

POLIMORFISMO -31118 G/A (*rs1761667*) DEL GEN DEL RECEPTOR CD36 Y LAS VARIANTES 388 T/C (*rs429358*) Y 526 C/T (*rs7412*) DEL GEN DE LA APO-E EN INDIVIDUOS OBESOS

Angélica Fernández ¹, María Victoria Atencio ², Gustavo Benítez Pérez ³, Maria Fatima Garces ⁴.

¹Licenciada en Bioanálisis. Profesor Instructor de la Cátedra de pasantías hospitalarias de la Escuela de Bioanálisis de la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela. ²Licenciada en Bioanálisis, Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", Caracas, Venezuela. ³Médico Cirujano, Dr. en Gerencia, Profesor Titular, Escuela Luis Razetti, Facultad de Medicina. Jefe del Departamento de Cirugía HUC-UCV. ⁴Licenciada en Bioanálisis, Doctor en Bioquímica. Profesor Titular, Cátedra de Bioquímica "A". Coordinadora del Laboratorio de Investigaciones Básicas y Aplicadas de la Escuela de Bioanálisis. Vicerrectora Académica de la Universidad Central de Venezuela. Premio "Franca Billi" XVII Congreso Venezolano de Bioanálisis 2023

Recibido para publicación 22 julio 2023. Aceptado: 15 septiembre 2023

RESUMEN:

Introducción: La obesidad es una patología compleja en donde el ambiente y la genética del individuo participan en la regulación del peso y la grasa corporal. Estudios relacionados con el gen CD36, polimorfismo *rs1761667* y el gen APOE, variantes 388 T/C (*rs429358*) y 526 C/T (*rs7412*) han sido asociados con variaciones en la concentración de las lipoproteínas séricas, sin embargo, estos han sido muy contradictorios. **Objetivo:** Evaluar la asociación del polimorfismo -31118 G/A (*rs1761667*) del gen CD36 y las variantes 388 T/C (*rs429358*) y 526 C/T (*rs7412*) del gen APOE con el riesgo a desarrollar obesidad. **Metodología:** La muestra en estudio comprende un grupo de individuos obesos (n=110) y un grupo control de individuos normopeso (n=114). La extracción del ADN genómico se realizó por el método de Bunce modificado, para la identificación de los polimorfismos se realizó la metodología de PCR-RFLP. **Resultados y conclusiones:** Los individuos con obesidad presentaron concentraciones significativamente incrementadas de colesterol total, LDL-c, VLDL-c, triglicéridos basales y postprandiales a las 2 y 4 horas, insulina basal, y HOMA con respecto a las concentraciones del grupo control. No se observó asociación entre los polimorfismos -31118 G/A (*rs1761667*) del gen CD36, 388 T/C (*rs429358*) y 526 C/T (*rs7412*) del gen APOE y el riesgo a desarrollar obesidad, intolerancia a las grasas ni resistencia a la insulina.

Palabras clave: Obesidad, Lípidos, Polimorfismo, PCR-RFLP, APOE, CD36, *rs1761667*, *rs429358*, *rs7412*.

POLYMORPHISM -31118 G/A (*rs1761667*) OF THE CD36 RECEPTOR GENE AND THE VARIANTS 388 T/C (*rs429358*) AND 526 C/T (*rs7412*) OF THE APO-E GENE IN OBESE INDIVIDUALS

ABSTRACT

Introduction: Obesity is a complex pathology where the environment and the individual's genetics play roles in regulating body weight and fat. Studies related to the CD36 gene, polymorphism *rs1761667*, and the APOE gene, variants 388 T/C (*rs429358*) and 526 C/T (*rs7412*), have been associated with variations in serum lipoprotein concentrations; however, these results have been highly contradictory. **Objective:** To evaluate the association of the -31118 G/A (*rs1761667*) polymorphism of the CD36 gene and the 388 T/C (*rs429358*) and 526 C/T (*rs7412*) variants of the APOE gene with the risk of developing obesity. **Methodology:** The study sample comprises a group of obese individuals (n=110) and a control group of normal-weight individuals (n=114). Genomic DNA extraction was performed using the modified Bunce method. The identification of the polymorphisms was carried out using the PCR-RFLP methodology. **Results and Conclusions:** Obese individuals showed significantly increased concentrations of total cholesterol, LDL-c, VLDL-c, fasting and postprandial triglycerides at 2 and 4 hours, fasting insulin and HOMA compared to the control group's concentrations. No association was observed between the -31118 G/A (*rs1761667*) polymorphisms of the CD36 gene, 388 T/C (*rs429358*) and 526 C/T (*rs7412*) of the APOE gene and the risk of developing obesity, fat intolerance, or insulin resistance.

Keywords: Obesity, Lipids, Polymorphism, PCR-RFLP, APOE, CD36, *rs1761667*, *rs429358*, *rs7412*.

Introducción

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la obesidad como una enfermedad crónica de alta prevalencia, que se caracteriza por un aumento

desmesurado de la grasa corporal y un mayor riesgo para la salud. Asimismo, es considerada una pandemia, las cifras señalan que desde 1975 hasta el 2016 se ha triplicado el número de individuos que la padecen

Solicitar copia a: Maria Fatima Garces (mariafatimagarcesdasilva@gmail.com)

a nivel mundial (1), este incremento ha sido ligado con la llegada de la urbanización, lo que demuestra el papel decisivo que poseen los factores ambientales a la hora de estudiar esta patología.

Ahora bien, la obesidad se considera una enfermedad multifactorial, es decir, puede ser provocada por distintos factores, entre los cuales destacan, los factores genéticos, ambientales, metabólicos y endocrinos (2). En los últimos años y debido a los avances tecnológicos se ha podido comprobar la importancia de la genética en el desarrollo de diversas enfermedades, incluyendo la obesidad. Muchos han sido los genes asociados a esta condición, y la interacción entre los mismos puede tener la capacidad de propiciar, o por el contrario proteger a los individuos portadores del desarrollo de dicha patología. Entre muchas funciones, el receptor *scavenger* clase B tipo I, CD36, juega un papel importante facilitando el consumo y utilización de los ácidos grasos celulares. Las investigaciones sobre este receptor son relativamente nuevas, sin embargo, estudios de los polimorfismos en dicho gen demuestran la influencia de estos en los lípidos plasmáticos (3).

Por otra parte, el gen codificante de la apolipoproteína E (APOE) es catalogado como uno de los genes más estudiados del genoma (4), su función es el “aclaramiento” de lipoproteínas remanentes sirviendo como ligando para LDL y los receptores de Apo E (5). Existen tres alelos APOE diferentes ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$), que dan lugar a las isoformas de la proteína en plasma (6). Las alteraciones en proteínas relacionadas con el metabolismo lipídico influyen en el fenotipo de obesidad, y las concentraciones de dichas proteínas estarán determinadas por los polimorfismos de los genes que las codifican (7).

Por lo anteriormente expuesto, se propone evaluar la asociación del polimorfismo -31118 G/A (rs1761667) del gen CD36 y los polimorfismos 388 T/C (rs429358) y 526 C/T (rs7412) del gen APOE con el riesgo a desarrollar obesidad y con los perfiles glucémico y lipídico, en pacientes obesos venezolanos pertenecientes a la Unidad de Cirugía Bariátrica y Metabólica (UNIBAROS), adscrita al Departamento de Cirugía del Hospital Universitario de Caracas.

Materiales y métodos

Tipo y nivel de la investigación

El presente es un estudio descriptivo-correlacional, de cohorte de casos y controles. Los individuos participantes fueron pacientes atendidos en la Unidad de cirugía bariátrica y metabólica (UNIBAROS), del Hospital Universitario de Caracas.

Aspectos éticos y administrativos

El protocolo de estudio cuenta con el aval del Comité de Bioética de la Escuela de Bioanálisis de la Universidad Central de Venezuela, se realiza bajo las normas de ética de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para trabajos de investigación en humanos y cuenta con el consentimiento informado escrito y firmado de los participantes en estudio.

Población

La población estudiada fue parte de la Unidad de Cirugía Bariátrica y Metabólica (UNIBAROS), adscrita al Departamento de Cirugía del Hospital Universitario de Caracas. De igual forma, se cuenta con una población control conformada por individuos voluntarios normopeso y aparentemente sanos, que acudieron al Laboratorio de Ciencias Básicas y Aplicadas de la Escuela de Bioanálisis de la Universidad Central de Venezuela (UCV).

Recolección y procesamiento de muestras sanguíneas

A cada individuo en estudio se le extrajeron 10 ml de sangre venosa en ayunas. Posteriormente, se les proporcionó un desayuno, el cual consistió en una empanada de queso y un café con leche, lo que contiene una carga aproximada de 26,3 g de grasa. Luego de la ingesta, se extrajeron dos muestras sanguíneas más, correspondientes a las 2 horas y 4 horas después de comer, denominadas muestras postprandiales.

Determinación de los parámetros bioquímicos

Las muestras se procesaron con el equipo KONELAB prime 60i de THERMOS *Scientific*, para la determinación de los parámetros de glucosa, colesterol total, colesterol HDL y triglicéridos. La determinación de insulina se realizó mediante la técnica de ELISA, empleando el kit comercial Insulin ELISA de DRG *Diagnostics*.

Genotipificación

La extracción de ADN se realizó mediante el método de Bunce modificado (8). La cuantificación de ADN

se determinó en un biofotómetro (Eppendorf) a 260 nm. Así mismo, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0,75% para determinar la calidad del ADN.

El ADN genómico se amplificó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en un termociclador Labcycler SensoQuest.

a. Polimorfismo -31118 G/A (rs1761667) del gen CD 36

Se realizó PCR con los oligómeros y mezcla de reacción descrita por Banerjee *et al.* (9), con ligeras modificaciones. Los oligonucleótidos utilizados fueron los siguientes:

Primer Forward:

5' - CAAAATCACAATCTATTCAAGACCA - 3'

Primer Reverse:

5' - TTTTGGGAGAAATTCTGAAGAG - 3'

Las condiciones utilizadas para la PCR fueron las descritas por Salim *et al.* (10). Se preparó un volumen final de reacción de 25 µl, que contuvo 100 - 150 ng de ADN genómico, 25 pmol/µl de cada oligómero, 100 mM de dNTPs, 25 mM de MgCl₂ y 5 U/µm de Taq DNA Polimerasa, junto con su respectivo buffer. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: desnaturalización a 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización de 95 °C por 30 segundos, alineamiento a 54°C por 30 segundos, extensión a 72 °C por 30 segundos y una extensión final a 72 °C por 5 minutos. Los productos amplificados se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio y visualizados en el equipo Gel Doc™ XR+ System (Bio-Rad).

Los productos amplificados se sometieron a una digestión con la enzima de restricción *HhaI*, como lo indicado por Banerjee *et al.* (9) para la determinación del polimorfismo -31118G/A (rs1761667) del gen CD36, separándose posteriormente por electroforesis vertical en gel de poliacrilamida al 10% en Buffer TAE 1X y coloreado con Bromuro de Etidio.

b. Polimorfismos 388 T/C (rs429358) y 526 C/T (rs7412) del gen APOE

La PCR se realizó con los oligómeros y la mezcla de reacción descrita por Hixon *et al.* (11), con ligeras modificaciones. Los oligonucleótidos utilizados fueron los siguientes:

Primer Forward:

5' - ACA GAA TTC GCC CCG GCC TGG TAC AC - 3'

Primer Reverse:

5' - TAA GCT TGG CAC GGC TGT CCA AGG A - 3'

Las condiciones de la PCR fueron las utilizadas en el estudio de Srivastava *et al.* (7). Se preparó un volumen final de reacción de 25 µl, que contuvo 100 - 150 ng de ADN genómico, 25 pmol/µl de cada oligómero, 100 mM de dNTPs, 25 mM de MgCl₂, 100% de dimetil sulfóxido y 5 U/µm de Taq DNA Polimerasa, junto con su respectivo buffer. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos con fases de desnaturalización a 94°C por 1 minuto, hibridación o alineamiento a 58°C por 1 minuto, y extensión a 70°C por 1:30 minutos, seguidos por una extensión final a 70°C por 10 min. Los productos amplificados se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio, y visualizados en el equipo Gel Doc™ XR+ System (Bio-Rad).

Los productos amplificados se sometieron a una digestión con la enzima *HhaI*, indicado por Srivastava *et al.* (7) para la determinación de las variantes del gen *APOE*, separándose posteriormente por electroforesis vertical en gel de poliacrilamida al 10% en Buffer TAE 1X coloreado con Bromuro de Etidio.

Análisis estadístico

Se utilizó estadística descriptiva, la cual incluye; media, desviación estándar y se aplicó la prueba ANOVA (análisis de la varianza) para establecer la diferencia entre los grupos. La significancia estadística de las diferencias de frecuencias de los polimorfismos del gen *CD36* y del gen *APOE* entre el grupo de pacientes y controles, fue estimada por la prueba de Ji cuadrado (X^2) usando tablas de contingencia. Para estimar la posible asociación de los diferentes polimorfismos de los genes *CD36* y *APOE* y obesidad se calculó la razón de probabilidades (Odds Ratio: OR), con el correspondiente intervalo de confianza (95%). Para determinar las relaciones entre alelos y/o genotipos de los genes a estudiar y los parámetros bioquímicos se realizaron pruebas de ANOVA. De igual forma se realizó la prueba de equilibrio Hardy-Weinberg (H-W) para determinar si la distribución genotípica en los individuos en estudio se encuentra en equilibrio.

Resultados y discusión

Características de la población estudiada

La población estudiada quedó conformada por 110 individuos obesos, 75,45% (n= 83) de sexo biológico femenino y 24,55% (n= 27) de sexo biológico masculino, con una edad promedio de 47 años \pm 11,99 (20 - 80). Por otra parte, el grupo control quedó conformado por 114 individuos normopeso, 69,30% (n= 79) de sexo biológico femenino y 30,70% (n= 35) de sexo biológico masculino, con una edad promedio de 30 años \pm 11,16 (18 - 65).

En la tabla 1 se presenta la media aritmética \pm desviación estándar, tanto para los individuos obesos como para los controles de los parámetros antropométricos y bioquímicos de cada grupo en estudio. Los individuos obesos presentaron un perfil lipídico alterado en comparación con los individuos normopeso, donde las concentraciones de triglicéridos basales y

postprandiales (2 horas y 4 horas), VLDL-c, LDL-c poseen un incremento estadísticamente significativo y las HDL-c una disminución igualmente significativa. En cuanto al perfil glucémico, los individuos obesos presentaron concentraciones de glucosa, insulina y HOMA-IR significativamente incrementadas en comparación con el grupo control. Estos resultados son comparables con los encontrados por Luz E. Ramos Arellanos *et al.* (12), quienes describieron que las concentraciones de colesterol total, LDL-c y TG en los individuos obesos se encontraban significativamente elevados en comparación con el grupo control de individuos normopeso ($p < 0,05$).

Tipificación del polimorfismo -31118 G/A (rs1761667) del gen del receptor CD36

En la Figura N° 1, se visualizan los productos amplificados correspondientes a la región -31118 G/A del gen del receptor CD36.

Tabla 1. Parámetros antropométricos y bioquímicos de los individuos en estudio

Parámetros	Individuos normopeso (controles) n = 114	Individuos obesos (casos) n = 110	Valores de referencia
IMC (Kg/m ²)	22,56 \pm 2,27	36,77 \pm 9,06***	20,0-24,99
Talla (m)	1,66 \pm 0,08	1,62 \pm 0,09	-
Peso (Kg)	62,50 \pm 9,43	96,16 \pm 21,11	-
Glicemia Basal (mg/dL)	86,94 \pm 10,80	91,13 \pm 29,82***	70 - 100
Colesterol total (mg/dL)	183,92 \pm 45,80	162,33 \pm 51,01	< 200
Triglicéridos basales (mg/dL)	99,27 \pm 33,11	105,91 \pm 58,07*	30 - 150
Triglicéridos 2h (mg/dL)	111,32 \pm 36,96	140,24 \pm 62,97***	< 30% TG basal
Triglicéridos 4h (mg/dL)	107,41 \pm 34,43	129,34 \pm 57,36**	< 30% TG basal
HDL-c (mg/dL)	52,07 \pm 16,76	28,31 \pm 13,48**	40 - 60
LDL-c (mg/dL)	112,01 \pm 40,25	112,83 \pm 48,27	< 159
VLDL-c (mg/dL)	19,84 \pm 6,58	21,18 \pm 11,62*	15 - 44
TG basal/ HDL-c	2,13 \pm 1,08	5,59 \pm 7,19***	< 3
TG 2H/ HDL-c	2,40 \pm 1,18	5,75 \pm 4,51***	< 3
TG 4H/ HDL-c	2,32 \pm 1,17	5,32 \pm 4,31***	< 3
Col/ HDL-c	3,78 \pm 1,23	8,37 \pm 10,67***	< 5
LDL-Col/ HDL-c	2,35 \pm 1,10	6,25 \pm 9,55***	< 3,6
Insulina (mUI/mL)	8,61 \pm 4,09	19,81 \pm 8,98**	2 - 25
HOMA	1,85 \pm 0,91	4,67 \pm 3,85**	

HDL: Lipoproteína de alta densidad. LDL: Lipoproteína de baja densidad. VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad. c: Colesterol. HOMA: Modelo de registro homeostático.

*** $p < 0,001$ con respecto al grupo control

** $p < 0,005$ con respecto al grupo control

* $p < 0,05$ con respecto al grupo control

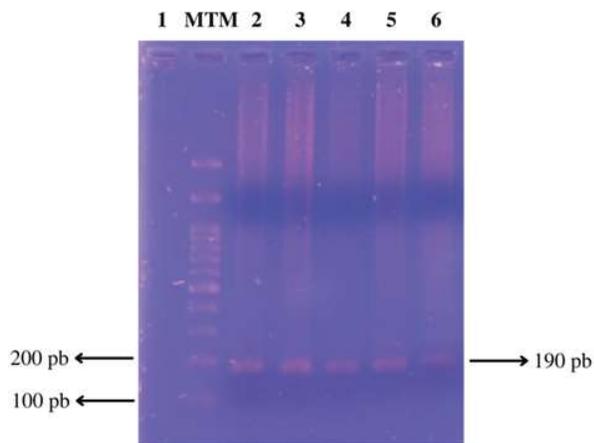


Figura N° 1. Productos amplificados por PCR del gen del receptor CD36. El carril 1 corresponde al control negativo. MTM (Marcador de tamaño molecular) de 100 pb (Promega). En los carriles 2, 3, 4, 5 y 6 se observa la amplificación del gen del receptor CD36 (190 pb).

En la Figura N° 2 se visualiza el producto de digestión de los fragmentos amplificados por PCR del gen del receptor CD36.

Se asignó el genotipo homocigoto A/A, cuando se evidencia una banda de 190 pb (carril 1), indicando que la enzima no realizó ningún corte; el genotipo heterocigoto G/A, cuando se evidencian tres bandas de 190 pb, 138 pb y 52 pb (carriles 2, 3 y 4); el genotipo homocigoto G/G cuando se evidencian dos bandas de 138 pb y 52 pb (carriles 5 y 6) y en el carril 7 se encuentra el control negativo.

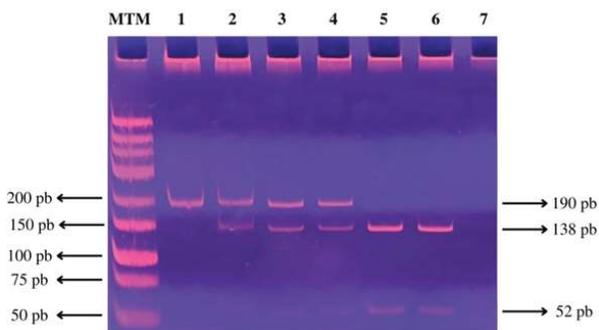


Figura N° 2. Producto de digestión del fragmento amplificado por PCR del gen del receptor CD36. MTM (marcador de tamaño molecular) de 25 pb (Promega). En el carril 1 se observa el genotipo homocigoto A/A, en los carriles 2, 3 y 4 se observa el genotipo heterocigoto G/A, en los carriles 5 y 6 se observa el genotipo homocigoto G/G, y en el carril 7 se encuentra el control negativo.

Tabla 2. Distribución de la frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo rs1761667 del gen CD36 en individuos obesos e individuos aparentemente sanos

	Individuos obesos (casos) n = 110	Individuos normopeso (controles) n = 114
Genotipo		
A/A	27,2 (30)	26,3 (30)
G/A	56,4 (62)	55,3 (63)
G/G	16,4 (18)	18,4 (21)
Alelo		
A	55,5 (122)	53,9 (123)
G	44,5 (98)	46,1 (105)

Nota. La frecuencia se muestra en porcentaje y entre paréntesis el número de individuos

En la tabla 2 se pueden observar las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo del gen del receptor CD36. Como se puede apreciar, el genotipo más frecuente fue el heterocigoto G/A para ambos grupos de estudio, seguido por el genotipo homocigoto A/A y el homocigoto G/G. Estos resultados son consistentes con los descritos por Ramos-Arellano *et al.* (13) en el año 2013, y Ramos-López *et al.* (14) en el año 2015.

En la tabla 3, se muestra el modelo de herencia entre individuos obesos e individuos normopeso, observándose que el modelo de herencia más ajustado es el dominante. No se observó asociación entre el desarrollo de obesidad y la frecuencia genotípica del polimorfismo rs1761667 del gen del receptor CD36 (OR = 0,952, IC95% = 0,527 - 1,721). Es importante destacar que tampoco se observaron diferencias

Tabla 3. Modelo de herencia dominante del polimorfismo rs1761667 del gen del receptor CD36 de pacientes obesos y controles en estudio

	Individuos obesos (casos) n = 110	Individuos normopeso (controles) n = 114	OR (IC: 95%)	P
Genotipo				
G/G - G/A	72,8 (80)	73,7 (84)	0,952 (0,527 - 1,721)	> 0,05
A/A	27,2 (30)	26,3 (30)		

Nota. La frecuencia se muestra en porcentaje y entre paréntesis el número de individuos

significativas al comparar la frecuencia alélica entre obesos y normopesos (OR = 0,941, IC 95% = 0,649 - 1,305).

No se encontraron estudios donde se relacionara directamente el riesgo a desarrollar obesidad con los diferentes genotipos del polimorfismo *rs1761667* del gen del receptor CD36, sin embargo Latisha Love-Gregory y Nada A. Abumrad (15), realizaron una revisión que resume la comprensión actual de la función de CD36 en el metabolismo de los lípidos, con énfasis en la influencia de las variantes genéticas del gen CD36 y su posible contribución a las complicaciones relacionadas con la obesidad.

Al clasificar los individuos en obesos tolerantes e intolerantes a las grasas, basados en el modelo de herencia dominante, no se observaron diferencias significativas (OR = 1,045, IC95% = 0,546 - 2,002, $p > 0,05$).

Como bien se sabe, el receptor CD36 actúa en la captación de ácidos grasos (AG) y lipoproteínas oxidadas. Además, se ha descrito que la ausencia de CD36 está asociada con lípidos séricos altos y con un perfil metabólico deficiente (16). Se ha observado que el alelo A del polimorfismo *rs1761667* reduce la expresión del receptor CD36 (13,14).

Al clasificar los individuos obesos en resistentes y no resistentes a la insulina, considerando valores de HOMA superiores a 3 como resistencia a la insulina (tabla 4), siguiendo un modelo de herencia recesivo, no se observaron diferencias significativas al comparar la frecuencia genotípica entre ambos grupos ($p > 0,05$). Sin embargo, los portadores de los genotipo A/A y G/A poseen 2 veces mayor posibilidad de desarrollar resistencia a la insulina con respecto a los individuos con el genotipo G/G (OR = 2,151, IC95% = 0,741 - 6,244, $p > 0,05$).

Durante los períodos de ayuno y ejercicio, la movilización de ácidos grasos (AG) aumenta desde los adipocitos y depósitos de AG hacia los tejidos, particularmente al músculo esquelético, para su absorción y oxidación. No obstante, la disponibilidad excesiva de ácidos grasos en plasma puede resultar en flujos de ácidos grasos que exceden la capacidad de los tejidos para utilizarlos, lo que lleva a resistencia a la insulina en el hígado y el músculo esquelético (3).

Al comparar los parámetros bioquímicos de los individuos obesos agrupados por el genotipo del gen

Tabla 4. Distribución de la frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo *rs1761667* del gen CD36 en individuos obesos resistentes y no resistentes a la insulina

	Obesos resistentes a la insulina n = 82	Obesos no resistentes a la insulina n = 28	OR (IC: 95%)	P
Genotipo				
A/A - G/A	86,6 (71)	75,0 (21)	2,151 (0,741 - 6,244)	> 0,05
G/G	13,4 (11)	25,0 (7)		
Alelo				
A	57,3 (94)	50,0 (28)	1,343 (0,731 - 2,467)	> 0,05
G	42,7 (70)	50,0 (28)		

Nota. La frecuencia se muestra en porcentaje y entre paréntesis el número de individuos

del receptor CD36, se observó que los individuos obesos con el genotipo homocigoto A/A presentaban un IMC mayor en comparación a los individuos obesos con los genotipos G/A y G/G. A su vez, el genotipo A/A se pudo asociar con mayores valores de insulina, lo cual concuerda con lo descrito por Terri A. Pietka *et al.* (3), en donde enfatizan la importancia de la molécula de CD36 como regulador de las vías implicadas en el metabolismo de la glucosa.

Polimorfismos 388 T/C (rs429358) y 526 C/T (rs7412) del gen APOE

En la Figura N° 3, se visualizan los productos amplificados correspondientes a la variante 388 T/C (rs429358) y 526 C/T (rs7412) del gen APOE.

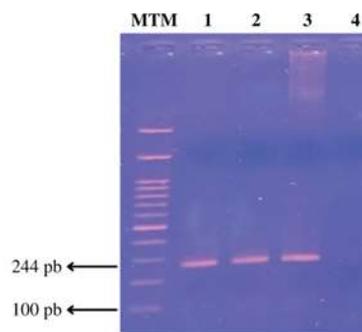


Figura N° 3. Productos amplificados por PCR de la variante 388 T/C (rs429358) y 526 C/T (rs7412) del gen APOE. MTM (Marcador de tamaño molecular). En los carriles 1, 2 y 3 se observa la amplificación del gen APOE (244 pb) y en el carril 4 se observa el control negativo.

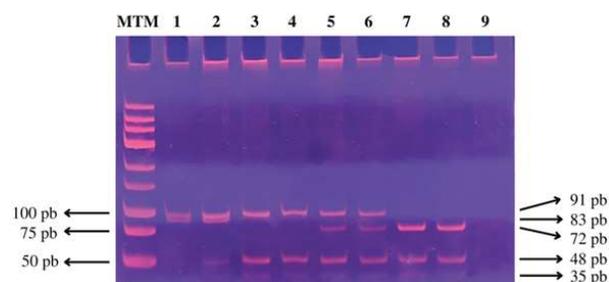


Figura N° 4. Producto de digestión del fragmento amplificado por PCR del gen de la variante 388 T/C (rs429358) y 526 C/T (rs7412) del gen APOE. MTM (marcador de tamaño molecular) de 25 pb (Promega). En el carril 1 se observa el genotipo homocigoto E2/E2, en el carril 2 se observa el genotipo heterocigoto E3/E2, en los carriles 3 y 4 se observa el genotipo homocigoto E3/E3, en los carriles 5 y 6 se observa el genotipo heterocigoto E3/E4, en los carriles 7 y 8 se observa el genotipo homocigoto E4/E4, y en el carril 9 se encuentra el control negativo.

En la Figura N° 4 se visualiza el producto de digestión de los fragmentos amplificados por PCR de la variante 388 T/C (rs429358) y 526 C/T (rs7412) del gen APOE.

Se asignaron los genotipos de la siguiente manera: genotipo homocigoto E2/E2: dos bandas: 91 pb y 83 pb (carril 1); genotipo heterocigoto E3/E2: cuatro bandas: 91 pb, 83 pb, 48 pb y 35 pb (carril 2); genotipo homocigoto E3/E3: tres bandas: 91 pb, 48 pb y 35 pb (carriles 3 y 4); genotipo heterocigoto E3/E4: cuatro bandas: 91 pb, 72 pb, 48 pb y 35 pb (carriles 5 y 6); genotipo homocigoto E4/E4: tres bandas: 72 pb, 48 pb y 35 pb (carriles 7 y 8); y genotipo heterocigoto E2/E4: cuatro bandas: 91 pb, 83 pb, 72 pb y 48 pb (no se observó el genotipo) (Figura 4) (11).

Estimación del equilibrio de Hardy Weinberg (H-W) para el polimorfismo -31118 G/A (rs1761667) del gen receptor CD36 y polimorfismos 388 T/C (rs429358) y 526 C/T (rs7412) del gen APOE

Se pudo constatar la existencia del equilibrio de Hardy-Weinberg tanto para el grupo de individuos controles (normopeso) como para el grupo de individuos obesos, en la distribución genotípica del sitio polimórfico estudiado en el gen del receptor CD36, al igual que en el gen APOE.

Distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos 388 T/C (rs429358) y 526 C/T (rs7412) del gen APOE en los dos grupos de adultos estudiados

Como se puede observar en la tabla 5 el alelo $\epsilon 3$ del

Tabla 5. Distribución de la frecuencia genotípica y alélica de los polimorfismos 388 T/C (rs429358) y 526 C/T (rs7412) del gen APOE en individuos obesos e individuos aparentemente sanos

	Individuos obesos (casos) n = 110	Individuos normopeso (controles) n = 114
Genotipo		
$\epsilon 2/\epsilon 2$	0,9 (1)	0
$\epsilon 3/\epsilon 2$	5,5 (6)	11,4 (13)
$\epsilon 3/\epsilon 3$	68,2 (75)	65,8 (75)
$\epsilon 3/\epsilon 4$	22,7 (25)	21,0 (24)
$\epsilon 4/\epsilon 4$	2,7 (3)	1,8 (2)
Alelo		
$\epsilon 2$	3,6 (8)	5,7 (13)
$\epsilon 3$	82,3 (181)	82 (187)
$\epsilon 4$	14,1 (31)	12,3 (28)

Nota. La frecuencia se muestra en porcentaje y entre paréntesis el número de individuos

gen APOE es el más frecuente tanto para los individuos obesos (82,3%) como para los individuos normopeso (82%), en concordancia con Fernández-Mestre *et al.* (17) quienes indican que el alelo más común es el alelo $\epsilon 3$, seguido por el alelo $\epsilon 2$. Sin embargo, en el presente estudio el alelo $\epsilon 2$ presentó una menor frecuencia en los individuos obesos y normopeso (3,6% y 5,7%, respectivamente), de igual forma los resultados obtenidos en esta investigación coinciden con los encontrados por Garcés *et al.* (18).

En los individuos obesos los genotipos E2/E2 + E3/E2 representan un 74,6% y los genotipos E4/E4 + E3/E4 un 25,4%, en los normopesos los genotipos E2/E2 + E3/E3 + E3/E2 representan un 77,2% y los genotipos E4/E4 + E3/E4 un 22,8%.

No se observaron diferencias significativas en las frecuencias genotípicas entre los grupos en estudio (OR = 1,156, IC95% = 0,626 - 2,133, $p > 0,05$) ni en las frecuencias alélicas (OR = 0,941, IC95% = 0,649 - 1,365, $p > 0,05$) entre los grupos en estudio (tabla 6), lo que concuerda con lo notificado por Zarkesh *et al.* (19).

Al comparar los individuos obesos tolerantes e intolerantes a las grasas, no se observó asociación entre la frecuencia genotípica (OR = 1,120, IC95% = 0,328 - 3,404, $p > 0,05$) y alélica (OR = 1,667, IC95% = 0,636 - 4,371, $p > 0,05$) con el riesgo a desarrollar intolerancia

Tabla 6. Distribución genotípica y alélica de los polimorfismos 388 T/C (*rs429358*) y 526 C/T (*rs7412*) del gen APOE en individuos obesos y normopesos aparentemente sanos

	Individuos Obesos (casos) n = 110	Individuos normopeso (controles) n = 114	OR (IC: 95%)	p
Genotipo				
E2/E2 + E3/E3 + E3/E2	82 (74,6%)	88 (77,2%)	1,156 (0,626-2,133)	> 0,05
E4/E4 + E3/E4	28 (25,4%)	26 (22,8%)		
Alelo				
ε2 + ε3	189 (85,9%)	200 (87,7%)	0,941 (0,649-1,365)	> 0,05
ε4	31 (14,1%)	28 (12,3%)		

a las grasas. No se encontró ninguna investigación que relacione directamente el riesgo a desarrollarla. No obstante, Das *et al.* (20) describieron que los individuos con el alelo ε4 (tanto genotipo heterocigoto ε3/ε4 como homocigoto ε4/ε4) poseían concentraciones significativamente mayores de triglicéridos basales, colesterol total y LDL-c, correspondientes con mayor ocurrencia de dislipidemia. En este estudio no se observó esta tendencia para los portadores obesos del alelo ε4.

En cuanto a las comparaciones entre los individuos obesos resistentes y no resistentes a la insulina, no se observó asociación entre la frecuencia genotípica (OR = 1,344, IC95% = 0,482 - 3,752) y alélica (OR = 1,498, IC95% = 0,581 - 3,867) y el riesgo a desarrollar resistencia a la insulina, en concordancia con Meigs *et al.* (21), quienes no encontraron una asociación significativa entre el polimorfismo del gen APOE y la resistencia a la insulina, ya que éste no afecta o modifica directamente el valor de HOMA en su prevalencia. Todo lo anteriormente expuesto se puede explicar debido a que el tejido adiposo en los obesos es insulino-resistente, lo que eleva los ácidos grasos libres en plasma. A su vez, éstos tienen un efecto directo en los órganos diana de la insulina (por ejemplo, el hígado), mediante acciones específicas que bloquean la señalización intracelular del receptor de insulina. Este fenómeno, bien conocido como lipotoxicidad, podría ser el responsable de la RI en el órgano y la falta de regulación pancreática a la glicemia elevada (22).

Al comparar los parámetros bioquímicos de los individuos obesos agrupados según los polimorfismos del gen APOE, se puede observar que los pacientes obesos que poseen el genotipo homocigoto ε4/ε4 presentan un IMC mayor en comparación con los demás genotipos, al igual que para los valores de glicemia basal. Los parámetros de colesterol total y LDL-c, se observaron incrementados en los individuos

con genotipo homocigoto ε3/ε3 en comparación a los individuos con otros genotipos. Con respecto al valor de insulina y triglicéridos basales, 2 horas y 4 horas posprandiales se encontraron incrementados en los portadores del genotipo homocigoto ε2/ε2 + heterocigoto ε3/ε2.

Finalmente, Hagberg *et al.* (23) mostraron que el alelo ε4 está asociado con concentraciones elevadas de colesterol y LDL-c, en comparación con el alelo ε2 que se asocia con concentraciones disminuidas de los mismos. Lo anteriormente expuesto, se correlaciona con los resultados obtenidos en este estudio, donde se observa que los portadores del genotipo ε4/ε4 poseen valores incrementados de colesterol y LDL-c en comparación con los portadores del genotipo ε2/ε2.

Conclusiones

Los individuos obesos presentan alteraciones en sus índices aterogénicos, lo que incrementa su riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares. Entre los genes estudiados, se observó que el genotipo G/A del polimorfismo -31118 G/A (*rs1761667*) del gen CD36 es el más frecuente en individuos tanto obesos como normopeso, mientras que el genotipo G/G es el menos común. En cuanto al gen APOE, el genotipo ε3/ε3 de las variantes 388 T/C (*rs429358*) y 526 C/T (*rs7412*) es el más frecuente en ambos grupos, y el genotipo ε4/ε4 es el menos común. En cuanto a la frecuencia alélica, el alelo ε3 es el más común para ambos grupos.

No se encontró asociación significativa entre el polimorfismo -31118 G/A (*rs1761667*) del gen CD36 y las variantes 388 T/C (*rs429358*) y 526 C/T (*rs7412*) del gen APOE con el desarrollo de obesidad, intolerancia a las grasas o resistencia a la insulina. Es posible que otros polimorfismos de estos genes estén involucrados en estos trastornos metabólicos. Por lo

tanto, se recomienda realizar estudios adicionales que incluyan otros polimorfismos genéticos y un mayor tamaño de muestra para obtener conclusiones más definitivas. Determinar si existe una asociación entre estos polimorfismos y las enfermedades mencionadas permitiría tomar medidas tempranas en individuos con mayor riesgo para prevenir su desarrollo y sus consecuencias.

Referencias

- World Health Organization (WHO). Obesidad y sobrepeso [Internet]. [citado 24 de marzo de 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
- Manuel Moreno G. Definición y clasificación de la obesidad. *Rev médica Clín Las Condes* 2012;23(2):124-128. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/s0716-8640\(12\)70288-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0716-8640(12)70288-2)
- Pietka TA, Schappe T, Conte C, Fabbrini E, Patterson BW, Klein S, et al. Adipose and muscle tissue profile of CD36 transcripts in obese subjects highlights the role of CD36 in fatty acid homeostasis and insulin resistance. *Diabetes Care* 2014;37(7):1990-1997. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.2337/dc13-2835>
- Marais AD. Apolipoprotein E in lipoprotein metabolism, health and cardiovascular disease. *Pathology* 2019;51(2):165-176. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pathol.2018.11.002>
- Dixit M, Bhattacharya S, Mittal B. Association of CETP TaqI and APOE polymorphisms with type II diabetes mellitus in North Indians: a case control study. *BMC Endocr Disord* 2005; 5(1):7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6823-5-7>
- Xu CF, Talmud PJ, Angelico F, Del Ben M, Savill J, Humphries SE. Apolipoprotein E polymorphism and plasma lipid, lipoprotein, and apolipoprotein levels in Italian children: Apo E Polymorphism in Children. *Genet Epidemiol* 1991;8(6):389-398. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/gepi.1370080605>
- Srivastava N, Achyut BR, Prakash J, Agarwal CG, Pant DC, Mittal B. Association of cholesteryl ester transfer protein (TaqIB) and apolipoprotein E (HhaI) gene variants with obesity. *Mol Cell Biochem* 2008;314(1-2):171-177. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-008-9778-5>
- Welsh K, Bunce M. Molecular typing for the MHC with PCR-SSP. *Rev Immunogenet* 1999;1(2):157-176. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11253945/>
- Banerjee M, Gautam S, Saxena M, Bid HK, Agrawal CG. Association of CD36 gene variants rs1761667 (G>A) and rs1527483 (C>T) with Type 2 diabetes in North Indian population. *Int J Diabetes Mellit* 2010;2(3):179-183. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijdm.2010.08.002>
- Salim S, Kartawidjajaputra F, Suwanto A. Association of FTO rs9939609 and CD36 rs1761667 with visceral obesity. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2020;66(Supplement):S329-335. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3177/jnsv.66.S329>
- Hixson JE, Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J Lipid Res* 1990;31(3):545-548. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2341813/>
- Ramos Arellano LE, Muñoz-Valle JF, de la Cruz Mosso U, Salgado Bernabe AB, Castro Alarcon N, Rojas IP. Circulating CD36 oxLDL levels are associated with cardiovascular risk factors in young subjects: a case- control study. *BMC Cardiovasc Disord* 2014;14:54. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2261-14-54>.
- Ramos-Arellano LE, Salgado-Bernabé AB, Guzmán-Guzmán IP, Salgado-Goytia L, Muñoz-Valle JF, Parra-Rojas I. CD36 haplotypes are associated with lipid profile in normal-weight subjects. *Lipids Health Dis* 2013;12(1):167. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/1476-511X-12-167>
- Ramos O, Panduro A. Genetic variant in the CD36 gene (rs1761667) is associated with higher fat intake and high serum cholesterol among the population of west Mexico. *J Nutr Food Sci* 2015;05(02). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9600.1000353>
- Love-Gregory L, Abumrad NA. CD36 genetics and the metabolic complications of obesity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2011;14(6):527-534. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1097/MCO.0b013e32834bbac9>
- Love-Gregory L, Sherva R, Schappe T, Qi J-S, McCrear J, Klein S, et al. Common CD36 SNPs reduce protein expression and may contribute to a protective atherogenic profile. *Hum Mol Genet* 2011;20(1):193-201. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddq449>
- Fernández-Mestre MT, Yehirobi C, Montagnani S, Balbas O, Layrisse Z. Genetic variability of Apolipoprotein E in different populations from Venezuela. *Dis Markers* 2005;21(1):15-19. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2005/625182>
- Garcés MF, Cerviño M, Recio D, Révai E, Piedra I. Polimorfismo Pro12Ala del gen PPARγ2, Ala54Thr del gen FABP2 y polimorfismos del gen de la Apolipoproteína E en habitantes del sector "Los Eucaliptos" de la parroquia San Juan, municipio Libertador. *Acta Científ Soc Venez Bioanalistas Espec* 2013;16(1):28-40. Disponible en: http://saber.ucvve/ojs/index.php/rev_ACSVBE/article/view/18613
- Zarkesh M, Daneshpour MS, Faam B, Hedayati M, Azizi F. Is there any association of apolipoprotein E gene polymorphism with obesity status and lipid profiles? *Tehran Lipid and Glucose Study (TLGS)*. *Gene* 2012;509(2):282-285. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2012.07.048>
- Das M, Pal S, Ghosh A. Apolipoprotein E gene polymorphism and dyslipidaemia in adult Asian Indians: A population based study from Calcutta, India. *Indian J Hum Genet* 2008;14(3):87-91. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4103/0971-6866.45000>
- Meigs JB, Ordovas JM, Cupples LA, Singer DE, Nathan DM, Schaefer EJ, et al. Apolipoprotein E isoform polymorphisms are not associated with insulin resistance: the Framingham Offspring Study. *Diabetes Care* 2000;23(5):669-674. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.2337/diacare.23.5.669>
- Martínez R G, Alonso K R, Novik A V. Síndrome metabólico: Bases clínicas y fisiopatológicas para un enfoque terapéutico racional. *Rev Med Chil* 2009;137(5). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4067/s0034-98872009000500014>
- Hagberg JM, Wilund KR, Ferrell RE. APO E gene and gene-environment effects on plasma lipoprotein-lipid levels. *Physiol Genomics* 2000;4(2):101-108. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1152/physiolgenomics.2000.4.2.101>