

Resumen ejecutivo

GEMM, significa Genética de las Enfermedades Metabólicas en México. Es un estudio colaborativo recientemente establecido, multicéntrico, sobre la epidemiología genética del síndrome metabólico, un conjunto de trastornos relacionados con la diabetes tipo 2, la obesidad, las dislipidemias y el riesgo de enfermedad cardiovascular. El objetivo general de este proyecto es identificar los genes que están involucrados en el desarrollo de estos serios problemas de salud pública para mejorar el diagnóstico y el tratamiento de las personas que se encuentran afectadas o en riesgo de estarlo. La supervisión científica y la coordinación de GEMM serán proporcionadas por miembros del Departamento de Genética del Texas Biomedical Research Institute (TxBiomed), en San Antonio, Texas. El Dr. Raúl Bastarrachea es el investigador internacional principal del estudio, ha acumulado una amplia experiencia en investigación sobre la obesidad y diabetes y ha estado involucrado en proyectos que estudian a la población hispana en el área de genética poblacional. El Dr. Jack W. Kent Jr., experto en genética estadística, estará a cargo de la coordinación en el análisis dimensional de los datos y resultados obtenidos en el Centro de Computación Genómica AT&T. El Consultor Experto (Senior Adviser) en Genómica Cuantitativa para el diseño metodológico y estadístico del proyecto es el Dr. Anthony G. Comuzzie. A través de sus esfuerzos se han establecido fuertes vínculos de colaboración y conexiones con colegas en México para poder desarrollar el estudio GEMM. Nuestros Centros participantes en México han sido cuidadosamente seleccionados por su afiliación a una Universidad y/o a un Hospital de Enseñanza, y por las credenciales académicas de sus investigadores en cada Centro. A continuación se presentan las Instituciones Académicas, los investigadores que coordinan el estudio a nivel Nacional y sus Hospitales de Enseñanza Afiliados que integran el Consorcio: Morelos, *Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos* Dr. Jesús Santa Olalla Tapia y Dr. Jesús Ángeles Chimal, ambos Profesores Investigadores de Tiempo Completo (PTC); Chihuahua, *Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Chihuahua, Hospital Central Universitario*, PhD. Irene Leal-Berumen y Dr. Jesús G. Benavides Olvera; Michoacán, *Universidad Latina de América, Licenciatura de Nutrición, Clínica de Enfermedades Crónicas y Procedimientos Especiales (CECYPE)*, M.NH. Areli Murillo Ramirez y Dr. Juan Carlos Castillo Pineda; Jalisco, *Instituto Superior Autónomo de Occidente, A.C., Universidad del Valle de Atemajac, Universidad Católica (UNIVA), Hospital Salud de los Enfermos*, Lic. Nutr. Laura Gonzalez Lopez, Lic. Nutr. Rocío Angélica Salinas Osornio y Dr. Melesio Valencia; Veracruz, *Instituto de Investigaciones Médico Biológicas Universidad Veracruzana, Veracruz*, Dr. Jose María Remes Troche, Dra. Alina Calcano, y Dr. Juan Manuel Villaseñor, Coordinador Adjunto; Ciudad Victoria, Tamaulipas, *Hospital Infantil de Tamaulipas SSA*, Dra. Judith Cornejo Barrera y Dr. Jose Daniel Llanas Rodriguez; San Luis Potosí, *Centro de Investigación y Estudios de Posgrado (CIEP), Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí*, PhD. Claudia Escudero Lourdes, *Universidad del Centro de Mexico (UCEM), SLP*, Dr. Jorge Alejandro Alegría Torres y *Hospital Central "Ignacio Morones Prieto"* Dra. María del Carmen Esmer Sánchez; México, DF, *Fundación Mexicana para la Salud, MD*. Guillermo Meléndez, *Facultad de Ciencias de la Salud Universidad Anáhuac México Norte*, Dr. Ernesto Rodriguez Ayala, *Hospital Juarez SS Mexico DF*, Dr. Gustavo Acosta y Dra. Elizabeth Perez Cruz.

Cada Centro reclutará individuos en familias extensas. Los voluntarios serán invitados a acudir a una Unidad de Investigación Genómico-Metabólica en cada localidad dedicada a: (1) efectuar una historia médica, (2) medir una amplia variedad de parámetros clínicos, antropométricos y bioquímicos relacionados con enfermedades metabólicas, (3) proporcionar una muestra de sangre para análisis de ADN para la determinación del genotipo, (4) recolectar biopsias de grasa subcutánea y musculo, extraer ARNm, y llevar a cabo el perfil diferencial de expresión del transcriptoma en todas las muestras colectadas, y (5) llevar a cabo mediciones posprandiales después de una comida mixta. El estudio completo se prevé que tendrá una duración de 10 años. Los análisis bioquímicos, así como los análisis de determinación del genotipo y estadística, se llevará a cabo en el Departamento de Genética del TxBiomed en San Antonio, Texas, USA. Cada Centro reclutará individuos en familias extensas. El Departamento de Genética del TxBiomed se encuentra desarrollando estudios genéticos epidemiológicos en México-Americanos como el San Antonio Familia Heart Study, Estudio Familiar de Diabetes de San Antonio, y el estudio Viva la Familia. Estos estudios ya han dado pistas valiosas acerca de las bases genéticas de las enfermedades metabólicas. El estudio GEMM complementará dichos estudios con una cohorte mucho más amplia en personas que nacieron y viven en México. Lo anterior podrá permitir comparar el efecto de un fondo genético común en ambos lados de la frontera, y también ofrecer la posibilidad de encontrar nuevas variantes genéticas a través de estudiar una muestra más amplia de personas de diferentes regiones de México.

Además de los beneficios de la investigación médica y biomédica, GEMM está estructurado para mejorar la capacidad científica de cada uno de los Centros Universitarios establecidos alrededor de la República Mexicana, proporcionando en lo posible recursos materiales, capacitación técnica y oportunidades de investigación para los investigadores Mexicanos y sus estudiantes que colaboran en este proyecto utilizando los datos generados por GEMM. El establecimiento de las instalaciones de diagnóstico también implica capacitación en investigación genómica a cada uno de los Centros. Una vez terminada la recolección de datos del estudio GEMM, estos recursos pondrán ser puestos a disposición de las Instituciones participantes para futuras investigaciones biomédicas. La intención inicial de este proyecto genético es estudiar el transcriptoma de estas personas, y las bases genéticas de su metabolismo posprandial. Estas dos premisas intentaran buscar genes de acuerdo a la flexibilidad metabólica de cada individuo en población Mexicana, situación acorde a la nueva era genómica de enfocar estudios en base a sistemas de biología humanos integrados. El integrar, asociar y correlacionar las mediciones del metabolismo posprandial de cada individuo, con los cambios que suceden a nivel celular y molecular en los tejidos donde afectan estas enfermedades (grasa y músculo) después de ingerir alimentos, abrirá una ventana inmensa para determinar qué genes y sus variantes alélicas contribuyen a determinar la eficacia de un individuo para poder metabolizar su ingesta de carbohidratos, grasas y proteínas y como esta variabilidad se relaciona con el riesgo y susceptibilidad de desarrollar y detectar tempranamente enfermedades tales como la obesidad, diabetes y enfermedad cardiovascular. En síntesis, el proyecto consta de dos ejes fundamentales:

1) Reclutar individuos en familias extensas en cada uno de los Centros Universitarios que colaboran en el estudio y forman el Consorcio, para obtener muestras de sangre y tejido muscular y graso subcutáneo en los participantes voluntarios, y de esta manera poder efectuar análisis comparativos en dichos tejidos relevante a las enfermedades metabólicas, analizar los fenotipos posprandiales y la expresión transcriptómica en los participantes del estudio, y establecer también parámetros con respecto al riesgo genético poblacional en desarrollar enfermedades metabólicas en México

2) Proveer técnicas de avanzada en investigación genómica en el Departamento de Genética de la TxBiomed para el personal en formación profesional de cada Centro
La intención inicial de este proyecto genético es estudiar

Es será la primera vez que este tipo de abordaje genético será utilizado en una base amplia poblacional en México, incluyendo Latinoamérica. Hoy en día, estos métodos se han aplicado solamente en unos cuantos centros de avanzada en EEUU y Europa, ya que el costo y los recursos tecnológicos y humanos son de alta especialidad y automatizados. Si se logra establecer una base de epidemiología genética poblacional en México a nivel simultaneo del ADN y ARN como se pretende, se avanzará inmensamente en entender los rasgos genéticos específicos de la población Mexicana, situación que traerá incontables beneficios principalmente a los sectores médicos, farmacológicos y la industria de la alimentación, con la ventaja de contar con la tecnología de punta en análisis genómicos gracias a los recursos disponibles en el Departamento de Genética de la TxBiomed, en San Antonio, Texas.

I ANTECEDENTES:

I.1 Bases genómicas de los factores de riesgo cardiovascular de origen metabólico en México.

La enfermedad cardiovascular aterosclerosa es la causa principal de muerte e incapacidad en la diabetes. Es muy probable que la enfermedad cardiovascular ya se encuentre presente en el momento en que se diagnostica la diabetes. La íntima asociación de la diabetes tipo 2 con la enfermedad cardiovascular ha dado lugar a la hipótesis de que las dos enfermedades poseen un proceso fisiopatológico común; este concepto ha permitido establecer una entidad clínica referida como el “Síndrome Metabólico”. Esta condición se caracteriza desde el punto de vista clínico-epidemiológico por la presencia simultánea en un mismo individuo de rasgos discretos como son la obesidad, dislipidemia, hiperglicemia e hipertensión. La agrupación de los rasgos individuales del síndrome sucede en un grado notablemente mayor que lo esperado por sólo la casualidad, hecho que apunta hacia la evidencia substancial de la existencia de un desorden discreto, con una base fisiopatológica común, cuya biología subyacente parece esbozar un patrón genético que apunta hacia la existencia de un conjunto de genes cuyos efectos pleiotrópicos ejercen una susceptibilidad aumentada para que los fenotipos aparezcan simultáneamente. La prevalencia del Síndrome Metabólico en los Estados Unidos como lo define el reporte de la NCEP-III fue de 21.8% y 23.7%, respectivamente. Es de destacar que lo México-Americanos tuvieron la prevalencia más elevada del Síndrome Metabólico (31.9%).

Los Hispanos en Estados Unidos, denominados *Hispano-Americanos*, son individuos que descienden de personas que hablan español. También son llamados Latinos, porque la mayoría de ellos son de origen Latinoamericano. Ellos también se identifican de acuerdo a sus antecedentes culturales o nacionales y se refieren a ellos mismos como México-Americanos si sus lazos familiares provienen de México. Muchos Hispano-Americanos son descendientes de la gente Mexicana que vivía en el Suroeste de ese país, cuando se convirtió en parte de los EEUU. Casi todos los otros Hispano- Americanos, o sus ancestros, emigraron a los EEUU desde algún país en Latinoamérica. Sin embargo el grupo de hispanos más grandes en los EEUU son los México-Americanos.

Este grupo representa 66.9% del total de la población Hispano-Americana. Como grupo, los México-Americanos son una raza mestiza con antecedentes étnicos y genéticos, claramente distinguibles, predominando por mucho la mezcla entre indios de América (amerindios) y Españoles de Europa. Hoy en día, más de 35 millones de personas de descendencia Hispana viven en los EEUU. Ellos conforman el grupo minoritario más grande en los EEUU. La mayoría de los México-Americanos hablan Inglés pero también continúan utilizando el Español. Además de su idioma, los México-Americanos han conservado muchas otras tradiciones de sus lugares de origen. La comida, la música, la indumentaria, y la arquitectura de sus países de origen han influido grandemente en la cultura norteamericana.

Esta similitud entre México-Americanos y personas que han nacido y viven en México se refleja también por la presencia y la prevalencia de enfermedades comunes a ambas poblaciones viviendo en ambos lados de la frontera del Río Bravo, especialmente en lo que se

refiere a enfermedades complejas, comunes, altamente prevalentes como son la obesidad, diabetes tipo 2 y las enfermedades cardiovasculares. En América Latina hoy en día, las enfermedades cardiovasculares son la causa del 31% del total de las defunciones. Se estima que en los próximos 10 años habrá 20.7 millones de muertes ocasionadas por enfermedades cardiovasculares en esta región. La prevalencia de la diabetes tipo 2 en México en 1993 fue de 7.2% para individuos cuya edad fluctuaba entre los 20 y 69 años de edad. En el año 2000 esta prevalencia aumentó a un 10.9%. En 1993 la prevalencia de la obesidad era de 21.4%, incrementándose para el año 2000 a 24.4%. En una encuesta en población Mexicana, la prevalencia del Síndrome Metabólico resultó de 13.61% utilizando la definición de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y de 26.6% utilizando los criterios de la NCEP-III.

Estos datos epidemiológicos sobre la prevalencia de los fenotipos de riesgo cardiovascular y metabólico que ocurren al mismo tiempo en individuos sin relación consanguínea, clínicamente integrados en el Síndrome Metabólico, presentan cifras alarmantes en individuos nacidos y que están viviendo en México, y en México-Americanos viviendo en los EEUU, lo que nos permite proponer fuertemente que este Síndrome califica como una entidad común, compleja, altamente prevalente dentro de este grupo étnico. Ambos grupos poblacionales comparten la presencia de enfermedades crónicas similares y antecedentes culturales y biológicos comunes aún viviendo en ambos lados de la frontera. Este hecho justifica sin lugar a dudas, un estudio de investigación en genética poblacional en México para localizar locus de rasgos cuantitativos que seguramente albergan variantes alélicas que incrementan la susceptibilidad en este grupo étnico para el desarrollo de diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares.

I, 2 Variación cuantitativa en la expresión genética: el fenotipo transcriptómico.

Al parecer, solamente existen alrededor de 23,000 genes, con un tamaño promedio de 27 kb, que codifican proteínas en el humano. Hoy se sabe que la mayoría de los 3.2 Gb del genoma se transcriben. La actividad de un gen puede ser relacionada con la cantidad de transcrito que puede producirse, a pesar de que algunos de estos transcritos no codifiquen proteínas. El conjunto de ARN de todos los genes es lo que se conoce como transcriptoma. A pesar de la semejanza sustancial entre los genomas de diferentes especies de mamíferos, los transcriptomas muestran una divergencia importante.

Los microarreglos de ADN, han permitido el estudio de la expresión de miles de genes a través de métodos de alto rendimiento (high-throughput). Estos procedimientos se usan actualmente para el estudio de la interacción entre genes y factores ambientales, haciendo posible la identificación de genes asociados a enfermedades. La adquisición y el análisis de estos fenotipos de expresión podrán ofrecer información relevante de la variación de la herencia como consecuencia de la expresión de genes individuales, así como emplear una tecnología de vanguardia en población Mexicana que permita identificar genes candidatos para enfermedades complejas, comunes y altamente prevalentes como la obesidad, diabetes tipo 2 y la enfermedad cardiovascular aterosclerosa.

Hasta hoy, son pocos los estudios llevados a cabo en humanos donde se han colectado muestras de diferentes tejidos para estudiar los patrones de expresión de los diferentes transcritos conocidos del genoma. Además, la metodología y el análisis de este tipo de abordaje apenas están conociéndose en todo el mundo. Los métodos a utilizarse en este estudio piloto mostraran la factibilidad de recolectar múltiples tejidos y analizar su expresión genética, lo que fundamentará incorporar posteriormente un gran número de sujetos, a este protocolo. La cuantificación de la concentración de transcritos debe ser entendida como fenotipos cuantitativos para efectuar mediciones estadísticas que ayuden a identificar la arquitectura genética subyacente en la población.

II Publicaciones preliminares del estudio GEMM:

2007.

Bastarrachea RA, Kent Jr. J, Comuzzie AG. GEMM: Reporte preliminar de la heredabilidad de fenotipos asociados a riesgo de enfermedad cardiovascular aterosclerosa en familias Mexicanas. Barcelona. Med Clin (Barc). 2007 Jun 2; 129(1):11-3.

Bastarrachea RA, Kent Jr. JW, Rozada G, Cole SA, López-Alvarenga JC, Aradillas C, Brito O, Cerda R, Gallegos E, Laviada H, Hernandez V, Rosas J, Machado A, Vadillo F, Ramos M, Santa Olalla, J, MacCluer JW, Comuzzie AG. Heritability of metabolic disease-related phenotypes in Mexico: Preliminary report from the GEMM Family Study. Hum Biol. 2007; 78:121-30.

2008.

Bastarrachea RA, López-Alvarenga JC, Kent JW Jr, Laviada-Molina HA, Cerda-Flores RM, Calderón-Garcidueñas AL, Torres-Salazar A, Nava-González EJ, Solis-Pérez E, Gallegos-Cabral EC, Cole SA, Comuzzie AG. Transcriptome among Mexicans: large scale methodology to analyze the genetics expression profile of simultaneous samples in muscle, adipose tissue and lymphocytes obtained from the same individual. Gac Med Mex. 2008; 144(6):473-9.

2011.

Kent JW Jr., Bastarrachea RA, Charlesworth J, Torres-Salazar A, Haack K, Gallegos E, Göring HHH, López-Alvarenga JC, Curran JE, Johnson MP, Dyer TD, Jowett JB, Mahaney MC, Almasy L, MacCluer JW, Moses EK, Cerda-Flores R, Nava-Gonzalez EJ, Laviada-Molina H, Blangero J, Comuzzie AG, Cole SA. Correlation and reliability of synchronous in-vivo gene expression in three human tissues. Advances in Nutrition. (Accepted)

III RESULTADOS PRELIMINARES

Calculo de la Heredabilidad de Fenotipos y Frecuencia de Relaciones Pareadas de Parentesco en Mexicanos.

1) En esta fase inicial del estudio GEMM, se estimaron las heredabilidades para factores de riesgo para enfermedades cardiovasculares (CVD, del Inglés Cardio Vascular Disease) en

381 individuos distribuidos en 21 familias extensas. Cuando menos tres generaciones son representadas en cada familia. Como una medida para comprobar la eficacia del diseño del estudio consistente en reclutar en cada centro al mismo tiempo a los sujetos participantes, se reclutaron simultáneamente y de manera piloto (preliminar) a familias de 8 áreas geográficas en México (Celaya, Cuernavaca, Durango, Mérida, Ciudad de México, Monterrey, San Luis Potosí, y Sonora). Seis centros reclutaron cada uno 3 familias, un centro reclutó 2 familias y el último centro reclutó solamente una familia. La razón se relaciona con el hecho de que estos dos últimos centros se unieron al proyecto multicéntrico de trabajo muy recientemente. Cada centro reclutó un promedio de 6 participantes por semana. Los fenotipos para factores de riesgo cardiovascular (edad, sexo, presión arterial, índice de masa corporal (IMC), lípidos y glucosa en ayunas) se midieron en plasma de ayuno de cada miembro vivo de cada familia.

2) Las características fenotípicas de todos los individuos fueron: 200 personas del sexo femenino y 181 del sexo masculino, con valores medios de edad (fem/mas): 41/39 años; IMC: 27.4/28.0 kg/m²; circunferencia de la cintura: 87.4/95.9 cm; glucosa en ayunas: 104.5/104.0 mg/dL; colesterol total: 196.3/187.3 mg/dl; triglicéridos: 129.2/157.6 mg/dl; presión arterial sistólica: 115.9/119.1 mmHg; presión arterial diastólica: 79.6/86.0 mmHg. 34 mujeres (17.0%) y 29 hombres (16.0%) presentaron niveles de glucosa en ayunas igual o mayores a 126 mg/dL.

3) Debido al tamaño y la complejidad de los árboles genealógicos de estas familias extensas, la muestra de individuos examinados incluyó un número muy amplio de parentescos pareados.

Fue posible obtener información disponible para 2,548 parentescos (relaciones) pareados: 738 pares de parientes de primer grado (310 padres/hijos y 428 pares de hermanos), 538 pares de parientes de segundo grado (relación de tíos/tías, abuelos, o pares de medios-hermanos), y 470 pares de parientes de tercer grado o mayores.

4) Los estimados de las heredabilidades son calculadas como la proporción de la varianza fenotípica residual secundaria al efecto aditivo de los genes, después de que los efectos de las covariaciones han sido contabilizados, para factores de riesgo cardiovascular seleccionados. Las estimaciones de las heredabilidades (EE o error estandard) para los fenotipos transformados a log_e arrojaron: IMC, 0.28 (0.10); circunferencia de la cintura, 0.28 (0.12); glucosa en ayunas, 0.14 (0.08); colesterol, 0.31 (0.13); triglicéridos, 0.23 (0.10); presión arterial sistólica, 0.13 (0.06).

IV JUSTIFICACION DEL ESTUDIO

Este proyecto de investigación cubrirá aspectos novedosos en identificar genes con estrategias metodológicas y tecnología de punta combinando análisis tanto a nivel del ADN, como del ARN celular en condición posprandial, en cada uno de los individuos que participen en este estudio. Si se logra establecer una base de datos en base a fenotipos posprandiales, habremos avanzado inmensamente en la contribución y complementación de los trabajos genómicos efectuados actualmente en México, que permitirán entender los rasgos genéticos específicos de nuestra propia población.

Cabe aclarar que es tremendamente difícil establecer esta clase de abordaje ya que para efectuarlo es necesario contar con un sólido respaldo económico y, principalmente, los recursos tecnológicos y humanos. Este es el principal y más convincente aspecto de la colaboración entre la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), y el Instituto de Investigación Biomédica de Texas, (TxBiomed) en San Antonio, Texas. Ya que el trabajo de campo y recolección de datos se llevará a cabo en la Unidad de Diagnóstico y Medicina Molecular “Dr. Ruy Pérez Tamayo”/Hospital del Niño Morelense, dependiente de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, y la parte de cirugía menor ambulatoria, se efectuará en el Hospital Henri Dunant de Cuernavaca, Morelos., con lo cual se podrá iniciar un aspecto fundamental educativo y de enseñanza entre los estudiantes y personal de dichas instituciones que deseen profundizar en estos nuevos adelantos y estrategias para descubrir genes a nivel poblacional a través del transcriptoma. Dicho enfoque en educación es prioritario, y está contemplado en este proyecto de investigación en colaboración con el TxBiomed. La formación de recursos humanos es uno de los objetivos primordiales de esta iniciativa.

Los 1,500 participantes propuestos se reclutarán a través de equipos integrados por profesionales en las Ciencias Médicas y Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Dichos profesionales serán previamente capacitados cuidadosamente para contestar todas las dudas que algún potencial participante pudiera tener. Se planea reclutar a los participantes de diferentes fuentes, incluyendo visitas domiciliarias en colonias donde se ha efectuado trabajo de campo preventivo de enfermedades dentro de los esquemas de trabajo que ha desarrollado la Facultad de Medicina en investigaciones previas.

Posteriormente, las muestras serán enviadas al Departamento de Genética del TxBiomed en San Antonio, Texas, USA. Durante este proyecto, no se utilizarán grabación de videos o cintas de audio. Así mismo, la protección de identidad, el consentimiento informado, y el resguardo seguro de datos seguirán lineamientos específicos exigidos en los protocolos utilizados en bases de datos poblacionales que rutinariamente exigen los Institutos de Salud de los Estados Unidos (US-NIH, del Inglés National Institutes of Health), y que han sido adoptadas con rigor y utilizadas por el Departamento de Genética del TxBiomed en San Antonio, Texas, USA, quien es el colaborador en los Estados Unidos para este proyecto con la UAEM. Durante todo el proyecto se monitoreará estrictamente la seguridad de los participantes durante los procedimientos de toma de muestras y mediciones que se les practicarán, según se especifica en forma explícita en el consentimiento informado (Anexo 1).

V OBJETIVOS

V.1 Objetivo General:

Estudiar el transcriptoma en población hispana, y las bases genéticas de su metabolismo posprandial.

Estas dos premisas intentaran buscar genes de acuerdo a la flexibilidad metabólica de cada individuo en población Mexicana, situación acorde a la nueva era genómica de enfocar

estudios en base a sistemas de biología humanos integrados. El integrar, asociar y correlacionar las mediciones del metabolismo posprandial de cada individuo con los cambios que suceden a nivel celular y molecular en los tejidos donde afectan estas enfermedades (grasa y músculo) después de ingerir alimentos, abrirá un nuevo enfoque para determinar que genes y cuales variantes alélicas contribuyen a determinar la eficacia de un individuo para poder metabolizar su ingesta de carbohidratos, grasas y proteínas, de manera eficiente y sin consecuencias nocivas para la salud.

V.2 Objetivos particulares:

- 1) Proveer técnicas de avanzada en investigación genómica en el TexBiomed para el personal en formación profesional de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) y del Hospital Henri Dunant;
- 2) Reclutar 1500 individuos en familias extensas en Morelos. La duración de este estudio se calcula es 10 años;
- 3) Obtener muestras de sangre y biopsias de tejido muscular y subcutáneo en los participantes para poder efectuar análisis comparativos en dichos tejidos relevantes para el desarrollo de las enfermedades metabólicas;
- 4) Analizar los fenotipos posprandiales y el transcriptoma de los participantes del estudio para establecer parámetros con respecto al riesgo genético poblacional para desarrollar enfermedades metabólicas en México

VI DISEÑO DE INVESTIGACION.

Este estudio pretende reclutar 1500 individuos seleccionados a través de un cuestionario estandarizado de estructura familiar, que nacieron y viven en el área urbana y conurbana del estado de Morelos para integrar una base preliminar de fenotipos posprandiales y transcriptómicos.

VI. 1 CRITERIOS DE INCLUSION Y EXCLUSION.

Se incluirán en el estudio 1500 individuos mayores de 18 años que hayan nacido y se encuentren viviendo en el estado de Morelos, que se encuentren saludables de acuerdo a los parámetros de salud poblacional.

Para ser elegible para el estudio, el probando potencial deberá cumplir los requisitos de ser mayor de 18 años de edad, idealmente entre 20-30 años y que cuente con ambos padres vivos y dispuestos a participar voluntariamente.

Por tratarse de un estudio donde los antecedentes familiares son importantes, sólo serán invitados a participar personas con ambos padres vivos y que tengan un número mínimo de 40 familiares consanguíneos vivos y localizables en el área urbana y conurbada de Morelos.

Se excluirán a pacientes con enfermedades contagiosas, con infecciones agudas, y con complicaciones de padecimientos crónico-degenerativos como serian diabéticos con

insuficiencia renal, individuos con enfermedad isquémica coronaria, individuos con cáncer o enfermedades relacionadas con el sistema inmune como lupus, etc. Y especialmente, a pacientes femeninas embarazadas.

VI.2 POBLACION DE ESTUDIO.

La población meta la constituyen miembros de familias numerosas (30-50 individuos mayores de 18 años) residentes en el área urbana de Morelos. A partir de las familias se pretende reclutar un total de 1500 individuos.

El reclutamiento se hará en comunidades e instituciones de salud-preferentemente consulta externa- contactando a un adulto, el cual se le denomina probando o sujeto ancla. Cada probando será invitado a participar voluntariamente a través de solicitudes de participación al azar y voluntarias, que darán lugar a una entrevista para efectuarle un cuestionario de estructura familiar y así determinar su árbol genealógico, parentescos y tamaño de su familia; previo a la entrevista firmará consentimiento informado. En esta primera entrevista cada probando, al informar sobre sus parentescos y árbol familiar, no necesitará proporcionar nombres o generales de identificación de sus parientes. Únicamente indicará si están vivos y si radican en el área urbana y conurbana de Morelos y qué relación consanguínea tienen entre ellos (tíos, hermanos, primos, sobrinos, etc.).

El probando podrá actuar como facilitador para contactar a parientes no relacionados o relacionados que se consideren potenciales participantes; en ese caso se procederá con la entrevista inicial, previa firma de consentimiento informado. Una vez que el candidato acepte participar, en una entrevista, proporcionará datos de su familia nuclear con los cuales se construirá un pedigrí familiar.

El Hospital Henri Dunant de Cuernavaca (HD), reúne las condiciones para desarrollar los procedimientos de Cirugía menor pertinentes a las biopsias, con personal médico y paramédico altamente calificado, certificado por el Consejo de Salubridad General, siendo una institución que proporciona servicios de salud, cumpliendo también con objetivos de enseñanza e investigación. El HD proveerá el espacio, los insumos (Anexo 2) el cual posteriormente será reembolsado su costo y en su caso, también los médicos especialistas en cirugía para llevar a cabo la toma de biopsias en períodos equiparables a cirugía menor ambulatoria, todos ello de acuerdo a un esquema de trabajo previamente acordado.

Específicamente, el proyecto proporcionará personal calificado (enfermeros, nutriólogos y químicos biólogos) y recurso material para la preparación, etiquetado, y centrifugación de los tubos de ensayo con plasma en alícuotas y material de laboratorio, así como para las mediciones antropométricas y de gasto energético, y para el procesamiento y almacenamiento de las muestras de tejido (biopsias). Posteriormente, se efectuarán las solicitudes correspondientes para la apertura de otros centros de Investigación en otras sedes del país, los cuales llevarán a cabo los trámites correspondientes a la autorización por los comités vigentes en sus instituciones.

VI.3 VISITA PRE-HOSPITALARIA

La visita debe de programarse para comenzar entre 8:30 y 10 AM de acuerdo a los horarios y actividades del participante.

La visita durara aproximadamente 90 minutos.

La visita debe de efectuarse al menos una semana antes de programar la fecha de visita al Hospital.

Durante la visita, el personal de Enfermería a cargo de esta visita específica (reclutadores pre-entrenados y estandarizados de la Facultad de Medicina) se encargara de:

1. Explicar en detalle, de que se trata el estudio, que esperamos del paciente, la necesidad de efectuar una historia clínica que incluye preguntas sobre hábitos, costumbres alimentarias y estilo de vida
2. Preguntar si acepta participar
3. Si es afirmativo, inmediatamente ofrecer la firma del consentimiento informado
4. Efectuar la Historia Clínica y el cuestionario de hábitos, costumbres alimentarias, ejercicio y estilo de vida.
5. Dar indicaciones precisa de su ayuno el día de visita al Hospital y una explicación detallada de quien ira a recoger al participante y la hora y fecha.
6. Es importante que el participante cuente con un número telefónico de algún responsable del proyecto para comunicarse con esta persona en cualquier momento.

VI.3.1 Día previo a la visita:

Preparacion del material para la visita y los procedimientos para la obtención de muestras

- Etiquetas con datos del paciente
- Etiquetado de microtubos para procesamiento y colección de plasma (aliquotas) y tejidos
- Papelería pertinente para transcribir las mediciones del protocolo en carpetas etiquetadas con el nombre del participante, principalmente la hoja de recopilación de datos.

Confirmación del personal que estará a cargo del procedimiento (Supervisor, personal de enfermería) Equipo integrado por: Coordinador del proyecto, supervisor general en el Hospital, Médico encargada del participante, y 2 pasantes de medicina en servicio social (MPSS) o médico interno de pregrado (MIP) previamente estandarizadas para coleccionar mediciones y fenotipos y procesar las muestras de tejido y sangre.

VI.3.2 PROCEDIMIENTOS PARA LA OBTENCIÓN DE MUESTRAS DURANTE LA VISITA CLÍNICA AL HOSPITAL:

Cada participante acudirá al Hospital en 2 visitas con 2 semanas de intervalo (Día 0: Visita 1; Día 14: Visita 2).

Visita No. 1

El participante debe de tener indicaciones precisas por escrito proporcionadas con anticipación por las reclutadoras sobre la necesidad de estar en 12 horas de ayuno. El participante debe de estar sin ingerir alimentos desde las 21:00 horas la noche anterior.

7:30 – 8:15 am.

- a) A su llegada, le solicita que vista la bata hospitalaria que le proporciona la enfermera.
- b) Su ropa y objetos personales se colocan en bolsa de plástico y se ponen en resguardo seguro
- c) Se le pide al participante que utilice el sanitario, se le entrega un frasco de plástico estéril, y se le solicita que colecte una muestra de orina que entrega a la enfermera para prueba de cuerpos cetónicos.

8:15 – 9:00 am. Se le efectúa su antropometría:

Peso, talla, cintura, cadera, IMC, ICC

Composición corporal por Bioimpedancia.

Se efectúa el cálculo de su gasto energético total por Nutrióloga para calcular su alimento mixto (Formula enteral).

9:00 – 9:15 am. Inmediatamente se le solicita que repose por 15 min en la cama.

9:15 am. Se le efectúa la primera toma de la presión arterial, y ritmo cardiaco por la enfermera.

9:25 am. Se le efectúa la segunda toma de la presión arterial, y ritmo cardiaco por la enfermera.

9:35 am. Se le efectúa la tercera toma de la presión arterial, y ritmo cardiaco por la enfermera.

9:40 am – 9:55 am. Se le efectúa su medición de gasto energético en reposo con MEDGEM

10:00 am Se coloca una venoclisis con solución salina 0.45% al participante.

10:05 am Toma de muestra en ayunas (10 ml de sangre total).

10:10am El participante ingiere su alimento mixto (Fórmula Enteral).

10:15 am Toma de muestra posprandial # 1 (3 ml de sangre total).

10:30 am Toma de muestra # 2 (3 ml de sangre total) y Evaluación con MEDGEM.

10:45 am Toma de muestra # 3 (3 ml de sangre total).

11:00 am Toma de muestra # 4 (3 ml de sangre total).

11:30 am Toma de muestra # 5 (3 ml de sangre total).

12:00 am Toma de muestra # 6 (3 ml de sangre total)

13:00 pm Toma de muestra # 7 (3 ml de sangre total y (3 ml para RNA después) y Toma de Biopsias

14:00 pm Toma de muestra # 8 (3 ml de sangre total) y Evaluación con MEDGEM.

15:00 pm Toma de muestra # 9 (3 ml de sangre total)

15:15 pm Término del procedimiento. Se ofrece alimento al paciente y una vez que los haya consumido, se le dan las indicaciones sobre medicamentos y cuidado de la herida quirúrgica. El participante es trasladado a su domicilio

Visita No. 2 (2 SEMANAS DESPUES DE LA VISITA No. 1)

7:30-9:00 am

Transporte proporcionado por el proyecto acude al domicilio del participante para trasladarlo al HD para efectuar Densitometría (Equipo de DXA GE Lunar Prodigy Advance DXA Modelo 301264. Software enCore ver. 11.30.062).

9:00 – 9:30 am Toma de radiografía de rodilla

9:30 – 10:15 am.

- a) A su llegada, le solicita que vista la bata hospitalaria que le proporciona la enfermera.
- b) Su ropa y objetos personales se colocan en bolsa de plástico y se ponen en resguardo seguro
- c) Se le pide al participante que utilice el sanitario, se le entrega un frasco de plástico estéril, y se le solicita que colecte una muestra de orina que entrega a la enfermera para prueba de cuerpos cetónicos.

10:30 am. Se le evalúa por el Médico y/o Enfermera si la herida de la semana anterior está en condiciones apropiadas, se le efectúa una anamnesis para enfermedad infecciosa, signos vitales, etc., y si el médico autoriza proceder, iniciamos la segunda biopsia (Este es el único procedimiento en la segunda visita, junto con una muestra de sangre en ayunas).

11:00 am. Toma de muestra de sangre en ayunas (10 ml de sangre total).

12:00 am. Inicio de la toma de biopsia.

13:00 pm. Termina de la toma de biopsia.

13:15 pm. Se le ofrecen alimentos al participante, se le dan las indicaciones sobre medicamentos y cuidados con la herida quirúrgica, e inmediatamente después, se traslada de regreso a su domicilio.

VI.3.3 CARACTERÍSTICAS DE LA BIOPSIA

Se intentará obtener biopsias de tejidos muscular, adiposo y piel en una sola intervención. Las dimensiones de cada tejido son la obtención de 2 piezas en forma cilíndrica (grasa y músculo). El corte quirúrgico será de aprox. 2 cms de largo por 1.5 cms de profundidad.

Se espera obtener un cilindro de músculo de 1 cm x 0.25 cm con peso aproximado mínimo de 300 mg y máximo de un cilindro de tejido adiposo subcutáneo de 2 cm x 0.5 cm con peso aproximado de 600 mg. También se obtendrá piel (300 mg) en el momento del corte de la herida por el cirujano (Se debe tener en cuenta que en genética se necesitan cantidades muy escasas de tejidos para buscar la expresión de genes. De acuerdo a las recomendaciones del Cirujano, la región que se propone para efectuar la pequeña cirugía o cirugía menor es la región antero-superior interna (ingle) para obtener tejido adiposo y músculo en la cara lateral del cuádriceps).

Todos los aspectos legales pertinentes para enviar tejidos y material genético a los estados Unidos serán cubiertos de acuerdo a los requisitos de la Administración de Aduanas y a través de la compañía autorizada por la Comisión Federal para la Protección de Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) denominada World Courier.

Todos los aspectos éticos pertinentes para aceptar los tejidos y el material genético obtenido en México, y hacerlo llegar a territorio de los Estados Unidos, han sido aprobados por el Department of Health and Human Services, Center for Diseases Control, Atlanta GA.

VI.3.4 RIESGOS POTENCIALES ASOCIADOS A LA TOMA DE MUESTRAS

Con respecto a la venopunción los riesgos relacionados son leves: sangrado, sensación de mareo, hematoma, infección (un riesgo mínimo en cualquier situación que presente ruptura de la piel), punciones múltiples en caso de dificultad para localizar una vena útil. La potencial complicación a prevenir es la infección de la herida de la biopsia y/o sangrado o equimosis.

Monitoreo de la evolución de los participantes después de la toma de biopsia.

- a) La enfermera o personal responsable del monitoreo de los pacientes dejará claramente los números telefónicos u otro medio donde la persona o un familiar pueda comunicarse si surgiera algún problema relacionado con el manejo de la herida quirúrgica (dolor, sangrado, etc.)
- b) Sistemáticamente la enfermera se comunicará con él o la participante (aún sin que lo hayan solicitado) a las 24 hrs. del evento y al 4º y sexto día del evento de toma de muestras, para saber de su evolución.
- c) De ser necesario, se efectuara visita domiciliaria y para referir al participante al cirujano para consulta

Todo participante debe ser “dado de alta” al concluir su participación sin problemas y habiéndole entregado los resultados de sangre con orientación, según el caso.

De acuerdo al consentimiento informado, se le ha detallado al participante que la canalización de la vena podría darle algo de molestia; que si hubiera dificultades para encontrarle la vena se efectuarían máximo tres intentos de canalización. La extracción de las muestras de sangre no debe producir molestia alguna, ya que se hacen a través del suero de la venoclisis y la llave de tres vías, equipo que precisamente permite extraer sangre sin tocar el catéter que se ha canalizado.

También se ha indicado claramente que en caso de hematoma, molestias e inflamación en mover el brazo, serán signos de alerta para buscar que se efectúe una evaluación urgente e inmediata en el Hospital. También se ha explicado con claridad que la toma de muestras de tejido podría provocar dolor postquirúrgico mientras cicatriza la herida. Se documenta también que la inyección inicial de anestesia produce malestar y ardor, y que la infusión de anestésico más profunda puede también ser algo dolorosa. Se comunica con especial cuidado que la toma de los tejidos (piel, grasa y músculo) no debe producir dolor pero sí que el participante puede sentir las manipulaciones del cirujano.

Se establece que el riesgo clasificatorio para este tipo de cirugía menor es mayor al mínimo, y consiste en obtener sangre del lugar donde se ha canalizado la vena, la presencia de dolor, hematoma o inflamación en el sitio de la venopunción, por la toma de biopsias pudiera ser que tenga dolor fuerte y molestias al caminar, y riesgo de infección que es prevenida por la administración de antibióticos y antiinflamatorios por una semana a cada participante, y la toma radiográfica de la rodilla.

VI.3.5 COORDINACION Y ESTANDARIZACIÓN DEL PERSONAL A CARGO DE COLECTAR MUESTRAS DE SANGRE Y BIOPSIAS.

Cada participante del equipo intrahospitalario a cargo de los participantes estará sujeto a: 1) una visión general de las técnicas de genética estadística, 2) una revisión de los procedimientos de protección de los sujetos humanos, 3) una capacitación en los protocolos para el reclutamiento y la entrevista de los participantes, y 4) estandarización en recopilación de datos, entrada de datos, y procesamiento de sangre, linfocitos y manipulación de muestras de biopsia. El objetivo de esta capacitación (estandarización) es para maximizar la coherencia y el control en la calidad de los datos colectados. Cabe señalar que el estudio preliminar (ver Resultados Preliminares, arriba) demostró una excelente consistencia.

VI.4 MEDICIONES

Mediciones de fenotipos antropométricos, hemodinámicos y de gasto energético
Peso, Talla, Cintura, Cadera, Índice de Masa Corporal, Índice de Cadera Cintura, Composición corporal (porcentaje de grasa y músculo total) a través de bioimpedancia con la báscula Tanita, y medición de gasto energético a través de calorimetría indirecta con el aparato MEDGEM. Tensión arterial y ritmo cardíaco.

VI.4.1 Procedimiento para medición de estatura:

Se le pide al participante que se coloque de pie, descalzo y manteniendo una posición erguida procurando que la parte media de su cuerpo coincida con la regla del estadímetro, de tal manera que su espalda y glúteos toquen la misma, con los talones juntos y las puntas ligeramente separadas.

Plano de Frankfort: Mirada en ángulo recto con la vertical y con el borde inferior de la órbita en el mismo plano horizontal que el conducto auditivo externo.

Una vez en esta posición se procede a la medición de la estatura: con la escuadra, deslizar hasta que toque la parte más alta de la cabeza (vértex).

Registrar el dato en metros y centímetros en el formato correspondiente.

Instrumento:

Estadiómetro HM200P Porststad

VI.4.2 Procedimiento para medición de la circunferencia abdominal:

Medir con cintra métrica el espacio de la circunferencia abdominal en el plano medio entre la parrilla costal y la espina iliaca anterosuperior.

Registrar el dato en metros y centímetros en el formato correspondiente.

Instrumento:

Cinta métrica profesional Gulick ó Seca

VI.4.3 Procedimiento para medición del peso y la composición corporal:

Asegurarse que se encuentre calibrado el equipo, colocar sobre una superficie plana y horizontal.

El participante deberá portar el mínimo de ropa posible

El sujeto necesita estar descalzo

Se captura en la Tanita el peso de la ropa del participante.

Preguntar al participante si realiza ejercicio para capturar de acuerdo al sexo (standar- si no hace ejercicio; athletic- si realiza ejercicio de competencia), deberá oprimirse la opción correspondiente.

Capturar la edad del participante.

Capturar la estatura del participante.

Capturar el porcentaje de grasa

Colocar al sujeto en el centro de balanza sin apoyo, con los talones juntos y con su peso distribuido equitativamente en ambos pies.

Se le indica al participante que es el momento de sujetar las palancas para la medición de impedancia.

Cuando el procedimiento haya finalizado se imprimirá el resultado del participante.

Una vez obtenido el resultado impreso, se indica al paciente que puede bajar de la báscula.

Instrumento:

Tanita BC-418 Body Composition Analyzer

VI.4.4 Alimento Mixto.

La distribución calórica del alimento mixto (Ensure plus) a utilizar consiste en formula enteral líquida (botellas individuales de 237 mL cada una) con:

Proteína: 24% (ingredientes modificados de la leche)

Carbohidratos: 55% (sucrosa y jarabe de maíz)

Grasas: 21% (aceite de canola, maíz y aceite rico en ácido oleico)

Densidad calórica: 1.01 cal/mL

Osmolaridad: 650 mOsm/kg de agua.

VI.4.5 Cálculo del Gasto Energético Total del Día.

Para calcular el gasto energético total del día hemos utilizado una combinación de la ecuación de Harris-Benedict que es una fórmula de calorías que utiliza los factores de altura, peso, edad y sexo para determinar la tasa metabólica basal (TMB), y la ecuación Katch-McArdle que basa sus estimaciones en el peso de la masa magra muscular exclusivamente para determinar también TMB. Posteriormente, se agrega el factor de actividad para tener el gasto calórico y energético total del día.

VI.4.6 Medición del Índice Metabólico en Reposo y Posprandial.

MedGem es un aparato innovador y portátil que mide el índice metabólico en reposo (IMR) científicamente, a través de simplemente soplar aire por la boquilla plástica del mismo. Se podría comparar al electrocardiograma que utilizan los cardiólogos para detectar la señal eléctrica del corazón.

Detecta el número exacto de calorías que una persona quema estando en reposo. Esta medición representa el total de aproximadamente el 70% de las calorías que el cuerpo necesita quemar para mantener sus funciones básicas. Si se mide este índice metabólico en reposo después de comer, aumentará de acuerdo a la eficacia con que quemamos calorías cuando nuestro metabolismo (intestinos, absorción, almacenamiento, utilización de nutrientes) está trabajando. Si nuestro IMR es bajo en ayunas, tendremos tendencia a acumular más grasa. En este estudio, el medir IMR servirá para determinar qué genes están detrás de nuestras capacidades de quemar grasa de manera más efectiva o no.

VI.4.7 Medición de la Presión Arterial

Se le solicita al participante que repose por 15 min en la cama. Luego, se le efectúa la primera toma de la presión arterial, y ritmo cardiaco por la enfermera. Después de 5 minutos, se le efectúa la segunda toma de la presión arterial, y ritmo cardiaco. Después de 5 minutos, se le efectúa la tercera toma de la presión arterial, y ritmo cardiaco por la enfermera. El participante estará recostado para la toma de la tensión arterial y estas serán tomadas siempre en el mismo brazo.

Instrumento:

Monitor automatizado digital Omrom HEM- 907XL para toma de presión arterial

VI.5 MANEJO DE MUESTRAS EN MÉXICO

Procesamiento de muestras de sangre y tejidos (biopsias).

VI.5.1 Sangre periférica.

Se traslada la sangre total a un tubo EDTA

Se extrae sangre total del tubo de EDTA para medir Hemoglobina Glucosilada (HbA1c). Se centrifuga el tubo EDTA.

Se traspassa el plasma a microtubos en alicuotas

Cada alicuota en los microtubos debe de estar perfectamente identificado con una etiqueta especial (cryolabel) que contenga: Numero de Identificación del participante, fecha de nacimiento (DOB, por las siglas en Ingles, date of birth), hora de la extracción de sangre, y fecha del día del procedimiento (Date)

Todos los microtubos con alicuotas se almacenan temporalmente en el termo con hielo seco (-80 °C) hasta ser transportados al ultracongelador (-80 °C) en la UDMM.

Todo el manejo de las muestras tanto de sangre como tejidos, se efectúan siguiendo la Norma Oficial Mexicana correspondiente.

Instrumentos:

Tubo Vacutainer EDTA, Centrifuga VWR Eppendorf 5702R, Microtubos de plástico (crioviales), Etiquetas especiales (crioetiquetas) con los datos del participante, Pipetas de transferencia y Graduadas

VI.5.2 Biopsias de músculo y tejido adiposo

El cirujano entrega la muestra en un recipiente cuadrado de plástico (weighing boat or dish)

Se pesa el tejido en la báscula de miligramos

La muestra se traslada a un microtubo

Dicho microtubo previamente ha sido llenado con 1.5 ml de solución RNA Later

El microtubos con RNA Later y el tejido adiposo o muscular se trasladan y conservan -80 °C

VI.6 MANEJO DE MUESTRAS EN ESTADOS UNIDOS

A su llegada al TexBiomed en San Antonio, Texas, las muestras de sangre serán inventariadas. La mayoría de los fenotipos bioquímicos se analizarán en una plataforma Luminex 100is, que consiste en un flujo de optometría avanzada diseñado para analizar hasta 17 diferentes citocinas y quimiocinas en menos de 2 horas en aproximadamente 25 µL de plasma. Se medirán y analizarán una amplia gama de fenotipos que definen el estado cardiometabólico de los participantes del estudio y / o pueden estar implicadas en la vinculación de la obesidad con la inflamación crónica, la resistencia a la insulina y el riesgo de enfermedad cardiovascular y diabetes tipo 2. Dichos fenotipos serán medidos en ayunas y en curvas fisiológicas posprandialmente.

Los fenotipos bioquímicos y transcriptómicos en ayuno y posprandiales a coleccionar se mencionan en específico a continuación e incluyen mediciones de:

VI.6.1 Fenotipos Bioquímicos: (Mediciones a efectuar en el TexBiomed):

Metabolismo de la glucosa y célula B: Insulina, Glucosa, HbA1c.

Hormonas Gastrointestinales: GIP, GLP-1, PYY, Ghrelin.

VI.6.2 Tejido Adiposo: Leptina, Adiponectina.

Respuesta inflamatoria: CRP-hs, IL-6, PAI-1, TNF-alfa,

Metabolismo Lipídico: Colesterol total, Triglicéridos, HDL-C, LDL-C, Ácidos grasos libres.

VI.6.3 Procesamiento de sangre para extracción posterior de ARN en linfocitos

Se traslada la sangre total a un tubo especial TEMPUS TUBE ARN de 10 ml

Se almacena en el refrigerador de -80 °C

VI.6.4 Perfil de expresión transcriptómica de linfocitos, músculo y grasa subcutánea.

(Todo el trabajo del análisis de expresión “transcriptoma” se llevarán a cabo en el TexBiomed de San Antonio, Texas.)

VI.6.5 Extracción de ARN en linfocitos.

El ARN total se extraerá de linfocitos de sangre periférica de las muestras de los tubos de Tempus utilizando el Prime Perfect Pure ARN Cell Kit (Fisher Scientific).

Para evitar contaminación con ADN genómico, el ARN será tratado con DNasa. La cantidad y la calidad de las muestras de ARN serán determinada mediante un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000. Las muestras cuya relación A260/A280 se desvíen ± 0.2 de la proporción aceptada de 2.0 serán excluidas.

La calidad e integridad del ARN serán evaluadas mediante el Agilent RNA 6000 Nano LabChip Kit y el Bioanalyzer Agilent 2100 (Agilent Technologies), asegurando que las especies ribosomales 28S y 18S de ARN están intactas y que no ha ocurrido degradación significativa. Las grandes cantidades de ARN de globina contenida en el ARN total de la sangre se eliminarán posteriormente de las muestras utilizando el kit de GLOBINclear (Applied Biosystems). La concentración de las muestras de ARN resultante es determinada mediante el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000.

VI.6.6 Extracción de ARN a partir de biopsias de tejido graso subcutáneo y muscular.

El ARN total se aislará del tejido adiposo y del músculo utilizando el kit de RiboPure (Applied Biosystems), después de homogeneizar los tejidos previamente estabilizados en el RNAlater en TRI reagent. El control de la cuantificación y la calidad / integridad de las muestras de ARN se llevará a cabo exactamente igual a como se efectuó con el ARN de los linfocitos.

VI.6.7 Amplificación del ARN y etiquetado.

Para la síntesis de cARN utilizaremos IlluminaTotal Prep ARN amplificación kit (Applied Biosystems). Consiste en tres pasos: a) Síntesis de ADNc de primera línea por transcripción reversa usando un oligo (dT) primer etiquetado con un promotor fago T7 para conseguir transcripción in vitro, b) Síntesis de ADNc de segunda línea y conversión de la cadena simple de cDNA para producir ADN de cadena doble, y c) Transcripción in vitro para generar cARN biotinilado.

La calidad de la cRNA se evaluará utilizando Agilent RNA 6000 Nano LabChip Kit y un

Bioanalyzer Agilent 2100 (Agilent Technologies). La cantidad de cRNA se medirá usando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000.

VI.6.8 Obtención de los perfiles de expresión génica del transcriptoma en linfocitos, tejido adiposo y músculo.

Se utilizará el sistema Illumina Human GT-6 y 3.0 BeadChips de expresión comercialmente disponibles para el análisis de toda la expresión del genoma. Estos BeadChips contienen seis arreglos, cada uno con > 48,000 dianas. Cada arreglo provee una cobertura transcripcional genómica amplia de genes bien caracterizados, genes candidatos y variantes de empalme. Consiste en dos tiras: una tira, en cada par de arreglos, se basa en el Centro Nacional de Bioinformática de la Información (NCBI) sobre Referencia de Secuencia de Genes (RefSeq), con un contenido de pozos (probes) ampliamente aceptado. El contenido de la segunda tira incluye sondas para genes con locaciones únicas en el genoma humano, tales como ESTs, o aquellos que aparecen en múltiples bases de datos independientes.

Las sondas están específicamente diseñadas para evitar pseudogenes y sitios de polimorfismo de nucleótido único de alta frecuencia.

Aproximadamente 1.8 millones de perlas (beads) están disponibles para cuantificar los niveles de ARNm para cada muestra proporcionando en promedio una redundancia de 30 veces y por lo tanto una muy alta precisión de detección. Dado que los arreglos en cada chip están separados entre sí por un sello, seis muestras diferentes pueden ser analizadas de forma simultánea.

Esto reduce los costos de experimentación y disminuye la manipulación, ya que todos los pasos intermedios de la hibridación son realizados en paralelo en cada BeadChip. Este sistema utiliza un enfoque de "hibridación directa", las sondas para genes específicos unidos a las perlas en los arreglos son utilizados para capturar y detectar ARNc marcados. Cada perla en los arreglos contiene varios cientos de miles de copias de un oligo que consiste en una secuencia específica de genes de 50 nucleótidos para detectar genes específicamente, así como una "dirección secuencial" de 29 nucleótidos que permite la identificación de cada pozo y cada perla conectada. El resultado de ~ 48,000 mediciones cuantitativas se capturan en la base de datos fenotípicos y procedimientos adicionales de control de calidad estadística son efectuados para detectar a estos fenotipos de expresión global para el análisis estadístico genético.

VI.7 CRONOGRAMA:

Trabajo de campo: 7 años

Procesamiento de muestras y análisis de datos: 3 años

Marzo 2014 – diciembre 2020

Colección de muestras de tejidos y sangre para medición de fenotipos globales de expresión y posprandiales.

Enero 2021 – diciembre 2022

Análisis estadístico genético de la correlación de los fenotipos posprandiales y transcriptómico.

VII UTILIZACION DEL MATERIAL GENETICO

El material genético obtenido de las muestras trasladadas a Texas será utilizado con la exclusiva finalidad de obtener datos especificados en los objetivos de esta investigación.

Estos datos son relevantes al avance de la ciencia y se pretende hacerlos del conocimiento público a través de artículos científicos producto de la colaboración académica binacional descrita en este proyecto, respetando siempre los aspectos éticos de confidencialidad de los participantes. Todo resultado de esta investigación está sujeto a las estrictas políticas del TexBiomed, indicando que como esta Institución se encuentra constituida como una entidad filantrópica sin fines de lucro, sus lineamientos y principios aplicarán a los resultados de este estudio, respetando la soberanía genética Mexicana y prohibiendo cualquier intención de comercialización que se pretenda efectuar con respecto a dichos resultados del estudio GEMM.

VIII INSTITUCIÓN COLABORADORA EN LOS ESTADOS UNIDOS: TEXAS BIOMEDICAL RESEARCH INSTITUTE (TXBIOMED)

Es considerado una de las instituciones en investigación genética líderes a nivel mundial, el TexBiomed, en los Estados Unidos, tiene como misión procurar el avance de la salud humana a través de investigación biomédica y genómica.

Hoy en día, el equipo multidisciplinario de científicos trabaja en muy diversas áreas de investigación y proyectos científicos para la búsqueda de genes. Esta institución se localiza en un campus de 332 acres en San Antonio, Texas.

Los científicos que trabajan en el TexBiomed han podido ensamblar el conglomerado más grande de computadoras para investigación genética y genómica. Estas computadoras se encuentran localizadas en el AT&T Genomics Computer Center, uno de los modernos edificios que pertenecen al Departamento de Genética dentro del campus del TexBiomed. Esta inmensa red de procesadores paralelos permite a los genetistas del TexBiomed el escrutinio de genes que influyen en el desarrollo de enfermedades a velocidades record. Con 3,000 computadoras trabajando en paralelo, el AT&T Genomics Computer Center es el mas grande conglomerado de computadoras exclusivo para análisis genómicos a nivel mundial. Se le conoce como el “rancho de computadoras”.

El TexBiomed comparte sus instalaciones con el Centro Nacional de Investigación en Primates del Suroeste de los Estados Unidos. Es el hogar de la colonia de papiones sagrados (baboons) más grande en el mundo. Por este hecho, el TexBiomed tiene sus principales programas de investigación avanzada coordinados desde su Departamentos de Genética y desde su Centro Nacional de Investigación en Primates. Este tipo de recursos es la razón por

la que el TexBiomed es conocido como una institución con una sólida reputación en investigación en las ciencias genómicas en los Estados Unidos y a nivel internacional.

El TexBiomed ha cambiado su nombre desde el 2011: antes se denominaba Southwest Foundation for Biomedical Research (SWFBR) y ahora oficialmente su nombre es el Instituto de Investigación Biomédica de Texas (Texas Biomedical Research Institute, TexBiomed).

IX CONSIDERACIONES ÉTICAS Y DE BIOSEGURIDAD

El estudio se apega estrictamente a lo estipulado en la Ley General de Salud en Materia de Investigación (LGSMI), lo concerniente a Aspectos Éticos de la investigación en seres humanos y de la bioseguridad de las investigaciones, (Título Segundo Capítulo I y Título IV, Capítulo I). Así mismo observa a lo pertinente lo establecido por la Norma Oficial **NOM-087-ECOL -SSA 1-2002**, protección ambiental- Salud ambiental- Residuos peligrosos biológico-infecciosos. Clasificación y especificaciones de manejo (**NOM-087**).

La propuesta en extenso fue sometida a la evaluación y aprobación de los Comités de Ética, Investigación y Bioseguridad del Hospital del Niño Morelense (Anexo 3 y 4), del Hospital General de Cuernavaca "Dr. José G. Parres" de los Servicios de Salud de Morelos (SSM) y de la Facultad de Medicina de la UAEM.

Artículo XIV

Fracción V. Todo participante decide libremente su participación y firma consentimiento informado donde se explica claramente el procedimiento a seguir y las posibles molestias que le puede ocasionar, así como el seguimiento que se le da por parte del cirujano y el Hospital del Niño Morelense, así como personal del equipo de investigación de la Facultad de Medicina y del Hospital Henri Dunant.

Fracción VI.

Los integrantes del equipo de trabajo son profesionales del campo de la salud con entrenamiento intensivo; los procedimientos de toma de muestras de sangre y tejidos se realizan en el Hospital Henri Dunant.

Artículo XVI

La privacidad del o la participante se protege por medio de un código que se incorpora a toda la información recolectada. Sin embargo, se pide autorización para tener dirección y teléfono particular, con el fin de poder darles seguimiento después de la toma de muestras.

Artículo XVII.

De acuerdo a los criterios establecidos la investigación se considera de riesgo mayor que el mínimo (Artículo 84), dado los procedimientos a realizar (antropometría, punción venosa y extracción de 45 ml en tomas de 3ml; biopsia con incisión de 2 cms. de longitud y 1.5 cms de profundidad (dependiendo del espesor del tejido adiposo), densitometría ósea y toma de rayos X de rodilla. En todos los casos se proporciona a los participantes analgésico y tratamiento profiláctico de antibióticos, prescrito por el cirujano, para tres a cinco días posteriores a la toma

de muestras. Se proporciona además números telefónicos del médico y la enfermera a quienes puede recurrir en cualquier momento si tuviera algún problema relacionado con los procedimientos a los que se le sometió por causa de la investigación, en cuyo caso la UDMM ofrecerá cualquier servicio que requiriera el participante.

IX.1 Manejo de sangre y tejidos (Bioseguridad)

La investigación contempla la toma y conservación de sangre y tejidos en las instituciones locales participantes; el procesamiento de las muestras se llevará a cabo en Departamento de Genética del Instituto de Investigación Biomédica en Texas (Department of Genetics, Texas Biomedical Research Institute) localizado en San Antonio, Texas. El Center for Disease Control de Atlanta Georgia, USA., ha sido notificada y ha autorizado al Texas Biomedical Research Institute el recibir e importar el material colectado para procesarlo posteriormente, en notificación fechada el día 5 de Diciembre de 2011 siendo dicha notificación válida por 2 años.

From: CDC Import Permit [<mailto:importpermit@cdc.gov>].
To: jkent@txbiomedgenetics.org [<mailto:jkent@txbiomedgenetics.org>].
Sent: Mon, 05 Dec 2011 13:28:16 -0600.
Subject: CDC Import Permit Application for non-infectious material (Jack W. Kent)
RE: GEMM Family Study
**(Estudio GEMM (Genética de las Enfermedades Metabólicas en México):
Bases Genómicas del Metabolismo Posprandial).**

Good afternoon,

The Public Health Service Foreign Quarantine Regulations (42 C.F.R. 71.54) govern the importation of etiological agents, hosts, and vectors of human disease into the United States.

A U.S. Public Health Service (PHS) import permit is not required for non-infectious materials (e.g., formalin-fixed specimens, tissues or slides), or human or animal diagnostic specimens such as blood, urine, tissues in which there is no evidence or indication that such materials contain an infectious agent. Please note that specimens from humans may be subject to the Bloodborne Pathogens Standard (29 C.F.R. 1910.1030) and that specimens from animals may require a permit from the United States Department of Agriculture (USDA), Animal and Plant Health Inspection Service (Telephone: 301-734-3277).

Based upon the review of your application dated 12/02/11, the material you wish to import contains non-infectious material (i.e. blood from healthy humans) and would not require a U.S. PHS Import Permit.

To facilitate clearance of materials that do not require a U.S. PHS Import Permit, it is recommended that each shipment of this material be accompanied by a signed statement, on official letterhead, from the person responsible for the shipment of this material with the following information:

- (1) A description of the material;
- (2) A statement that this material meets one of the above criteria (e.g., this material is not known or suspected to contain an etiological agent, host, or vector of human disease); and,
- (3) Verification that it has been packaged, labeled, and transported in accordance with all applicable regulations. Note that other permits may be required (e.g., USDA).

Thank you,

Centers for Disease Control and Prevention.
Division of Select Agents and Toxins (DSAT).
Etiologic Import Permit Program: 404-718-2077.
Fax for Import Permit Program: 404-718-2093.
Fax for Select Agent Program: 404-718-2096.

Articulado Implicado

Ley General en materia de Investigación para la Salud.

Capítulo I, Artículo 75

Frac. III. Integrantes del equipo de trabajo: enfermeras, nutriólogas, médicas y cirujanos llevan a cabo entrenamiento intensivo sobre manipulación y transporte de tejidos, así como la eliminación de desechos.

Frac. IV. Los procedimientos son supervisados por personal médico y de enfermería que se han entrenado en los procedimientos, su enseñanza y supervisión.

Artículo 77

Frac. II. Seguridad de los integrantes del equipo de trabajo. Cualquier accidente con agujas o material cortante que sufra alguna de los integrantes del equipo se reporta y se lleva a cabo lo estipulado en el "Manejo de Accidentes con Punzocortantes en el Hospital"

Frac. VI. Recepción de transportes de materiales biológicos. Las muestras de sangre se colocan en tubos definidos en el protocolo, debidamente identificados con código del participante, colocándose en cajas con gradillas y en refrigeración (hielo seco, nitrógeno líquido). En igual forma, la piel, grasa y músculo, son manipulados con guantes y almacenados en tubos con la solución estipulada y cierre hermético, para colocarse en caja con gradilla y en refrigeración (hielo seco, nitrógeno líquido).

El nitrógeno se almacena en tanque especial de 6 litros; su manejo se hace utilizando guantes especiales y pinzas largas que evitan el contacto con el material. El hielo seco se encuentra en hielera y se evita el contacto directo con el mismo por medio de uso de pinzas. Una vez completas las muestras en hielera y tanque de nitrógeno perfectamente cerrados, se trasladan a la UDMM, donde se entregan a la persona responsable del laboratorio, quien con guantes y pinzas extrae las cajas gradillas para colocarlas en el ultracongelador a -80 °C y -4 según corresponda.

Las muestras de sangre y tejidos serán trasladadas al Texas Biomedical Research Institute en San Antonio por la compañía especializada "WORLD COURIEER" con certificación ISO 9001-Certified A08875.

IX.2 Joint Comission. Seguridad del participante.

Meta 1. La identificación del participante se hace al recibirlo en el Hospital Metropolitano con pregunta directa sobre su nombre completo. Ya en la habitación se le pide nombre, edad, y otros datos que se registran en hojas de control de procedimientos.

Meta 2. La comunicación con el participante se hace en forma verbal y escrita: Previo al evento se hace visita en el hogar explicándole el procedimiento dejándole indicaciones escritas sobre cómo prepararse el día previo.

Meta 3. Durante el procedimiento se informa oportunamente lo que se le hace (veno-punción, extracción de sangre, pasos de la cirugía menor), y al concluir los eventos se le dan indicaciones verbales y escritas haciendo seguimiento telefónico.

Meta 4. El lugar de la cirugía menor está claramente señalado en el protocolo (tercio antero superior del muslo) y es observado por la enfermera responsable de ayudar en el procedimiento.

Las muestras de sangre y tejidos serán trasladadas al Texas Biomedical Research Institute En San Antonio por compañía especializada "WORLD COURIER" con certificación ISO 9001-Certified A08875.

X REFERENCIAS SELECTAS.

- 1) Després JP, Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* 14;444(7121):881-7, 2006.
- 2) Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, Capeau J, Feve B. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw.*17(1):4-12, 2006
- 3) Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest.*116(7):1793-801, 2006.
- 4) Comuzzie AG, Towne B, Blangero J, Mahaney MC, Chumlea WC, Roche AF, Siervogel RM, MacCluer JW. Differences between Mexican Americans and non-Hispanic Whites in the genetic and environmental correlations between waist and hip circumference: Implications for cross-population comparisons of the waist/hip ratio. *Am J Hum Biol* 7:120, 1995.
- 5) MacCluer JW, Stern MP, Almasy L, Atwood LA, Blangero J, Comuzzie AG, Dyke B, Haffner SM, Henkel RD, Hixson JE, Mahaney MC, Mitchell BD, Rainwater DL, Samollow PB, Sharp RM, VandeBerg JL, Williams JT. Genetics of atherosclerosis risk factors in Mexican Americans. *Nutr Reviews* 57:S59-S65, 1999

- 6) Arroyo P, Pardio J, Fernandez V, Vargas-Ancona L, Canul G, Loria A. Obesity and cultural environment in the Yucatan region. *Nutr Rev.*57(5 Pt 2):S78-82, 1999
- 7) Cárdenas-Villarreal Velia M, López-Alvarenga Juan C, Bastarrachea Raúl A, Onofre-Rodríguez Dora J, Lerma-Cuevas Reyna E, Cerda-Flores Ricardo M, Comuzzie Anthony G. Prevalencia de Fenotipos de Riesgo Cardiovascular en Niños y Adolescentes del Noreste de México. *Salud Publica de México* (Submitted Ref # 07041)
- 8) Rivera JA, Barquera S, Campirano F, Campos I, Safdie M, Tovar V. Epidemiological and nutritional transition in Mexico: rapid increase of non-communicable chronic diseases and obesity. *Public Health Nutr.*5:113-22, 2002.
- 9) Martinez-Marignac VL, Valladares A, Cameron E, Chan A, Perera A, Globus-Goldberg R, Wachter N, Kumate J, McKeigue P, O'Donnell D, Shriver MD, Cruz M, Parra EJ. Admixture in Mexico City: implications for admixture mapping of type 2 diabetes genetic risk factors. *Hum Genet.*120(6):807-19, 2007
- 10) Cheung VG, Conlin LK, Weber TM, Arcaro M, Jen KY, Morley M, Spielman RS. Natural variation in human gene expression assessed in lymphoblastoid cells. *Nat Genet.* 33:422–425, 2003
- 11) Morley M, Molony CM, Weber TM, Devlin JL, Ewens KG, Spielman RS, Cheung VG. Genetic analysis of genome-wide variation in human gene expression. *Nature* 430: 743-747, 2004.
- 12) Schadt EE, Lamb J, Yang X, Zhu J, Edwards S, Guhathakurta D, Sieberts SK, Monks S, Reitman M, Zhang C, Lum PY, Leonardson A, Thieringer R, Metzger JM, Yang L, Castle J, Zhu H, Kash SF, Drake TA, Sachs A, Lusis AJ. An integrative genomics approach to infer causal associations between gene expression and disease. *Nat Genet* 37: 710-717, 2005.
- 13) Curran JE, Johnson MP, Dyer TD, Göring HH, Jack WK, Charlesworth JC, Borg AJ, Jowett JB, Cole SA, Maccluer JW, Kissebah AH, Moses EK, Blangero J. Genetic Determinants of Mitochondrial Content. *Hum Mol Genet.* 2007 Apr 27; [Epub ahead of print].
- 14) Ramirez R, De la Cruz GP. *The Hispanic Population in the United States*. Washington, DC: US Census Bureau. Current Population Reports, P20-545, 2002.
- 15) Borrell LN. Racial identity among Hispanics: implications for health and well-being. *Am J Public Health.* 95(3):379-81, 2005.
- 16) Medina-Lezama J, Chirinos-Pacheco J, Chirinos JA. Cardiovascular disease in Latin America. *Am Heart J.* 149(2):E13, 2005.
- 17) Sánchez-Castillo CP, Velasquez-Monroy O, Lara-Esqueda A, Berber A, Sepulveda J, Tapia-Conyer R, James WP. Diabetes and hypertension increases in a society with abdominal obesity: results of the Mexican National Health Survey 2000. *Public Health Nutr.*8(1):53-60, 2005.
- 18) Executive summary of the 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). *JAMA.* 285:2486-2497, 2001.
- 19) Ford ES, Giles WH, Dietz WH. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA.* 287 (3):356-9, 2002.

- 20) Aguilar-Salinas CA, Rojas R, Gomez-Perez FJ, Mehta R, Franco A, Olaiz G, Rull JA. The metabolic syndrome: a concept hard to define. *Arch Med Res.* 36(3):223-31, 2005.
- 21) Ruchat SM, Després JP, Weisnagel SJ, Chagnon YC, Bouchard C, Périusse L. Genome-wide linkage analysis for circulating levels of adipokines and C-reactive protein in the Quebec family study (QFS). *J Hum Genet.* 2008;53(7):629-36
- 22) Ford ES. The metabolic syndrome and C-reactive protein, fibrinogen, and leukocyte count: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Atherosclerosis* 2003; **168**: 351–358.
- 23) Rifai N, Ridker PM. Inflammatory markers and coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol* 2002; **13**: 383–389.
- 24) Ding K, Feng D, de Andrade M, Mosley TH Jr, Turner ST, Boerwinkle E, Kullo IJ. Genomic regions that influence plasma levels of inflammatory markers in hypertensive sibships. *J Hum Hypertens.* 2008 Feb;22(2):102-10
- 25) Stumvoll M, Haring H. Resistin and adiponectin-of mice and men. *Obes Res* 2002; 10: 1197–1198.
- 26) Tejero ME, Cole SA, Cai G, Peebles KW, Freeland-Graves JH, Cox LA, Mahaney MC, Rogers J, VandeBerg JL, Blangero J, Comuzzie AG. Genome-wide scan of resistin mRNA expression in omental adipose tissue of baboons. *Int J Obes (Lond).* 2005 Apr;29(4):406-12.
- 27) Kent JW Jr, Mahaney MC, Comuzzie AG, Göring HH, Almasy L, Dyer TD, Cole SA, MacCluer JW, Blangero J. Quantitative trait locus on Chromosome 19 for circulating levels of intercellular adhesion molecule-1 in Mexican Americans. *Atherosclerosis* 2007;195:367-73.
- 28) Arya R, Duggirala R, Jenkinson CP, Almasy L, Blangero J, O'Connell P, Stern MP 2004 Evidence of a novel quantitative-trait locus for obesity on chromosome 4p in Mexican Americans. *Am J Hum Genet* 74:272–282.
- 29) Duggirala R, Blangero J, Almasy L, Arya R, Dyer TD, Williams KL, Leach RJ, O'Connell P, Stern MP 2001 A major locus for fasting insulin concentrations and insulin resistance on chromosome 6q with strong pleiotropic effects on obesity-related phenotypes in nondiabetic Mexican Americans. *Am J Hum Genet* 68:1149–1164
- 30) Mitchell BD, Kammerer CM, Mahaney MC, Blangero J, Comuzzie AG, Atwood LD et al (1996) Genetic Analysis of the IRS. Pleiotropic effects of genes influencing insulin levels on lipoprotein and obesity measures. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16:281–288.
- 31) Comuzzie AG, Mitchell BD, Cole SA, Martin LJ, Hsueh WC, Rainwater DL et al (2003) The Genetics of obesity in Mexican-Americans: the evidence from genome scanning efforts in the San Antonio Family Heart Study. *Hum Biol* 75:635–646
- 32) Comuzzie AG, Blangero J, Mahaney MC, Haffner SM, Mitchell BD, Stern MP, MacCluer JW (1996) Genetics and environmental correlations among hormone levels and measures of body fat accumulation and topography. *J Clin Endocrinol Metab* 81:597–600.
- 33) Voruganti VS, Lopez-Alvarenga JC, Nath SD, Rainwater DL, Bauer R, Cole SA, Maccluer JW, Blangero J, Comuzzie AG. Genetics of variation in HOMA-IR and cardiovascular risk factors in Mexican-Americans. *J Mol* 2008;86(3):303-11.

- 34) Comuzzie AG, Funahashi T, Sonnenberg G et al (2001) The genetic basis of plasma variation in adiponectin, a global endophenotype for obesity and the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 86:4321–4325
- 35) Lindsay RS, Funahashi T, Krakoff J et al (2003) Genome-wide linkage analysis of serum adiponectin in the pima Indian population. *Diabetes* 52:2419–2425
- 36) Chuang LM, Chiu YF, Sheu WH et al (2004) Biethnic comparisons of autosomal genomic scan for loci linked to plasma adiponectin in populations of Chinese and Japanese origin. *J Clin Endocrinol Metab* 89:5772–5778
- 37) Rangnekar AS, Lammert F, Igolnikov A, Green RM. Quantitative trait loci analysis of mice administered the methionine-choline deficient dietary model of experimental steatohepatitis. *Liver Int* 2006;26:1000- 1005
- 38) Göring HHH, Curran JE, Johnson MP, Dyer TD, Cole SA, Jowett JBM, Rainwater DL, Comuzzie AG, Mahaney MC, Almasy L, MacCluer JW, Collier GR, Moses EK, Blangero J. Discovery of expression QTLs using large-scale transcriptional profiling in human lymphocytes. *Nat Genet* 2007; 39:1208-1216.
- 39) Bastarrachea RA, Kent JW Jr., López-Alvarenga JC, Tejero E, Aradillas C, Brito-Zurita O, Machado-Dominguez A, Cerda-Flores RM, Ibarra-Costilla E, Gallegos E, Laviada-Molina H, Hernandez-Escalante V, Rosas J, Lazalde B, Santa-Ollala J, Chávez-Vela J, Dyer TD, Blangero J, Cole SA, Comuzzie AG. Estudio GEMM: Reporte preliminar de la heredabilidad de fenotipos asociados a riesgo de enfermedad cardiovascular aterosclerosa en familias Mexicanas. *Med Clin (Barc)* 2007;129(1):11-3.
- 40) Dyke B. PEDSYS: a pedigree data management software. San Antonio, TX: Department of Genetics, Southwest Foundation for Biomedical Research, 1994.
- 41) R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-00-3, URL <http://www.R-project.org>. 2003.
- 42) Almasy L, Blangero J: Multipoint quantitative-trait linkage analysis in general pedigrees. *Am J Hum Genet* 62:1198-1211, 1998
- 43) Self SG, Liang KY. Asymptotic properties of maximum likelihood ratio tests under nonstandard conditions. *J Am Stat Assoc.* 82:605–10, 1987.
- 44) Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care.* 20(7):1183-97, 1997.
- 45) Almasy L, Dyer TD, Blangero J. Bivariate quantitative trait linkage analysis: pleiotropy versus co-incident linkages. *Genet Epidemiol.* 1997;14(6):953-8
- 46) Tang W, Hong Y, Province MA, et al. Familial clustering for features of the metabolic syndrome: the National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) Family Heart Study. *Diabetes Care.* 29:631-636, 2006.
- 47) Williams JT, Van Eerdewegh P, Almasy L, Blangero J. Joint Multipoint Linkage Analysis of Multivariate Qualitative and Quantitative Traits. I. Likelihood Formulation and Simulation Results. *Am J Hum Genet.* 65:1134-1147, 1999.
- 48) Blangero J, Williams JT, Almasy L. Robust LOD scores for variance component-based linkage analysis. *Genet Epidemiol.* 19 Suppl 1:S8-14, 2000.
- 49) Curran JE, Johnson MP, Göring HHH, Dyer TD, Rainwater DL, Cole SA, Mahaney MC, Jowett JBM, MacCluer JW, Collier GR, Moses EK, Blangero J. Genetic analysis of

- transcriptional profiles for the identification of genes influencing common complex diseases. HUGO's 11th Genome Meeting, Helsinki, Finland, p33 (A72), 2006.
- 50) Curran JE, Johnson MP, Göring HHH, Dyer TD, Stern MP, Cole SA, Comuzzie AG, Jowett JBM, MacCluer JW, Collier GR, Moses EK, Blangero J. Genetic analysis of transcriptional profiles for the identification of genes influencing risk of diabetes. *66th Scientific Sessions of the American Diabetes Association*, Washington DC, June 9-13, Late Breaking Abstracts, pg 7 (A25-LB), 2006
 - 51) Curran JE, Johnson MP, Charlesworth JC, Goring HHH, Dyer TD, Comuzzie AG, Cole SA, Mahaney MC, Jowett JBM, MacCluer JW, Collier GR, Moses EK, Blangero J (2007) Large scale transcriptional profiling for the identification of genes influencing obesity. *Int J Obesity* 31 (Suppl. 1): S20
 - 52) Kent JW Jr., Mahaney MC, Comuzzie AG, Göring HHH, Almasy L, Dyer TD, Cole SA, MacCluer JW, Blangero J. Quantitative trait locus on chromosome 19 for circulating levels of intercellular adhesion molecule-1 in Mexican Americans. *Atherosclerosis* (In press). Available online 16 Nov. 2006: doi:10.1016/j.atherosclerosis.2006.10.005
 - 53) Lord DK, Cross NC, Bevilacqua MA, Rider SH, Gorman PA, Groves AV, Moss DW, Sheer D, Cox TM. Type 5 acid phosphatase. Sequence, expression and chromosomal localization of a differentiation-associated protein of the human macrophage. *Eur J Biochem.* 30;189(2):287-93, 1990.
 - 54) Elliott, K., Blangero, J. & Jowett, J. In *25th Lorne Conference on Protein Structure and Function*, Lorne, Australia, 2004
 - 55) Johnson M, Fitzpatrick E, Dyer TD, Jowett JBM, Brennecke SP, Blangero J, Moses EK. Identification of two novel quantitative trait loci for pre-eclampsia susceptibility on chromosomes 5q and 13q using a variance components-based linkage approach. *Mol Hum Reprod.* 13:61-67, 2007.
 - 56) Tejero ME, Cole SA, Cai G, Peebles KW, Freeland-Graves JH, Cox LA, Mahaney MC, Rogers J, VandeBerg JL, Blangero J, Comuzzie AG. Genome-wide scan of resistin mRNA expression in omental adipose tissue of baboons. *Int J Obes (Lond).* 29(4):406-12, 2005
 - 57) International Multiple Sclerosis Consortium. Enhancing linkage analysis of complex disorders: an evaluation of high-density genotyping. *Human Molecular Genetics* 13, 1943-1949, 2004.
 - 58) Kruglyak L. The use of a genetic map of biallelic markers in linkage studies. *Nature Genetics* 17: 21-24, 1989.
 - 59) Kennedy GC, Matsuzaki H, Dong S, Liu WM, Huang J, Liu G, Su X, Cao M, Chen W, Zhang J, Liu W, Yang G, Di X, Ryder T, He Z, Surti U, Phillips MS, Boyce-Jacino MT, Fodor SP, Jones KW. Large-scale genotyping of complex DNA. *Nat Biotechnol* 21:1233-1237, 2003.
 - 60) Hubner N, Wallace CA, Zimdahl H, Petretto E, Schulz H, Maciver F, Mueller M, Hummel O, Monti J, Zidek V, Musilova A, Kren V, Causton H, Game L, Born G, Schmidt S, Muller A, Cook SA, Kurtz TW, Whittaker J, Pravenec M, Aitman TJ. Integrated transcriptional profiling and linkage analysis for identification of genes underlying disease. *Nat Genet* 2005; 37:243-253.
 - 61) Bastarrachea RA, López-Alvarenga JC, Kent JW Jr., Laviada-Molina H, Cerda-Flores R, Calderón-Garcidueñas AL, Torres-Salazar A, Gallegos-Cabriales EC, Tejero ME, Cole

- SA, Comuzzie AG. [Transcriptomics in Mexicans: Simultaneous genome-wide expression profiling of three tissues.] (In Spanish.) *Gac Med Mex* (In press)
- 62) Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest.* 2003;112(12):1796-808
- 63) Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest.* 2003;112(12):1821-30
- 64) Chen HC, Farese RV Jr. Determination of adipocyte size by computer image analysis. *J Lipid Res.* 2002;43(6):986-9.
- 65) Bastarrachea RA, Kent JW Jr., Rozada G, Cole SA, Alvarenga JL, Aradillas C, Brito O, Cerda R, Gallegos E, Laviada H, Hernandez V, Rosas J, Machado A, Vadillo F, Ramos M, Santa-Ollala J, MacCluer JW, Comuzzie AG. Heritability and genetic correlations of metabolic disease-related phenotypes in Mexico: Preliminary report from the GEMM Family Study. *Hum Biol* 2007; 78:121-130.
- 66) Dyke B. PEDSYS: a pedigree data management software. San Antonio, TX: Department of Genetics, Southwest Foundation for Biomedical Research, 1994.
- 67) R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-00-3, URL <http://www.R-project.org>. 2003.
- 68) Almasy L, Blangero J: Multipoint quantitative-trait linkage analysis in general pedigrees. *Am J Hum Genet* 62:1198-1211, 1998
- 69) Self SG, Liang KY. Asymptotic properties of maximum likelihood ratio tests under nonstandard conditions. *J Am Stat Assoc.* 82:605–10, 1987.
- 70) Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care.* 20(7):1183-97, 1997.
- 71) Almasy L, Dyer TD, Blangero J. Bivariate quantitative trait linkage analysis: pleiotropy versus co-incident linkages. *Genet Epidemiol.* 1997;14(6):953-8
- 72) Tang W, Hong Y, Province MA, et al. Familial clustering for features of the metabolic syndrome: the National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) Family Heart Study. *Diabetes Care.* 29:631-636, 2006.
- 73) Abecasis GR, Cherny SS, Cookson WO, Cardon LR. Merlin--rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow trees. *Nat Genet* 2002; 30:97-101.
- 74) Voruganti VS, Kent JW Jr., Carless M, Curran JE, Göring HHH, Almasy L, Dyer TD, Arar NH, Bauer R, Abboud HE, MacCluer JW, Comuzzie AG, Moses EK, Blangero J. Genome-wide association confirms variants in *SLC2A9* are associated with serum uric acid in Mexican Americans. *Proc Am Soc Hum Genet 58th Annual Meeting* 2008 (In press).
- 75) Li S, Sanna S, Maschio A, Busonero F, Usala G, Mulas A, Lai S, Dei M, Orrù M, Albai G, Bandinelli S, Schlessinger D, Lakatta E, Scuteri A, Najjar SS, Guralnik J, Naitza S, Crisponi L, Cao A, Abecasis G, Ferrucci L, Uda M, Chen WM, Nagaraja R. The *GLUT9* gene is associated with serum uric acid levels in Sardinia and Chianti cohorts. *PLoS Genet* 2007;3(11):e194.
- 76) Wallace C, Newhouse SJ, Braund P, Zhang F, Tobin M, Falchi M, Ahmadi K, Dobson RJ, Marçano AC, Hajat C, Burton P, Deloukas P, Brown M, Connell JM, Dominiczak A,

- Lathrop GM, Webster J, Farrall M, Spector T, Samani NJ, Caulfield MJ, Munroe PB. Genome-wide association study identifies genes for biomarkers of cardiovascular disease: serum urate and dyslipidemia. *Am J Hum Genet* 2008;82:139-49.
- 77) Rutherford S, Cai G, Lopez-Alvarenga JC, Kent JW, Voruganti VS, Proffitt JM, Curran JE, Johnson MP, Dyer TD, Jowett JB, Bastarrachea RA, Atwood LD, Goring HH, Maccluer JW, Moses EK, Blangero J, Comuzzie AG, Cole SA. A chromosome 11q quantitative-trait locus influences change of blood-pressure measurements over time in Mexican Americans of the San Antonio Family Heart Study. *Am J Hum Genet*. 2007 Oct;81(4):744-55
- 78) Elliott, K., Blangero, J. & Jowett, J. In *25th Lorne Conference on Protein Structure and Function*, Lorne, Australia, 2004
- 79) Johnson M, Fitzpatrick E, Dyer TD, Jowett JBM, Brennecke SP, Blangero J, Moses EK. Identification of two novel quantitative trait loci for pre-eclampsia susceptibility on chromosomes 5q and 13q using a variance components-based linkage approach. *Mol Hum Reprod*. 13:61-67, 2007
- 80) Blangero J. Statistical genetic approaches to human adaptability. *Hum Biol* 1993;65:941-966.
- 81) Almasy L, Towne B, Peterson C, Blangero J. Detecting genotype×age interaction. *Genet. Epidemiol* 2001;21(suppl. 1): S819-S824.
- 82) Diego, V.P., Almasy, L., Dyer, T.D., Soler, J.M.P., Blangero, J. Strategy and model building in the fourth dimension: A null model for genotype×age interaction as a Gaussian stationary stochastic process. *BMC Genet* 2003;4(Suppl. 1):S34.
- 83) Vigh J, Suh Y. Genetics of longevity and aging. *Ann. Rev. Med* 2005;56:193-212.
- 84) Holliday, R. Aging is no longer an unsolved problem in biology. *Ann. NY Acad. Sci* 2006;1067:1-9.
- 85) Kent JW Jr., Charlesworth J, Göring HHH, Curran JE, Johnson MP, Dyer TD, Cole SA, Jowett JB, Mahaney MC, Almasy L, MacCluer JW, Moses EK, Blangero J. Genotype × diabetes duration interaction effects on gene expression. *Diabetes* 2008a; 57(Suppl. 1):A61.
- 86) Abe H, Matsubara T, Lehara N, Nagai K, Takahashi T, Arai H, Kita T, Doi T. Type IV collagen is transcriptionally regulated by Smad1 under advanced glycation end product (AGE) stimulation. *J Biol Chem* 2004;279:14201-14206.
- 87) Mima A, Arai H, Matsubara T, Abe H, Nagai K, Tamura Y, Torikoshi K, Araki M, Kanamori H, Takahashi T, Tominaga T, Masuura M, Lehara N, Fukatsu A, Kita T, Doi T. Urinary Smad1 is a novel marker to predict later onset of mesangial matrix expansion in diabetic nephropathy. *Diabetes* 2008;57:1712-1722.
- 88) McPeck MS, Sun L. Statistical tests for detection of misspecified relationships by use of genome-screen data. *Am J Hum Genet* 2000;66:1076-1094.
- 89) Sobel E, Lange K. Descent graphs in pedigree analysis: applications to haplotyping, location scores, and marker-sharing statistics. *Am J Hum Genet* 1996; 58:1323-1337.
- 90) Boehnke M. Allele frequency estimation from data on relatives. *Am J Hum Genet* 1991; 48:22-25.
- 91) Almasy L, Towne B, Peterson C, Blangero J. Detecting genotype×age interaction. *Genet. Epidemiol* 2001;21(suppl. 1): S819-S824.

- 92) Burdick JT, Chen WM, Abecasis GR, Cheung VG. In silico method for inferring genotypes in pedigrees. *Nat Genet* 2006; 38:1002-4.
- 93) Boerwinkle E, Chakraborty R, Sing CF. The use of measured genotype information in the analysis of quantitative phenotypes in man. *Ann Hum Genet* 1986;50:181-194.
- 94) Lewontin RC. On measures of gametic disequilibrium. *Genetics* 1988; 120:849-852.
- 95) Lange K, Weeks D, Boehnke M. Programs for Pedigree Analysis: MENDEL, FISHER, and dGENE. *Genet Epidemiol* 1988; 5:471-472.
- 96) Blangero J, Goring HHH, Kent JWJ, Williams JT, Peterson CP, Almasy L, Dyer TD. Quantitative trait nucleotide analysis using Bayesian Model Selection. *Hum Biol* 2005; 77:541-559.
- 97) Curran JE, Jowett JBM, Elliott KS, Gao Y, Gluschenko K, Wang J, Abel Azim DM, Cai G, Mahaney MC, Comuzzie AG, Dyer TD, Walder KR, Zimmet P, MacCluer JW, Collier GR, Kissebah AH, Blangero J. Genetic variation in selenoprotein S influences inflammatory response. *Nat Genet* 2005; 37:1234-1241.
- 98) Soria JM, Almasy L, Souto JC, Sabater-Leal A, Stone WH, Fontcuberta J, Blangero J. Dissection of a human quantitative trait locus: Allelic architecture of F7 and FVII levels. *Hum Biol* 2005; 77:561-575.
- 99) Kass RE, Raftery AE. Bayes factors. *J Amer Stat Assoc* 1995; 90:773-795.
- 100) Blangero J, Williams JT, Iturria SJ, Almasy L. Oligogenic model selection using the Bayesian Information Criterion: linkage analysis of the P300 Cz event-related brain potential. *Genet Epidemiol* 1999.
- 101) Raftery AE. Bayesian model selection in social research In *Sociological Methodology* (ed. Marseden, Suppl: S67-72
- 102) Havill LM, Dyer TD, Richardson DK, Mahaney MC, Blangero J. The quantitative trait linkage disequilibrium test: a more powerful alternative to the quantitative transmission disequilibrium test for use in the absence of population stratification. *BMC Genetics* 2005; 6:S91.
- 103) Dronavalli S, Duka I, Bakris GL. The pathogenesis of diabetic nephropathy. *Nat Clin Practice Endocrinol Metabol* 2008;4:444-452
- 104) Havill LM, Dyer TD, Richardson DK, Mahaney MC, Blangero J. The quantitative trait linkage disequilibrium test: a more powerful alternative to the quantitative transmission disequilibrium test for use in the absence of population stratification. *BMC Genetics* 2005; 6:S91.
- 105) Dronavalli S, Duka I, Bakris GL. The pathogenesis of diabetic nephropathy. *Nat Clin Practice Endocrinol Metabol* 2008;4:444-452.