

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO



UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

RELACIÓN ENTRE POLIMORFISMOS EN EL GEN *ESR1* Y EL
ORIGEN ANCESTRAL AMERINDIO CON SÍNDROME METABÓLICO Y
RIESGO A ENFERMEDAD CORONARIA CARDÍACA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A:

M EN C JOSÉ ÁNGEL CAHUA PABLO

DIRECTORA DE TESIS: DRA. EUGENIA FLORES ALFARO

CODIRECTOR DE TESIS: DR. MIGUEL CRUZ LÓPEZ

CHILPANCINGO, GRO., JULIO DE 2015.

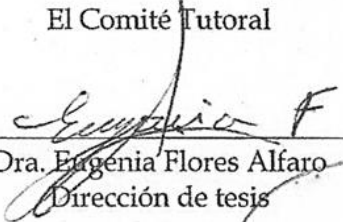



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

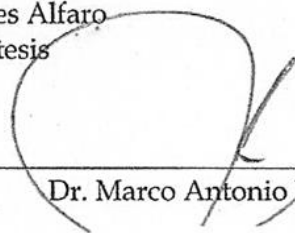
ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 08 días del mes de junio del dos mil quince, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado del Doctorado en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "Relación entre polimorfismos en el gen *ESR1* y el origen ancestral amerindio con síndrome metabólico y riesgo a enfermedad coronaria cardíaca", presentada por el alumno José Ángel Cahua Pablo, para obtener el Grado de Doctor en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

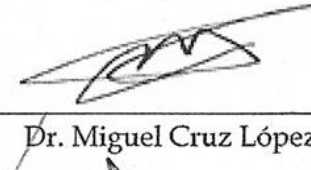
El Comité Tutorial


Dra. Eugenia Flores Alfaro
Dirección de tesis


Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero


Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez

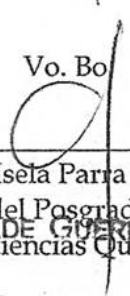

Dra. Isela Parra Rojas

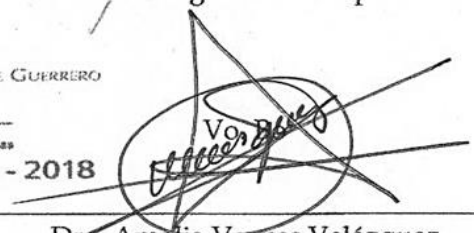

Dr. Miguel Cruz López

Vo. Bo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO

UAGro
Unidad Académica de
Ciencias Químico Biológicas
DIRECCIÓN 2014 - 2018


Dra. Isela Parra Rojas
Coordinadora del Posgrado de la Unidad
Académica de Ciencias Químico Biológicas


Dra. Amalia Vences Velázquez
Directora de la Unidad Académica de Ciencias
Químico Biológicas

AGRADECIMIENTOS A LA INSTITUCION

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Investigación en Epidemiología Clínica y Molecular (LIECM), de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero.

Bajo la dirección de:

Dra. Eugenia Flores Alfaro

Codirector:

Dr. Miguel Cruz López

La asesoría de:

Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero

Dra. Isela Parra Rojas

Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez

Durante el Doctora en Ciencias Biomédicas el C. José Ángel Cahua Pablo recibió una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis la **Dra. Eugenia Flores Alfaro** por su gran apoyo y motivación para la realización de este trabajo, por la confianza brindada, sus enseñanzas, sobre todo la paciencia, tiempo dedicado y la amistad durante todo este tiempo que duro mi maestría y doctorado muchas gracias Dra. Eugenia, le deseo lo mejor ahora y siempre, que Dios la bendiga Dra.

Al **Dr. Miguel Cruz López** mi codirector, sin duda un gran apoyo durante la realización de mi estancia y tesis de Doctorado, gracias por su amistad, por sus sabios consejo que llevo siempre, por sus palabras de aliento que siempre me dio. Gracias

Al **Dr. Adán Valladares Salgado**, quien a pesar de apenas conocerme me dio mucha confianza y apoyo durante la realización de mi estancia. Siempre se preocupó por mí y eso se lo agradezco mucho Dr. Sin su ayuda hubiera sido más difícil para mí, gracias Dr. Adán.

Al **Dr. Esteban Parra** por su apoyo, guía y tener siempre disposición para ayudarme

A mis sinodales, la **Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero, Dra. Isela Parra Rojas y el Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez**, por el apoyo, tiempo, la amistad y sus valiosas aportaciones realizadas a mi trabajo de tesis. Muchas gracias a todos.

DEDICATORIAS

A dios por permitirme nacer y crecer en la hermosa familia que tengo, por cuidarnos y estar con nosotros, gracias.

A mis primeros maestros, mis maravillosos padres **Floriberta y Ermilo**. Padres gracias por el gran apoyo y confianza que siempre me han tenido. Gracias por sus sacrificios, por sus sabios consejos, que me han permitido llegar hasta donde estoy, los amo padres.

A mis hermanos: Gabriel, **Dulce y María Guadalupe**, sigan adelante con todo lo que se propongan, sigamos con nuestros planes siempre. Gracias por todo el apoyo que me han dado, sus locuras y por siempre darme ánimos, los amo hermanos.

Amparo, gracias por todo lo que has hecho por mí, por no dejarme solo hasta en los momentos más difícil, por tener siempre palabras de apoyo, por sentirte orgullosa de mi y no dejarme caer a pesar de que muchas veces me puse impertinente ☺ . Y a todo el grupo de amigos que me presentaste y me integraron como uno de ellos. Gracias.

A mis compañeros, amigos y hermanos del laboratorio de Epidemiología Clínica y Molecular (LIECM) **Abi, pao, Aurea, Ale, Dulce, Sandy, Monse, Marco, Alberto, crisalde, Diana, Viane y Karen**. Pero han sido muchos más los que han pasado por el lab, **Karen, Guadalupe, Caro, Claudia, esme, Itzel, cristi, moi, Álvaro, Misael, azu**. Y a mi buen amigo **Anwar** donde quiera que estés gracias

Abigail (aby) Paola (pao), que decir de ustedes, conocerlas fue una de las mejores cosas que me han pasado en la vida. Muchas gracias por su ayuda, por estar siempre en esos momentos en los que más las necesite, en los que solo ustedes sabían que hacer para evitar que perdiera la cordura. Pero sobre todo gracias por su gran amistad, no sé qué hubiera hecho sin ustedes, las quiero mucho.

Y a mis amigos de los laboratorios de Biomedicina Molecular, (en especial a **Nati, Josué y Alin**). A mis amigos del laboratorio de Investigación Médica en Bioquímica, Jorge, Dani, el Dr. Suarez, Dr. Jaime, Sandy, Víctor y a todos aquellos que me ayudaron en mi estancia. A Paola Macedo, mejor conocida como pao, gracias por su tiempo y ayuda.

A mis tíos: **Luis, Emilia, Hermelindo y Francisca**. Gracias por apoyarme. A mis abuelos: **José Cahua (†), Angelita, Francisca y Efraín (†)**, a ellos gracias por su apoyo y cariño. A mis abuelos Efraín y José, a pesar de que ya no están físicamente pero siempre vivirán en nuestros corazones y desde donde estén nos estás dando ánimos. A mis padrinos el **Dr. Donaciano B. Y la enfermera Josefina G**. Gracias por apoyarme y ser como unos padres para mí.

A todos mis amigos los cuales quiero y aprecio mucho, y sin ellos la vida no sería emocionante☺: **Ramón, Ana, Inés, Sam, Ana Zacapala, Zuby, y Jorge**. Gracias amigos por su amistad, algunos los conocí hace poco, pero en poco tiempo se han hecho unos de mis mejores amigos y a los que ya conocía gracias por seguir conmigo☺. A mi hermanita Mara, gracias por ser mi hermanita y su amistad, te echare de menos.

A todos aquellos que de alguna manera han ayudado a la realización de esta tesis, espero que no se me olvide ninguno.

Relación entre polimorfismos en el gen *ESR1* y el origen ancestral amerindio con síndrome metabólico y riesgo a enfermedad coronaria cardíaca

ÍNDICE

	Pág.
Resumen	1
Introducción	2
Capítulo I	
Polymorphisms in the <i>LPL</i> and <i>CETP</i> genes and haplotype in the <i>ESR1</i> gene are associated with metabolic syndrome in women from Southwestern Mexico	13
CAPÍTULO II	
Analysis of the ancestral contribution of women in the state of Guerrero, Mexico.	28
Discusión y conclusiones	36
Referencias	40
Anexos	47
Anexo 1: Artículo de revisión:	
Receptor a estrógenos α en obesidad y diabetes.	48
Anexo: Consentimiento informado	72
Anexo 2: Técnica rápida no enzimática para sangre líquida	73
Table 1. Association between SNP rs1884051 in <i>ESR1</i> gene with MetS and their components	74
Table 2. Association between SNP rs328 in <i>LPL</i> gene with MetS and their components	75
Table 3. Association between SNP rs708272 in <i>CETP</i> gene with MetS and their components	76

Resumen

El síndrome metabólico (SM) es una combinación de desórdenes metabólicos que están asociados con un incremento en la susceptibilidad a diabetes tipo 2 (DT2) y enfermedad cardiovascular (ECV). Diversos estudios han demostrado que polimorfismos en el gen del *ESR1* y la ancestría genética en poblaciones mestizas participan en procesos y alteraciones metabólicas, incluyendo ECV, resistencia a la insulina, DT2 y el metabolismo de lipoproteínas. **Objetivo:** Evaluar la asociación entre los genotipos y haplotipos de los SNPs en el gen *ESR1*, la ancestría genética, con el SM y el índice de riesgo de enfermedad coronaria cardiaca (ECC) en mujeres guerrerenses. **Metodología:** Se incluyeron 480 mujeres, de 30-65 años no relacionadas genéticamente, con dos generaciones nacidas en el estado de Guerrero, a las cuales se les realizaron medidas antropométricas y perfil bioquímico por medio de métodos enzimáticos, por medio de la técnica rápida no enzimática se extrajo ADN, la genotipificación de los polimorfismos del *ESR1* fue hecha por PCR en tiempo real al igual que los Marcadores Informativos de Ancestría (AIMs). **Resultados:** La prevalencia de SM fue del 33.1%, el score de riesgo promedio para las mujeres con y sin SM fue de 22.8 y 15.1 respectivamente, las proporciones promedio de ancestría fueron del 69.2% para la Nativo Americana, 27.1% para la Europea y del 3.7% para la Africana. No se encontró relación entre las variantes individuales en el gen *ESR1* con SM, con la ancestría o con el índice de riesgo de ECC, solo se encontró asociación del genotipo AA del rs1884051 con niveles elevados de glucosa (OR=2.9; p=0.013) en comparación con el genotipo GG o AG y del haplotipo ACTCCG con una disminución al riesgo de SM (OR=0.02; p<0.001). **Conclusión:** Nuestros resultados muestran una leve participación de las variantes en el gen *ESR1* en eventos metabólicos relacionados con SM en una población mestiza. También se sugiere que estos SNPs en conjunto, pueden estar involucrados en mecanismos relacionados con la disminución al riesgo de SM, y por tanto, menor riesgo de DT2 o ECC, y la ancestría Nativo Americana o Europea no contribuyen al riesgo de SM o de ECC en las mujeres estudiadas.

Introducción

Síndrome metabólico

El síndrome metabólico (SM) es una combinación de desórdenes metabólicos que está asociado con un incremento en la susceptibilidad a diabetes tipo 2 (DT2) y (ECV) (Wilson et al., 2005, Cruz et al., 2010). Se han propuesto múltiples definiciones, de acuerdo al ATP III (por sus siglas en inglés Adult Treatment Panel III), el SM está caracterizado por tres o más de las siguientes características: obesidad abdominal, niveles séricos disminuidos del colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (cHDL) e incremento en los triglicéridos (TG) y glucosa en ayuno (Antonopoulos, 2002). Un componente clave en el SM es la obesidad, padecimiento crónico que se desarrolla por un desequilibrio entre la energía ingerida y la energía gastada, se presentan alteraciones en la respuesta inmune, se genera un proceso de inflamación crónica y de bajo grado (Blancas-Flores et al., 2010, Martínez-Gomez et al., 2011).

La DT2 es considerada la combinación de factores genéticos, nutricionales y ambientales, sugiriendo que influyen genes de susceptibilidad, entre los genes polimórficos se encuentran el receptor a la insulina, el gen de la glucosinasa, calpaina 10 y PPAR-g (Cruz et al., 2002, Martínez-Gomez et al., 2011). Se han hecho estudios en diversos genes para determinar la asociación de estos con la DT2, en México los estudios de asociación están limitados, debido al alto porcentaje de ancestría amerindia, europea y en menor proporción africana (Martínez-Fierro et al., 2009), en el año 2010 Burguete-García y colaboradores reportan, que el SNP Gly972Arg en el gen del IRS1 y Martínez Gómez y colaboradores en el 2011 en los genes de *IRS1* y *TCF7L2* mostraron alto riesgo al desarrollo de diabetes tipo 2 en población mexicana (Burguete-Garcia et al., 2010, Martínez-Gomez et al., 2011).

La incidencia del SM difiere significativamente entre hombres y mujeres, lo cual ha sido atribuido a los diferentes factores de riesgo y a la producción hormonal (Miller and Duckles, 2008a). Así mismo, Las mujeres postmenopáusicas tienen altas prevalencias de SM y eventos cardiovasculares, relacionadas con la reducción en la producción de estrógenos (Yoshihara et al., 2009).

Los estrógenos y su relación con el síndrome metabólico.

Los niveles de estrógenos se han relacionado con varios componentes del SM, incluida la intolerancia a la glucosa, alteración de lípidos, y de presión arterial, alteraciones en la vía de señalización de los estrógenos está relacionado con el desarrollo de enfermedades metabólicas (Toth et al., 2000, Shakir et al., 2007, Faulds et al., 2012). Niveles de estradiol libre fueron significativamente altos en mujeres con SM en comparación con mujeres sin SM (Weinberg et al., 2006, Shakir et al., 2007).

El 17 β -estradiol (E2) participa en la regulación fisiológica vía difusión a través de la membrana plasmática de células blanco y la señalización a través de receptores específicos a estrógenos (REs). Estudios en mujeres postmenopáusicas han reportado asociaciones entre los REs y componentes del SM, de manera particular con obesidad y dislipidemias (Gallagher et al., 2007). Estas asociaciones se deben principalmente a polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en el gen del receptor a estrógenos 1 (*ESR1*) (Rebelo et al., 2012). Análisis de asociación de SNPs y haplotipos, proporcionan evidencias de que SNPs en este gen están asociados con diabetes, SM, resistencia a insulina, perfil de lípidos y adiposidad (Gallagher et al., 2007). Los SNPs conocidos como XbaI y PvuII del gen *ESR1* se han asociado con SM, ECV y diabetes (Deroo and Korach, 2006).

Mecanismos de acción de los estrógenos.

Los estrógenos inducen cambios celulares a través de diferentes mecanismos. El mecanismo genómico clásico de la acción del RE ocurre normalmente en horas, resultando en la activación o represión de los genes blanco. En la vía de señalización clásica la unión del ligando al RE provoca un cambio conformacional y la disociación de las proteínas de choque térmico (Hsp), promoviéndose la homodimerización y la unión con una alta afinidad a los elementos de respuesta a estrógenos (ERE), los cuales son secuencias palindrómicas en un promotor de un gen (Deroo and Korach,

2006, Acconcia and Marino, 2011). Después de la unión con el ligando los REs, actúan sobre los ERE, estos RE interactúan con cofactores (coactivadores o correpresores) para regular la expresión génica (Noriega-Reyes and McCarron, 2008b) y dependiendo de los coreguladores presentes en la célula, el complejo estrógeno-RE puede tener diversos efectos (Safe and Kim, 2008).

Por otro lado, los estrógenos pueden actuar con mayor rapidez vía mecanismos no genómicos, ya sea a través del RE localizado en la membrana plasmática, o a través de otra proteína de unión a estrógenos asociadas a la membrana plasmática, no-RE, (Deroo and Korach, 2006, Heldring et al., 2007). En varios tipos celulares, los REs están asociados con cavéolas y grandes complejos de proteínas, donde también se encuentran otras moléculas que se cree promueven la eficiencia de la señalización.

Los REs también pueden actuar independiente del ligando para alterar la transcripción de genes, pueden ser fosforilados directamente permitiendo la unión a ERE o la unión al DNA indirectamente vía factores de transcripción, y así modular la transcripción en ausencia de la unión al ligando (Le Goff et al., 1994). La fosforilación en sitios específico de serina como ser104 y ser106 son importantes en la activación de la transcripción independiente del ligando(Thomas et al., 2008, Lannigan, 2003). También, se ha demostrado que la activación de la vía de las cinasas dependiente de cAMP o MAPK son activadas por la fosforilación en el RE- α , y se ha reportado que el RE- α puede ser fosforilado en la tirosina 537 (Murphy et al., 2011).

Receptores a estrógenos

Existen al menos tres receptores para estrógenos: dos factores de transcripción activados por ligando, RE- α y RE- β . Un receptor acoplado a proteína G, GPER (también conocido como GPR30) (Miller and Duckles, 2008b), otro menos definido es el RE-X, del cual existen evidencias de su existencia en el cerebro (Toran-Allerand, 2004, Noriega-Reyes and McCarron, 2008a). El RE- α está formado por 595 aminoácidos, tiene 6 dominios denominados de la A a la F (Klinge, 2001), los

dominios N-terminal A-B, están involucrados tanto en interacciones inter-molecular e intra-molecular, como también tienen una función de activación transcripcional independiente del ligando (TAF-1). Los dominios de unión al DNA (DBD, región C) permite al RE dimerizarse y unirse a secuencias de elementos de respuesta a estrógenos (ERE) en el DNA a través de sus dos estructuras de dedos de zinc. El dominio D es la región “bisagra” (H) tiene un papel en la dimerización del receptor y en la unión a proteínas de choque térmico (Hsp) chaperonas. La región C-terminal contiene el dominio de unión a hormonas (HBD, dominios E y F), y la función de activación transcripcional dependiente de hormonas (TAF-2) (Mendelsohn and Karas, 1999, Toran-Allerand, 2004, Farhat et al., 1996, Jiang and Huhtaniemi, 2004, Marino et al., 2006, Deroo and Korach, 2006).

Los REs contienen dos regiones llamadas funciones de activación transcripcionales (TAF-1 y TAF-2) importantes para la actividad transcripcional dependiente de ligando. Las regiones TAF-1 y TAF-2 de REs interactúan con un número de coactivadores transcripcionales. TAF-1 podría ser incluso activado independiente del ligando, dependiendo del estado de fosforilación del RE. En particular, el residuo de Ser118 en la región TAF-1 del RE- α , como también en residuos de Ser106 y Ser124 en la región TAF-1 de RE- β , son los sitios de fosforilación esenciales para la activación independiente del ligando de REs a través de la cascada de señalización de las MAPK (por sus siglas en inglés Ras-mitogen activated proteinkinase) (Lannigan, 2003, Orti et al., 1992)

Gen del receptor de estrógenos alfa (*ESR1*) y beta (*ESR2*)

El RE- α humano es un miembro de la familia de factores de transcripción activados por ligando, el gen está localizado en el cromosoma 6q25.1, compuesto por 8 exones, 7 intrones y una región reguladora, abarca más de 140 kilobases. El RE- α está compuesto de varios dominios importantes para la unión a hormonas y a DNA, y activación de la transcripción (Kos et al., 2001, Jiang and Huhtaniemi, 2004). Por otro lado, el gen del RE- β está localizado en el cromosoma 14 q23-24.1,

compuesto por ocho exones, que comprende aproximadamente 40 kb (**Figura 1**). (Gennari et al., 2005).

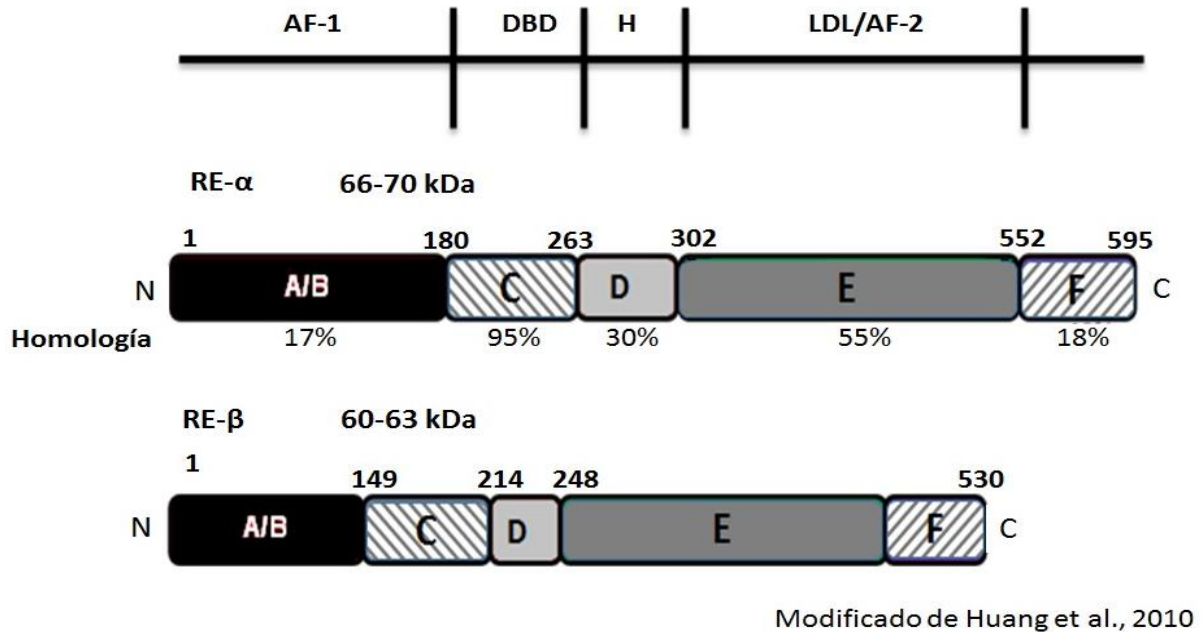


Figura 1. Organización de los dominios del RE-α y RE-β. Los RE consisten de la región N-terminal involucrada en la transactivación (dominios A/B AF-1), el dominio de unión al DNA (DBD, dominio C) la región C-terminal que contiene el dominio de unión al ligando (DBL, dominio E/F, AF-2) y la función de transactivación-2 (AF-2). En porcentajes se indica la homología entre el RE-α y RE-β. (Huang et al., 2010, Marino et al., 2006)

RE-α en la homeostasis de la glucosa y sensibilidad a la insulina.

Los niveles de glucosa están controlados la insulina y el glucagón. En respuesta a niveles altos de glucosa, se libera proinsulina de las células β del páncreas y es convertida a su forma activa. La insulina, estimula el gasto y

almacenamiento de glucosa en el músculo esquelético y tejido adiposo, o como glucógeno a través de la glucogenogénesis en el hígado. Dos vías principales de transducción son activadas por acción de la insulina: la vía de la PI3K y la vía de MAPK(Barros et al., 2009). Ambas vías regulan la mayoría de las acciones de la insulina asociadas a la regulación del metabolismo energético, de la expresión genética y de efectos mitogénicos, la vía de la PI3K es el principal mecanismo por el que la insulina ejerce sus funciones en el metabolismo de la glucosa y de lípidos(Barros and Gustafsson, 2011).

Cuando la insulina se une a su receptor se activa una cascada de señalización que involucra a varias proteínas entre ellas el IRS, PI3K, Akt y AMPK, que finalmente resulta en la translocación a la membrana plasmática del transportador de glucosa 4 (GLUT4), permitiendo la entrada de la glucosa a la célula (Zhou et al., 1999, Bjornholm and Zierath, 2005). La DT2 es caracterizada por niveles elevados de glucosa en sangre y RI. La deficiencia, intolerancia a la glucosa e hiperinsulinemia, fue observada en hombres que carecen del RE- α . Una función metabólica del RE- α se ha sustentado en estudios con animales, en los que se sugiere efectos dependientes de estrógenos en la homeostasis de la glucosa a través del RE- α y RE- β (Heine et al., 2000).

Se ha demostrado que El RE- α está involucrado en mantener el metabolismo de la glucosa en varios tejidos incluyendo hígado, musculo esquelético, tejido adiposo y células β del páncreas y sistema nervioso central (Okura et al., 2003). Mujeres pre-menopáusicas son más sensibles a la insulina con mejora a la tolerancia a la glucosa y son más resistentes al desarrollo de la RI en comparación con hombres, así mismo, muestran un incremento en la expresión de GLUT4 (Zhou et al., 1999). Los estrógenos también son conocidos que regulan la función de las células β del páncreas a través de un mecanismo dependiente del RE- α La liberación de insulina dependiente de estrógenos en cultivo de islotes pancreáticos, se encontró reducida en ratones deficientes de RE- α , comparados con islotes derivados de ratones deficientes de RE- β .(Alonso-Magdalena et al., 2008).

Asociación de los genes *ESR1*, *LPL* y *CETP* en el metabolismo de lípidos

Los niveles de lípidos en plasma están relacionados con factores ambientales, consumo de tabaco, peso corporal, consumo de grasa en la dieta (Antonopoulos, 2002, Sviridov and Nestel, 2007). Las lipoproteínas ricas en TG, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y quilomicrones son secretados por el hígado e intestino y experimentar un rápido catabolismo a remanentes de lipoproteínas. La lipoproteína lipasa (LPL) lipasa hepática y la apoproteína. (Apo) C-III son importantes en el catabolismo de lipoproteínas ricas en TG (Redgrave, 2004). Apo A-I, el principal componente de la HDL, esta es secretada por el hígado e intestinos como una partícula de HDL pobre en lípidos adquiriendo colesterol libre de tejidos periféricos por interacción con el cassette de unión a ATP A1(ABCA1) y receptores G1 (ABCG1) (Rader, 2006). También, polimorfismos en genes involucrados en el metabolismo de lipoproteínas explican la variabilidad individual en los niveles de lípidos en plasma. Los polimorfismos en el *ESR1* están relacionados con niveles en plasma de HDL y Apo A-I, con niveles de TG debido al incremento en la producción de VLDL, reducen los niveles de LDL por la sobre regulación del receptor de la LDL (Zhu et al., 1999, Herrington, 2003).

La proteína transportadora de esteres de colesterol (CETP) es una enzima importantes en el metabolismo de las partículas de HDL y el transporte reverso del colesterol. La CETP participa en el intercambio de esteres de colesterol de TG entre LDL, HDL y partículas de lipoproteínas ricas en TG, resultando en un enriquecimiento de partículas de HDL y LDL en TG (Morton, 1999, Thuren, 2000). Variantes en el gen de la *CETP* podrían dar como resultados cambios en la función de la proteína. En humanos una deficiencia en la CETP está caracterizado con un incremento en el c-HDL, mientras un incremento en la actividad de esta se asocia con una disminución en los niveles de c-HDL (Ikewaki et al., 1993, Lopez-Rios et al., 2011). La variante TaqIB en el gen de la *CETP* está localizado en el primer intrón y está en desequilibrio de ligamiento con una mutación funcional en la región promotora (Klerkx et al., 2003). El alelo G, también llamado B1, está asociado con la actividad enzimática más alta y los niveles más bajos de c-HDL (Demissie et al., 2006).

La lipoproteína lipasa (LPL), es una enzima importante en el metabolismo de lipoproteínas, hidroliza TGs de VLDL para formar LDL. El gen de la *LPL* se localiza en el cromosoma 8p22, tiene una longitud aproximada de 30 kb y contiene 10 exones (Sparkes et al., 1987). El gen presenta varios sitios polimórficos, entre ellos los polimorfismos *HindIII* (rs320) y *S447K* (rs328) se han asociado con cambios en el perfil lipídico, aumento en el riesgo cardiovascular y DT2 (Muñoz-Barrios et al., 2012, Daoud et al., 2013). El polimorfismo *HindIII* se encuentra en desequilibrio de ligamiento con *S447X*, al alelo T del *HiindIII* se le ha asociado con un incremento en los niveles de TG y niveles de HDL disminuidos, sin embargo, al alelo G se ha relacionado con niveles de TG disminuidos (Chen et al., 2008). Para el polimorfismo *S447X*, se ha observado que la estabilidad y actividad catalítica en su forma truncada es normal pudiendo estar en altas concentraciones en circulación, dando como resultado una alta actividad de la LPL, por lo cual considera protector, debido a que se le ha asociado con niveles disminuidos de TG e incrementados de HDL, disminuyendo así el riesgo de ECV (Rip et al., 2006).

Polimorfismos en el gen del *ESR1*

La revisión genética del locus del gen *ESR1* ha revelado la existencia de varios sitios polimórficos. Los más estudiados son los SNPs rs2234693 (T397C) y rs9340799 (C351G) en el intrón 1, y las (TA)_n, repeticiones en tándem de números variables en la región promotora. Estos polimorfismos se han asociado con varias condiciones patológicas como son cáncer de mama y próstata, osteoporosis, así como con el riesgo de accidente cerebrovascular, enfermedades cardiovasculares y SM (Lu et al., 2002, Shearman et al., 2003, Cai et al., 2003, Gennari et al., 2005, Chae et al., 2009, Shearman et al., 2005) (Almeida and Hutz, 2006). Otras variantes en el gen del *ESR1* han sido asociadas con componentes del SM, incluyendo obesidad, cHDL, presión sanguínea y diabetes tipo 2, así como también con la lipoproteína aterogénica LDL. En un estudio realizado por Gallaghe y colaboradores

en familias afroamericanas, encontraron una asociación significativa entre SNPs del gen *ESR1* y el SM, diabetes tipo 2, sensibilidad a la insulina, insulina en ayuno, triglicéridos, LDL, colesterol, IMC, circunferencia de cintura y tejido adiposo subcutáneo (Gallagher et al., 2007)

Dado que la prevalencia de un alelo de riesgo varía debido al fondo genético y varía en impacto por la frecuencia de una población a otra, el mapeo por mezcla (sus siglas en inglés: admixture mapping) permite la identificación de factores de riesgo genéticos y enfermedades que pueden tener efectos de confusión en los estudios de asociación genética. Para esto se han usado los marcadores informativos de ancestralidad (AIMs).

Marcadores informativos de ancestralidad

Mezcla poblacional

La mezcla poblacional ocurre cuando dos o más poblaciones antes aisladas interactúan entre sí, a las poblaciones anteriormente aisladas se les conoce como ancestral o parental y a la nueva población formada se le conoce como mezcla (admixture), los individuos mezclados tienen una ancestría mezclada. El mapeo por mezcla es un método para capitalizar una mezcla reciente para correlacionar la ancestría en un locus genético con un fenotipo (Shriner, 2013).

La mayoría de la variación genética es compartida entre las poblaciones, pero las frecuencias alélicas pueden variar a veces de manera importante. Por ejemplo el antígeno null Duffy tiene una frecuencia de ~100% en poblaciones del oeste de África y ~0% en la población no africana (Hodgson et al., 2014). El mapeo por mezcla (Admixture mapping) está diseñado para localizar loci genéticos basado en la suposición de que la variante causal que lleva a un incremento al riesgo ocurre con mayor frecuencia en los segmentos cromosómicos heredados de la población ancestral que tiene mayor riesgo de enfermedad (Shriner et al., 2011). Los datos

requeridos para un mapeo por mezcla incluyen los datos de los fenotipos para las muestras de las poblaciones mezcladas y ancestrales.

Los métodos originales fueron basados en un número mínimo de marcadores probados a variar ampliamente en frecuencia a través de las poblaciones ancestrales (Smith et al., 2004). Estos marcadores son conocidos como marcadores informativos de ancestralidad (AIMs), estos son polimorfismos que muestran las grandes diferencias entre poblaciones, estos marcadores pueden ser útiles para proporcionar información acerca de la ancestría a nivel de población, de subgrupo o individual. Asimismo, los AIMs se utilizan a menudo en estudios de asociación genética para la prueba de homogeneidad genética y corregir la posible estratificación de la población. Los AIMs que comúnmente se utilizan son los microsatélites (STRs, por sus siglas en inglés *Short Tandem Repeats*), polimorfismos de inserción-delección o SNPs que son seleccionados dependiendo de la información que aporten (Shriver et al., 2003, Budowle and van Daal, 2008).

La mayoría de la población mexicana está constituida por mestizos, grupo con bagaje derivado de los habitantes nativos americanos que radicaban en México, de emigrantes europeos, principalmente españoles que llegaron después de la conquista a México por Hernán Cortés en el Siglo XVI, y por un grupo minoritario de africanos occidentales que fueron traídos como esclavos a México durante los Siglos XVI al XVIII (Beltran, 1981, Stavenhagen R and T., 1997).

El estudio de la mezcla de las poblaciones es relevante desde el punto de vista histórico y antropológico, especialmente con las herramientas moleculares modernas que permite conocer de forma más específica la historia de las poblaciones y los patrones de migración. Además, se ha incrementado el interés en conocer la mezcla poblacional desde el punto de vista biomédico lo que posibilitará hacer un mapa de genes con la población actual, bajo el concepto de las variaciones génicas y la susceptibilidad genética a padecer una enfermedad. Este abordaje es conocido como el análisis de la mezcla génica poblacional (por sus siglas en inglés: admixture mapping) (Hoggart et al., 2004, Patterson et al., 2004, Nievergelt and Schork, 2005)

Por otro lado, el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) reporta a la población guerrerense la de mayor ancestría amerindia con el 67%, de ancestría europea el 28.4 %, en menor proporción la africana y asiática oriental con el 4.5% y 1% respectivamente.

Poblaciones con una historia reciente de historia de mezcla génica (por ejemplo, menos de 20 generaciones), como lo que ha sucedido en la mayoría de las poblaciones en el norte, centro y Sudamérica y el Caribe, son ideales o se ajustan perfectamente para el estudio de la mezcla génica poblacional (Parra et al., 1998).

La historia de la mezcla de cada población determina la densidad del mapa genético requerido; para elaborar un mapeo resolutivo y el análisis fino. Así la primera etapa para la planeación del estudio de la mezcla génica poblacional, debe incluir tanto la historia y la dinámica de la mezcla en la población en que se pretenda estudiar (Patterson et al., 2004, Hoggart et al., 2004). En los Estados Unidos de Norteamérica, la población con alto contenido de ancestros europeos tiene un bajo riesgo al desarrollo de diabetes, comparado con nativos americanos, latinos y población afroamericana. Los nativos americanos tienen 2.2 veces más riesgo de tener diabetes en comparación con la población con historia ancestral europea con edades similares. De igual manera, se ha observado que los individuos con ancestros mexicanos presentan el doble de riesgo de diabetes, comparado con la población con ancestros europeos (Permutt et al., 2005).

Se ha demostrado que variantes en el gen del *ESR1* pueden influir en el riesgo de SM, ECC y diabetes, así como también se ha observado que individuos con ancestros mexicanos presentan el doble de riesgo de padecer SM y diabetes. Debido a esto es importante evaluar la asociación entre los genotipos y haplotipos de los SNPs en el gen *ESR1*, la ancestría genética, con el SM y el índice de riesgo de enfermedad coronaria cardiaca (ECC) en mujeres guerrerenses.

CAPITULO I

Polymorphisms in the *LPL* and *CETP* genes and haplotype in the *ESR1* gene are associated with metabolic syndrome in women from Southwestern Mexico

8 **Polymorphisms in the *LPL* and *CETP* genes and haplotype in the**
9 ***ESR1* gene are associated with metabolic syndrome in women**
10 **from Southwestern Mexico**

11 José Ángel Cahua-Pablo,¹ Miguel Cruz,² Abigail Méndez-Palacios,¹ Diana Lizzete Antúnez-Ortiz,¹
12 Amalia Vences-Velázquez,¹ Luz del Carmen Alarcón-Romero,³ Esteban J Parra,⁴ Vianet Argelia
13 Tello-Flores,¹ Marco Antonio Leyva-Vázquez,³ Adán Valladares-Salgado,² Claudia Paola Pérez-
14 Macedonio,¹ Eugenia Flores-Alfaro¹

15 ¹Laboratorio de Investigación en Epidemiología Clínica y Molecular, Unidad Académica de Ciencias
16 Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, México.

17 ²Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, Hospital de Especialidades “Bernardo Sepúlveda”,
18 Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, DF, México.

19 ³Laboratorio de Biomedicina Molecular, Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas,
20 Universidad Autónoma de Guerrero, México.

21 ⁴Department of Anthropology, University of Toronto at Mississauga, Mississauga, Ontario, Canada.

22 Correspondence should be addressed to Eugenia Flores-Alfaro; efloresa_2@hotmail.com

23 **Abstract:** Metabolic syndrome (MetS) is a combination of metabolic disorders associated
24 with an increased risk for cardiovascular disease (CVD), studies in women reported
25 associations between polymorphisms in *ESR1*, *LPL* and *CETP* genes and MetS. Our aim was
26 to evaluate the association between variants in *ESR1*, *LPL* and *CETP* genes with MetS and its
27 components. 480 women were analyzed, anthropometric features and biochemical profile were
28 evaluated and genotyping was performed by real-time-PCR. We found an association with
29 elevated glucose levels [odds ratio (OR)=2.9; p=0.013] in carrying the AA genotype of
30 rs1884051 in the *ESR1* gene compared with the GG genotype, the CC genotype of rs328 in the
31 *LPL* gene is associated with MetS compared to the CG or GG genotype (OR=2.8; p=0.04).
32 Moreover, the GA genotype of rs708272 in the *CETP* gene is associated with MetS compared
33 to the GG or AA genotype (OR=1.8; p=0.006). In addition the ACTCCG haplotype in *ESR1*
34 gene is associated with a decrease in the risk of MetS (OR=0.02; p<0.001). In conclusion, our
35 results show the involvement of the variants of *ESR1*, *LPL* and *CETP* genes in metabolic
36 events related to MetS or some of its features.

37 **Keywords:** Metabolic syndrome; *LPL* and *CETP* polymorphisms; *ESR1* haplotype.

39 **1. Introduction**

40 Metabolic syndrome (MetS) is a combination of metabolic disorders and is associated with an
 41 increased risk for cardiovascular disease (CVD) and type 2 diabetes (T2D) in both genders [1]. The MetS
 42 traits, as defined by the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (NCEP-ATP
 43 III), include an increased waist circumference, blood pressure elevation, low high density lipoprotein
 44 cholesterol (HDL-c), high triglycerides (TG) and hyperglycemia. This syndrome is considered to be
 45 present when at least 3 of the 5 traits are present, and affected individuals generally are insulin resistant [2,
 46 3]. The incidence of MetS differs significantly between men and women, which has been attributed to
 47 differences in risk factors and hormone production [4].

48 Studies in women associations have been reported between estrogen receptor (ESR1 or ESR2) with
 49 MetS or its components, particularly with obesity and dyslipidemia [5], these associations might be
 50 explained by single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *ESR1* gene, as reported by some studies [6,
 51 7]. Moreover, SNPs in the lipoprotein lipase (*LPL*) and cholesteryl ester transfer protein (*CETP*) genes
 52 have been implicated in lipid abnormalities characteristic of MetS, where a decrease of the LPL is
 53 associated with hypertriglyceridemia and atherosclerosis, which, under normal conditions, hydrolyzes TG
 54 of chylomicrons and the very low density lipoproteins (VLDL), and CETP has the function of transferring
 55 cholesteryl esters from HDL to low density lipoprotein (LDL) as well as VLDL [8, 9]. Given the close
 56 relationship between TG and HDL-c metabolism with various polymorphisms in the genes mentioned, the
 57 study of these SNPs in women from Southwestern Mexico may be of interest, due to the genetic diversity
 58 of populations. Therefore, our interest was to evaluate the association between SNPs and haplotypes in the
 59 *ESR1*, *LPL*, *CETP* genes with MetS or its components, in Mexican-Mestizo women. We found association
 60 between two polymorphisms in the *LPL* and *CETP* genes and a haplotype in the *ESR1* gene with MetS
 61 regardless of the admixture proportions.

62 **Results**

63 The average age of women participants was 46 years, 159 of them were diagnosed with MetS, with a
 64 prevalence of 33.1%. No significant differences were found in serum levels of atherogenic risk of LDL-c
 65 (≥ 160 mg/dl) among women with MetS compared to those who did not have the syndrome. Estimates of
 66 admixture proportions were obtained with the program ADMIXMAP v.3.8, using data from 104 ancestry
 67 informative markers (AIMs). The average Native American, European and African contributions were
 68 69.2%, 27.1% and 3.7%, respectively, and were similar in women with or without MetS (Table 1).

69 **Table 1.** Somatometric, clinical and ancestry characteristics in women with and without MetS

Characteristic	n =480	MetS n=159 (33.1%)	Without MetS n=321 (66.9%)	P
Age (y)	46 (38-53)	51 (44-56)	43 (36-50)	<0.001 [†]
BMI (kg/m ²)	27.3 (24.8-30.3)	29.2 (27-33.4)	26.3 (24-29)	<0.001 [†]
Abdominal obesity, n (%)	271 (56.5)	141 (88.7)	130 (40.5)	<0.001 [‡]
% Body fat	36.6 (31.4-40.9)	39.5 (35.4-43.6)	35.4 (29.7-38.8)	<0.001 [†]

% Water	44.4 (41.8-47.9)	42.2 (39.9-45.1)	45.3 (43-48.9)	<0.001 [†]
BP systolic, (mm Hg)	116 (107-127)	129 (117-137)	112 (105-120)	<0.001 [†]
BP diastolic, (mm Hg)	73.5 (67-81)	79 (71-86)	71 (66-78)	<0.001 [†]
Glucose (mg/dL)	79.7 (71.5-89)	86 (77-107)	76.9 (70-83.4)	<0.001 [†]
≥ 110, n (%)	54 (11.3)	43 (27)	11 (3.4)	<0.001 [‡]
Total cholesterol (mg/dL)	172 (146.7-197)	184.3 (159.9-207)	165 (142-191.1)	<0.001 [†]
≥ 200, n (%)	115 (24)	49 (30.8)	66 (20.6)	0.013 [‡]
Triglycerides, (mg/Dl)	130.5 (93.4-170.8)	170 (145-212.5)	110 (80.5-141)	<0.001 [†]
≥ 150, n (%)	175 (36.5)	114 (71.7)	61 (19)	<0.001 [‡]
HDL-c, (mg/dL)	39.9 (32.3-49.5)	37.6 (31.5-44.2)	40.4 (33.5-53.5)	<0.001 [†]
<50, n (%)	366 (76.3)	147 (92.5)	219 (68.2)	<0.001 [‡]
LDL-c, mg/dL	119 (90.5-157.2)	126.3 (95.3-168.3)	112.9 (88.8-155)	0.04 [†]
≥ 160, n (%)	114 (23.9)	42 (26.8)	72 (22.5)	0.306 [‡]
Exercise, n (%)	235 (49.1)	80 (50.6)	155 (48.3)	0.629 [‡]
Years of schooling	17 (12-18)	17 (12-18)	17 (12-19)	0.155
Ancestry, %				
Native American	69.2	68.8	69.4	0.548 [†]
European	27.1	27.7	26.7	0.275 [†]
African	3.7	3.5	3.9	0.602 [†]

Data are reported as medians (25th - 75th percentile) or as noted in table.

[†] Mann-Whitney test; [‡] Chi-square test.

BMI: body mass index; BP: Blood pressure; HDL-c: High density lipoprotein cholesterol; LDL-c: Low density lipoprotein cholesterol.

70 Table 2 shows the genotype distribution in women with and without MetS, as well as the comparison
 71 between the allelic frequencies obtained in the study with those reported in the database of SNPs of the
 72 National Center for Biotechnology Information (NCBI)
 73 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/index.html>).

74 **Table 2.** Genotype distribution and allele frequencies of the *ESRI*, *LPL* and *CETP* variants in
 75 the women with and without MetS, and allele frequencies reported by the database of SNP
 76 (dbSNP)

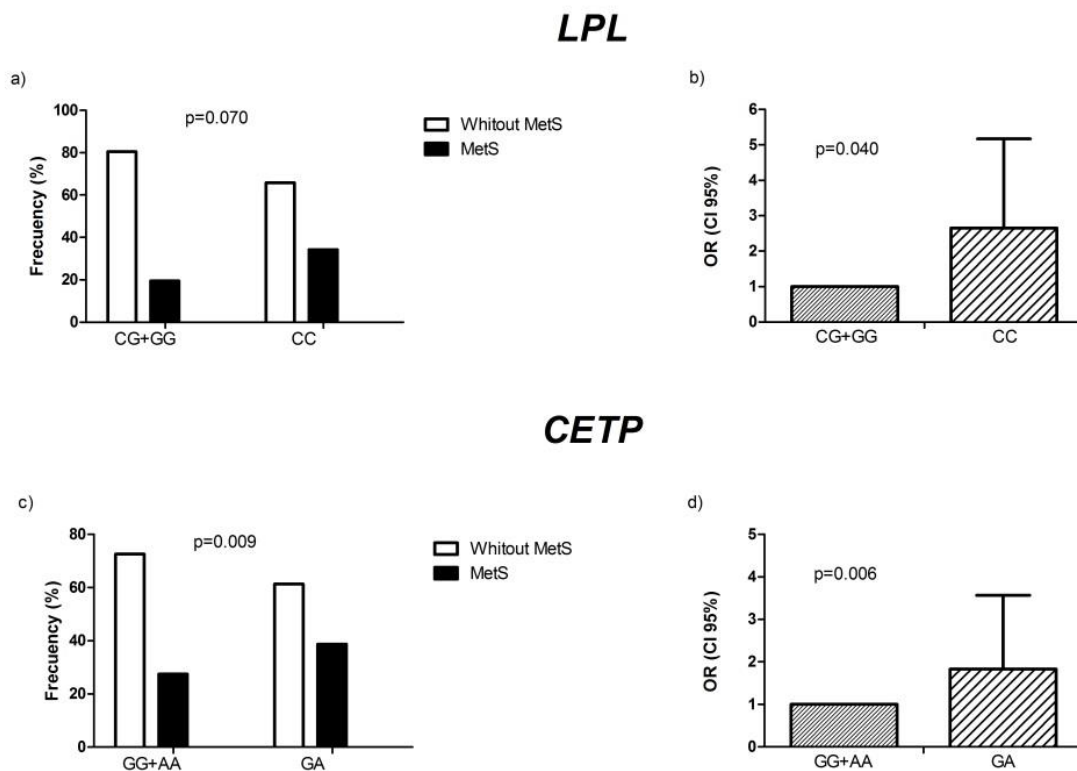
SNP	Total	Allele Frequencies	Allele frequencies (dbSNP-NCBI)	MetS	Without MetS	<i>p</i> [‡]
	n (%)			n (%)	n (%)	
<i>ESRI</i>						
rs1884051						
AA	95 (19.8)	A: 0.442	A=0.509	29 (18.2)	66 (20.6)	0.251
AG	234 (48.7)	G: 0.558	G=0.491	86 (54.1)	148 (46.1)	
GG	151 (31.5)			44 (27.7)	107 (33.3)	
rs3798577						
TT	142 (29.6)	T: 0.539	T=0.536	44 (27.7)	98 (30.5)	0.740
CT	233 (48.5)	C: 0.461	C=0.464	81 (50.9)	152 (47.4)	
CC	105 (21.9)			34 (21.4)	71 (22.1)	

rs2077647						
TT	146 (30.4)	T: 0.557	T=0.533	49 (30.8)	97 (30.2)	0.991
CT	243 (50.6)	C:0.443	C=0.467	80 (50.3)	163 (50.8)	
CC	91 (19.0)			30 (18.9)	61 (19.0)	
rs1801132						
CC	190 (39.6)	C: 0.624	C=0.718	64 (40.2)	126 (39.2)	0.975
CG	219 (45.6)	G: 0.376	G=0.282	72 (45.3)	147 (45.8)	
GG	71 (14.8)			23 (14.5)	48 (15.0)	
rs2234693						
TT	270 (56.3)	T=0.742*	T=0.554*	93 (58.5)	177 (55.1)	0.254
CT	172 (35.8)	C=0.258	C=0.446	58 (36.5)	114 (35.5)	
CC	38 (7.9)			8 (5.0)	30 (9.4)	
rs9340799						
AA	295 (61.5)	A=0.768	A=0.719	102 (64.2)	193 (60.1)	0.309
AG	147 (30.6)	G=0.232	G=0.281	42 (26.4)	105 (32.7)	
GG	38 (7.9)			15 (9.4)	23 (7.2)	
<i>LPL</i>						
rs320						
TT	325 (67.7)	T=0.821	T=0.738	108 (67.9)	217 (67.6)	0.366
TG	138 (28.8)	G=0.179	G=0.262	48 (30.2)	90 (28.0)	
GG	17 (3.5)			3 (1.9)	14 (4.4)	
rs328						
CC	444 (92.5)	C=0.961	C=0.907	152 (95.6)	292 (91.0)	0.043
CG	35 (7.3)	G=0.039	G=0.093	6 (3.8)	29 (9.0)	
GG	1 (0.2)			1 (0.6)	0	
<i>CETP</i>						
rs708272						
GG	115 (24.0)	G=0.493*	G=0.622*	32 (20.1)	83 (25.9)	0.032
GA	243 (50.6)	A=0.507	A=0.378	94 (59.1)	149 (46.4)	
AA	122 (25.4)			33 (20.8)	89 (27.7)	

77 †Chi-square test: * significant differences.

78 Significant differences were found in the allelic frequencies reported in the NCBI database in two
79 SNPs (rs2234693 and rs708272) compared with those found in this investigation ($p < 0.05$). Genotype
80 frequencies among women without MetS were consistent with the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE)
81 test. The highest frequencies of the minor allele (MAF) of polymorphisms in the *ESR1* gene corresponded
82 to the rs1884051-G (55.8%), rs3798577-C (46.1%), rs2077647-C (44.3%), rs1801132-G (37.6%) and the
83 lowest frequencies to rs2234693-C (25.8%) and rs9340799-G (23.2%). While the frequency of the minor
84 allele of the rs708272-A in the *CETP* gene was 50.7%. The lowest frequency of the minor allele was
85 found in the rs328-G (3.9%) in the *LPL* gene. No significant differences were found in the genotypic
86 frequencies of the six SNPs in the gene *ESR1*, nor for rs320 SNP in the *LPL* gene ($p > 0.05$) in women who
87 had MetS compared with those who did not have the syndrome. While for the SNPs rs328 and rs708272
88 in the *LPL* and *CETP* genes respectively, significant differences were found (Table 2).

89 The association analysis showed that polymorphisms in the *ESR1* gene were not associated with MetS,
 90 however, we found a significant association between women carrying the AA genotype of rs1884051 with
 91 elevated glucose levels (≥ 110 mg/dl) or previous diagnosis of T2D compared to the carriers of the GG
 92 genotype (OR=2.9; 95%CI: 1.2-6.6; $p=0.013$). We found in a model of recessive inheritance significant
 93 association of the CC genotype of rs328 in the *LPL* gene with MetS compared to women carrying the CG
 94 or GG genotype (OR=2.8; 95%CI: 1.1-6.9; $p=0.04$), finding association of this genotype with high levels
 95 of glucose (OR=5.5; $p=0.10$), high blood pressure (OR=2.5; $p=0.08$), and raised TG (OR=1.4; $p=0.36$),
 96 but no statistical significance was found. Moreover, in a model of overdominant inheritance, we found
 97 significant association of the GA genotype of rs708272 in the *CETP* gene with MetS compared to women
 98 carrying the GG or AA genotype (OR=1.8; 95%CI: 1.2-2.7; $p=0.006$) (Figure 1). While the GG or AA
 99 genotypes compared with the GA reduces the risk of MetS to 53% ($p=0.01$) and 59% ($p=0.04$),
 100 respectively, regardless of age, years of schooling and admixture proportion.



101

102 **Figure 1. Association between genotypes of *LPL* and *CETP* genes with MetS.** a) Genotype
 103 frequencies of rs328 (*LPL*) by group with and without MetS. b) Logistic regression model
 104 adjusted by age, years of schooling and by the admixture proportion (Native American,
 105 European and African), CG+GG genotypes were the reference group (OR=1.0). c) Genotype
 106 frequencies of rs708272 (*CETP*) by group with and without MetS. d) Logistic regression
 107 model adjusted for age, years of schooling and by the admixture proportion (Native American,
 108 European and African), GG+AA genotypes were the reference group (OR = 1.0).

Haplotype frequencies in the *ESRI* gene were calculated, finding that the haplotype GCCCTA was the most frequent (0.097). A significant decrease in the risk of MetS was found with ACTCCG haplotype (freq=0.019) compared to most frequent haplotype (OR=0.02; 95%CI: 0.01-0.03; p<0.001). The genetic association analysis (SNPs and haplotypes) were performed through logistic regression models adjusted for age, years of schooling and by the proportion of Native American and European ancestry. Furthermore, we found strong linkage disequilibrium between several SNPs in the *ESRI* gene, the information is shown in Figure 2.

Linkage Disequilibrium

	rs2077647	rs3798577	rs1801132	rs2234693	rs9340799
rs1884051	0.03015 0.5483 0.458994	0.05608 2.0462 0.152582	0.00556 0.0147 0.903651	0.07154 2.1634 0.141332	0.04995 0.9162 0.338481
rs2077647		0.08855 6.9787 0.008249	0.28399 37.0661 1.14e-09	0.21082 18.7080 1.52e-05	0.11607 4.9259 0.026457
rs3798577			0.16222 13.0464 0.000304	0.08628 2.1328 0.1441176	0.02289 0.1304 0.718013
rs1801132				0.41479 34.6714 3.90e-09	0.43975 33.8530 5.94e-09
rs2234693					D' χ ² P-value 0.82156 562.8839 <2e-16

Marker 2

117

Figure 2. Map of linkage disequilibrium (LD) between the SNPs of the *ESRI* gene. The figure provided the statistics employed to determine the LD, the degree of shading indicates higher (p<0.0001), low (p<0.05) and no significant (p>0.05) LD, respectively.

120

121 Discussion

MetS is defined by a constellation of an interconnected physiological, biochemical, clinical, and metabolic factors that directly increases the risk of atherosclerotic cardiovascular disease, T2D, and all cause mortality [12]. The prevalence of MetS in the world is high and significantly elevated in Latin

124

125 America. Low prevalence has been reported in individuals with Dominican ancestry (14%) and higher in
126 the Brazilian population [13]. In the study by Hess *et al.* in a population of Hispanic/Latino diverse origin,
127 they found a prevalence of 36% among women and 34% in men, among women the metabolic syndrome
128 prevalence ranged from 27% in South Americans to 41% in Puerto Ricans [14]. In our study we found a
129 prevalence of MetS of 33.1%, noting that it was lower than that reported in the country (42.2%) [15]. A
130 number of potential candidate genes have been suggested according to their biological relevance and
131 many of these have been strongly associated with MetS in different populations. In this study the
132 relationship between SNPs in the *ESR1*, *LPL* and *CETP* genes with MetS and its components was
133 analyzed, in women from Southwestern Mexico.

134 The genetic association has been described for SNPs in the *ESR1* gene with various pathological
135 conditions, including CVD, DT2, hypertension, and lipoprotein metabolism [16, 17]. In the present study,
136 we found no association of SNPs in the *ESR1* gene with MetS, results coincide with those reported by
137 Goulart, *et al.* where they found no relation of SNPs in *ESR1* and *ESR2* genes with MetS in Caucasian
138 postmenopausal women [18], however, in the study conducted in young women by Rebelo *et al.* they
139 found no association between rs2234693 and rs9340799 SNPs with metabolic variables (total cholesterol,
140 HDL-c, LDL-c, and triglycerides) [19]. Moreover Gallagher *et al.* in African American families, they
141 reported the association of rs9340799 polymorphism in the *ESR1* gene with MetS, and the C allele of
142 rs2234693 with reduced insulin sensitivity [20]. In our study, only the AA genotype of SNP rs1884051
143 was found to be associated with elevated glucose levels, indicating that this variant may contribute to
144 insulin resistance.

145 In the haplotype analysis for the six SNPs of the *ESR1* gene, we found significant decrease in the risk
146 of MetS attributed to haplotype ACTCCG ($p < 0.001$), the study of Gallagher *et al.* reported not having
147 found significant association between haplotypes with MetS [20]. As mentioned Gallagher *et al.*, derived
148 from other studies, in animal models of the *ESR1* gene support pleiotropic effects on phenotypes related to
149 diabetes and CVD risk because male and female *ESR1* knockout mice exhibit insulin resistance, impaired
150 glucose tolerance, and obesity. A human male with an *ESR1*-null mutation had insulin resistance,
151 impaired glucose tolerance and obesity [20].

152 In order to minimize bias by population stratification, all logistic regression models used in the
153 assessment of the associations in this study were adjusted for the contribution of admixture proportion, as
154 well as by other confounding factors.

155 The LPL and CETP enzymes participant in lipid metabolism, the LPL catalyzes the hydrolysis of TG
156 of VLDLs and chylomicrons and enhances the HDL-c level by processing HDL to its mature form, while
157 CETP facilitates the transfer of cholesteryl esters from HDL to apolipoprotein (Apo) B-containing
158 lipoproteins (VLDL, LDL), and exchanges them for cholesteryl esters from HDL. It has been reported that
159 a deficiency of LPL and CETP enzymes are related to the development of atherosclerosis, this deficiency
160 could be related to mutations or variants in their genes, or by altering molecules involved in its
161 metabolism [9, 21].

162 Several studies have found an association of SNP rs328 (S447X) in the *LPL* gene with lipid levels.
163 Ariza *et al.* found a significant decrease in serum TG levels in subjects carrying the GG (XX) genotype of

164 rs328 [22], similar results are reported by Webster *et al.* where they indicate that the 447X (G) allele at the
165 rs328 was associated with reduced TG levels ($p=0.0004$) and raised HDL-c levels ($p=0.0004$), the authors
166 mention that their results are limited to people with European ancestry and because they only studied four
167 variants in three genes involved in DT2, though many common variants have been identified that
168 influence metabolic traits and diabetes risk, additional studies are required [23]. On the other hand,
169 contrary to the studies described above, Emamian *et al.* found that CG+GG genotypes were significantly
170 associated with increased concentrations of TG ($p=0.044$), mentioning that one of the main limitations of
171 the study was the modest sample size [24]. In our study, we found significant association ($p=0.04$)
172 between women carrying the CC genotype rs328 with MetS compared with the carriers of the GG or CG
173 genotypes, finding association of this genotype with high blood pressure, high levels of glucose and
174 triglycerides, to have no statistical significance. We found low frequency of the GG genotype (3.5%),
175 which may be a limiting factor, so further studies are needed with a larger sample size to confirm this
176 association.

177 A number of SNPs have been described in the *CETP* gene. Most of these SNPs are associated with
178 reduced plasma CETP and HDL-c concentrations. Interestingly, environmental factors have been shown
179 to contribute to the association strength between these SNPs in the *CETP* gene and HDL-c concentration.
180 It has been reported that the SNP rs708272 (Taq1B) in the *CETP* gene influences CETP, HDL-c
181 concentration, and LDL-size. Carriers of the A (B2) allele of this polymorphism have been associated
182 with significantly decreased CETP concentrations, raised HDL-c levels, and increased LDL-particle
183 diameter [25]. Lopez-Rios *et al.*, found in a population of Spain, that the GG (B1B1) genotype carriers
184 showed significantly lower HDLc concentrations than the B2-allele (A) carriers ($p<0.001$), as well as
185 higher glucose levels after the oral glucose tolerance test [26]. Similar results were found by Elsammak *et*
186 *al.* who reported similar genotypic frequencies to our study, and that serum levels of HDL-c was
187 significantly higher in subjects with the AA (B2B2) genotype than those with B1B1 genotype, also they
188 found a significant difference in the distribution of the different genotypes of the Taq1B polymorphism
189 between controls and patients with metabolic syndrome ($p=0.03$) [27].

190 In this study we found, in a model of overdominant inheritance, an increased risk of MetS in women
191 carrying GA genotype (OR=1.8; 95%CI:1.2-2.8; $p=0.006$) compared with carriers of AA or GG
192 genotypes, even after adjusting for confounding factors such as age, years of schooling and by the
193 admixture proportion (Native American, European and African). This may mean that the homozygous be
194 for both alleles confer protection to the development of MetS, as indicated by our results, and that having
195 a copy for both alleles (heterozygous) alters this protection. Experimental studies are needed to confirm or
196 refute this hypothesis.
197

198 **Materials and Methods**

199 *1.1. Subjects*

200 A cross-sectional study was conducted in 480 female university workers, older than 30 years, residents
201 and native of Guerrero, Mexico, a state located in the southwestern part of the country, whose parents and
202 grandparents were also born in Guerrero. Pregnant women, with myocardial infarction, angina pectoris,
203 cancer or hormone replacement therapy, were excluded. The project was approved by the Ethics
204 Committee of the Autonomous University of Guerrero. All women agreed to participate in the study by
205 means of written informed consent. Measurements of weight, height, waist circumference (WC) and blood
206 pressure (BP) were performed on each of the women participating in the study. Blood samples were
207 obtained after fasting for 12 hours for biochemical measurements and DNA extraction.

208 1.2. *Diagnosis of Metabolic Syndrome*

209 We used the criteria from the NCEP-ATP III for the diagnosis of MetS for women: waist
210 circumference ≥ 88 cm (abdominal obesity), blood pressure elevation ($\geq 130/85$ mmHg), low HDL-c (< 50
211 mg/dL), high triglycerides (≥ 150 mg/dL), and hyperglycemia (fasting glucose ≥ 110 mg/dL or a previous
212 diagnosis of diabetes).

213 1.3. *Biochemical Assays*

214 Serum levels of glucose, total cholesterol, triglycerides, HDL-c and LDL-c were determined using
215 conventional enzymatic methods with commercially available kits (Spinreact, Spain).

216 1.4. *Genomic DNA Isolation and Genotyping*

217 Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes using the nonenzymatic rapid technique
218 [10]. Six SNPs were genotyped in the *ESR1* gene (rs1884051, rs2077647, rs3798577, rs1801132,
219 rs2234693, rs9340799), two in the *LPL* gene (rs328 and rs320) and one in the *CETP* gene (rs708272),
220 using the 5'-nuclease assay for real-time PCR with specific TaqMan probe for each SNP (7500 Real-
221 Time, Life Technology, Applied Biosystems, USA). In 10% of randomly selected samples, genotyping
222 was performed in duplicate and 100% concordance was found.

223 1.5. *Ancestry Informative Markers*

224 In order to reduce population stratification bias, a panel of ancestry informative markers (AIMs) was
225 determined. The AIMs used in this study were biallelic SNPs that were selected with Affymetrix Human
226 100K chip, based on the informativeness for ancestry in the ancestral population samples genotyped.
227 Because our population is a mixture of the three ancestral populations: African, European and Native
228 Americans, SNPs were selected if the difference in allele frequency (delta value) was at least 0.5 (scale of
229 0 a1) between either ancestral populations. 104 AIMs were selected, which were distributed across the
230 genome, a physical distance between them such that were in linkage equilibrium in the three ancestral
231 populations (distance between markers was about 2.4×10^7 bp). Genotyping was performed using iPLEX
232 reagents and protocols for multiplex PCR, single base primer extension (SBE) and generation of mass
233 spectra, as per the manufacturer's instructions (Sequenom, San Diego).

234 1.6. *Statistical Analysis*

235 Data are presented as median (25th-75th percentile), or percentage of total for qualitative variables. To
236 compare medians and frequencies between groups, Mann Whitney or Chi-square (X^2) tests were used.
237 Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was verified using the X^2 test with one degree of freedom.
238 Haplotype frequencies and linkage disequilibrium was calculated using the genetic data analysis program
239 SNPstats (<http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats>). Logistic regression models were adjusted for age,
240 years of schooling and by the admixture proportion (Native American, European and African) to assess
241 the association between the different SNPs, haplotypes and AIMs in women with or without MetS.
242 Statistical analysis was performed using STATA software (v.11.2). P values uncorrected ($P < 0.05$) or
243 corrected ($p < 0.01$) for the analysis of SNPs based on the method of correction for multiple comparisons
244 were used [11].

245 **Conclusion**

246 In conclusion, our results show the participation of the variants in the *ESRI*, *LPL* and *CETP* genes in
247 metabolic events related to MetS or some of its features in a Mexican mestizo population. Suggesting that
248 SNPs in these genes may be involved in mechanisms related to MetS, such as lipid and carbohydrate
249 metabolism and could contribute to metabolic abnormalities.

250 **Acknowledgments**

251 This research was supported by the Secretariat of Public Education of Mexico, through of the PIFI,
252 PROMEP/103.5/12/3616. During the study José Ángel Cahua-Pablo was a grant recipient of the Consejo
253 Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) of Mexico. We thank Travis Ashworth for his
254 contribution to the revision of the grammar of English that made the manuscript.

255 **Author Contributions**

256 EFA, MC, and AVV conceived, designed the experiments and contributed reagents/materials/analysis
257 tools; JACP, AMP, DLAO, LCAR, VATF, AVS, and CPPM recruited women in different towns in the
258 state of Guerrero, and contributed to the realization of measurements and writing of the manuscript; EJP,
259 and MALV analyzed the data.

260 **Conflicts of Interest**

261 The authors declare no conflict of interest.

262 **References**

- 263 1. Wilson, P.W.F.; D'Agostino, R.B.; Parise H.; Sullivan, L.; Meigs, J.B. Metabolic syndrome as
264 a precursor of cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus. *Circulation* **2005**, *112*,
265 3066-3072.

- 266 2. Executive Summary of the Third Report of The National Cholesterol Education Program
267 (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in
268 Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* **2001**, *285*, 2486–2497.
- 269 3. Grundy, S.M.; Brewer, H. B. Jr.; Cleeman, J.I.; Smith, S.C.Jr.; Lenfant, C. Definition of
270 metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart
271 Association conference on scientific issues related to definition. *Arterioscler. Thromb. Vasc.*
272 *Biol.* **2004**, *109*, 433-438.
- 273 4. Miller, V.M.; Duckles, S.P. Vascular actions of estrogens: functional implications. *Pharmacol.*
274 *Rev.* **2008**, *60*, 210-241.
- 275 5. Gallagher, C.J.; Langefeld, C.D.; Gordon, C.J.; Campbell, J.K.; Mychaleckyj, J.C.; Bryer-Ash,
276 M.; Rich, S.S.; Bowden, D.W.; Sale, M.M. Association of the estrogen receptor-alpha gene
277 with the metabolic syndrome and its component traits in African-American families: the
278 Insulin Resistance Atherosclerosis Family Study. *Diabetes* **2007**, *56*, 2135-2141.
- 279 6. Ghattas, M.H.; Mehanna, E.T.; Mesbah N.M.; Abo-Elmatty, D. M. Association of estrogen
280 receptor alpha gene polymorphisms with metabolic syndrome in Egyptian women.
281 *Metabolism* **2013**, *62*, 1437-1442.
- 282 7. Deroo, B.J.; Korach, K.S. Estrogen receptors and human disease. *J. Clin. Invest.* **2006**, *116*,
283 561-570.
- 284 8. Yasuda, T.; Ishida, T.; Rader, D.J. Update on the role of endothelial lipase in high-density
285 lipoprotein metabolism, reverse cholesterol transport, and atherosclerosis. *Cir. J.* **2010**, *74*,
286 2263-2270.
- 287 9. Nagano, M.; Yamashita, S.; Hirano, K.; Takano, M.; Maruyama, T.; Ishihara, M.; Sagehashi,
288 Y.; Kujiraoka, T.; Tanaka, K.; Hattori, H.; Sakai, N.; Nakajima, N.; Egashira, T.; Matsuzawa,
289 Y. Molecular mechanisms of cholesteryl ester transfer protein deficiency in Japanese. *J.*
290 *Atheroscler. Thromb.* **2004**, *11*, 110-121.

- 291 10.Lahiri, D.K.; Nurnberger, J.I.Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW
292 DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*, 5444.
- 293 11.Cheverud, J.M. A simple correction for multiple comparisons in intervalmapping genome
294 scans. *Heredity* **2001**, *87*, 52–58.
- 295 12.Kaur, J. A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiol. Res. Pract.* **2014**, 1-21.
- 296 13.Grundy, S.M. Metabolic syndrome pandemic. *Arterioscler. Thromb. Vas. Biol.* **2008**, *28*, 629-
297 636.
- 298 14.Heiss, G.; Snyder, M.L.; Teng, Y.; Schneiderman, N.; Llabre, M.M.; Cowie, C.; Carnethon,
299 M.; Kaplan, R.; Giachello, A.; Gallo, L.; Loehr, L.; Avilés-Santa, L. Prevalence of metabolic
300 syndrome among Hispanics/Latinos of diverse background: the Hispanic Community Health
301 Study/Study of Latinos. *Diabetes care* **2014**, *37*, 2391-2399.
- 302 15.Rojas, R.; Aguilar-Salinas, C.A.; Jiménez-Corona, A.; Shamah-Levy, T.; Rauda, J.; Avila-
303 Burgos, L.; Villalpando, S.; Ponce, E.L. Metabolic syndrome in Mexican adults: results from
304 the National Health and Nutrition Survey 2006. *Salud Publica Mex.* **2010**, *52*, S11-S18.
- 305 16.Faulds, M.H.; Zhao, C.; Dahlman-Wright, K.; Gustafsson, JA. The diversity of sex steroid
306 action: regulation of metabolism by estrogen signaling. *J. Endocrinol.* **2012**, *212*, 3-12.
- 307 17.Alonso-Magdalena, P.; Ropero, A.B.; Carrera, M.P.; Cederroth, C.R.; Baquié, M.; Gauthier,
308 B.R.; Nef, S.; Stefani, E.; Nadal, A. Pancreatic insulin content regulation by the estrogen
309 receptor ER alpha. *PLoS One* **2008**, *3*, E2039
- 310 18.Goulart, A.C.; Zee, R.Y.; Pradhan, A.; Rexrode, K.M. Associations of the estrogen receptors
311 1 and 2 gene polymorphisms with the metabolic syndrome in women. *Metab. Syndr. Relat.*
312 *Disord.* **2009**, *7*, 111-117.
- 313 19.Rebelo, A.C.; Verlengia, R.; Kunz, V.; Tamburus, N.; Cerda, A.; Hirata, R.; Hirata, M.; Silva,
314 E. Lack of association of estrogen receptor alpha gene polymorphisms with cardiorespiratory
315 and metabolic variables in young women. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 13691-13703.

- 316 20. Gallagher, C.J.; Langefeld, C.D.; Gordon, C.J.; Campbell, J.K.; Mychaleckyj, J.C.; Bryer-Ash,
317 M.; Rich, S.S.; Bowden, D.W.; Sale, M.M. Association of the estrogen receptor-alpha gene
318 with the metabolic syndrome and its component traits in African-American families: the
319 Insulin Resistance Atherosclerosis Family Study. *Diabetes* **2007**, *56*, 2135-2141.
- 320 21. Dallinga-Thie, G.M.; Franssen, R.; Mooij, H.L.; Visser, M.E.; Hassing, H.C.; Peelman, F.;
321 Kastelein, J.J.; Péterfy, M.; Nieuwdorp, M. The metabolism of triglyceride-rich lipoproteins
322 revisited: new players, new insight. *Atherosclerosis* **2010**, *211*, 1-8.
- 323 22. Ariza, M.J.; Sánchez-Chaparro, M.A.; Barón, F.J.; Hornos, A.M.; Calvo-Bonacho, E.; Rioja,
324 J.; Valdivielso, P.; Gelpi, J.A.; González-Santos, P. Additive effects of LPL, APOA5 and
325 APOE variant combinations on triglyceride levels and hypertriglyceridemia: results of the
326 ICARIA genetic sub-study. *BMC Med. Genet.* **2010**, *29*, 1-10.
- 327 23. Webster, R.J.; Warrington, N.M.; Weedon, M.N.; Hattersley, A.T.; McCaskie, P.A.; Beilby,
328 J.P.; Palmer, L.J.; Frayling, T.M. The association of common genetic variants in the APOA5,
329 LPL and GCK genes with longitudinal changes in metabolic and cardiovascular traits.
330 *Diabetologia* **2009**, *52*, 106-114.
- 331 24. Emamian, M.; Avan, A.; Pasdar, A.; Mirhafez, S.R.; Sadeghzadeh, M.; Moghadam, M.;
332 Parizadeh, S.M.; Ferns, G.A.; Ghayour-Mobarhan, M. The lipoprotein lipase S447X and
333 cholesteryl ester transfer protein rs5882 polymorphisms and their relationship with lipid
334 profile in human serum of obese individuals. *Gene* **2015**, *558*, 195-199.
- 335 25. Sandhofer, A.; Tatarczyk, T.; Laimer, M.; Ritsch, A.; Kaser, S.; Paulweber, B.; Ebenbichler,
336 C.F.; Patsch, JR. The Taq1B-variant in the cholesteryl ester-transfer protein gene and the
337 risk of metabolic syndrome. *Obesity* **2008**, *16*, 919-922.
- 338 26. López-Ríos, L.; Nóvoa, F.J.; Chirino, R.; Varillas, F.; Boronat-Cortés, M.; Wagner, A.M.
339 Interaction between cholesteryl ester transfer protein and hepatic lipase encoding genes and
340 the risk of type 2 diabetes: results from the Telde study. *PLoS One* **2011**, *6*, e27208.

Int. J. Mol. Sci. **2015**, *16*

341 27.Elsammak, M.Y.; Al-Sharkaweey, R.M.; Fahmy, M.; Reda, A.A.; Farid, W.; Emara, A.;
342 Hassan, H.; Kandil, M.H. Taq1B polymorphism of cholesteryl ester transfer protein (CETP) in
343 Egyptian patients with metabolic syndrome. *Diabetes Metab. Syndr.* **2011**, *5*, 61-65.

344

345

CAPÍTULO II

**Analysis of the ancestral contribution of women in the state
of Guerrero, Mexico**

Analysis of the ancestral contribution of women in the state of Guerrero, Mexico

Introduction

Ancestry y informative markers (AIMs) are genetic loci showing large frequency differences between populations that are useful to study the ancestral contributions to recently admixed groups [1,2] AIMs are often used in genome association studies to test for the genetic homogeneity of the studied population and to correct for possible population stratification [3]. Panels of AIMs for Latin American populations have been proposed [4]. These maps will allow the application of admixture mapping studies as an approach for the identification of genetic risk factors for complex diseases in populations of mixed ancestry. The majority of the contemporary Mexican population is Mestizo in origin, which means that it originated as a result of admixture between Europeans, Native Americans and in smaller proportion by Africans brought to the country [4].

Keywords: ancestry, admixture, AIMs, population admixture, Mexicans.

Materials and Methods

Four hundred eighty women university workers, older than 30 years, residents and native of Guerrero, Mexico, a state located in the southwestern part of the country, whose parents and grandparents were also born in Guerrero. Pregnant women, with myocardial infarction, angina pectoris, cancer or hormone replacement therapy, were excluded. The project was approved by the Ethics Committee of the Autonomous University of Guerrero

Selection of AIMs.

The AIMs used in this study were biallelic SNPs that were selected with Human 100K Affymetrix chip, based on the informativeness for ancestry in the ancestral population samples genotyped. Because our population is a mixture of the three ancestral populations: African, European and Native Americans, SNPs were selected if the difference in allele frequency (delta value) was at least 0.5 (scale of 0 a1) between either ancestral populations. 104 AIMs were selected, which were distributed across the genome, a physical distance between them such that were in linkage equilibrium in the three ancestral populations (distance between markers was about 2.4×10^7 bp).

Sample QC and genotyping.

Quality control was performed on all DNA using a two-part procedure. Quantitative QC (part 1) involved non-allelic quantitative real-time PCR using a single TaqMan probe in order to ensure ability to amplify the DNA samples. Qualitative QC. (part 2) an end-point reading from an Taqman allelic-discrimination (SNP) assay, and in addition to providing a second measure of the ability of PCR to amplify each sample, it is a sensitive indicator of sample-to-sample cross-contamination (which shows up as dispersed clusters). Genotyping was performed using iPLEX reagents and protocols for multiplex PCR, single base primer extension (SBE) and generation of mass spectra, as per the manufacturer's instructions. Only 104 generated call rates at 90 or higher.

Multiplexed PCR was performed in 5- μ l reactions on 384-well plates containing 5 ng of genomic DNA. Reactions contained 0.5 U HotStarTaq polymerase (QIAGEN), 100 nM primers, 1.25 x HotStar Taq buffer, 1.625 mM MgCl₂, and 500 μ M dNTPs. Following enzyme activation at 94°C for 15 min, DNA was amplified with 45 cycles of 94°C x 20s, 56°C x 30s, 72°C x 1 min, followed by a 3-min extension at 72°C. Unincorporated dNTPs were removed using shrimp alkaline phosphatase (0.3 U, Sequenom). Single-base extension was carried out by addition of SBE primers at concentrations from 0.625 μ M (low MW primers) to 1.25 μ M (high MW primers) using iPLEX enzyme and buffers (Sequenom, San Diego) in 9- μ l reactions. Reactions were desalted and SBE products measured using the MassARRAY Compact system, and mass spectra analyzed using TYPER software (Sequenom, San Diego), in order to generate genotype calls and allele frequencies.

Analyses admixture

Average admixture proportions, the sum of intensities parameter (equivalent to the average number of generations since the admixture event) and the individual ancestry proportions were estimated using the software ADMIXMAP v3.2 for Windows.

Results

The state of Guerrero, Mexico is one of the 31 states that along with Distrito Federal, comprise the 32 states of Mexico. Its capital is the city of Chilpancingo de los Bravo. The state of Guerrero is territorially divided into seven regions, which distinguish economic, social, cultural and geographical features: Acapulco, Centro, Costa Chica, Costa Grande, Montaña, Norte and Tierra Caliente. Estimates of admixture proportions were obtained using data from 104 ancestry informative markers (AIMs). The average proportion of the ancestral contribution Native American, European and African were 69.2%, 27.1% and 3.7%, respectively (Figure 1).

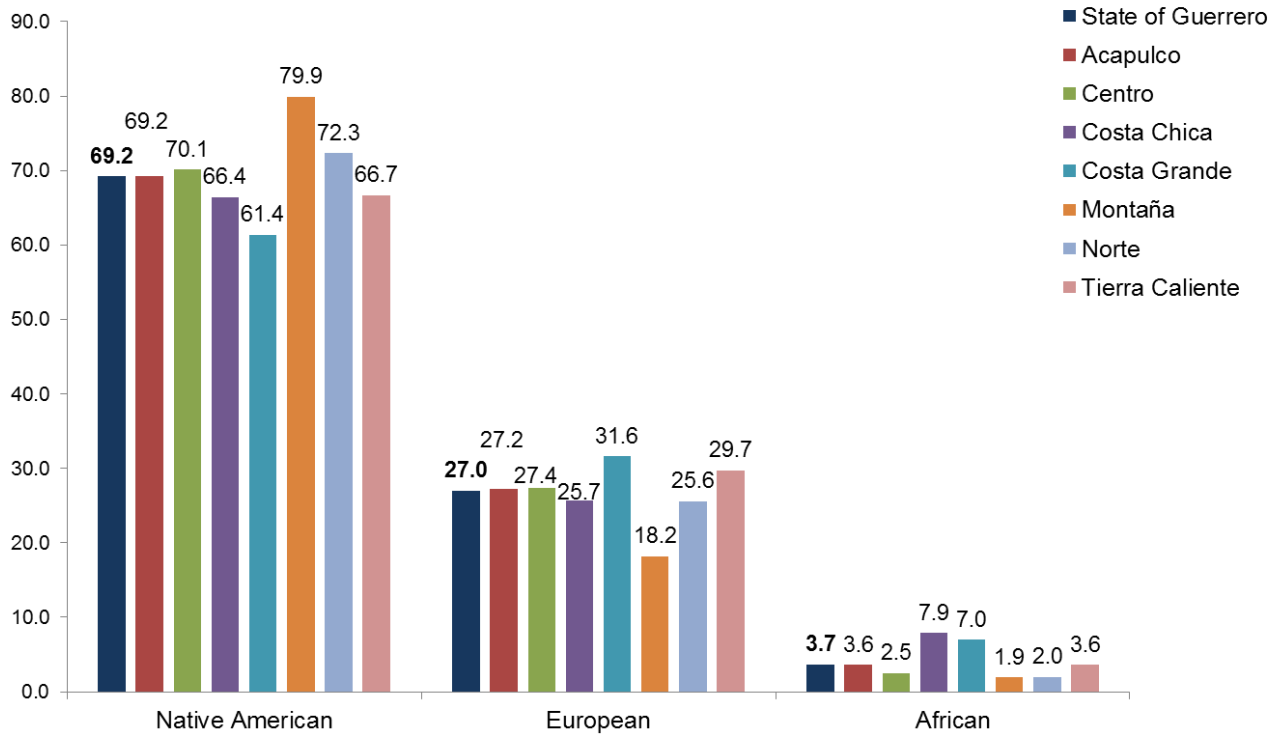


Figure 1. Shown the ancestral distribution by region observing for the mountain region Native American ancestral contribution of 79.9%, being higher than the other regions, a greater European contribution is also observed in the region of the Costa Grande of a 31.6%, finally the Costa Chica y Costa Grande is noted for a contribution African of 7.9% and 7.0% respectively.

Table 1 shows the significant differences found in the analysis of variance of the average proportions of ancestral contribution through geographical regions of the state of Guerrero.

Table 1. Significant differences between regions

	Native American		European		African
p<0.05	Acapulco vs Montaña	p<0.01	Centro vs montaña	p<0.05	Acapulco vs Costa Grande
p<0.001	Centro vs Montaña	p<0.001	Costa grande vs montaña	p<0.01	Acapulco vs Costa Chica
p<0.001	Centro vs Costa Grande	p<0.001	Montaña vs Tierra caliente	p<0.001	Centro vs Costa Chica
p<0.001	Costa Chica vs Montaña			p<0.001	Centro vs Costa Grande
p<0.001	Costa Grande vs Montaña			p<0.001	Costa Chica vs Montaña
p<0.001	Costa Grande vs Norte			p<0.001	Costa Chica vs Norte
p<0.001	Montaña vs Tierra Caliente			p<0.001	Costa chica vs Tierra Caliente
				p<0.001	Costra Grande vs Montaña
				p<0.001	Costa Grande vs Norte
				p<0.001	Costa rande vs Tierra Caliente

Through logistic regression models adjusted for age and years of schooling, no significant associations between the average contribution ancestral Native American or African with metabolic syndrome or the risk of coronary heart disease (data not shown) were found.

Discussion

A panel of ancestry informative markers (AIMs) was used to determine the percentage of genetic mixing in the female population in the state of Guerrero. The Native American ancestral contribution (69.2%), Europe (27.1%) and Africa (3.7%) was estimated. This is similar to that reported by Silva-Zolezzi et al, in a population of Native Mexican [5]. On the other hand, in a study in a population of Tlapa, Bonilla et al, reports a Native American ancestral contribution of up to 98.5%, this shows that in this population is little admixture with Europeans and Africans[6]. Different that reported in our population and the diversity and the genetic contribution they have seen and observed more marked phenotypic traits present in individuals and are characteristic of the population Native American, European and African. In conclusion, women in the state of Guerrero high Native American ancestry (69.2%) that could modify the risk of certain diseases compared with women from other parts of the world is observed. Suggesting that heterogeneity is an important feature that should be taken into account when epidemiological studies are designed in Mexican population

References

1. Shriver, M.D., et al., *Skin pigmentation, biogeographical ancestry and admixture mapping*. Human genetics, 2003. **112**(4): p. 387-399.
2. Collins-Schramm, H.E., et al., *Mexican American ancestry-informative markers: examination of population structure and marker characteristics in European Americans, Mexican Americans, Amerindians and Asians*. Human genetics, 2004. **114**(3): p. 263-271.
3. Hoggart, C.J., et al., *Control of confounding of genetic associations in stratified populations*. The American Journal of Human Genetics, 2003. **72**(6): p. 1492-1504.
4. Mao, X., et al., *A genomewide admixture mapping panel for Hispanic/Latino populations*. The American Journal of Human Genetics, 2007. **80**(6): p. 1171-1178.
5. Silva-Zolezzi, I., et al., *Analysis of genomic diversity in Mexican Mestizo populations to develop genomic medicine in Mexico*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. **106**(21): p. 8611-8616.
6. Bonilla, C., et al., *Admixture analysis of a rural population of the state of Guerrero, Mexico*. American journal of physical anthropology, 2005. **128**(4): p. 861-869

Discusión y conclusiones

El síndrome metabólico (SM) es una combinación de desórdenes metabólicos que está asociado con un incremento en la susceptibilidad a diabetes tipo 2 (DT2) y ECV (Cruz et al., 2010, Kaur, 2014). Se han propuesto múltiples definiciones, de acuerdo al ATP III (por sus siglas en inglés Adult Treatment Panel III), el SM está caracterizado por tres o más de las siguientes características: obesidad abdominal, niveles séricos disminuidos de cHDL, incremento en los TG y glucosa en ayuno (Antonopoulos, 2002). En este estudio reportamos una prevalencia de SM en mujeres guerrerenses de 33.1 %, siendo más baja a la reportada a nivel nacional (42.2%). Nuestros resultados son diferentes a los reportados en población dominicana (14%) (Grundy, 2008) y similares a los reportados por Heiss *et al* en una población con origen hispano/latino, donde ellos reportan una prevalencia de 36% para mujeres y 34% en hombres (Heiss et al., 2014).

Se han sugerido polimorfismos en genes candidatos de acuerdo a su importancia biológica y a su asociación con SM. Diversos estudios han demostrado que polimorfismos en el gen del *ESR1* participan en procesos y alteraciones metabólicas, incluyendo ECV, resistencia a la insulina, DT2, hipertensión y metabolismo de lipoproteínas (Alonso-Magdalena et al., 2008, Faulds et al., 2012, Rettberg et al., 2014). En este estudio no encontramos asociación de los SNPs en el *ESR1* con SM, nuestros resultados coinciden con los reportados por Goulart *et al*. En una población de mujeres caucásicas postmenopausicas donde ellos no encuentran relación de los SNPs tanto del *ESR1* y *ESR2* con SM (Goulart et al., 2009). Sin embargo, Gallagher *et al* en familias africoamericanas, reportan asociación del polimorfismo rs9340799 en el *ESR1* con SM y el alelo C del rs22340799 con reducción de la sensibilidad a la insulina (Gallagher et al., 2007). En nuestro estudio solo el genotipo AA del SNP rs1884051 se asoció con niveles elevados de glucosa, esto nos indica que esta variante podría participar en resistencia a la insulina en población guerrerense.

También se realizó un análisis de haplotipos para las 6 variantes del *ESR1*, encontrando una disminución significativa al riesgo de SM con el haplotipo ACTCCG ($p < 0.001$). Por su parte, Gallagher al hacer el análisis entre los diferentes bloques de SNPs que ellos analizaron no reportan ninguna asociación significativa entre los haplotipos con SM (Gallagher et al., 2007).

Los variantes analizadas fueron: **rs2077647** es una mutación silente situado en el exón 1 (S10S). Esta ubicación corresponde a el dominio estructural A/B, contiene un dominio co-regulador al cual se unen co-activadores o co-represores y tiene un papel importante para la modulación de la transcripción ER- α (Anghel et al., 2010). El **rs2234693** y **rs9340799** se localizan en el intrón 1 y están en desequilibrio de ligamiento, el mecanismo funcional posible que se atribuye a estos polimorfismos incluye un cambio en la expresión del gen de *ESR1* por una alteración en la unión de factores de transcripción y la influencia del splicing alternativo del gen de *ESR1*, han sido relacionados con el SM y resistencia a la insulina tal y como lo reporta Gallagher y colaboradores en el 2007 en un estudio echo en familias Afroamericanas (Gallagher et al., 2007), el **rs1801132** es una mutación silente, en el codón 325 (Pro325Pro) del exón 4. Representa un blanco para potenciadores del splicing exonicos sc35 y sf2 (factores de splicing ricos en serina arginina) que interactúan con el RNA nucleolar pequeño y son necesarios para la primera etapa en el reacción de splicing y el ensamblaje del spliceosoma (Anghel et al., 2010) además, este polimorfismo se ha relacionado con los niveles de lípidos en plasma y apolipoproteínas en caucásicos (Klos et al., 2008). El **rs3798577**, este polimorfismo se encuentra en la región 3'-UTR del gen *ESR1*. Aunque su funcionalidad no se conoce todavía, tomando en cuenta esa región 3'-UTR está asociada con microRNAs y factores de splicing, parece modular la expresión de RE (Anghel et al., 2010), así como también fue asociado significativamente con concentraciones de estradiol circulantes (Sowers et al., 2006). el **rs1884051**, es mutación silente que no afecta la secuencia de aminoácidos de la proteína de ER- α , sin embargo se le ha relacionado con DT2 y obesidad (Doo and Kim, 2011). Estos SNPs en el *ESR1* están en un fuerte desequilibrio de ligamiento, se encuentran ubicados en regiones que afectan la transcripción del RE- α , así como

también en regiones intrónicas y exónicas importantes para el splicing alternativo que da lugar a isoformas del RE- α , algunas de las cuales podrían ser variantes que carecen de dominios funcionales los cuales codifican para proteínas truncadas del RE- α (Hopp and Fuqua, 1998). Es conocido que el RE- α participa en la regulación del balance energético, peso corporal distribución de la grasa y apetito en ratones (Dubuc, 1985). Los estrógenos modulan la síntesis y secreción de leptina vía mecanismo transcripcional dependiente de RE (Machinal et al., 1999). La leptina es una hormona metabólica importante en la regulación central del metabolismo e interacciona con el receptor de leptina (LEPR) en el hipotálamo. La forma b (LEPRb) es importante en la regulación del balance energético (Bacart et al., 2010). Se ha reportado que el LEPRb está co-localizado con el RE- α en el hipotálamo, los estrógenos regulan la expresión del mRNA del LEPRb vía elementos de respuesta a estrógenos (ERE) en gen *LEPR*, lo cual sugiere una interacción entre esta vía para la regulación de la homeostasis de la energía y alteraciones del RE- α afecten la señalización de leptina río abajo de transcripción/translocación de la leptina (Faulds et al., 2012)

Los mecanismos por los cuales el E2-RE, ejerce su acción y regula el metabolismo no son totalmente esclarecidos, sin embargo, datos sugieren que el E2 es benéfico para la sensibilidad a la insulina, mientras el hipo o hiperestrogenismo están relacionados con RI (Livingstone and Collison, 2002). El E2 regula la utilización de glucosa a través de sus acciones en varias proteínas de la vía de señalización de la insulina y en la expresión y translocación de GLUT4, tal como lo reporta Rogers et al., en ratas que muestra una homeostasis de glucosa normal, el E2 estimula la fosforilación de Akt, AMPK y el sustrato TBC1D1 y TBC1D4 de Akt, que son proteínas homologas implicadas en la regulación de la captación de glucosa en musculo (Rogers et al., 2009). La administración de E2 en ratas o ratones que son resistentes a insulina se incrementa IRS-1 y la concentración de la forma fosforilada de Akt en musculo, restaurando la acción de la insulina (Riant et al., 2009). Por otro lado, en modelos animales cuando se silencia el *ESR1* se disminuye la translocación del GLUT4, resistencia a la insulina y se da lugar a un fenotipo obeso (Galluzzo et al., 2009). En mujeres después de la menopausia, con la disminución de la producción de E2, se

presenta, resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, incremento en la grasa visceral, acumulación de lípidos y una disminución en la utilización de estos, aumentando así el riesgo al desarrollo de DT2 y ECV, la incidencia de SM en mujeres posmenopáusicas es similar al de los hombres.

Se usó un panel de marcadores informativos de ancestría (AIMs) para determinar el porcentaje de mezcla genética en la población de mujeres del estado de Guerrero. Se estimó la contribución ancestral nativo americana (69.2%), europea (27.1%) y africana (3.7%), esto es similar a lo reportado por Silva-Zolezzi et al, en una población de mestizos mexicanos, encontrando evidencias de diferencias entre subpoblaciones mexicanas que deberían de ser consideradas para diseñar y analizar estudios de asociación de enfermedades complejas(Silva-Zolezzi et al., 2009). Por otro lado, en un estudio echo en una población de Tlapa, Bonilla et al, reporta una contribución ancestral nativo americana de hasta un 98.5%, esto demuestra que en esta publicación es poca la mezcla con europeos y africanos (Bonilla et al., 2005).

En conclusión, en mujeres del estado de Guerrero se observa una alta ancestría nativa americana (69.2%) que podría modificar el riesgo a ciertas enfermedades comparadas con mujeres de otras partes del mundo. Sugiriendo que la heterogeneidad es una característica importante que debe de ser tomada en cuenta cuando se diseñan estadios epidemiológicos en población mexicana.

Nuestros resultados muestran una leve participación de las variantes en el gen *ESR1* en eventos metabólicos relacionados con SM o alguna de sus características en una población mestiza. También se sugiere que estos SNPs en conjunto, pueden estar involucrados en mecanismos relacionados con la disminución al riesgo de SM, y por tanto, menor riesgo de DT2 o ECC, y la ancestría Nativo Americana o Europea no contribuyen al riesgo de SM o de ECC en las mujeres estudiadas.

REFERENCIAS

- ACCONCIA, F. & MARINO, M. 2011. The Effects of 17beta-estradiol in Cancer are Mediated by Estrogen Receptor Signaling at the Plasma Membrane. *Front Physiol*, 2, 30.
- ALMEIDA, S. & HUTZ, M. 2006. Estrogen receptor 1 gene polymorphisms and coronary artery disease in the Brazilian population. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 39, 447-454.
- ALONSO-MAGDALENA, P., ROPERO, A. B., CARRERA, M. P., CEDERROTH, C. R., BAQUIE, M., GAUTHIER, B. R., NEF, S., STEFANI, E. & NADAL, A. 2008. Pancreatic insulin content regulation by the estrogen receptor ER alpha. *PLoS One*, 3, e2069.
- ANGHEL, A., NARITA, D., SECLAMAN, E., POPOVICI, E., ANGHEL, M. & TAMAS, L. 2010. Estrogen receptor alpha polymorphisms and the risk of malignancies. *Pathology & Oncology Research*, 16, 485-496.
- ANTONOPOULOS, S. 2002. Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*, 106, 3421.
- BACART, J., LELOIRE, A., LEVOYE, A., FROGUEL, P., JOCKERS, R. & COUTURIER, C. 2010. Evidence for leptin receptor isoforms heteromerization at the cell surface. *FEBS letters*, 584, 2213-2217.
- BARROS, R. P., GABBI, C., MORANI, A., WARNER, M. & GUSTAFSSON, J. A. 2009. Participation of ERalpha and ERbeta in glucose homeostasis in skeletal muscle and white adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 297, E124-33.
- BARROS, R. P. & GUSTAFSSON, J. A. 2011. Estrogen receptors and the metabolic network. *Cell Metab*, 14, 289-99.
- BELTRAN, A. 1981. La población negra de México. En: Secretaría de la Reforma Agraria (Eds). *Estudio Etnohistórico Mexico, Centro de Estudios del Agrarismo en México*.
- BJORNHOLM, M. & ZIERATH, J. R. 2005. Insulin signal transduction in human skeletal muscle: identifying the defects in Type II diabetes. *Biochem Soc Trans*, 33, 354-7.
- BLANCAS-FLORES, G., ALMANZA-PÉREZ, J. C., LÓPEZ-ROA, R. I., ALARCÓN-AGUILAR, F. J., GARCÍA-MACEDO, R. & CRUZ, M. 2010. La obesidad como un proceso inflamatorio. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 67, 88-97.
- BONILLA, C., GUTIÉRREZ, G., PARRA, E. J., KLINE, C. & SHRIVER, M. D. 2005. Admixture analysis of a rural population of the state of Guerrero, Mexico. *American journal of physical anthropology*, 128, 861-869.
- BUDOWLE, B. & VAN DAAL, A. 2008. Forensically relevant SNP classes. *Biotechniques*, 44, 603-8, 610.
- BURGUETE-GARCIA, A. I., CRUZ-LOPEZ, M., MADRID-MARINA, V., LOPEZ-RIDAURA, R., HERNANDEZ-AVILA, M., CORTINA, B., GOMEZ, R. E. & VELASCO-MONDRAGON, E. 2010. Association of Gly972Arg polymorphism of IRS1 gene with type 2 diabetes mellitus in lean participants of a national health survey in Mexico: a candidate gene study. *Metabolism*, 59, 38-45.

- CAI, Q., GAO, Y. T., WEN, W., SHU, X. O., JIN, F., SMITH, J. R. & ZHENG, W. 2003. Association of breast cancer risk with a GT dinucleotide repeat polymorphism upstream of the estrogen receptor- α gene. *Cancer Res*, 63, 5727-30.
- CRUZ, M., MONTOYA, C., GUTIÉRREZ, M., WACHER, N. & KUMATE, J. 2002. Polimorfismo de genes relacionados con diabetes tipo 2. *Rev Med IMSS*, 40, 113-125.
- CRUZ, M., VALLADARES-SALGADO, A., GARCIA-MENA, J., ROSS, K., EDWARDS, M., ANGELES-MARTINEZ, J., ORTEGA-CAMARILLO, C., DE LA PENA, J. E., BURGUETE-GARCIA, A. I., WACHER-RODARTE, N., AMBRIZ, R., RIVERA, R., D'ARTOTE A, L., PERALTA, J., PARRA, E. J. & KUMATE, J. 2010. Candidate gene association study conditioning on individual ancestry in patients with type 2 diabetes and metabolic syndrome from Mexico City. *Diabetes Metab Res Rev*, 26, 261-70.
- CHAE, Y. K., HUANG, H. Y., STRICKLAND, P., HOFFMAN, S. C. & HELZLSOUER, K. 2009. Genetic Polymorphisms of Estrogen Receptors α and β and the Risk of Developing Prostate Cancer. *PLoS One*, 4.
- CHEN, Q., RAZZAGHI, H., DEMIRCI, F. Y. & KAMBOH, M. I. 2008. Functional significance of lipoprotein lipase HindIII polymorphism associated with the risk of coronary artery disease. *Atherosclerosis*, 200, 102-108.
- DAOUD, M. S., ATAYA, F. S., FOUAD, D., ALHAZZANI, A., SHEHATA, A. I. & AL-JAFARI, A. A. 2013. Associations of three lipoprotein lipase gene polymorphisms, lipid profiles and coronary artery disease. *Biomedical reports*, 1, 573-582.
- DEMISSIE, S., CUPPLES, L. A., SHEARMAN, A. M., GRUENTHAL, K. M., PETER, I., SCHMID, C. H., KARAS, R. H., HOUSMAN, D. E., MENDELSON, M. E. & ORDOVAS, J. M. 2006. Estrogen receptor- α variants are associated with lipoprotein size distribution and particle levels in women: The Framingham Heart Study. *Atherosclerosis*, 185, 210-218.
- DEROO, B. J. & KORACH, K. S. 2006. Estrogen receptors and human disease. *J Clin Invest*, 116, 561-70.
- DOO, M. & KIM, Y. 2011. Association between ESR1 rs1884051 polymorphism and dietary total energy and plant protein intake on obesity in Korean men. *Nutr Res Pract*, 5, 527-32.
- DUBUC, P. U. 1985. Effects of estrogen on food intake, body weight, and temperature of male and female obese mice. *Experimental Biology and Medicine*, 180, 468-473.
- FARHAT, M. Y., LAVIGNE, M. C. & RAMWELL, P. W. 1996. The vascular protective effects of estrogen. *FASEB J*, 10, 615-24.
- FAULDS, M. H., ZHAO, C., DAHLMAN-WRIGHT, K. & GUSTAFSSON, J. A. 2012. The diversity of sex steroid action: regulation of metabolism by estrogen signaling. *J Endocrinol*, 212, 3-12.
- GALLAGHER, C. J., LANGEFELD, C. D., GORDON, C. J., CAMPBELL, J. K., MYCHALECKYJ, J. C., BRYER-ASH, M., RICH, S. S., BOWDEN, D. W. & SALE, M. M. 2007. Association of the estrogen receptor- α gene with the metabolic syndrome and its component traits in African-American families: the Insulin Resistance Atherosclerosis Family Study. *Diabetes*, 56, 2135-41.

- GALLUZZO, P., RASTELLI, C., BULZOMI, P., ACCONCIA, F., PALLOTTINI, V. & MARINO, M. 2009. 17beta-Estradiol regulates the first steps of skeletal muscle cell differentiation via ER-alpha-mediated signals. *Am J Physiol Cell Physiol*, 297, C1249-62.
- GENNARI, L., MERLOTTI, D., DE PAOLA, V., CALABRO, A., BECHERINI, L., MARTINI, G. & NUTI, R. 2005. Estrogen Receptor Gene Polymorphisms and the Genetics of Osteoporosis: A HuGE Review. *Am. J. Epidemiol.*, 161, 307-320.
- GOULART, A. C., ZEE, R. Y., PRADHAN, A. & REXRODE, K. M. 2009. Associations of the estrogen receptors 1 and 2 gene polymorphisms with the metabolic syndrome in women. *Metab Syndr Relat Disord*, 7, 111-7.
- GRUNDY, S. M. 2008. Metabolic syndrome pandemic. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 28, 629-636.
- HEINE, P. A., TAYLOR, J. A., IWAMOTO, G. A., LUBAHN, D. B. & COOKE, P. S. 2000. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 12729-34.
- HEISS, G., SNYDER, M. L., TENG, Y., SCHNEIDERMAN, N., LLABRE, M. M., COWIE, C., CARNETHON, M., KAPLAN, R., GIACHELLO, A. & GALLO, L. 2014. Prevalence of metabolic syndrome among Hispanics/Latinos of diverse background: the Hispanic Community Health Study/Study of Latinos. *Diabetes Care*, 37, 2391-2399.
- HELDING, N., PIKE, A., ANDERSSON, S., MATTHEWS, J., CHENG, G., HARTMAN, J., TUJAGUE, M., STROM, A., TREUTER, E., WARNER, M. & GUSTAFSSON, J.-A. 2007. Estrogen Receptors: How Do They Signal and What Are Their Targets. *Physiol. Rev.*, 87, 905-931.
- HERRINGTON, D. M. 2003. Role of estrogen receptor- α in pharmacogenetics of estrogen action. *Current opinion in lipidology*, 14, 145-150.
- HODGSON, J. A., PICKRELL, J. K., PEARSON, L. N., QUILLEN, E. E., PRISTA, A., ROCHA, J., SOODYALL, H., SHRIVER, M. D. & PERRY, G. H. 2014. Natural selection for the Duffy-null allele in the recently admixed people of Madagascar. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 281, 20140930.
- HOGGART, C. J., SHRIVER, M. D., KITTLES, R. A., CLAYTON, D. G. & MCKEIGUE, P. M. 2004. Design and analysis of admixture mapping studies. *Am J Hum Genet*, 74, 965-78.
- HOPP, T. & FUQUA, S. W. 1998. Estrogen Receptor Variants. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 3, 73-83.
- HUANG, P., CHANDRA, V. & RASTINEJAD, F. 2010. Structural overview of the nuclear receptor superfamily: insights into physiology and therapeutics. *Annu Rev Physiol*, 72, 247-72.
- IKEWAKI, K., RADER, D., SAKAMOTO, T., NISHIWAKI, M., WAKIMOTO, N., SCHAEFER, J., ISHIKAWA, T., FAIRWELL, T., ZECH, L. & NAKAMURA, H. 1993. Delayed catabolism of high density lipoprotein apolipoproteins AI and A-II in human cholesteryl ester transfer protein deficiency. *Journal of Clinical Investigation*, 92, 1650.
- JIANG, M. & HUHTANIEMI, I. 2004. Polymorphisms in androgen and estrogen receptor genes: effects on male aging. *Experimental gerontology*, 39, 1603-1611.

- KAUR, J. 2014. A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiology research and practice*, 2014.
- KLERKX, A. H., TANCK, M. W., KASTELEIN, J. J., MOLHUIZEN, H. O., JUKEMA, J. W., ZWINDERMAN, A. H. & KUIVENHOVEN, J. A. 2003. Haplotype analysis of the CETP gene: not TaqIB, but the closely linked- 629C→ A polymorphism and a novel promoter variant are independently associated with CETP concentration. *Human molecular genetics*, 12, 111-123.
- KLINGE, C. M. 2001. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucl. Acids Res.*, 29, 2905-2919.
- KLOS, K. L., BOERWINKLE, E., FERRELL, R. E., TURNER, S. T. & MORRISON, A. C. 2008. ESR1 polymorphism is associated with plasma lipid and apolipoprotein levels in Caucasians of the Rochester Family Heart Study. *Journal of lipid research*, 49, 1701-1706.
- KOS, M., REID, G., DINGER, S. & GANNON, F. 2001. Minireview: genomic organization of the human ER {alpha} gene promoter region. *Molecular endocrinology*, 15, 2057.
- LANNIGAN, D. A. 2003. Estrogen receptor phosphorylation. *Steroids*, 68, 1-9.
- LE GOFF, P., MONTANO, M. M., SCHODIN, D. J. & KATZENELLENBOGEN, B. S. 1994. Phosphorylation of the human estrogen receptor. Identification of hormone-regulated sites and examination of their influence on transcriptional activity. *J Biol Chem*, 269, 4458-66.
- LIVINGSTONE, C. & COLLISON, M. 2002. Sex steroids and insulin resistance. *Clin Sci (Lond)*, 102, 151-66.
- LOPEZ-RIOS, L., NOVOA, F. J., CHIRINO, R., VARILLAS, F., BORONAT-CORTES, M. & WAGNER, A. M. 2011. Interaction between cholesteryl ester transfer protein and hepatic lipase encoding genes and the risk of type 2 diabetes: results from the Telde study. *PLoS One*, 6, e27208.
- LU, H., HIGASHIKATA, T., INAZU, A., NOHARA, A., YU, W., SHIMIZU, M. & MABUCHI, H. 2002. Association of estrogen receptor-alpha gene polymorphisms with coronary artery disease in patients with familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22, 817-23.
- MACHINAL, F., DIEUDONNE, M.-N., LENEVEU, M.-C., PECQUERY, R. & GIUDICELLI, Y. 1999. In vivo and in vitro ob gene expression and leptin secretion in rat adipocytes: evidence for a regional specific regulation by sex steroid hormones. *Endocrinology*, 140, 1567-1574.
- MARINO, M., GALLUZZO, P. & ASCENZI, P. 2006. Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. *Curr Genomics*, 7, 497-508.
- MARTINEZ-FIERRO, M. L., BEUTEN, J., LEACH, R. J., PARRA, E. J., CRUZ-LOPEZ, M., RANGEL-VILLALOBOS, H., RIEGO-RUIZ, L. R., ORTIZ-LOPEZ, R., MARTINEZ-RODRIGUEZ, H. G. & ROJAS-MARTINEZ, A. 2009. Ancestry informative markers and admixture proportions in northeastern Mexico. *J Hum Genet*, 54, 504-9.
- MARTINEZ-GOMEZ, L. E., CRUZ, M., MARTINEZ-NAVA, G. A., MADRID-MARINA, V., PARRA, E., GARCIA-MENA, J., ESPINOZA-ROJO, M., ESTRADA-VELASCO, B. I., PIZA-ROMAN, L. F., AGUILERA, P. & BURGUETE-GARCIA, A. I. 2011. A replication study of the IRS1, CAPN10, TCF7L2, and PPARG gene

- polymorphisms associated with type 2 diabetes in two different populations of Mexico. *Ann Hum Genet*, 75, 612-20.
- MENDELSON, M. E. & KARAS, R. H. 1999. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med*, 340, 1801-11.
- MILLER, V. M. & DUCKLES, S. P. 2008a. Vascular actions of estrogens: functional implications. *Pharmacological reviews*, 60, 210-241.
- MILLER, V. M. & DUCKLES, S. P. 2008b. Vascular actions of estrogens: functional implications. *Pharmacol Rev*, 60, 210-41.
- MORTON, R. E. 1999. Cholesteryl ester transfer protein and its plasma regulator: lipid transfer inhibitor protein. *Curr Opin Lipidol*, 10, 321-7.
- MUÑOZ-BARRIOS, S., GUZMÁN-GUZMÁN, I. P., MUÑOZ-VALLE, J. F., SALGADO-BERNABÉ, A. B., SALGADO-GOYTIA, L. & PARRA-ROJAS, I. 2012. Association of the HindIII and S447X polymorphisms in LPL gene with hypertension and type 2 diabetes in Mexican families. *Disease markers*, 33, 313-320.
- MURPHY, L. C., SEEKALLU, S. V. & WATSON, P. H. 2011. Clinical significance of estrogen receptor phosphorylation. *Endocrine-related cancer*, 18, R1-R14.
- NIEVERGELT, C. M. & SCHORK, N. J. 2005. Admixture mapping as a gene discovery approach for complex human traits and diseases. *Curr Hypertens Rep*, 7, 31-7.
- NORIEGA-REYES, M. & MCCARRON, E. 2008a. Correguladores del Receptor de Estrógenos y su Implicación en el Cáncer Mamario. *Cancerología*, 3, 29-40.
- NORIEGA-REYES, M. Y. & MCCARRON, L. 2008b. Correguladores del Receptor de Estrógenos y su Implicación en el Cáncer Mamario. *Cancerología*, 3, 29-40.
- OKURA, T., KODA, M., ANDO, F., NIINO, N., OHTA, S. & SHIMOKATA, H. 2003. Association of polymorphisms in the estrogen receptor alpha gene with body fat distribution. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 27, 1020-7.
- ORTI, E., BODWELL, J. E. & MUNCK, A. 1992. Phosphorylation of steroid hormone receptors. *Endocr Rev*, 13, 105-28.
- PARRA, E. J., MARCINI, A., AKEY, J., MARTINSON, J., BATZER, M. A., COOPER, R., FORRESTER, T., ALLISON, D. B., DEKA, R. & FERRELL, R. E. 1998. Estimating African American admixture proportions by use of population-specific alleles. *The American Journal of Human Genetics*, 63, 1839-1851.
- PATTERSON, N., HATTANGADI, N., LANE, B., LOHMUELLER, K. E., HAFLER, D. A., OKSENBERG, J. R., HAUSER, S. L., SMITH, M. W., O'BRIEN, S. J., ALTSHULER, D., DALY, M. J. & REICH, D. 2004. Methods for high-density admixture mapping of disease genes. *Am J Hum Genet*, 74, 979-1000.
- PERMUTT, M. A., WASSON, J. & COX, N. 2005. Genetic epidemiology of diabetes. *J Clin Invest*, 115, 1431-1439.
- RADER, D. J. 2006. Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies. *J Clin Invest*, 116, 3090-100.
- REBELO, A. C., VERLENGIA, R., KUNZ, V., TAMBURUS, N., CERDA, A., HIRATA, R., HIRATA, M. & SILVA, E. 2012. Lack of association of estrogen receptor alpha gene polymorphisms with cardiorespiratory and metabolic variables in young women. *International journal of molecular sciences*, 13, 13691-13703.
- REDGRAVE, T. 2004. Chylomicron metabolism. *Biochemical Society Transactions*, 32, 79-82.

- RETTBERG, J. R., YAO, J. & BRINTON, R. D. 2014. Estrogen: a master regulator of bioenergetic systems in the brain and body. *Frontiers in neuroendocrinology*, 35, 8-30.
- RIANT, E., WAGET, A., COGO, H., ARNAL, J.-F., BURCELIN, R. & GOURDY, P. 2009. Estrogens protect against high-fat diet-induced insulin resistance and glucose intolerance in mice. *Endocrinology*, 150, 2109-2117.
- RIP, J., NIERMAN, M. C., ROSS, C. J., JUKEMA, J. W., HAYDEN, M. R., KASTELEIN, J. J., STROES, E. S. & KUIVENHOVEN, J. A. 2006. Lipoprotein lipase S447X a naturally occurring gain-of-function mutation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 26, 1236-1245.
- ROGERS, N. H., WITCZAK, C. A., HIRSHMAN, M. F., GOODYEAR, L. J. & GREENBERG, A. S. 2009. Estradiol stimulates Akt, AMP-activated protein kinase (AMPK) and TBC1D1/4, but not glucose uptake in rat soleus. *Biochemical and biophysical research communications*, 382, 646-650.
- SAFE, S. & KIM, K. 2008. Non-classical genomic estrogen receptor (ER)/specificity protein and ER/activating protein-1 signaling pathways. *J Mol Endocrinol*, 41, 263-75.
- SHAKIR, Y. A., SAMSIOE, G., NYBERG, P., LIDFELDT, J., NERBRAND, C. & AGARDH, C.-D. 2007. Do sex hormones influence features of the metabolic syndrome in middle-aged women? A population-based study of Swedish women: The Women's Health in the Lund Area (WHILA) Study. *Fertility and sterility*, 88, 163-171.
- SHEARMAN, A. M., COOPER, J. A., KOTWINSKI, P. J., HUMPHRIES, S. E., MENDELSON, M. E., HOUSMAN, D. E. & MILLER, G. J. 2005. Estrogen receptor alpha gene variation and the risk of stroke. *Stroke*, 36, 2281-2.
- SHEARMAN, A. M., CUPPLES, L. A., DEMISSIE, S., PETER, I., SCHMID, C. H., KARAS, R. H., MENDELSON, M. E., HOUSMAN, D. E. & LEVY, D. 2003. Association between estrogen receptor alpha gene variation and cardiovascular disease. *JAMA*, 290, 2263-70.
- SHRINER, D. 2013. Overview of admixture mapping. *Current Protocols in Human Genetics*, 1.23. 1-1.23. 8.
- SHRINER, D., ADEYEMO, A., RAMOS, E., CHEN, G. & ROTIMI, C. N. 2011. Mapping of disease-associated variants in admixed populations. *Genome Biol*, 12, 223.
- SHRIVER, M. D., PARRA, E. J., DIOS, S., BONILLA, C., NORTON, H., JOVEL, C., PFAFF, C., JONES, C., MASSAC, A., CAMERON, N., BARON, A., JACKSON, T., ARGYROPOULOS, G., JIN, L., HOGGART, C. J., MCKEIGUE, P. M. & KITTLES, R. A. 2003. Skin pigmentation, biogeographical ancestry and admixture mapping. *Human Genetics*, 112, 387-399.
- SILVA-ZOLEZZI, I., HIDALGO-MIRANDA, A., ESTRADA-GIL, J., FERNANDEZ-LOPEZ, J. C., URIBE-FIGUEROA, L., CONTRERAS, A., BALAM-ORTIZ, E., DEL BOSQUE-PLATA, L., VELAZQUEZ-FERNANDEZ, D. & LARA, C. 2009. Analysis of genomic diversity in Mexican Mestizo populations to develop genomic medicine in Mexico. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 8611-8616.
- SMITH, M. W., PATTERSON, N., LAUTENBERGER, J. A., TRUELOVE, A. L., MCDONALD, G. J., WALISZEWSKA, A., KESSING, B. D., MALASKY, M. J., SCAFE, C. & LE, E. 2004. A high-density admixture map for disease gene

- discovery in African Americans. *The American Journal of Human Genetics*, 74, 1001-1013.
- SOWERS, M. R., WILSON, A. L., KARVONEN-GUTIERREZ, C. A. & KARDIA, S. R. 2006. Sex steroid hormone pathway genes and health-related measures in women of 4 races/ethnicities: the Study of Women's Health Across the Nation (SWAN). *The American journal of medicine*, 119, S103-S110.
- SPARKES, R. S., ZOLLMAN, S., KLISAK, I., KIRCHGESSNER, T. G., KOMAROMY, M. C., MOHANDAS, T., SCHOTZ, M. C. & LUSIS, A. J. 1987. Human genes involved in lipolysis of plasma lipoproteins: mapping of loci for lipoprotein lipase to 8p22 and hepatic lipase to 15q21. *Genomics*, 1, 138-144.
- STAVENHAGEN R & T., C. 1997. La diversidad étnica y cultural. En: Florescano E. El patrimonio nacional de México. . *Consejo Nacional para la Cultura y las Artes*, 249-280.
- SVIRIDOV, D. & NESTEL, P. J. 2007. Genetic factors affecting HDL levels, structure, metabolism and function. *Current opinion in lipidology*, 18, 157-163.
- THOMAS, R. S., SARWAR, N., PHOENIX, F., COOMBES, R. C. & ALI, S. 2008. Phosphorylation at serines 104 and 106 by Erk1/2 MAPK is important for estrogen receptor-alpha activity. *J Mol Endocrinol*, 40, 173-84.
- THUREN, T. 2000. Hepatic lipase and HDL metabolism. *Current opinion in lipidology*, 11, 277-283.
- TORAN-ALLERAND, C. D. 2004. Minireview: A plethora of estrogen receptors in the brain: where will it end? *Endocrinology*, 145, 1069-74.
- TOTH, M., TCHERNOF, A., SITES, C. & POEHLMAN, E. 2000. Effect of menopausal status on body composition and abdominal fat distribution. *International journal of obesity*, 24, 226-231.
- WEINBERG, M. E., MANSON, J. E., BURING, J. E., COOK, N. R., SEELY, E. W., RIDKER, P. M. & REXRODE, K. M. 2006. Low sex hormone-binding globulin is associated with the metabolic syndrome in postmenopausal women. *Metabolism*, 55, 1473-80.
- WILSON, P. W., D'AGOSTINO, R. B., PARISE, H., SULLIVAN, L. & MEIGS, J. B. 2005. Metabolic syndrome as a precursor of cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus. *Circulation*, 112, 3066-72.
- YOSHIHARA, R., UTSUNOMIYA, K., GOJO, A., ISHIZAWA, S., KANAZAWA, Y., MATOBA, K., TANIGUCHI, K., YOKOTA, T., KURATA, H., YOKOYAMA, J., URASHIMA, M. & TAJIMA, N. 2009. Association of polymorphism of estrogen receptor-alpha gene with circulating levels of adiponectin in postmenopausal women with type 2 diabetes. *J Atheroscler Thromb*, 16, 250-5.
- ZHOU, L., CHEN, H., XU, P., CONG, L. N., SCIACCHITANO, S., LI, Y., GRAHAM, D., JACOBS, A. R., TAYLOR, S. I. & QUON, M. J. 1999. Action of insulin receptor substrate-3 (IRS-3) and IRS-4 to stimulate translocation of GLUT4 in rat adipose cells. *Mol Endocrinol*, 13, 505-14.
- ZHU, X., BONET, B., GILLENWATER, H. & KNOPP, R. H. 1999. Opposing effects of estrogen and progestins on LDL oxidation and vascular wall cytotoxicity: implications for atherogenesis. *Experimental Biology and Medicine*, 222, 214-221.

ANEXOS

ARTÍCULO DE REVISIÓN

Cahua-Pablo JA

RE- α en obesidad y diabetes.

Receptor a estrógenos α en obesidad y diabetes.

Estrogen receptor α in obesity and diabetes.

Resumen

El estradiol (E2) es una hormona importante en la fisiología reproductiva, cardiovascular, esquelética y en el sistema nervioso central (SNC). Tanto en humano como en roedores el E2 y sus receptores participan en el control del metabolismo energético y de la glucosa tanto en salud como en enfermedades metabólicas. El receptor de estrógenos (RE) pertenece a una superfamilia de receptores nucleares (RN), los cuales son factores de transcripción que regulan la expresión génica. Existen tres REs, el RE- α , RE- β y uno acoplado a proteína GPER (GPR30) en tejidos están involucrados en la homeostasis de glucosa y lípidos. También puede tener implicaciones importantes para factores de riesgo asociados al síndrome metabólico (SM), resistencia a la insulina (RI), obesidad y diabetes tipo 2 (DT2).

Palabras claves: *Receptor a estrógenos, estradiol, diabetes, obesidad, resistencia a la insulina.*

Summary

Estradiol (E2) is an important hormone in reproductive physiology, cardiovascular, skeletal and in the central nervous system (CNS). In human and rodents, E2 and its receptors are involved in the control of energy and glucose metabolism in health and

metabolic diseases. The estrogen receptor (ER) belongs to the superfamily of nuclear receptors (NR), which are transcription factors that regulate gene expression. Three ER, ER α , ER β and the G protein-coupled ER (GPER; also called GPR30) in tissues are involved in glucose and lipid homeostasis. Also, it may have important implications for risk factors associated with metabolic syndrome (MS), insulin resistance (IR), obesity and type 2 diabetes (T2D).

Keywords: *Estrogen receptor, estradiol, diabetes, obesity, insulin resistance.*

Introducción

Un mecanismo importante para mantener la homeostasis de la glucosa es la rápida acción de la insulina para estimular la captación y metabolismo de la misma en el tejido periférico, como el músculo esquelético, hígado y tejido adiposo.¹ La acción de la insulina para el transporte de glucosa al interior de las células del músculo esquelético, tejido adiposo e hígado, es por activación del sustrato receptor de insulina (IRS-1), fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) y proteína kinasa B (Akt) que contribuyen para la translocación del transportador de glucosa 4 (GLUT4), principal transportador de glucosa regulado por insulina. Por otro lado, la RI en el músculo esquelético es uno de los principales factores de la diabetes tipo 2 (DT2). Alteración en los mecanismos de la señalización contribuyen al desbalance metabólico y a la morbilidad por obesidad, definida como el exceso de grasa corporal en el cuerpo que puede afectar la salud de forma progresiva.²

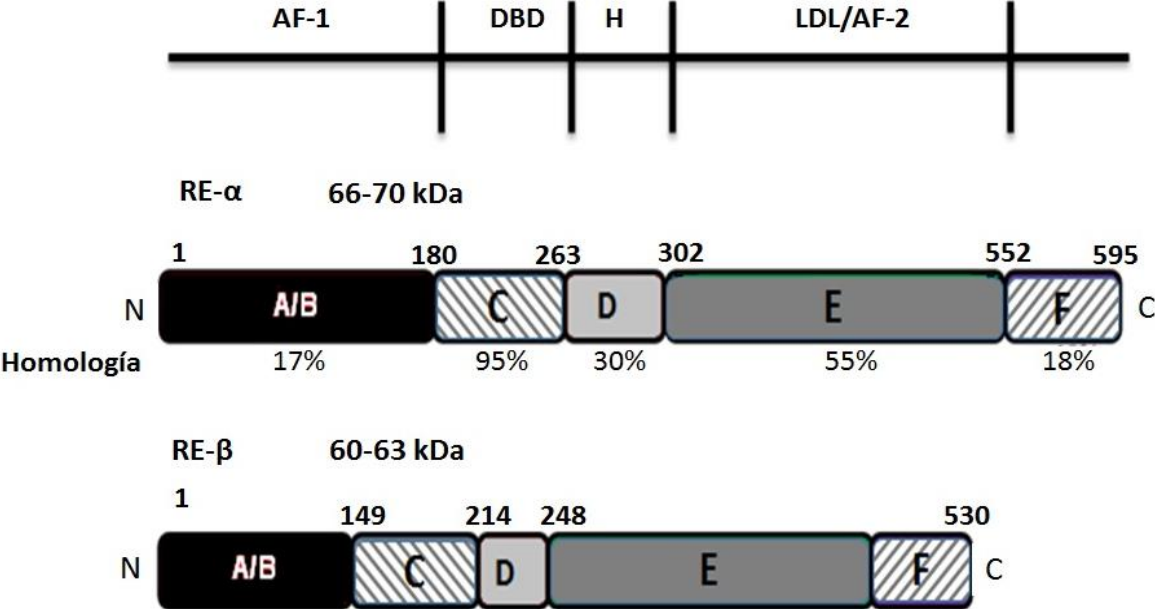
El E2 participa en la regulación de procesos en numerosos tejidos, siendo miembro de la familia de hormonas esteroideas, que incluye progesterona, testosterona, entre otras, estas hormonas controlan principalmente aspectos fisiológicos en mamíferos.³ Las hormonas esteroideas son sintetizadas en los ovarios, testículos y glándulas adrenales. También participan en la regulación del desarrollo, crecimiento y homeostasis de numerosos tejidos,⁴ regulan la fisiología del esqueleto,⁵ función cardiovascular,⁶ SNC,⁷ y participan en el control del sistema inmune.⁸ En mujeres postmenopáusicas el desarrollo de obesidad visceral y RI representan un alto riesgo de DT2. En mujeres postmenopáusicas diabéticas se ha reportado que el uso de estrógenos puede estar asociado con un aumento de apoA, así como con una disminución de la glucosa en ayunas y colesterol total en este grupo de mujeres.⁹

Se han realizado estudios en modelos de ratones *knockout* para el gen del RE- α , donde se ha demostrado el papel de los estrógenos y sus receptores en obesidad y la tolerancia a la glucosa.¹⁰ Así, un estudio realizado en ratones carentes del RE- α , pero no en ratones carentes del RE- β , se produce un gran aumento en el tejido adiposo blanco, tanto en ratones hembra y macho, acompañado por RI e intolerancia a la glucosa, el incremento de tejido adiposo parece ser resultado de una disminución en el gasto de energía.¹¹

Origen de estrógenos en circulación en hombres y mujeres

En mujeres en edad reproductiva, el E2 es el principal estrógeno en circulación producido por los ovarios después de la aromatización de androstenadiona a estrona (E1), seguido por la conversión de E1 a E2.³ En mujeres con un ciclo menstrual normal el E2 generalmente actúa sobre órganos distantes mientras que en mujeres postmenopáusicas cuando los ovarios fallan en la producción de E2. Por otro lado, en hombres se observan de manera natural valores bajos en circulación. El E2 es sintetizado en sitios extragonadales como son mama, cerebro, hueso y tejido adiposo, donde actúan localmente como un factor paracrino e intracrino.¹² Los estrógenos para llevar a cabo su función actúan con sus receptores, se ha reportado al menos tres REs, dos factores de transcripción activados por ligando, el RE- α y RE- β ,^{12,13} presentándose una homología de 95 % de aminoácidos idénticos entre estos (Figura 1), y un receptor acoplado a la proteína G (GPRE) conocido como GPR30. Este último actúa de manera independiente de los receptores α y β pero influye en la activación del factor de crecimiento epidermal (EGF), pudiendo así participar en la biología del cáncer.⁴ Otro

receptor descrito pero no totalmente definido es el RE-X, del cual existen evidencias de su existencia en el de cerebro.⁷



Modificado de Huang et al., 2010

Fig 1. Organización de los dominios del RE- α y RE- β . Los RE consisten de la región N-terminal involucrada en la transactivación (dominios A/B AF-1), el dominio de unión al DNA (DBD, dominio C) la región C-terminal que contiene el dominio de unión al ligando (DBL, dominio E/F, AF-2) y la función de transactivación-2 (AF-2). En porcentajes se indica la homología entre el RE- α y RE- β .^{22,23}

Receptores de estrógeno y estructura del RE- α

Los REs pertenecen a la superfamilia de RN, los cuales son factores de transcripción que regulan la expresión génica de manera dependiente de su unión al ligando y en respuesta específica a señales fisiológicas y patológicas.^{13,14}

El RE- α y RE- β son codificados por diferentes genes localizados en los cromosomas 6q25.1 y 14q23-24.1, respectivamente, y su expresión varía dependiendo del tipo de tejido.¹⁵ El RE- α es expresado predominantemente en órganos del sistema reproductor (útero, mama y ovario), sin embargo también existen reportes de su expresión en hígado y el SNC, en tanto el RE- β es expresada mayoritariamente en otros tejidos como hueso, endotelio, pulmones, tracto urogenital, ovario, SNC y próstata.¹⁶

El RE- α está formado por 595 aminoácidos, compuesto por 6 dominios designados de la A a la F.¹⁷ El dominio N-terminal (región A-B) tiene una función de activación transcripcional independiente del ligando (TAF-1) participa tanto en interacciones intra e inter moleculares, así como en la transcripción de genes. Los dominios de unión al DNA (DBD o región C) contienen dos dedos de zinc que son altamente conservados en todos los receptores a hormonas esteroideas.¹⁸ El dominio bisagra (región D) tiene un papel importante en la dimerización de estos receptores y en la unión de proteínas de choque térmico (Hsp). Por su parte el dominio de unión a hormonas (HBD, regiones E/F y C-terminal), tiene la función de activación transcripcional dependiente de

hormonas (TAF-2).¹⁹ El dominio F es una región variable que incluye la secuencia para la hélice 12 de la molécula, la cual es probablemente importante para la diferencia en la respuesta de los REs al E2 y a los moduladores selectivos para los receptores a estrógenos (SERMs).^{7,19-21}

Los REs contienen dos regiones llamadas funciones de activación (AFs) que son importantes para la actividad transcripcional dependiente del ligando.²² Las regiones AF1-1 y AF-2, interaccionan con coactivadores transcripcionales.¹⁹ AF-1, podría ser activado en forma independiente del ligando, dependiendo del estado de fosforilación del RE, en particular de los residuos ser118 en la región AF-1 del RE- α , así como de los residuos ser106 y ser124 en la región AF-1 del RE- β , estos son sitios de fosforilación esenciales para la activación independiente del ligando de los REs a través de la cascada de señalización de la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK).²³

Mecanismo de acción de los RE

El mecanismo independiente del ligando en la acción del RE está definido como un miembro de la superfamilia de los RN de clase I, de los cuales los RE- α y RE- β son miembros. El mecanismo genómico clásico de la acción del RE ocurre normalmente en horas, resultando en la activación o represión de los genes blanco. En la vía de señalización clásica la unión del ligando al RE provoca un cambio conformacional y la disociación de las Hsp, promoviéndose la homodimerización y la unión con una alta afinidad a los elementos de respuesta a estrógenos (ERE), los cuales son secuencias palindrómicas en un promotor de un gen (Figura 2).^{17,24}

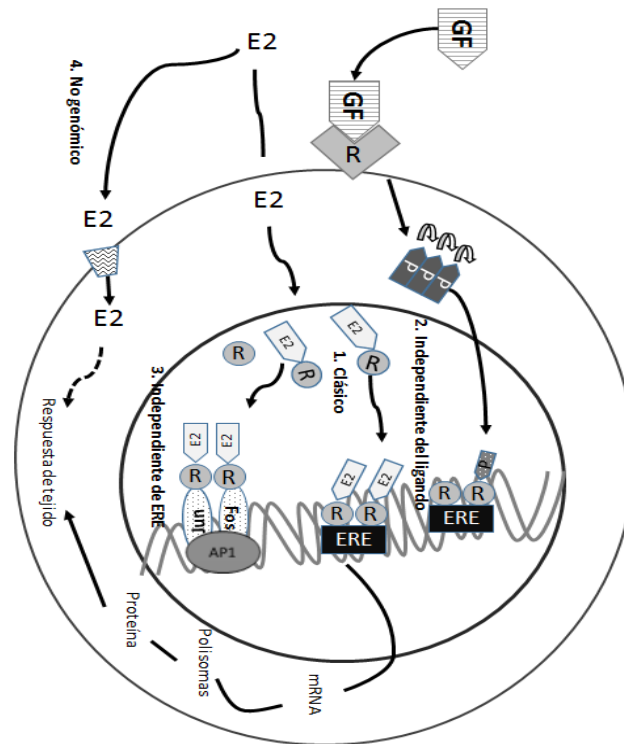
Después de la unión con el ligando los REs, actúan sobre los ERE, estos RE interactúan con cofactores (coactivadores o correpresores) para regular la expresión

génica,¹⁶ y dependiendo de los coreguladores presentes en la célula, el complejo estrógeno-RE puede tener diversos efectos.²⁵ El reclutamiento de coreguladores depende de la unión del ligando probablemente atribuible a las diferentes conformaciones con los diferentes ligandos, por ejemplo el tamoxifeno es un agonista en el endometrio debido a que recluta coactivadores, pero es un antagonista en mama debido a que recluta corepresores.^{26,27}

Los REs también pueden actuar en forma independiente del ligando para alterar la transcripción de genes, pueden ser fosforilados directamente permitiendo la unión a ERE o la unión al DNA indirectamente vía factores de transcripción, y así modular la transcripción en ausencia de la unión al ligando (Figura 2). Así, se ha reportado que la activación del EGF requiere del RE y este el factor de crecimiento puede estimular la proliferación.²⁸ Por otro lado la fosforilación en sitios específico de serina como ser104 y ser106 son importantes para la activación de la transcripción independiente del ligando.²⁹⁻³¹ También, se ha demostrado que la activación de la vía de las cinasas dependiente de cAMP o MAPK son activadas por la fosforilación en el RE- α , y se ha reportado que el RE- α puede ser fosforilado en la tirosina 537.^{32,33}

Un componente importante de las acciones del RE relacionados al metabolismo energético son los RE extranucleares, que modulan directamente la expresión de genes o que actúan indirectamente con eventos nucleares.³⁴ El E2 puede activar directamente vías de señalización rápidas produciéndose efectos en minutos o segundos vía RE asociados a membrana.³⁵ Los RE- α y RE- β están localizados en caveolas donde se asocian con otras moléculas como proteínas G, receptores a factores de crecimiento, tirosin cinasas (Src) y receptores acoplados a proteínas G, facilitando la interacción y la rápida señalización.³⁶ Los estrógenos también se unen a

receptores acoplados a proteínas G, la GPR30 puede activar una vía de señalización rápida por cinasas como, PI3K, MAPK y la movilización de calcio intracelular.^{37,38}



Modificado de Hall et al., 2001

Figura.2. Múltiples mecanismos de señalización del RE y E2. 1) dependiente de ligando, el complejo RE-E2 se une a sus EREs en los promotores de genes blanco. 2) ligando independiente, factores de crecimiento o monofosfato de adenosina activan una vía kinasa intracelular. 3) independiente de ERE, el complejo RE-E2 altera la transcripción de genes que contienen ER alternativos como AP-1, a través de la asociación con otros factores de transcripción unidos al DNA (Fos/Jun). 4) señalización no genómica el E2 activa a sitios de unión asociados a la membrana, posiblemente a forma de RE vinculados a las vías de transducción de señal intracelular que genera una respuesta rápida en tejido.

Papel de los estrógenos en la regulación del peso corporal y resistencia a la insulina

En las mujeres los estrógenos favorecen el depósito de grasa en la zona del glúteo, después de la menopausia la distribución de la grasa en las mujeres cambia a un fenotipo muy similar al de los hombres.^{39, 40} Parte de las funciones de los estrógenos es regular la composición corporal, balance energético, regula la homeostasis de la glucosa y la sensibilidad a la insulina en mujeres y hombres (Cuadro I).⁴¹ El peso corporal incrementa con varias condiciones asociadas a la deficiencia estrogénica como son ovariectomía, síndrome de ovario poliquístico o la falta de funcionalidad de la aromatasa por alteraciones en su gen, y todos pueden ser corregidos por tratamiento con E2.⁴²⁻⁴⁴

Cuadro I. Participación de los estrógenos y sus receptores en funciones metabólicas.

Acción de los estrógenos	Referencias
Regulación de la acumulación de grasa abdominal	Zhu et al. ⁵⁷
Regulación del tejido adiposo	Okura et al. ⁶⁹
Mejora la sensibilidad a la insulina	Bryzgalova et al. ⁸¹
Participa en la homeostasis de la glucosa	Bryzgalova et al. ⁸¹
Mejore la función de las células β	Bryzgalova et al. ⁸¹
Regulación del peso corporal	Okura et al. ⁶⁹
Modulación de la inflamación	Simpson et al. ¹²
Participa en la vía de señalización de la insulina y la translocación de GLUT4	Barros and Gustafsson. ⁷⁵
transportador de glucosa 4 (GLUT4)	

En los hombres la disminución de testosterona contribuye al desarrollo del SM, así mismo, existe una relación entre la testosterona y la cantidad de tejido adiposo visceral y SM.⁴⁵ Se ha demostrado que la aromatización de la testosterona en E2 es importante para la homeostasis de la energía en hombres, sugiriéndose que la testosterona actúa como prohormona proporcionando E2 para la homeostasis de la energía. Además, ratones machos castrados tratados, ya sea con testosterona o E2 permanecen delgados, mientras, que los tratados con puro andrógeno 5 α -dihidrotestosterona (DHT) (que no puede ser aromatizado por E2) desarrollan obesidad.⁴⁶

La regulación central del balance de la energía esta mediada por una compleja vía de señalización en el SNC integrando múltiples señales endocrinas de la periferia. Los neurocircuitos hipotalámicos son esenciales para la regulación del balance de la energía, involucrando al núcleo arqueado (NA), ventromedial (NVM), dorsomedial (NDM), paraventricular (NPV) y la región hipotalámica lateral.⁴⁷

Tanto el RE- α y el RE- β son expresados en el núcleo hipotalámico, se ha observado que el RE- α es la isoforma principal que participa en el control del peso corporal por los estrógenos.⁴⁸ Una delección dirigida contra el RE- α en ratones da como resultado un fenotipo obeso con un incremento en la acumulación de grasa pero con ausencia de marcadas diferencias entre ratones wild type (WT) y knockout.¹¹ También, el RE- α es expresado en el tallo cerebral, incluyendo el núcleo del tracto solitario (NTS), medial dorsal vago.⁴⁹ Se ha demostrado que el remplazo por E2 en ratones WT suprime el consumo de alimento, la saciedad inducida por la colecistocinina (CCK) y se ve acompañada por un incremento en la actividad del NTS. La CCK es sintetizada y liberada de células de la parte superior del intestino y

actúan con el receptor CCK-A abdominal, las CCK participan en procesos digestivos como, retardar el proceso de vaciado y la movilidad intestinal.⁵⁰ E2 incrementa la potencia la CCK por un incremento en la sensibilidad del receptor CCK-A, pero no incrementa la secreción de CCK o el número de receptores.^{51,52}

Se ha demostrado que la ausencia del RE- α produce una hiperplasia e hipertrofia del adipocito en tejido adiposo blanco pero no en tejido adiposo marrón y es acompañada por una RI e intolerancia a la glucosa.^{53,54} Por otro lado, animales y humanos que carecen de la síntesis de estrógenos endógenos, muestran RI que puede ser tratada con suplementación por estrógenos.⁵⁵ De manera particular, los estrógenos incrementan la actividad de la insulina hepática por la disminución de la gluconeogénesis, la glucolisis y revirtiendo aspectos de la RI, incrementando la liberación de insulina de los islotes de Langerhans pancreáticos.^{56,57} Los estrógenos previenen la apoptosis de células β , reducen la señalización proinflamatoria y mejora la acción de la insulina.⁵⁸ Tal como lo demostró Vogel y colaboradores, en un estudio echo en ratones obesos Nueva Zelanda (NZO), donde mostró que los estrógenos protegen contra la perdida de las células β y obesidad asociada a DT2, debió a la reducción de la RI y una posible disminución de la sensibilidad de las células β a la glucolipototoxicidad.⁵⁹ Se ha encontrado menor cantidad de estrógenos endógenos con una mayor cantidad de tejido adiposo visceral en hombres, que pueden estar relacionados con una mayor RI en comparación con mujeres sin menopausia lo que podría contribuir a las diferencias de género observadas en (ECV).^{42,60}

RE- α y distribución del tejido adiposo

La excesiva acumulación del tejido adiposo en la región central del cuerpo se ha relacionado con un incremento en el riesgo de mortalidad por alteraciones metabólicas como la DT2, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia y aterosclerosis.⁶¹ Los estrógenos son producidos en los adipocitos vía aromatización de precursores androgénicos; en hombres con obesidad mórbida se ha observado incremento en la concentración sanguínea de estrógenos y una disminución de testosterona, sin embargo en las mujeres con obesidad no se observan estos incrementos.^{62,63}

El tejido adiposo subcutáneo e intraabdominal expresan RE- α y - β , siendo el RE- α predominantemente expresado en el tejido adiposo intra abdominal.^{64,65} En ratones hembras y machos que carecen del RE- α (RE α KO) desarrollan obesidad central con incremento en el peso corporal, en el tejido adiposo blanco, en el tamaño y número de adipocito, así, como una disminución en el gasto de energía.^{11,66} Por otra parte los depósitos inguinales también incrementan en ratones RE β KO; esto sugiere que la eliminación del RE- α puede no solo focalizarse a depósitos intra-abdominales.⁶⁷ Así, la reducción en la expresión y daño en la función del RE- α se han relacionado con un incremento en la prevalencia de diversos factores del SM tanto en humanos y roedores, machos y hembras.^{68,69} También, se han reportado polimorfismos en el gen del RE- α que están asociados con una adiposidad anormal.^{15,69,70}

Los animales *knockout* al RE- α muestran un incremento en los niveles de colesterol sérico,⁷¹ indicando un papel fisiológico importante del RE- α en el efecto de los estrógenos en el control del peso corporal. La expresión del gen del RE- α en tejido adiposo y en adipocitos está reducida en mujeres premenopáusicas obesas.¹⁵ Sin

embargo, varios polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en el RE- α se han asociado con un fenotipo obeso en hombres y mujeres.^{69,72}

RE- α en la homeostasis de la glucosa y sensibilidad a la insulina

Los niveles circulantes de glucosa están regulados por las hormonas insulina y glucagón principalmente. En respuesta a niveles altos de glucosa se libera proinsulina de las células β del páncreas, compuesta por las cadenas A, B y C, que por acción de endopeptidasas es convertida a insulina y péptido C.⁷³ La insulina estimula el gasto y almacenamiento de glucosa en forma de glucógeno en el músculo esquelético, tejido adiposo y en el hígado. Dos vías principales de transducción son activadas por acción de la insulina: la vía de la PI3K y la vía de MAPK.⁷⁴ Ambas vías regulan la mayoría de las acciones de la insulina asociadas a la regulación del metabolismo energético, de la expresión genética y de efectos mitogénicos, la vía de la PI3K es el principal mecanismo por el que la insulina ejerce sus funciones en el metabolismo de la glucosa y de lípidos.⁷⁵ Cuando la insulina se une a su receptor se activa una cascada de señalización que involucra a varias proteínas entre ellas el IRS, PI3K, Akt y AMPK, que finalmente resulta en la translocación a la membrana plasmática de los GLUT4, permitiendo la entrada de la glucosa a la célula.⁷³

La intolerancia a la glucosa e hiperinsulinemia fue observada en hombres que carecen del RE- α . Una función metabólica del RE- α , sustentada en estudios con animales, es su participación en la homeostasis de la glucosa a través del RE- α y RE- β .¹¹ Por otro lado, mujeres premenopáusicas son más sensibles a la insulina con mejor tolerancia a la glucosa y son más resistentes al desarrollo de la RI en

comparación con hombres, así mismo muestran un incremento en la expresión de GLUT4.⁷⁶ Se ha demostrado, que el RE- α está involucrado en la regulación del metabolismo de la glucosa en varios tejidos incluyendo hígado, musculo esquelético, tejido adiposo, células β del páncreas y el SNC.⁶⁹

Los estrógenos también regulan la función de las células β del páncreas a través de un mecanismo dependiente del RE- α .⁵⁶ La liberación de insulina dependiente de estrógenos en cultivo de islotes pancreáticos se encontró reducida en ratones deficientes de RE- α en comparación con los islotes derivados de ratones deficientes de RE- β . Se ha encontrado que los dos subtipos de REs tienen efectos opuestos en el músculo, el RE- α induce y el RE- β inhibe la expresión de GLUT4.⁷⁴

Acción del RE- α en la regulación del metabolismo de la glucosa en músculo

El mecanismo molecular por el cual el E2 regula el metabolismo en el músculo aún se desconoce, sin embargo existen datos que sugieren que en rangos fisiológicos el E2 es benéfico para la sensibilidad a la insulina, mientras que un hipo o hiperestrogenismo está relacionado con RI.⁷⁷

El complejo RE-E2, modula el procesamiento de la glucosa a través de sus acciones en varias proteínas de la vía de señalización de la insulina y en la expresión y translocación de GLUT4. En estudios en ratas se observó que el E2 incrementa en la fosforilación de AMPK, Akt y en su sustrato TBC1D1/4 en músculo.⁷⁸ En un estudio en ratas el tratamiento con E2 mejora la homeostasis de la glucosa principalmente a través de su capacidad para incrementar en la membrana de células del músculo el contenido de GLUT4.⁷⁹ Por otro lado Alexanderson en el 2009 reporta en ratas hembras jóvenes que una sola dosis del E2 durante el periodo postnatal da como

resultado un incremento en la regulación de genes involucrados en el metabolismo de la glucosa, oxidación de lípidos, receptor activado de la proliferación de peroxisomas delta (PPAR δ) y la proteína desacoplante 3 (Ucp3) en músculo.⁸⁰ Mientras que para ratones RE- $\beta^{-/-}$ la tolerancia a la glucosa y la RI son normales o incluso mejores que en ratones WT, los ratones RE- $\alpha^{-/-}$ son intolerantes a la glucosa y resistentes a la insulina.^{11,81} Cuando ratones machos ArKO deficientes en E2 son tratados con diarilpropionitrilo (DPN) un agonista selectivo para el RE- β , hay un incremento en la expresión de GLUT4 en músculo.⁸² Esto sugiere que el RE- β tiene un papel supresor de GLUT4. Caso contrario con la ausencia del RE- α ya que con esto se presenta una reducción en la captación de glucosa en el músculo. Estos datos sugieren que el RE- β podría tener un efecto diabetogénico.⁸¹

Por otro lado, al tratar con un agonista selectivo para el RE- α , Propil pirazol triol PPT, incrementa el traslado de GLUT4 a la membrana de la célula en mieloblastos L6 y cuando es silenciado el RE- α hay una disminución en el traslado. En ratas ovariectomizadas tratadas con PPR incrementan la captación de glucosa y la expresión de GLUT4 en el músculo esquelético.⁸²

Conclusiones y perspectivas

En esta revisión nos enfocamos a describir las funciones del RE- α y RE- β en las vías metabólicas compuestas por tejidos involucrados en el metabolismo de la glucosa y lípidos. Es claro que los REs participan en números mecanismos complejos, pero estos mecanismos no se conocen con exactitud, más bien se consideran en un contexto como un sistema completo. Cada órgano tiene un papel

importante en el metabolismo y estos tejidos son dependientes uno del otro para la regulación de la homeostasis del cuerpo. Por lo tanto es razonable pensar que la homeostasis depende del equilibrio entre el RE- α y RE- β en las vías metabólicas. A los estrógenos y REs se les han relacionado con el balance energético y con el metabolismo de la glucosa, sin embargo, los mecanismos involucrados en sus acciones son aún desconocidos. En relación a la obesidad, las investigaciones futuras deberían de centrarse en la identificación de sitios importantes del cerebro donde lo RE regulan la homeostasis del peso corporal y las vías de señalización que son necesarias para la acción de los estrógenos.

Agradecimientos

Reconocimiento al apoyo otorgado por CONACyT con el número de convenio: I010/455/2013 C-677/2013 del Programa de Fortalecimiento Académico del Posgrado de Alta Calidad-CONACyT.

Referencias

1. Sukhanova A, Poly S, Shemetov A, Bronstein I, Nabiev I. Implications of protein structure instability: from physiological to pathological secondary structure. *Biopolymers*. 2012;97(8):577-88.
2. Yki-Jarvinen H, Sahlin K, Ren JM, Koivisto VA. Localization of rate-limiting defect for glucose disposal in skeletal muscle of insulin-resistant type I diabetic patients. *Diabetes*. 1990;39(2):157-67.
3. Thomas MP, Potter BV. The structural biology of oestrogen metabolism. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2013;137:27-49.
4. Prossnitz ER, Oprea TI, Sklar LA, Arterburn JB. The ins and outs of GPR30: a transmembrane estrogen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2008;109(3-5):350-3.
5. Frank GR. Role of estrogen and androgen in pubertal skeletal physiology. *Med Pediatr Oncol*. 2003;41(3):217-21.
6. Baker L, Meldrum KK, Wang M, Sankula R, Vanam R, Raiesdana A, et al. The role of estrogen in cardiovascular disease. *J Surg Res*. 2003;115(2):325-44.
7. Toran-Allerand CD. Minireview: A plethora of estrogen receptors in the brain: where will it end? *Endocrinology*. 2004;145(3):1069-74.
8. Kovacs EJ, Messingham KA, Gregory MS. Estrogen regulation of immune responses after injury. *Mol Cell Endocrinol*. 2002;193(1-2):129-35.
9. Crespo CJ, Smit E, Snelling A, Sempos CT, Andersen RE. Hormone replacement therapy and its relationship to lipid and glucose metabolism in diabetic and nondiabetic postmenopausal women: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *Diabetes Care*. 2002;25(10):1675-80.
10. Fisher CR, Graves KH, Parlow AF, Simpson ER. Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the cyp19 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(12):6965-70.
11. Heine PA, Taylor JA, Iwamoto GA, Lubahn DB, Cooke PS. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(23):12729-34.

12. Simpson ER, Misso M, Hewitt KN, Hill RA, Boon WC, Jones ME, et al. Estrogen--the good, the bad, and the unexpected. *Endocr Rev.* 2005;26(3):322-30.
13. Aranda A, Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev.* 2001;81(3):1269-304.
14. Krishnan V, Heath H, Bryant HU. Mechanism of action of estrogens and selective estrogen receptor modulators. *Vitam Horm.* 2000;60:123-47.
15. Nilsson M, Dahlman I, Ryden M, Nordstrom EA, Gustafsson JA, Arner P, et al. Oestrogen receptor alpha gene expression levels are reduced in obese compared to normal weight females. *Int J Obes (Lond).* 2007;31(6):900-7.
16. Noriega-Reyes MY, McCarron L. Correguladores del Receptor de Estrógenos y su Implicación en el Cáncer Mamario. *Cancerología.* 2008;3:29-40.
17. Klinge CM. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(14):2905-19.
18. Claessens F, Gewirth DT. DNA recognition by nuclear receptors. *Essays Biochem.* 2004;40:59-72.
19. Kumar R, Johnson BH, Thompson EB. Overview of the structural basis for transcription regulation by nuclear hormone receptors. *Essays Biochem.* 2004;40:27-39.
20. Mendelsohn ME, Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med.* 1999;340(23):1801-11.
21. Jiang M, Huhtaniemi I. Polymorphisms in androgen and estrogen receptor genes: effects on male aging. *Exp Gerontol.* 2004;39(11-12):1603-11.
22. McEwan IJ. Sex, drugs and gene expression: signalling by members of the nuclear receptor superfamily. *Essays Biochem.* 2004;40:1-10.
23. Orti E, Bodwell JE, Munck A. Phosphorylation of steroid hormone receptors. *Endocr Rev.* 1992;13(1):105-28.
24. Safe S, Kim K. Non-classical genomic estrogen receptor (ER)/specificity protein and ER/activating protein-1 signaling pathways. *J Mol Endocrinol.* 2008;41(5):263-75.
25. Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science.* 2005;307(5715):1625-30.

26. Shang Y, Brown M. Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs. *Science*. 2002;295(5564):2465-8.
27. Deroo BJ, Korach KS. Estrogen receptors and human disease. *J Clin Invest*. 2006;116(3):561-70.
28. Curtis SW, Washburn T, Sewall C, DiAugustine R, Lindzey J, Couse JF, et al. Physiological coupling of growth factor and steroid receptor signaling pathways: estrogen receptor knockout mice lack estrogen-like response to epidermal growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(22):12626-30.
29. Le Goff P, Montano MM, Schodin DJ, Katzenellenbogen BS. Phosphorylation of the human estrogen receptor. Identification of hormone-regulated sites and examination of their influence on transcriptional activity. *J Biol Chem*. 1994;269(6):4458-66.
30. Thomas RS, Sarwar N, Phoenix F, Coombes RC, Ali S. Phosphorylation at serines 104 and 106 by Erk1/2 MAPK is important for estrogen receptor-alpha activity. *J Mol Endocrinol*. 2008;40(4):173-84.
31. Lannigan DA. Estrogen receptor phosphorylation. *Steroids*. 2003;68(1):1-9.
32. Arnold SF, Melamed M, Vorojeikina DP, Notides AC, Sasson S. Estradiol-binding mechanism and binding capacity of the human estrogen receptor is regulated by tyrosine phosphorylation. *Mol Endocrinol*. 1997;11(1):48-53.
33. Arnold SF, Vorojeikina DP, Notides AC. Phosphorylation of tyrosine 537 on the human estrogen receptor is required for binding to an estrogen response element. *J Biol Chem*. 1995;270(50):30205-12.
34. Yang SH, Sarkar SN, Liu R, Perez EJ, Wang X, Wen Y, et al. Estrogen receptor beta as a mitochondrial vulnerability factor. *J Biol Chem*. 2009;284(14):9540-8.
35. Nuedling S, Kahlert S, Loebbert K, Doevendans PA, Meyer R, Vetter H, et al. 17 Beta-estradiol stimulates expression of endothelial and inducible NO synthase in rat myocardium in-vitro and in-vivo. *Cardiovasc Res*. 1999;43(3):666-74.
36. Hammes SR, Levin ER. Extranuclear steroid receptors: nature and actions. *Endocr Rev*. 2007;28(7):726-41.

37. Simoncini T, Hafezi-Moghadam A, Brazil DP, Ley K, Chin WW, Liao JK. Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature*. 2000;407(6803):538-41.
38. Xing D, Nozell S, Chen YF, Hage F, Oparil S. Estrogen and mechanisms of vascular protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29(3):289-95.
39. Bjorntorp P. Abdominal fat distribution and the metabolic syndrome. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1992;20 Suppl 8:S26-8.
40. Bouchard C, Despres JP, Mauriege P. Genetic and nongenetic determinants of regional fat distribution. *Endocr Rev*. 1993;14(1):72-93.
41. Guthrie JR, Dennerstein L, Taffe JR, Lehert P, Burger HG. The menopausal transition: a 9-year prospective population-based study. The Melbourne Women's Midlife Health Project. *Climacteric*. 2004;7(4):375-89.
42. Geer EB, Shen W. Gender differences in insulin resistance, body composition, and energy balance. *Gend Med*. 2009;6 Suppl 1:60-75.
43. Pedersen SB, Borglum JD, Moller-Pedersen T, Richelsen B. Effects of in vivo estrogen treatment on adipose tissue metabolism and nuclear estrogen receptor binding in isolated rat adipocytes. *Mol Cell Endocrinol*. 1992;85(1-2):13-9.
44. Shi H, Clegg DJ. Sex differences in the regulation of body weight. *Physiol Behav*. 2009;97(2):199-204.
45. Khaw KT, Barrett-Connor E. Lower endogenous androgens predict central adiposity in men. *Ann Epidemiol*. 1992;2(5):675-82.
46. Moverare-Skrtic S, Venken K, Andersson N, Lindberg MK, Svensson J, Swanson C, et al. Dihydrotestosterone treatment results in obesity and altered lipid metabolism in orchidectomized mice. *Obesity (Silver Spring)*. 2006;14(4):662-72.
47. Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*. 2006;443(7109):289-95.
48. Mitra SW, Hoskin E, Yudkovitz J, Pear L, Wilkinson HA, Hayashi S, et al. Immunolocalization of estrogen receptor beta in the mouse brain: comparison with estrogen receptor alpha. *Endocrinology*. 2003;144(5):2055-67.

49. Schlenker EH, Hansen SN. Sex-specific densities of estrogen receptors alpha and beta in the subnuclei of the nucleus tractus solitarius, hypoglossal nucleus and dorsal vagal motor nucleus weanling rats. *Brain Res.* 2006;1123(1):89-100.
50. Moran TH. Gut peptides in the control of food intake. *Int J Obes (Lond).* 2009;33 Suppl 1:S7-10.
51. Butera PC, Bradway DM, Cataldo NJ. Modulation of the satiety effect of cholecystokinin by estradiol. *Physiol Behav.* 1993;53(6):1235-8.
52. Mauvais-Jarvis F, Clegg DJ, Hevener AL. The role of estrogens in control of energy balance and glucose homeostasis. *Endocr Rev.* 2013;34(3):309-38.
53. Cooke PS, Heine PA, Taylor JA, Lubahn DB. The role of estrogen and estrogen receptor-alpha in male adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol.* 2001;178(1-2):147-54.
54. Ropero AB, Alonso-Magdalena P, Quesada I, Nadal A. The role of estrogen receptors in the control of energy and glucose homeostasis. *Steroids.* 2008;73(9-10):874-9.
55. Bailey CJ, Ahmed-Sorour H. Role of ovarian hormones in the long-term control of glucose homeostasis. Effects of insulin secretion. *Diabetologia.* 1980;19(5):475-81.
56. Alonso-Magdalena P, Ropero AB, Carrera MP, Cederroth CR, Baquie M, Gauthier BR, et al. Pancreatic insulin content regulation by the estrogen receptor ER alpha. *PLoS One.* 2008;3(4):e2069.
57. Zhu L, Brown WC, Cai Q, Krust A, Chambon P, McGuinness OP, et al. Estrogen treatment after ovariectomy protects against fatty liver and may improve pathway-selective insulin resistance. *Diabetes.* 2013;62(2):424-34.
58. Le May C, Chu K, Hu M, Ortega CS, Simpson ER, Korach KS, et al. Estrogens protect pancreatic beta-cells from apoptosis and prevent insulin-deficient diabetes mellitus in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(24):9232-7.
59. Vogel H, Mirhashemi F, Liehl B, Taugner F, Kluth O, Kluge R, et al. Estrogen deficiency aggravates insulin resistance and induces beta-cell loss and diabetes in female New Zealand obese mice. *Horm Metab Res.* 2013;45(6):430-5.
60. Meyer MR, Haas E, Prossnitz ER, Barton M. Non-genomic regulation of vascular cell function and growth by estrogen. *Mol Cell Endocrinol.* 2009;308(1-2):9-16.

61. Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev.* 2000;21(6):697-738.
62. Schneider G, Kirschner MA, Berkowitz R, Ertel NH. Increased estrogen production in obese men. *J Clin Endocrinol Metab.* 1979;48(4):633-8.
63. Tchernof A, Després J-P, Dupont A, Bélanger A, Nadeau A, Prud'homme D, et al. Relation of Steroid Hormones to Glucose Tolerance and Plasma Insulin Levels in Men: Importance of visceral adipose tissue. *Diabetes Care.* 1995;18(3):292-9.
64. Mizutani T, Nishikawa Y, Adachi H, Enomoto T, Ikegami H, Kurachi H, et al. Identification of estrogen receptor in human adipose tissue and adipocytes. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994;78(4):950-4.
65. Price TM, O'Brien SN. Determination of estrogen receptor messenger ribonucleic acid (mRNA) and cytochrome P450 aromatase mRNA levels in adipocytes and adipose stromal cells by competitive polymerase chain reaction amplification. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993;77(4):1041-5.
66. Dieudonne MN, Leneveu MC, Giudicelli Y, Pecquery R. Evidence for functional estrogen receptors alpha and beta in human adipose cells: regional specificities and regulation by estrogens. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004;286(3):C655-61.
67. Ogawa S, Chan J, Chester AE, Gustafsson JA, Korach KS, Pfaff DW. Survival of reproductive behaviors in estrogen receptor beta gene-deficient (betaERKO) male and female mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(22):12887-92.
68. Smith EP, Boyd J, Frank GR, Takahashi H, Cohen RM, Specker B, et al. Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *N Engl J Med.* 1994;331(16):1056-61.
69. Okura T, Koda M, Ando F, Niino N, Ohta S, Shimokata H. Association of polymorphisms in the estrogen receptor alpha gene with body fat distribution. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2003;27(9):1020-7.
70. Casazza K, Page GP, Fernandez JR. The association between the rs2234693 and rs9340799 estrogen receptor alpha gene polymorphisms and risk factors for cardiovascular disease: a review. *Biol Res Nurs.* 2010;12(1):84-97.
71. Ribas V, Nguyen MT, Henstridge DC, Nguyen AK, Beaven SW, Watt MJ, et al. Impaired oxidative metabolism and inflammation are associated with insulin

resistance in ERalpha-deficient mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010;298(2):E304-19.

72. Deng HW, Li J, Li JL, Dowd R, Davies KM, Johnson M, et al. Association of estrogen receptor-alpha genotypes with body mass index in normal healthy postmenopausal Caucasian women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(8):2748-51.

73. Bjornholm M, Zierath JR. Insulin signal transduction in human skeletal muscle: identifying the defects in Type II diabetes. *Biochem Soc Trans.* 2005;33(Pt 2):354-7.

74. Barros RP, Gabbi C, Morani A, Warner M, Gustafsson JA. Participation of ERalpha and ERbeta in glucose homeostasis in skeletal muscle and white adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009;297(1):E124-33.

75. Barros RP, Gustafsson JA. Estrogen receptors and the metabolic network. *Cell Metab.* 2011;14(3):289-99.

76. Zhou L, Chen H, Xu P, Cong LN, Sciacchitano S, Li Y, et al. Action of insulin receptor substrate-3 (IRS-3) and IRS-4 to stimulate translocation of GLUT4 in rat adipose cells. *Mol Endocrinol.* 1999;13(3):505-14.

77. Livingstone C, Collison M. Sex steroids and insulin resistance. *Clin Sci (Lond).* 2002;102(2):151-66.

78. Rogers NH, Witczak CA, Hirshman MF, Goodyear LJ, Greenberg AS. Estradiol stimulates Akt, AMP-activated protein kinase (AMPK) and TBC1D1/4, but not glucose uptake in rat soleus. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;382(4):646-50.

79. Moreno M, Ordonez P, Alonso A, Diaz F, Tolviva J, Gonzalez C. Chronic 17beta-estradiol treatment improves skeletal muscle insulin signaling pathway components in insulin resistance associated with aging. *Age (Dordr).* 2010;32(1):1-13.

80. Alexanderson C, Eriksson E, Stener-Victorin E, Lonn M, Holmang A. Early postnatal oestradiol exposure causes insulin resistance and signs of inflammation in circulation and skeletal muscle. *J Endocrinol.* 2009;201(1):49-58.

81. Bryzgalova G, Gao H, Ahren B, Zierath JR, Galuska D, Steiler TL, et al. Evidence that oestrogen receptor-alpha plays an important role in the regulation of glucose homeostasis in mice: insulin sensitivity in the liver. *Diabetologia.* 2006;49(3):588-97.

82. Barros RP, Machado UF, Warner M, Gustafsson JA. Muscle GLUT4 regulation by estrogen receptors ERbeta and ERalpha. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(5):1605-8.

Anexo 1: CONSENTIMIENTO INFORMADO

Proyecto de investigación:

“EVALUACIÓN DEL RIESGO DE ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR EN MUJERES UNIVERSITARIAS DEL ESTADO DE GUERRERO”



Estimada trabajadora de la Universidad Autónoma de Guerrero:

Se le está invitando a participar en este estudio, antes de decidir debe conocer y comprender la importancia y beneficios del estudio que se mencionan a continuación. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas. Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregará una copia firmada y fechada.

Las enfermedades cardiovasculares (ECV), son la segunda causa de muerte en nuestro país, la evaluación de los factores de riesgo permite identificar el posible riesgo de un infarto. Las mujeres durante la etapa reproductiva, tienen una relativa protección para el desarrollo de ECV, relacionada con la producción de estrógenos, sin embargo, esta protección no es clara, y se agrava en la pos-menopausia.

A usted se le está invitando a participar con el principal interés de identificar posibles factores de riesgo de ECV y contribuir a su salud, previniendo estas enfermedades y con ello, disminuir la morbi-mortalidad por ECV en mujeres del estado de Guerrero, al proponer estrategias que mejoren el diagnóstico temprano de estas enfermedades. En caso de que usted acepte participar en el estudio, se le realizarán algunas preguntas, sus hábitos, sus antecedentes médicos y familiares; las mediciones de peso, talla, cintura y presión arterial, y se le tomará muestra de sangre con el fin de que en el laboratorio de Investigación de Enfermedades Crónicas Degenerativas de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la UAG, le realicemos las determinaciones de glucosa (azúcar), lípidos (grasas, como son colesterol, triglicéridos, c-HDL, c-LDL), estradiol, e identificación de variantes en genes relacionados al riesgo de ECV. La información que se obtenga, será totalmente confidencial, de interés solo de usted, en ningún informe de este estudio se le identificará jamás en forma alguna. Como beneficio personal le proporcionaremos sin costo alguno, los resultados por escrito de los diferentes estudios clínicos y de laboratorio practicados.

Por otra parte, usted está en libertad de abandonar el estudio en cuanto lo decida, sin que ello pueda generar conflicto de intereses, molestias o actitudes represivas hacia usted por cualquier integrante del grupo de investigación.

La Maestra en Ciencias, Eugenia Flores Alfaro, es la persona a quien debe buscar en caso de que tenga alguna pregunta acerca del estudio o sobre sus derechos como participante, en la UA de Ciencias Químico Biológicas de la UAG. Teléfono: (747)4725503, ó (747) 4719310, ext. 4526

Lugar y Fecha: _____

Nombre y firma del entrevistado(a) _____

Nombre y firma del entrevistador (a) _____

ANEXO 2

TÉCNICA RÁPIDA NO ENZIMÁTICA PARA SANGRE LÍQUIDA

1. Transferir 700µl de sangre periférica en un tubo eppendorf estéril de 1.5 ml.
2. Adicionar 700µl de buffer TKM1 y 18µl de Tritón 100X, agitar con vortex hasta disolución total.
3. Centrifugar a 3000 rpm por 5 min a temperatura ambiente, desechar el sobrenadante.
4. Repetir los pasos 2 y 3 hasta observar el botón blanco o libre de hemoglobina.
5. Adicionar 700µl de buffer TKM1.
6. Centrifugar a 3500 rpm por 5 min a temperatura ambiente. Desechar el sobrenadante.
7. Resuspender el botón en 120µl de buffer TKM2 y adicionar 15µl de SDS al 10%, resuspender totalmente e incubar durante 10 min a 65°C o hasta digestión total.
8. Agregar 60µl de NaCl 5M, resuspender por agitación suave (por inversión).
9. Centrifugar a 12000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente.
10. Recuperar el sobrenadante que contiene el DNA en un tubo eppendorf estéril, y desechar el precipitado proteico.
11. Agregar 2 volúmenes de etanol absoluto frío e invertir varias veces de manera suave el tubo hasta que el DNA precipite.
12. Centrifugar a 3500 rpm por 5 min a 4°C, decantar el exceso de etanol y agregar 400µl de etanol al 70% frío.
13. Centrifugar a 3500 rpm por 5 min a 4°C, decantar el exceso de etanol y secar al vacío o a temperatura ambiente.
14. Resuspender el DNA con agua desionizada estéril.

Table 1. Association between SNP rs1884051 in *ESR1* gene with MetS and their components

Factor	Inheritance model [‡]														
	Codominant						Dominant				Overdominant				
	GG	AG	OR (95%CI)	p	AA	OR (95%CI)	p	GG	AG+AA	OR (95%CI)	p	GG+AA	AG	OR (95%CI)	p
MetS, n (%)															
No	107 (33.3)	148 (46.1)	1.0		66 (20.6)	1.0		107 (33.3)	214 (66.7)	1.0		173 (53.9)	148 (46.1)	1.0	
Yes	44 (27.7)	86 (54.1)	1.3 (0.8-2.1)	0.237	29 (18.2)	0.9 (0.5-1.7)	0.768	44 (27.7)	115 (72.3)	1.2 (0.7-1.9)	0.430	73 (45.9)	86 (54.1)	1.4 (0.9-2.1)	0.125
AO >88 cm, n (%)															
No	65 (31.1)	98 (46.9)	1.0		46 (22.0)	1.0		65 (31.1)	144 (68.9)	1.0		111 (53.1)	98 (46.9)	1.0	
Yes	86 (31.7)	136 (50.2)	1.0 (0.6-1.5)	0.890	49 (18.1)	0.7 (0.4-1.3)	0.768	86 (31.7)	185 (68.3)	0.9 (0.6-1.3)	0.599	135 (49.8)	136 (50.2)	1.1 (0.8-1.6)	0.653
BP ≥130/85 mm Hg, n (%)															
No	119 (33.1)	172 (47.8)	1.0		69 (19.2)	1.0		119 (33.1)	241 (66.9)	1.0		188 (52.2)	172 (47.8)	1.0	
Yes	32 (26.7)	62 (51.6)	1.3 (0.8-2.1)	0.362	26 (21.7)	1.3 (0.7-2.4)	0.458	32 (26.7)	88 (73.3)	1.3 (0.8-2.0)	0.335	58 (48.3)	62 (51.6)	1.1 (0.7-1.8)	0.530
Glucose ≥110 mg/dL o T2D, n (%)															
No	140 (32.9)	209 (49.0)	1.0		77 (18.1)	1.0		140 (32.9)	286 (67.1)	1.0		217 (50.9)	209 (49.0)	1.0	
Yes	11 (20.4)	25 (46.3)	1.4 (0.7-3.1)	0.351	18 (33.3)	2.9 (1.2-6.6)	0.013	11 (20.4)	43 (79.6)	1.8 (0.9-3.7)	0.102	29 (53.7)	25 (46.3)	0.9 (0.5-1.5)	0.606
TG ≥150 mg/dL, n (%)															
No	97 (31.8)	140 (45.9)	1.0		68 (22.3)	1.0		97 (31.8)	208 (68.2)	1.0		165 (54.1)	140 (45.9)	1.0	
Yes	54 (30.9)	94 (53.7)	1.2 (0.8-1.8)	0.476	27 (15.4)	0.6 (0.4-1.1)	0.134	54 (30.9)	121 (69.1)	1.0 (0.7-1.5)	0.980	81 (46.3)	94 (53.7)	1.4 (0.9-2.0)	0.099
HDL-c <50 mg/dL, n (%)															
No	34 (29.8)	49 (43.0)	1.0		31 (27.2)	1.0		34 (29.8)	80 (70.2)	1.0		65 (57.0)	49 (43.0)	1.0	
Yes	117 (32.0)	185 (50.5)	1.1 (0.7-1.8)	0.764	64 (17.5)	0.6 (0.3-1.0)	0.067	117 (32.0)	249 (68.0)	0.9 (0.6-1.4)	0.607	181 (49.5)	185 (50.5)	1.3 (0.9-2.1)	0.168

OR: Odds ratio; CI: Confidence interval; MetS: Metabolic syndrome; AO: Abdominal obesity; BP: Blood pressure; T2D: Type 2 diabetes; TG: Triglycerides; HDL-c: High density lipoprotein cholesterol.

[‡]Model adjusted for age, years of schooling and by the admixture proportion.

Table 2. Association between SNP rs328 in *LPL* gene with MetS and their components

Factor	Inheritance model [‡]														
	Codominant						Dominant				Overdominant				
	CC	CG	OR (95%CI)	p	GG	OR (95%CI)	p	CC	CG+GG	OR (95%CI)	p	CC+GG	CG	OR (95%CI)	p
MetS, n (%)															
No	292 (91.0)	29 (9.0)	1.0		0	1.0		292 (91.0)	29 (9.0)	1.0		292 (91.0)	29 (9.0)	1.0	
Yes	152 (95.6)	6 (3.8)	0.3 (0.1-0.8)	0.018	1 (0.6)	ND		152 (95.6)	7 (4.4)	0.4 (0.1-0.9)*	0.030	153 (96.2)	6 (3.8)	0.3 (0.1-0.8)	0.02
AO >88 cm, n (%)															
No	192 (91.9)	16 (7.6)	1.0		1 (0.5)	1.0		192 (91.9)	17 (8.1)	1.0		193 (92.3)	16 (7.6)	1.0	
Yes	252 (93.0)	19 (7.0)	0.9 (0.4-1.7)	0.664	0	ND		252 (93.0)	19 (7.0)	1.3 (0.6-2.5)	0.529	252 (93.0)	19 (7.0)	0.9 (0.4-1.8)	0.670
BP ≥130/85 mm Hg, n (%)															
No	329 (91.4)	31 (8.6)	1.0		0	1.0		329 (91.4)	31 (8.6)	1.0		329 (91.4)	31 (8.6)	1.0	
Yes	115 (95.8)	4 (3.4)	0.3 (0.1-1.0)	0.041	1 (0.8)	ND		115 (95.8)	5 (4.2)	2.5 (0.9-7.0)	0.080	116 (96.7)	4 (3.3)	0.3 (0.1-0.9)	0.040
Glucose ≥110 mg/dL o T2D, n (%)															
No	391 (91.8)	34 (8.0)	1.0		1 (0.2)	1.0		391 (91.8)	35 (8.2)	1.0		392 (92.0)	34 (8.0)	1.0	
Yes	53 (98.1)	1 (1.9)	0.2 (0.1-1.5)	0.115	0	ND		53 (98.1)	1 (1.9)	5.5 (0.7-42.4)	0.102	53 (98.1)	1 (1.9)	0.2 (0.1-1.5)	0.116
TG ≥150 mg/dL, n (%)															
No	280 (91.8)	25 (8.2)	1.0		0	1.0		280 (91.8)	25 (8.2)	1.0		280 (91.8)	25 (8.2)	1.0	
Yes	164 (93.7)	10 (5.7)	0.7 (0.3-1.4)	0.292	1 (0.6)	ND		164 (93.7)	11 (6.3)	1.4 (0.7-3.1)	0.364	165 (94.3)	10 (5.7)	0.6 (0.3-1.4)	0.289
HDL-c <50 mg/dL, n (%)															
No	102 (89.5)	12 (10.5)	1.0		0	1.0		102 (89.5)	12 (10.5)	1.0		102 (89.5)	12 (10.5)	1.0	
Yes	342 (93.4)	23 (6.3)	0.5 (0.2-1.1)	0.090	1 (0.3)	ND		342 (93.4)	24 (6.6)	1.8 (0.9-3.8)	0.112	343 (93.7)	23 (6.3)	0.5 (0.2-1.1)	0.089

OR: Odds ratio; CI: Confidence interval; MetS: Metabolic syndrome; ND: Not determined; AO: Abdominal obesity; BP: Blood pressure; T2D: Type 2 diabetes; TG: Triglycerides; HDL-c: High density lipoprotein cholesterol.

[‡] Model adjusted for age, years of schooling and by the admixture proportion.

*The association between CC genotype with MetS was **OR=2.8 (95%CI: 1.1-6.9; p=0.030)** compared with CG or GG genotype.

Table 3. Association between SNP rs708272 in *CETP* gene with MetS and their components

Factor	Inheritance model [‡]														
	Codominant						Dominant				Overdominant				
	AA	GA	OR (95%CI)	p	GG	OR (95%CI)	p	AA	GA+GG	OR (95%CI)	p	AA+GG	GA	OR (95%CI)	p
MetS, n (%)															
No	89 (27.7)	149 (46.4)	1.0		83 (25.9)	1.0		89 (27.7)	232 (72.3)	1.0		172 (53.6)	149 (46.4)	1.0	
Yes	33 (20.8)	94 (59.1)	1.7 (1.0-2.8)	0.042	32 (20.1)	0.9 (0.9-1.7)	0.749	33 (20.8)	126 (79.2)	1.4 (0.9-2.3)	0.170	65 (40.9)	94 (59.1)	1.8 (1.2-2.7)	0.006
AO >88 cm, n (%)															
No	53 (25.3)	99 (47.4)	1.0		57 (27.3)	1.0		53 (25.3)	156 (74.6)	1.0		110 (52.6)	99 (47.4)	1.0	
Yes	69 (25.5)	144 (53.1)	1.1 (0.7-1.7)	0.794	58 (21.4)	0.7 (0.4-1.2)	0.794	69 (25.5)	202 (74.5)	0.9 (0.6-1.4)	0.769	127 (46.9)	144 (53.1)	1.2 (0.9-1.8)	0.250
BP ≥130/85 mm Hg, n (%)															
No	103 (28.6)	168 (46.7)	1.0		89 (24.7)	1.0		103 (28.6)	257 (71.4)	1.0		192 (53.3)	168 (46.7)	1.0	
Yes	19 (15.8)	75 (62.5)	2.5 (1.4-4.4)	0.002	26 (21.7)	1.5 (0.7-2.9)	0.279	19 (15.8)	101 (84.2)	2.1 (1.2-3.7)	0.009	45 (37.5)	75 (62.5)	2.0 (1.3-3.2)	0.002
Glucose ≥110 mg/dL o T2D, n (%)															
No	117 (27.5)	211 (49.5)	1.0		98 (23.0)	1.0		117 (27.5)	309 (72.5)	1.0		215 (50.5)	211 (49.5)	1.0	
Yes	5 (9.3)	32 (59.2)	3.5 (1.3-9.3)	0.013	17 (31.5)	3.7 (1.3-10.7)	0.016	5 (9.3)	49 (90.7)	3.6 (1.4-9.3)	0.010	22 (40.7)	32 (59.2)	1.5 (0.8-2.8)	0.161
TG ≥150 mg/dL, n (%)															
No	81 (26.6)	148 (48.5)	1.0		76 (24.9)	1.0		81 (26.6)	224 (73.4)	1.0		157 (51.5)	148 (48.5)	1.0	
Yes	41 (23.4)	95 (54.3)	1.2 (0.7-2.0)	0.375	39 (22.3)	0.9 (0.5-1.6)	0.684	41 (23.4)	134 (76.6)	1.1 (0.7-1.8)	0.630	80 (45.7)	95 (54.3)	1.3 (0.9-1.9)	0.171
HDL-c <50 mg/dL, n (%)															
No	26 (22.8)	64 (56.1)	1.0		24 (21.1)	1.0		26 (22.8)	88 (77.2)	1.0		50 (43.9)	64 (56.1)	1.0	
Yes	96 (26.2)	179 (48.9)	0.8 (0.4-1.3)	0.285	91 (24.9)	1.0 (0.6-1.9)	0.913	96 (26.2)	270 (73.8)	0.8 (0.5-1.4)	0.460	187 (51.1)	179 (48.9)	0.7 (0.5-1.1)	0.164

OR: Odds ratio; CI: Confidence interval; MetS: Metabolic syndrome; AO: Abdominal obesity; BP: Blood pressure; T2D: Type 2 diabetes; TG: Triglycerides; HDL-c: High density lipoprotein cholesterol.

[‡]Model adjusted for age, years of schooling and by the admixture proportion.