD, Shuldiner AR, Hagberg JM. Fatty acid binding protein-2 gene variants and insulin resistance: gene and gene-environment interaction effects. *Physiol Genomics*. 1 de enero de 2002;10(3):145-57.
32. De Koning L, Merchant AT, Hegele RA, Xie C, Vuksan V, Teo K, et al. Association of the FABP2 T54 variant with plasma triglycerides and insulin resistance in a multiethnic population. *Clin Chem*. octubre de 2008;54(10):1742-4.
33. Mansego ML, Martinez F, Martinez-Larrad MT, Zabena C, Rojo G, Morcillo S, et al. Common Variants of the Liver Fatty Acid Binding Protein Gene Influence the Risk of Type 2 Diabetes and Insulin Resistance in Spanish Population. *PLoS ONE [Internet]*. 2 de marzo de 2012 [citado 28 de enero de 2014];7(3). Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3292554/>
34. Chamberlain AM, Schreiner PJ, Fornage M, Loria CM, Siscovick D, Boerwinkle E. Ala54Thr polymorphism of the fatty acid binding protein 2 gene and saturated fat intake in relation to lipid levels and insulin resistance: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) study. *Metabolism*. septiembre de 2009;58(9):1222-8.
35. McColley SP, Georgopoulos A, Young LR, Kurzer MS, Redmon JB, Raatz SK. A High Fat Diet and the Thr54 polymorphism of FABP2 Reduces Plasma Triglyceride-Rich Lipoproteins. *Nutr Res N Y N*. julio de 2011;31(7):503-8.
36. Martinez-Lopez E, Garcia-Garcia MR, Gonzalez-Avalos JM, Maldonado-Gonzalez M, Ruiz-Madrigal B, Vizmanos B, et al. Effect of Ala54Thr polymorphism of FABP2 on anthropometric and biochemical variables in response to a moderate-fat diet. *Nutrition*. enero de 2013;29(1):46-51.
37. Albala C, Villarroel A, Santos JL, Angel B, Lera L, Liberman C, et al. FABP2 Ala54Thr polymorphism and diabetes in Chilean elders. *Diabetes Res Clin Pract*. 2007;77(2):245-50.

38. Chiu KC, Chuang L-M, Yoon C. The A54T polymorphism at the intestinal fatty acid binding protein 2 is associated with insulin resistance in glucose tolerant Caucasians. *BMC Genet.* 28 de marzo de 2001;2:7.
39. Albala C, Santos JL, Cifuentes M, Villarroel AC, Lera L, Liberman C, et al. Intestinal FABP2 A54T Polymorphism: Association with Insulin Resistance and Obesity in Women. *Obes Res.* 1 de febrero de 2004;12(2):340-5.
40. Yamada K, Yuan X, Ishiyama S, Koyama K, Ichikawa F, Koyanagi A, et al. Association between Ala54Thr substitution of the fatty acid-binding protein 2 gene with insulin resistance and intra-abdominal fat thickness in Japanese men. *Diabetologia.* 1 de mayo de 1997;40(6):706-10.
41. Vimalaswaran KS, Radha V, Mohan V. Thr54 allele carriers of the Ala54Thr variant of FABP2 gene have associations with metabolic syndrome and hypertriglyceridemia in urban South Indians. *Metabolism.* septiembre de 2006;55(9):1222-1226.
42. Csép K, Vitay M, Dudutz G, Rosivall L, Korányi L. A FABP2–A54T-polimorfizmus és a metabolikus szindróma kapcsolata a romániai Maros megyében. *Orv Hetil.* 1 de abril de 2007;148(13):597-602.
43. Auinger A, Helwig U, Rubin D, Herrmann J, Jahreis G, Pfeuffer M, et al. Human Intestinal Fatty Acid Binding Protein 2 Expression Is Associated with Fat Intake and Polymorphisms. *J Nutr.* 8 de enero de 2010;140(8):1411-1417.