



Universidad Autónoma de Guerrero

Facultad de Ciencias Químico Biológicas

Facultad de medicina

Unidad de investigación especializada en Microbiología

Maestría en Ciencias Biomédicas

Polimorfismos A-2570G, G-2081A, A896G y C1196T
del gen *TLR4* asociados con obesidad y alteraciones
metabólicas en jóvenes universitarios

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Presenta:

QBP. Rubén Rodríguez García

Directora de tesis: Dra. Natividad Castro Alarcón

Codirectora de tesis: Dra. Mirna Vázquez Villamar

Chilpancingo de los Bravo, Gro., Enero del 2018



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 16 días del mes de noviembre de dos mil diecisiete se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "Polimorfismos A-2570G, G-2081A, A896G y C1196T del gen *TLR4* asociados con obesidad y alteraciones metabólicas en jóvenes universitarios", presentada por el alumno Rubén Rodríguez García, para obtener el Grado de Maestría en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

El Comité Tutorial

Dra. Natividad Castro Alarcón
Dirección de tesis

Dra. Isela Parra Rojas

Dr. José Francisco Muñoz Valle

Dr. Lorenzo Salgado Goytia

Dr. Gerardo Aparicio Ozores

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
Vo. Bo
UAGro
Coordinación del
Posgrado de la FCB

Dra. Isela Parra Rojas
Coordinación 2014-2018 de la Facultad de
Ciencias Químico Biológicas

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
Vo. Bo
UAGro
Coordinación del
Posgrado de la FCB

Dra. Amalia Vences Velázquez
Directora de la Facultad de Ciencias Químico
Biológicas

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Investigación en Microbiología, de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas perteneciente a la Universidad Autónoma de Guerrero de Chilpancingo Guerrero.

Bajo la dirección de:

Dra. Natividad Castro Alarcón

Codirección de:

Dra. Mirna Vazquez Villamar

La asesoría externa de:

Dr. Gerardo Aparicio Ozores

La asesoría interna de:

Dra. Isela Parra Rojas

Dr. Lorenzo Salgado Goytia

Dr. José Francisco Muñoz Valle

Fuente de financiamiento

Durante el periodo que curso la Maestría en Ciencias Biomédicas, el C. Rubén Rodríguez García, recibió una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Agradecimientos

Primeramente agradezco a dios por permitirme vivir y obtener un logro más en mi preparación académica.

Gracias a mi directora de tesis, la Dra. Natividad Castro Alarcón, por brindarme su apoyo y las aportaciones para mejorar el trabajo de investigación.

A mi codirectora, la Dra. Mirna Vázquez Villamar, por su amistad, su dedicación y paciencia. Sus sugerencias fueron primordiales para culminar este trabajo.

A mi comité sinodal a la Dra. Isela Parra Rojas, Dr. Lorenzo Salgado Goytia, Dr. Francisco Muñoz Valle y el Dr. Gerardo Aparicio Ozores por sus críticas y puntos de vista que han sido primordiales para mejorar el trabajo.

A la Dra. Iris Paola Guzmán Guzmán por sus sugerencias y críticas al trabajo.

Gracias a todos mis compañeros de la maestría y del laboratorio de investigación en microbiología, en especial a Oscar Zaragoza García, Claudia Paola Pérez Macedonio, Flor, Blanca, Romina Vázquez, por brindare su amistad y apoyo.

Gracias a mi familia por creer en mí y brindarme su apoyo.

Dedicatoria

Quiero dedicar esta tesis en primera instancia a mis padres Francisco Rodríguez y Francisca García, por su cariño y apoyo incondicional que me han brindado para culminar otra etapa más en mi preparación. Especialmente a mis hermanas, por la motivación que me brindaron durante todo este proceso.

“Los desafíos son los que hacen la vida interesante, y superarlos es lo que hace la vida significativa” (Joshua J. Marino)

Índice	Pág
Índice de cuadros y figuras	I
Resumen	II
Abstract	III
Introducción	1
Materiales y métodos	6
Resultados	9
Discusión	18
Conclusiones	26
Perspectivas	26
Anexos	27
Referencias	32

Índice de cuadros y figuras	Pág.
Cuadro 1. Secuencias de oligos y condiciones de reacción de la PCR para los polimorfismos A-2570G, G-2081A, A896G y C1196T del gen <i>TLR4</i> .	7
Cuadro 2. Enzimas de restricción y condiciones de corte para los polimorfismos A-2570G, G-2081A, A896G y C1196T del gen <i>TLR4</i> .	8
Cuadro 3. Características sociodemográficas, antropométricas y clínico-metabólicas de los grupos de estudio.	10
Cuadro 4. Prevalencias de parámetros clínico-metabólicos alterados en los grupos de estudio.	11
Cuadro 5. Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos A-2570G, G-2081A, A896G y C1196T del gen <i>TLR4</i> en jóvenes con y sin obesidad.	12
Cuadro 6. Asociación de los polimorfismos G-2081A, A896G y C1196T del gen <i>TLR4</i> en jóvenes con y sin obesidad.	13
Cuadro 7. Relación de los polimorfismos A-2570G, G-2081A, A896A y C1196T del gen <i>TLR4</i> con parámetros antropométricos y concentración de parámetros bioquímicos.	14
Cuadro 8. Asociación de los polimorfismos A-2570G, G-2081A, A896G y C1196T del gen <i>TLR4</i> con alteraciones metabólicas.	15
Cuadro 9. Frecuencias de haplotipos de los polimorfismos A-2570G, A-2081A, A896G y C1196T del gen <i>TLR4</i> en ambos grupos de estudio.	16
Figura 1. Desequilibrio de ligamiento de los SNPs: A-2570G, G-2081A, A896G y C1196T del gen <i>TLR4</i> .	17

Resumen

Introducción: La obesidad es una enfermedad multifactorial caracterizada por un proceso inflamatorio crónico de bajo grado. Se han descrito variaciones genéticas en el gen *TLR4* que pueden disminuir o aumentar la respuesta al lipopolisacárido. Los polimorfismos (A-2570G, G-2081A, A896G y C1196T) localizados en el gen *TLR4* pueden aumentar la expresión o afectar la función del receptor induciendo un proceso inflamatorio crónico de bajo grado favoreciendo el desarrollo de la obesidad. **Objetivo:** Evaluar la asociación de los polimorfismos (A-2570G, G-2081A, A896G y C1196T) del gen *TLR4* con obesidad y alteraciones metabólicas en jóvenes universitarios del Estado de Guerrero. **Materiales y métodos:** Se seleccionaron 100 sujetos con obesidad y 104 sujetos controles, todos entre 18 a 30 años de edad, originarios del Estado de Guerrero. Los polimorfismos del gen *TLR4* fueron determinados mediante la técnica de PCR-RFLP's. **Resultados:** En este estudio se encontró que los portadores del genotipo heterocigoto de los polimorfismos G-2081A, A896G y C1196T confiere mayor riesgo a desarrollar obesidad (OR=3.73, IC95% 1.09-16.21, $p<0.05$; OR=5.66, IC95% 1.15-54.13, $p<0.05$ y OR=8.95, IC95% 1.15-401.12, $p<0.05$, respectivamente). Se determinó que los portadores del genotipo heterocigoto del polimorfismo G-2081A se asocian con incremento de cintura (9.27 cm), cadera (8.81 cm), el IMC (4.35 kg/m^2) y colesterol (19.08 mg/dL) ($p<0.05$). El genotipo A/G del polimorfismo A896G con aumento significativo de cintura (10.95 cm), cadera (7.32 cm), el IMC (5.53 kg/m^2) y LDL-c (29.87 mg/dL) ($p<0.05$). El genotipo C/T del polimorfismo C1196T con aumento significativo de cintura (13.47 cm), cadera (9.53 c), el IMC (5.48 kg/cm^2) y LDL-c (40.79 mg/dL) ($p<0.05$). **Conclusión:** El genotipo heterocigoto de los polimorfismos G-2081A de la región promotora y A896G, C1196T de la región codificante del gen *TLR4* están asociados con el desarrollo de obesidad e incremento de parámetros antropométricos y metabólicos en jóvenes universitarios del Estado de Guerrero.

Palabras clave: Obesidad, polimorfismos A-2570G, G-2081A, A896G, C1196T, gen *TLR4*

Abstract

Background: Obesity is a multifactorial disease characterized by a chronic low-grade inflammatory process. Nowadays, genetic variations have been described in the *TLR4* gene that can decrease or increase the response to lipopolysaccharide. Polymorphisms (A2570G, G2081A, A896G and C1196T) located in the *TLR4* gene can increase the expression or affect receptor function by inducing a low-grade chronic inflammatory process favoring the development of obesity. **Objective:** To evaluate the association of polymorphisms A-2570G, G-2081A, A896G and C1196T of the *TLR4* gene with obesity and metabolic alterations in young university students of the State of Guerrero. **Materials and methods:** We selected 100 subjects with obesity and 104 controls subjects, all aged 18-30, originating of the State of Guerrero. The *TLR4* gene polymorphisms were determined by PCR-RFLP technique. **Results:** In this study was found that the carriers of the heterozygous genotype of the polymorphism G-2081A, A896G and C1196T confers a higher risk of developing obesity (OR = 3.73, 95% CI 1.09-16.21, $p < 0.05$, OR = 5.66, 95% CI 1.15-54.13, $p < 0.05$ and OR = 8.95, 95% CI 1.15-401.12, $p < 0.05$). It was determined that the carriers of the heterozygous genotype of the polymorphisms G-2081A is associated with increased of waist (9.27 cm), the hip (8.81 cm), the BMI (4.35 kg / m²) and the cholesterol (19.08 mg / dL) ($p < 0.05$). The A/G genotype of the A896G polymorphism with significant increase of waist (10.95 cm), the hip (7.32 cm), the BMI (5.53 kg / m²) and LDL-c (29.87 mg / dL) ($p < 0.05$). The C/T genotype of the C1196T polymorphism with significant increase of waist (13.47 cm), the hip (9.53 cm), the BMI (5.48 kg / cm²) and LDL-c (40.79 mg / dL) ($p < 0.05$). **Conclusion:** The heterozygous genotype of the polymorphisms G-2081A of the promoter region and A896G, C1196T of the coding region of the *TLR4* gene are associated with the development of obesity and increase of anthropometric and metabolic parameters in young university students of the State of Guerrero.

Key words: Obesity, polymorphism A-2570G, G-2081A, A896G, C1196T, *TLR4* gene

Introducción.

La obesidad es una enfermedad multifactorial donde el antecedente genético y los factores ambientales promueven su desarrollo, y recientemente, se ha demostrado que cambios en la composición de la microbiota intestinal se asocia con el desarrollo de la obesidad (Vrieze *et al.*, 2010). Los mecanismos mediante los cuales la microbiota intestinal se encuentra implicada son: la fermentación de carbohidratos generando como productos ácidos grasos libres de cadena corta (AGCC), los cuales proveen energía a las células epiteliales del intestino estimulando la producción de leptina y el péptido YY, la supresión del factor de ayuno (*Fiaf*) inducido por los adipocitos cuya función principal es la inhibición de la lipoproteinlipasa (LPL) y la inhibición de la cinasa AMP (AMPK), favoreciendo la acumulación de ácidos grasos de cadena larga en células de colon, hígado y tejido adiposo (Backhed *et al.*, 2007; Buck *et al.*, 2008; Vinolo *et al.*, 2011; Devaraj *et al.*, 2013).

La microbiota intestinal regula la absorción de nutrientes, el metabolismo y la respuesta inmune (Tilg and Adolph, 2015). Comprende aproximadamente 10^{14} bacterias incluyendo 1000 especies diferentes que residen normalmente en el tracto gastrointestinal. Los cuatro *phylum* de bacterias que constituyen la mayoría de la microbiota intestinal de los mamíferos son: *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* y *Proteobacteria* (Huttenhower *et al.*, 2012; Vrieze *et al.*, 2010). Sin embargo, las *Proteobacterias* se encuentran en el tracto gastrointestinal en menor proporción y un desequilibrio puede generar un aumento de estos microorganismos (Shin *et al.*, 2015). Cani *et al.*, (2008) reportaron que la dieta rica en grasas genera un incremento de *Firmicutes* y *Proteobacterias*, asociándose con un aumento de la masa corporal.

La microbiota intestinal es capaz de promover la inflamación sistémica de bajo grado, mediante la exposición sistémica a lipopolisacárido (LPS) bacteriano, afectando tanto el almacenamiento de grasa y aprovechamiento de energía (Manco *et al.*, 2010). Fei y cols (2013) reportaron en un modelo *in vivo* en ratones libres de gérmenes colonizados con *Enterobacter cloacae*, que desarrollaron

obesidad ante el aumento de la endotoxina bacteriana, promoviendo así la inflamación sistémica de bajo grado. Se ha descrito en sujetos obesos que este aumento del LPS es debido al incremento de la permeabilidad intestinal facilitando así su transporte a circulación sanguínea. Así mismo, uno de los mecanismos propuestos es mediante una dieta rica en grasas, que promueve la liberación del LPS a través del epitelio intestinal transportado junto con los quilomicrones, facilitando así su absorción (Ghoshal *et al.*, 2009; Saad *et al.*, 2016).

Se ha evidenciado que una dieta alta en grasas conlleva a una disbiosis de la microbiota intestinal, debido al incremento de bacterias Gram-negativas productoras de LPS bacteriano, endotoxina que desencadena una respuesta inflamatoria aguda y crónica, así como la liberación de citocinas proinflamatorias y activación de las células inmunes (Lassenius *et al.*, 2011). Se ha descrito que el LPS es reconocido por receptores tipo toll (TLRs, *del inglés Toll-like Receptors*), glucoproteínas transmembrana que reconocen patrones moleculares de agentes microbianos, actualmente se reconocen 11 miembros TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10 y TLR11 (Botos *et al.*, 2011; Blasius and Beutler., 2010).

De manera particular el TLR4 reconoce al LPS bacteriano, interaccionando con un conjunto de moléculas adaptadoras como MyD88 (gen de respuesta primaria de diferenciación mieloides 88), TRIF (Molécula adaptadora asociadas con receptores toll-like), TIRAP O TRAM (Molécula adaptadora a TRIF) induciendo una cascada de señalización, activando al factor de transcripción NF- κ B favoreciendo la producción de citocinas proinflamatorias (Kawasaki T and Kawai, 2014). El LPS al ingresar a circulación se une a la proteína de unión a LPS (LBP *del inglés LPS binding protein*) que está presente en el suero, este complejo presenta al LPS a la proteína de diferenciación mieloides 2 (MD2) formando un complejo que interactúa con el TLR4 para inducir la señalización. Una vez activado el TLR4, recluta a TIRAP en la membrana plasmática, facilitando el reclutamiento de MyD88 para activar a NF- κ B y la AMPK. Por otro lado, también puede endocitarse a través de endosomas dando lugar a la formación de un complejo de señalización con TRAM

y TRIF (Kawai and Akira, 2010). El TLR4 es expresado en muchos tejidos incluyendo al tejido adiposo, hígado, músculo esquelético, células β del páncreas, el cerebro, macrófagos, neutrófilos, mastocitos, linfocitos B y epitelio intestinal (Kim *et al.*, 2010). Kim y cols (2012) demostraron un incremento de citocinas proinflamatorias en ratones alimentados con una dieta rica en grasas, tanto en el tejido adiposo como en el intestino a través de la señalización del receptor TLR4, influyendo en la regulación de la barrera intestinal.

La estructura del TLR4 consiste en 3 dominios: un dominio extracelular rico en leucina (LRR), un dominio transmembrana y un receptor intracelular toll-like-1 (TIR). El dominio LRR está implicado en el reconocimiento del LPS bacteriano (Ferwerda *et al.*, 2008). Se ha evidenciado que el TLR4 es activado por los ácidos grasos libres desencadenando una respuesta inflamatoria (Rocha *et al.*, 2016). También se ha descrito que la administración exógena de ácidos grasos saturados ejerce efectos proinflamatorios en ciertos tipos celulares debido a la activación del TLR4 (Suganami *et al.*, 2007). En un estudio *in vivo* en ratones alimentados con una dieta alta en grasas, se reportó un incremento en la activación del TLR4 en la pared intestinal, sugiriendo que el TLR4 puede asociarse con la obesidad en respuesta al consumo de alimentos ricos en grasa (De la serre *et al.*, 2010). El TLR4 puede mediar algunos efectos de la dieta alta en grasas, sobre la inflamación y resistencia a la insulina. Ambas condiciones están relacionadas con el síndrome metabólico y una variación genética en este receptor puede afectar la relación entre los lípidos de la dieta y síndrome metabólico (Cudac *et al.*, 2011). La presencia de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en el gen *TLR4* pueden ejercer una baja respuesta hacia el LPS bacteriano, incrementando la susceptibilidad de los humanos a infecciones por patógenos Gram-negativos (Long *et al.*, 2014).

El gen del receptor *TLR4* se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 9 en la posición 33.1 (9q33.1). Un gran número de variantes a nivel de promotor han sido descritos asociados con la modulación de la actividad promotora *in vitro* y los polimorfismos que disminuyen la actividad promotora, se han reportado

asociados en los pacientes propensos a infecciones del tracto urinario, caracterizados por una respuesta inmune innata deficiente. El polimorfismo G-2081A se ha descrito que tiene un efecto en aumentar la expresión del gen y el A-2570G en disminuirla, debido a que pueden generar o inducir la pérdida de un sitio de unión para ciertos factores de transcripción (Ragnarsdóttir *et al.*, 2010). El mecanismo molecular de los efectos de estos polimorfismos y su asociación con enfermedades metabólicas aún no está dilucidado. Sin embargo, el polimorfismo A-2570G ha sido asociado con infarto al miocardio (De Staercke *et al.*, 2007).

La presencia de variantes genéticas en la región codificante del gen *TLR4* pueden contribuir en la respuesta inflamatoria de la mucosa frente a la infección de patógenos Gram-negativos (Ziakas *et al.*, 2013). Existe evidencia de dos polimorfismos que están implicados en alterar la función del receptor el A896G (Asp299Gly) y C1196T (Thr399Ile) (Franchimont *et al.*, 2004). Se ha descrito, que los polimorfismos A896G y C1196T interfieren en la respuesta a LPS, debido a una interrupción de la señalización intracelular (Rodríguez *et al.*, 2012). Estas variantes del gen tienen un importante impacto sobre la susceptibilidad a diferentes enfermedades infecciosas (Ziakas *et al.*, 2013). Arbouor *et al.*, en el 2000 reportaron que el polimorfismo A896G se asocia con una disminución de citocinas proinflamatorias por células epiteliales y macrófagos alveolares estimuladas con LPS. Sin embargo, estudios previos han evidenciado que el polimorfismo A896G se ha asociado con un aumento en la activación del TLR4, citocinas proinflamatorias, reactantes de fase aguda, moléculas de adhesión celular y mayor riesgo para el desarrollo de aterosclerosis (Steinhardt *et al.*, 2010). También, se ha descrito que el polimorfismo A896G se asocia con componentes del síndrome metabólico (Cudac *et al.*, 2011).

Recientemente, se ha reportado que los polimorfismos A896G y C1196T del gen *TLR4* confieren un alto riesgo de desarrollar enfermedad inflamatoria intestinal (EII), trastorno inflamatorio crónico con etiología desconocida, sugiriendo que estas variantes genéticas del gen *TLR4* juegan un papel importante en la etiopatogenia de la EII (Ao *et al.*, 2015). También, se ha sugerido que ambos

polimorfismos pueden estar asociados a mayor riesgo a desarrollar cáncer gástrico (Zhou *et al.*, 2014). Ziakas *et al.*, (2013) reportaron que el polimorfismo C1196T se asocia con enfermedades como la malaria, brucelosis e infecciones del tracto urinario (ITU).

Existen muchos estudios que han relacionado las variaciones genéticas en el gen *TLR4* con la susceptibilidad a enfermedades infecciosas y no infecciosas, pero es importante tener en cuenta que estas interacciones son muy complejas y dependen de varios factores como ambientales, orígenes étnicos y género (Medvedev., 2013). En la actualidad, no se ha elucidado la asociación que tienen estos polimorfismos del gen *TLR4* con la obesidad, pero es evidente que están asociados con diversas patologías como cáncer, enfermedad cardiovascular, síndrome metabólico, diabetes, enfermedades infecciosas y marcadores de inflamación que pueden promover la obesidad, es por ello que en base a los antecedentes ya citados el objetivo de esta investigación fue analizar la asociación de los polimorfismos A-2570G, G-2081A, A896G y C1196T del gen *TLR4* con la obesidad y alteraciones metabólicas en jóvenes universitarios del Estado de Guerrero.

Materiales y métodos

Selección de los grupos de estudio

Se seleccionaron 204 jóvenes universitarios de ambos sexos, de 18 a 30 años de edad, de los cuales 100 fueron jóvenes con obesidad (casos) y 104 jóvenes con peso normal (controles). Los jóvenes participantes firmaron un consentimiento informado donde se les proporcionó información acerca de la importancia y de los beneficios que obtendrán al contribuir en el trabajo. Se aplicó una encuesta para valorar los factores de riesgo más relevantes como datos sociodemográficos, el historial clínico e historia familiar de enfermedades, hábitos alimenticios, actividad física y estilo de vida (Anexo 1). Los resultados obtenidos fueron manejados con confidencialidad y se tomó en cuenta todas las medidas de bioseguridad en el laboratorio.

Determinación de las medidas antropométricas

Se llevó a cabo la determinación de medidas antropométricas como el peso, talla e índice de masa corporal (IMC). El peso se determinó mediante una báscula de precisión (TANITA), considerando ciertas condiciones como estar de pie, con los pies juntos, descalzo, con ropa ligera, sin accesorios propios que puedan influir en la medición. La estatura se midió con la ayuda de un estadímetro. Se midió la circunferencia de cintura y cadera con una cinta antropométrica (SECA) con las siguientes recomendaciones: que el individuo este de pie, abdomen relajado, miembros superiores de costado y pies juntos.

Determinación de pruebas bioquímicas

Las muestras sanguíneas se tomaron por punción venosa, se utilizaron tubos al vacío, con EDTA y sin anticoagulante obteniendo 3mL. Las muestras de sangre sin anticoagulante fueron centrifugadas a 2500 RPM durante 5 minutos en la centrifuga UNICO (PowerSpin VX CENTIFUGUE) y se separó el suero en microtubos de plástico. La determinación de los niveles de glucosa, triglicéridos, colesterol total, HDL-c, LDL-c (kit de la marca Spinreac) se realizó mediante ensayos colorimétricos en un espectrofotómetro (Multiskan™GO, Thermo Scientific).

Determinación de los polimorfismos del gen *TLR4*

A partir de las muestras de sangre con anticoagulante se realizó extracción del DNA genómico (gDNA) mediante la técnica de Miller modificada (Miller *et al.*, 1998). El gDNA se cuantificó en un nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). Los polimorfismos A-2570G, G-2081A, A896G y C1196T se determinaron por PCR-RFLPs. Para la PCR se emplearon 100 ng de gDNA y un par de oligos específicos para cada polimorfismo (Cuadro 1). La mezcla de reacción para determinar los polimorfismos A-2570G, G-2081A, A896G y C1196T se realizó en un volumen final de 10 µL utilizando 3µL de GO *Taq*® Green Master Mix, 2x (Promega) (Anexo 2), 0.5µM de cada oligonucleótido, 1 ng de gDNA y 5µL de H₂O. El producto de PCR se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% (29:1) y visualizados por tinción con nitrato de plata.

Cuadro 1. Secuencias de oligos y condiciones de reacción de la PCR para los polimorfismos A-2570G, G-2081A, A896G y C1196T del gen *TLR4*

Gen <i>TLR4</i>	Oligos	Condiciones de temperatura	Tamaño del amplificado (pb)
G-2081A	Sentido 5'-TACAAGAGTTTGTGCCAGTCCA-3'	94 °C / 10 min	172
	Antisentido 5'-GCAAGTGCAATGTAAGTTTCTGTT-3'	(94 °C/30 s, 60 °C/ 30 s, 72 °C/ 30 s X 35ciclos Extensión final 72 °C / 7 min	
A-2570G	Sentido 5'-TGGTACCTGGACCTGTGATGAT-3'	94 °C / 10 min	334
	Antisentido 5'-GTTCCCTGGAAAGTTAATGGTGT-3'	(94 °C/ 30 s, 60 °C/ 30 s, 72 °C / 30 s) X 35 ciclos Extensión final 72 °C/ 7 min	
A896G	Sentido 5'-GATTAGCATACTTAGACTACTACCTCCATG-3'	94 °C/10 min	249
	Antisentido 5'-GATCAACTTCTGAAAAAGCATTCCCAC-3'	(94 °C/30 s, 60 °C/30 s, 72 °C/30 s) X 40 ciclos Extensión final 72 °C/7 min	
C1196T	Sentido 5'-GGTTGCTGTTCTCAAAGTGATTTGGGAGAA-3'	94 °C/10 min	405
	Antisentido 5'-CCTGAAGACTGGAGAGTGAGTTAAATGCT-3	(94 °C / 30 s, 60 °C /30 s, 72 °C/ 30 s) X 40 ciclos Extensión final 72 °C /7 min	

El producto de amplificación de gDNA fue digerido con enzimas de restricción. La digestión de los productos de PCR para el A896G, C1196T y G-2081A, se llevó a cabo a 37 °C por un lapso de 30 minutos y para el A-2570G a 65 °C por 30 minutos, los fragmentos generados se observaron en un gel de poliacrilamida al 7% (29:1) y visualizados por tinción con nitrato de plata. Los genotipos encontrados de cada polimorfismo se muestran en la figura 2 (Anexo 3).

Cuadro 2. Enzimas de restricción y condiciones de corte para los polimorfismos A-2570G, G-2081A, A896G y C1196T del gen *TLR4*.

Gen <i>TLR4</i>	Enzimas de restricción	Fragmentos a obtener (pb)	Genotipo
G-2081A	<i>HpyCH4IV</i>	116 y 56	GG (homocigoto silvestre)
	Sito de corte	172, 116 y 56	GA (heterocigoto)
	ACACG/T	172	AA (homocigoto polimorfo)
A-2570G	<i>TspRI</i>	334	AA (homocigoto silvestre)
	Sito de corte	334, 293 y 41	AG (heterocigoto)
	NNCAGT G /NN	293 y 41	GG (homocigoto polimorfo)
A896G	<i>NcoI</i>	249	AA (homocigoto silvestre)
	Sito de corte	249, 223 y 26	AG (heterocigoto)
	CCAT/ G G	223 y 26	GG (homocigoto polimorfo)
C1196T	<i>Hinf I</i>	405	CC (homocigoto silvestre)
	Corte	405, 376 y 29	CT (heterocigoto)
	G/AATC	376 y 29	TT (homocigoto polimorfo)

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico STATA v11.0. Se determinaron frecuencias relativas y absolutas para las variables cualitativas y comparación entre ambos grupos de estudio y para las frecuencias alélicas y distribución de los genotipos se realizó la prueba de X^2 . Para las variables cuantitativas no simétricas se obtuvieron medianas y percentiles 25th-75th utilizando el test de Mann Whitney. Para determinar la asociación de los polimorfismos en ambos grupos de estudio se calculó el odds ratio (OR) y los intervalos de confianza del 95% mediante modelos de regresión logística y modelos de regresión lineal múltiple para evaluar el riesgo de la variable dependiente con otras. Se consideró un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo. El equilibrio de Hardy-Weinberg fue evaluado por la prueba de X^2 . El desequilibrio de ligamiento (DL), la frecuencia de haplotipos, OR e IC 95%, se realizó con el software SHEsis.

Resultados

Se realizó un estudio de casos y controles en una población de jóvenes estudiantes del Estado de Guerrero, con un rango de 18-30 años de edad. Se analizaron 204 individuos (80 hombres y 124 mujeres), los cuales fueron clasificados de acuerdo a su IMC en dos grupos: 104 fueron de peso normal (controles) y 100 con obesidad (casos). La mayoría de los jóvenes con obesidad refirieron no realizar ejercicio. Por otro lado, en la población con obesidad se observó un aumento significativo en todos los parámetros antropométricos, acentuándose en aquellas medidas que reflejan adiposidad corporal en comparación con el grupo de peso normal. Además, la mayoría de los jóvenes con obesidad refirieron haber nacido por cesárea en comparación con los de peso normal (44% vs 25% respectivamente). Dentro de los parámetros bioquímicos analizados como la glucosa, colesterol, triglicéridos y LDL-c fueron más elevados en los jóvenes con obesidad, mientras que el HDL-c fue significativamente más elevado en jóvenes con peso normal (Cuadro 3).

También se determinó la prevalencia de alteraciones metabólicas en ambos grupos de estudio, observando una proporción significativamente mayor para las alteraciones del perfil lipídico (colesterol total, HDL-c, LDL-c y triglicéridos) y glucosa alterada, en comparación con los de peso normal (Cuadro 4).

Se genotipificaron los polimorfismos A-2570G, G-2081A, A896G y C1196T del gen *TLR4* en ambos grupos de estudio, las frecuencias alélicas y genotípicas se muestran en el cuadro 5. Para el polimorfismo A-2570G, se presentaron los genotipos A/A, A/G y G/G, sus frecuencias fueron 38, 53 y 9% respectivamente. Las frecuencias alélicas que se observaron fueron del 65 y 35%, para el alelo A y G, respectivamente. Al analizar las frecuencias alélicas y genotípicas entre grupos, no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$). Con respecto al polimorfismo G-2081A se presentaron los genotipos G/G y G/A con una frecuencia del 96 y 4%. Sus frecuencias alélicas observadas fueron del 98 y 2%, para el alelo G y A, respectivamente. Al analizar las frecuencias alélicas y genotípicas entre grupos se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$). Para el polimorfismo A896G, se

observaron los genotipos A/A y A/G con una frecuencia del 98 y 2 % respectivamente. Las frecuencias alélicas observadas fueron del 99 y 1%, para el alelo A y G, respectivamente. Al analizar las frecuencias alélicas y genotípicas por grupos se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$). Finalmente, para el polimorfismo C1196T se presentaron los genotipos C/C y C/T con una frecuencia del 99 y 1%. Las frecuencias alélicas observadas fueron del 99.52 y 0.96%, para el alelo C y T, respectivamente. Al analizar las frecuencias alélicas y genotípicas por grupos se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$). Los cuatro SNPs del gen *TLR4* se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg ($p > 0.05$) (cuadro 5).

Cuadro 3. Características sociodemográficas, antropométricas y clínico-metabólicas de los grupos de estudio.

Variables	Total (n=204)	Obesidad (n=100)	Peso normal (n=104)	Valor de p
Edad (años)**	21 (20-24)	22 (20-27)	21(20-23)	0.031
Género (n%)*				
-Femenino	124 (60.78)	56 (56.00)	68 (65.38)	0.170
-Masculino	80 (39.22)	44 (44.00)	36 (34.62)	
Ejercicio (n%)*				
-No	121 (59.31)	71 (71.00)	50 (48.08)	<0.001
-Si	83 (40.69)	29 (29.00)	54 (51.92)	
Tipo de nacimiento*				
-Parto normal	134 (65.69)	56 (56.00)	78 (75.00)	0.004
-Cesárea	70 (34.31)	44 (44.00)	26 (25.00)	
Estatura (cm)**	162 (156-168)	162.5 (158-169.5)	162(155-167)	0.218
Peso (kg)**	68.75 (56.2-84.15)	84.65 (77.5-99.35)	56.5 (51.9-62.95)	<0.001
Cintura (cm)**	90 (79-102.5)	103 (95-113)	79 (75-83.8)	<0.001
Cadera (cm)**	102 (95-112)	112 (106.5-121)	95 (91.75-98.5)	<0.001
ICT (cm)**	0.55(0.49-0.62)	0.62(0.59-0.68)	0.49 (0.46-0.52)	<0.001
IMC (kg/m ²)**	24.91 (21.89-32.16)	32.17 (30.45-34.85)	21.97 (20.67-23.42)	<0.001
Glucosa (mg/dL)**	86.68 (66.42-110.9)	89.74 (69.52-120.58)	82.65(65.72-104.6)	<0.001
Colesterol total (mg/dL)**	146.65 (96.23-222)	161.7 (103.8-232.75)	133.1 (94.6-178.5)	<0.001
Triglicéridos (mg/dL)**	131.55 (82.36-266)	157.79 (101-275.59)	118.2 (70.75-190.16)	<0.001
LDL-c (mg/dL)**	89.97 (73.4-111.4)	103.25 (82.65-127.7)	82.29 (69.72-93.18)	<0.001
HDL-c (mg/dL)**	40.25 (33.35-53)	37.45 (31.11-47.07)	45 (36.85-58.95)	<0.001

*Los datos mostrados en (n%) fueron obtenidos mediante la prueba de X² para las variables cualitativas. **Para las variables cuantitativas de distribución no paramétrica se analizó con medianas y con los percentiles (25th-75th)

**Datos mostrados en Mann witney. Valor de $p < 0.05$. Abreviaturas. HDL-c (colesterol de lipoproteínas de alta densidad); IMC (Índice de Masa Corporal); LDL-c (colesterol de lipoproteínas de baja densidad).

Cuadro 4. Prevalencia de parámetros clínico-metabólicos alterados en los grupos de estudio.

Variab les	Obesidad	Peso normal	Valor de
	n (%)	n (%)	p
Colesterol total			
<200 mg/dL	79 (79.00)	102 (98.00)	<0.001
≥ 200 mg/dL	21 (21.00)	2 (2.00)	
Triglicéridos			
<150 mg/dL	45 (45.00)	88 (85.00)	<0.001
≥ 150 mg/dL	55 (55.00)	16 (15.00)	
Glucosa			
<100 mg/dL	76 (76.00)	92 (88.00)	0.020
≥100 mg/dL	24 (24.00)	12 (12.00)	
HDL-c			
≥ 40 mg/dL	40 (40.00)	65 (62.00)	0.001
<40 mg/dL	60 (60.00)	39 (38.00)	
LDL-c			
<100 mg/dL	45 (45.00)	83 (80.00)	<0.001
≥ 100 mg/dL	55 (55.00)	21 (20.00)	

Los datos mostrados en (n%) se obtuvieron mediante la prueba de χ^2 . Valor de $p < 0.005$ considerado estadísticamente significativo. Abreviaturas HDL-c (colesterol de lipoproteínas de alta densidad); LDL-c (colesterol de lipoproteínas de baja densidad).

Con el objetivo de determinar la asociación de los polimorfismos A2570G, G-2081A, A896G y C1196T con la obesidad se realizaron modelos de regresión logística. El polimorfismo A-2570G no se asoció con obesidad (OR=0.83, IC 95% 0.21-2.95; $p=0.752$), El polimorfismo G-2081A se encontró asociado con obesidad observando que aquellos sujetos portadores del genotipo G/A presentaron un OR=3.73 asociado con la enfermedad. Por otro lado, el polimorfismo A896G, se asoció con obesidad, observando que aquellos sujetos portadores del genotipo A/G presentaron un OR=5.66 asociado con obesidad. Con respecto al polimorfismo C1196T aquellos individuos portadores del genotipo C/T presentaron un OR=8.95 asociado con obesidad (Cuadro 5).

También se realizó un modelo de regresión logística ajustado para las tres variantes, observando que los portadores del genotipo heterocigoto de los SNPs A896G, C1196T y G-2081A se asociaron con obesidad (OR= 6.62, IC95% 1.35-32.35; $p=0.020$, OR=8.04, IC95% 1.04-69.84; $p=0.46$ y OR=3.63, IC95% 1.11-11.85; $p=0.032$) independientemente del género y edad, ($p=0.046$) (Cuadro 6).

Cuadro 5. Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos A-2570G, G-2081A, A896G y C1196T del gen *TLR4* en jóvenes con y sin obesidad.

	Peso normal (n=104)	Obesidad (n=100)	HWE	OR (IC95%)	Valor de <i>p</i>
SNP A-2570G					
Genotipos					
A/A	40 (38)	32 (32)	$X^2(2.69) p(0.101)$	1.0	0.401
A/G	55 (53)	62 (62)		1.40 (0.74-2.65)	
G/G	9 (9)	6 (6)		0.83 (0.21-2.95)	
Alelos					
A	135 (65)	126 (63)			0.688
G	73 (35)	74 (37)			
SNP G-2081A					
Genotipos					
G/G	100 (96)	87 (87)	$X^2(0.040) p(0.841)$	1.0	0.018
G/A	4 (4)	13 (13)		3.73 (1.09-16.21)	
A/A	0 (0)	0 (0)			
Alelos					
G	204 (98)	187 (94)			0.008
A	4 (2)	13 (6)			
SNP A896G					
Genotipos					
A/A	102 (98)	90 (90)	$X^2(0.010) p(0.921)$	1.0	0.014
A/G	2 (2)	10 (10)		5.66 (1.15-54.13)	
G/G	0 (0)	0 (0)			
Alelos					
A	206 (99)	190 (95)			0.015
G	2 (1)	10 (5)			-
SNP C1196T					
Genotipos					
C/C	103 (99)	92 (92)	$X^2(0.002) p(0.960)$	1.0	0.014
C/T	1 (1)	8 (8)		8.95 (1.15-401.12)	
T/T	0 (0)	0 (0)			
Alelos					
C	207 (99.52)	192 (96)			0.015
T	1 (0.48)	8 (4)			

Los datos son expresados en n (%) mediante la prueba de X^2 . $p<0.05$ considerado estadísticamente significativo. Abreviaturas. OR; Odds ratio, IC; intervalo de confianza, HWE; Equilibrio Hardy-Weinberg, $p>0.05$ considerado en equilibrio génico.

Se determinó la relación de los 4 polimorfismos con parámetros antropométricos y parámetros bioquímicos. El polimorfismo A-2570G no se relacionó con ninguno de los parámetros alterados. El polimorfismo G-2081A en aquellos sujetos portadores del genotipo G/A relacionó con IMC, cintura, cadera y niveles de colesterol. (Cuadro 7). Por otra parte, el genotipo A/G del polimorfismo A896G se relacionó significativamente con el IMC, cintura, cadera y LDL-c. Con respecto al polimorfismo C1196T el genotipo C/T relacionó significativamente con IMC, cintura, cadera y LDL-c. Se determinó la asociación de los 4 polimorfismos con las alteraciones metabólicas, observando que los portadores heterocigotos para los SNPs G-2081A y A896G se asocia significativamente con colesterol y LDL-c alterado independientemente del género y la actividad física (Cuadro 8).

Cuadro 6. Asociación de los polimorfismos G-2081A, A896G y C1196T del gen *TLR4* en jóvenes con y sin obesidad.

	Peso normal n (104)	Obesidad n (100)			
SNP A-2081A			OR	IC 95%	Valor de p
GG	100	87	1.00		
GA	4	13	3.63	1.11-11.85	0.032
GG	0	0	-	-	-
SNP A896G					
AA	102	90	1.0		
AG	2	10	6.62	1.35-32.35	0.020
GG	0	0	-	-	-
SNP C1196T					
CC	103	92	1.00		
CT	1	8	8.04	1.04-69.84	0.046
TT	0	0	-	-	-

Análisis de asociación de los polimorfismos A896G, C1196T y G-2081A, mediante un modelo de regresión logística ajustado por género y edad. OR; Odds ratio, IC; intervalo de confianza y $p < 0.05$ considerado estadísticamente significativo ($p < 0.05$).

Cuadro 7. Relación de los polimorfismos A-2570G, G -2081A, A896G y C1196T del gen *TLR4* con parámetros antropométricos y concentración de parámetros bioquímicos.

Variables	SNP A-2570G		SNP G-2081A	SNP A896G	SNP C1196T
	AG β, p	GG β, p	GA β, p	AG β, p	CT β, p
Cintura	-0.36 (0.877)	-5.32 (0.236)	9.27(0.020)	10.95 (0.019)	13.47 (0.012)
	-0.28 (0.902) *	-5.52 (0.216) *	8.97 (0.023) *	11.42 (0.014) *	13.57 (0.011) *
Cadera	1.41 (0.448)	-4.09 (0.247)	8.81(0.005)	7.32 (0.048)	9.53 (0.025)
	1.49 (0.417) *	-4.30 (0.218) *	8.52 (0.006) *	7.79 (0.033) *	9.63 (0.021) *
IMC	0.33 (0.725)	-1.73 (0.340)	4.35(0.007)	5.53 (0.003)	5.48 (0.011)
	0.37 (0.692) *	-1.83 (0.307) *	4.20 (0.008) *	5.77 (0.002) *	5.53 (0.010) *
Colesterol	-5.55 (0.356)	-5.12 (0.653)	19.08(0.059)	20.39 (0.086)	22.36 (0.102)
	-5.55 (0.357) *	-5.10 (0.655) *	19.14 (0.060) *	20.43 (0.087) *	22.36 (0.103) *
HDL-c	-0.67 (0.795)	-0.16 (0.974)	-2.61(0.551)	-3.58 (0.485)	-10.64 (0.070)
	-0.74 (0.773) *	0.03 (0.995) *	-2.32 (0.594) *	-4.01 (0.433) *	-10.74 (0.067) *
LDL-c	-2.77 (0.556)	-14.26 (0.111)	13.73(0.084)	29.87 (0.001)	40.79 (<0.001)
	-2.94 (0.528) *	-13.80 (0.119) *	14.46 (0.066) *	28.90 (0.002) *	40.56 (0.001) *
Triglicéridos	4.53 (0.647)	13.91 (0.459)	0.89(0.958)	14.32 (0.465)	13.70 (0.543)
	4.49 (0.650) *	14.00 (0.457) *	1.02 (0.951) *	14.16 (0.472) *	13.66 (0.545) *
Glucosa	-3.65 (0.100)	-4.60 (0.274)	5.13(0.172)	-2.33 (0.597)	0.90 (0.859)
	-3.67 (0.099) *	-4.53 (0.282) *	5.24 (0.164) *	-5.03 (0.245) *	0.86 (0.864) *

Modelo de regresión lineal. β = coeficiente de correlación. IC= intervalo de confianza. p ; valor de significancia ($p < 0.05$).

*Modelo ajustado por género y actividad física

Cuadro 8. Asociación de los polimorfismos A-2570 G, G-2081A, A896G y C1196T del gen *TLR4* con alteraciones metabólicas.

Variables	SNP A-2570G		SNP G-2081A		SNP A896G		SNP C1196T			
	AG	GG	GA	AG	CT	OR, <i>p</i>	IC95%	OR, <i>p</i>	IC95%	
Colesterol	1.39 (0.569)	0.43-1.45	0.58 (0.649)	0.05-5.86	3.78 (0.028)	1.15-12.42	2.89 (0.141)	0.70-11.95	3.63 (0.091)	0.81-16.21
HDL-c	1.54 (0.214)	0.77-3.07	1.6 (0.397)	0.50-5.51	0.63 (0.389)	0.23-1.76	0.98 (0.977)	0.29-3.03	0.51 (0.362)	0.12-2.14
LDL-c	1.19 (0.626)	0.58-2.45	0.87 (0.842)	0.24-3.12	2.53 (0.077)	0.90-7.10	3.75 (0.039)	1.06-13.21	3.27 (0.109)	0.76-13.90
Triglicéridos	1.4 (0.370)	0.67-2.92	0.81 (0.757)	0.21-3.16	1.28 (0.626)	0.46-3.58	2.81(0.091)	0.84-9.31	2.26 (0.240)	0.57-8.90
Glucosa	0.45 (0.061)	0.19 -1.03	0.31 (0.181)	0.06-1.69	2.03 (0.225)	0.64-6.42	0.38 (0.370)	0.04-3.19	1.06 (0.942)	0.20-5.49

Los datos muestran un análisis de asociación de los polimorfismos A-2570G, G-2081A, A896G y C1196T en jóvenes con y sin obesidad, mediante un modelo de regresión logística ajustado por género y actividad física. Abreviaturas. OR; Odds ratio, IC; intervalo de confianza y *p*; valor de significancia ($p < 0.05$).

De los polimorfismos A-2570G, G-2081A, A896G y C1196T del gen *TLR4*, se infirieron 3 haplotipos, de los cuales el haplotipo AGAC fue el más frecuente (50%), mientras que el haplotipo AAAC fue el menos frecuente (6%). El haplotipo AAAC, mostró diferencias estadísticamente significativas, con un OR=3.54 (IC95% 1.13-11.06; $p=0.02$) (Cuadro 9).

Se midió el desequilibrio de ligamiento entre los 4 polimorfismos del gen *TLR4* en toda la población de estudio. Las comparaciones entre los polimorfismos G-2081A y C1196T mostraron un alto DL ($D = 1$) de manera similar para el A-2570G y G-2081A DL ($D=1$) (Figura 1).

Cuadro 9. Frecuencias de haplotipos de los polimorfismos A-2570G, A-2081A, A896G y C1196T del gen TLR4 en ambos grupos de estudio.

Genotipos	Casos	Control	Valor de p	OR (IC 95%)
	n=100 (n%)	N= 104 (n%)		
AGAC/GGAC	52 (52)	53 (50)	0.8	
AGAC/AGAC	18 (18)	36 (35)	0.0072	
AGAC/GAAC	7 (7)	0	0.0060	
AGAC/AGGT	6 (6)	0	0.0012	
GGAC/GGAC	6 (6)	9 (9)	0.4	
AGAC/AAAC	5 (5)	3 (3)	0.4	
Otros*	6 (6)	3 (3)	0.2	
Frecuencia de haplotipos				
AGAC	101 (0.505)	129 (0.62)	0.02	0.624 (0.421-0.92)
GGAC	74 (0.37)	73 (0.35)	0.75	1.08 (0.72-1.62)
AAAC	13 (0.065)	4 (0.019)	0.02	3.54 (1.13-11.06)

* Genotipos y haplotipos con baja frecuencia. Frecuencias fueron calculadas mediante la prueba de X^2 , $p<0.05$ considerado estadísticamente significativo. Abreviaturas. OR; odds ratio, IC; intervalo de confianza.

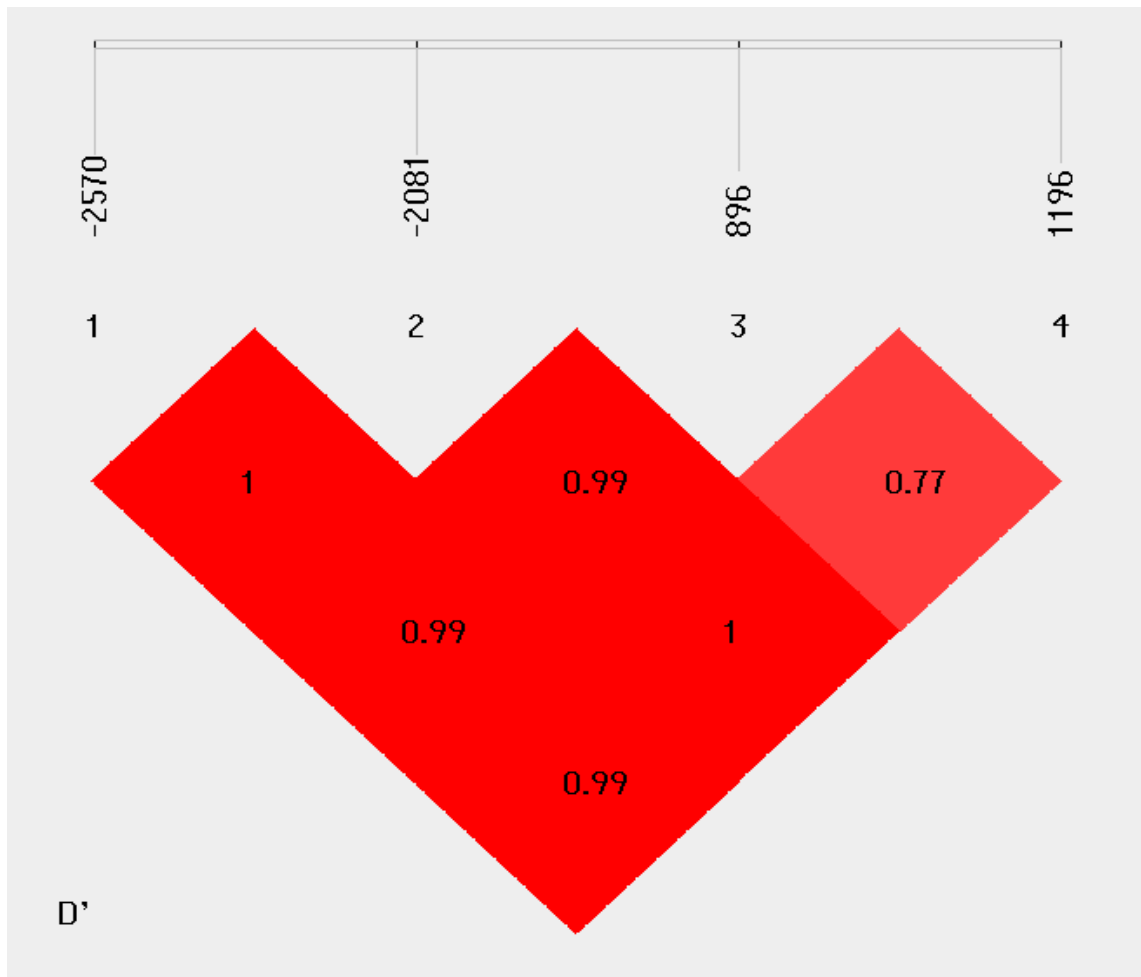


Figura 1. Desequilibrio de ligamiento de los SNPs: A-2570G, G-2081A, A896G y C1196T del gen *TLR4*.

Discusión

En este estudio se demostró la asociación de los polimorfismos A-2570G, G-2081A, A896G y C1196T del gen *TLR4* con el desarrollo de obesidad, alteraciones antropométricas y metabólicas en población joven guerrerense. Cabe mencionar que es el primer trabajo donde se investiga la asociación de polimorfismos del gen *TLR4* con obesidad y alteraciones metabólicas en jóvenes universitarios del estado de Guerrero.

La obesidad es una enfermedad crónica muy compleja con una etiología multifactorial, donde los factores genéticos y ambientales están relacionados. En este estudio se encontró mayor prevalencia de obesidad en el género femenino en comparación con el masculino aunque no de manera significativa. Barquera *et al.*, (2009), reportaron de manera similar, mayor prevalencia en el género femenino en comparación con el género masculino. La Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2012 reportó en jóvenes de 20 a 29 años de edad mayor prevalencia de obesidad en mujeres que en hombres (Gutiérrez *et al.*, 2012). Cabe mencionar que existen muchos factores que están contribuyendo a la alta prevalencia de la obesidad como el estilo de vida, nivel socioeconómico e inactividad física que son muy frecuentes en población mexicana.

Hasta la fecha la actividad física es uno de los factores primordiales para el mantenimiento de una buena salud. En este estudio se encontró que la mayoría de los sujetos con obesidad refirieron no realizar ejercicio, lo cual representa un factor importante para el desarrollo de la enfermedad.

Con respecto al tipo de nacimiento hubo una mayor prevalencia de sujetos con obesidad que nacieron por cesárea en comparación con los de peso normal. Yuan *et al.*, (2016) reportaron que el parto por cesárea se asocia con la obesidad, ya que dentro de su análisis encontraron que aquellos individuos nacidos por cesárea tenían 64% más probabilidad de desarrollar obesidad en comparación con aquellos nacidos por parto natural. De manera similar, Goldani *et al.*, (2011) reportaron que los sujetos con obesidad presentaron una mayor prevalencia de antecedentes de nacimiento por cesárea en comparación con los sujetos control,

por lo cual los autores postulan que el aumento de las tasas de partos por cesárea puede desempeñar un papel importante en el desarrollo de la obesidad, debido a que la colonización bacteriana intestinal es diferente por la adquisición tardía de las *Bifidobacterias*, lo que podría deberse a la falta de contacto de los bebés con la microbiota vaginal materna. La microbiota de los pacientes obesos se relaciona con menos *Bifidobacterium spp*, sugiriendo que los individuos nacidos por cesárea son más propensos a desarrollar obesidad en la vida adulta.

El índice cintura talla (ICT) es una alteración que está asociada con la obesidad y es considerado como un buen predictor de riesgo cardiovascular, valores de un ICT mayores a 0.5 ya representan un riesgo para un evento cardiovascular. En este estudio se encontró que los sujetos con obesidad presentan un ICT mayor en comparación con los sujetos con peso normal. Resultados similares fueron reportados por Castellanos *et al.*, (2015), donde encontraron que la mayoría de los sujetos con obesidad presentaron un ICT mayor en comparación con los de peso normal, concluyendo que este parámetro es importante para predecir y valorar un evento cardiovascular en sujetos con obesidad. En el presente estudio se observó que los sujetos con obesidad presentan hiperglucemia en comparación con los de peso normal de manera significativa. Así mismo, Silha *et al.*, (2003) reportaron resultados similares en una población caucásica, encontrando niveles de glucosa mayores en sujetos obesos en comparación con los de peso normal. Cabe mencionar que nuestra población de estudio es joven y esto es un factor de riesgo para presentar un trastorno metabólico en una etapa temprana.

Las dislipidemias son alteraciones típicas que están asociadas con la obesidad. En nuestro estudio se observaron alteraciones del perfil lipídico en el grupo de obesos. En este caso el 21% presentó hipercolesterolemia, 55% hipertrigliceridemia, 60% HDL-c alterado y 55% LDL-c alterado. Tomando en cuenta los datos reportados a nivel nacional por la ENSANUTEF 2012, la prevalencia de hipercolesterolemia fue de 24.7% en individuos de 20 a 29 años de edad (Gutierrez *et al.*, 2013). Estas cifras son mayores a las encontradas en nuestro estudio, debido a que es una alteración frecuente en la población

mexicana y representa un importante factor de riesgo, para un evento cardiovascular a largo plazo.

En la actualidad se ha descrito que la microbiota intestinal y factores genéticos juegan un papel muy importante en la etiología de la obesidad. Los TLRs son sensores de la respuesta inmune innata, que reconocen agentes microbianos desencadenando así una respuesta inflamatoria, varios polimorfismos en el gen del *TLR4* se han asociado con la susceptibilidad a enfermedades infecciosas e inflamatorias.

Se ha descrito que el polimorfismo A-2570G tiene un efecto en disminuir la expresión de gen *TLR4* debido a que potencialmente perturba un sitio de unión para CdxA, una proteína de homeodominio y Tst-1 que es un factor de transcripción de Pou (pit-Oct-Unc), (Ragnardotii *et al.*, 2010). En este estudio se encontró la presencia de los tres genotipos, observando con mayor frecuencia el genotipo heterocigoto, sin embargo, no se asoció con la obesidad (Cuadro 5). En la actualidad hay escasa evidencia en relación a este polimorfismo, sin embargo, De Staercke *et al.*, (2007), reportaron que las frecuencias genotípicas de este polimorfismo difieren significativamente entre los caucásicos y afroamericanos encontrando una alta heterogocidad en la población caucásica, en un estudio de casos y controles en pacientes con infarto agudo al miocardio (IM); similar a nuestros resultados no encontraron asociación con la enfermedad. Por otro lado, este polimorfismo no se asoció con los parámetros antropométricos (IMC, cintura, cadera) y bioquímicos (colesterol total, triglicéridos, glucosa, HDL-c, LDL-c), ni con alteraciones clínico-metabólicas (Cuadro 7 y 8). De acuerdo a los datos observados, se sugiere que este polimorfismo podría ser un factor protector para el desarrollo de la obesidad y alteraciones metabólicas.

Por otro lado, se encontró, que el ser portador de un alelo polimórfico del polimorfismo G-2081A en el caso de los heterocigotos, es un factor de riesgo para desarrollar obesidad (Cuadro 5). En un modelo de regresión ajustado por género y edad, se encontró que los portadores del genotipo G/A tienen 3.63 veces más posibilidad de desarrollar obesidad independientemente del género y edad

(Cuadro 6). Además, se observó que el ser portador de un alelo polimórfico en el caso de los heterocigotos, aumenta en promedio el IMC 4.35 kg/m², cintura 9.27 centímetros, cadera 8.81 centímetros y colesterol 19.08 mg/dL en comparación con los que portan el genotipo G/G. También se encontró que aquellos individuos portadores con tan solo un alelo de riesgo tienen 3.78 veces más posibilidad de tener colesterol total alterado (cuadro 8). Regarnotii *et al.*, (2010), realizaron un estudio *in silico* donde sugieren que este polimorfismo aumenta la expresión del receptor debido a que perturba potencialmente un posible sitio de unión para N-Myc, factor de transcripción que se encarga de regular la expresión de muchos genes, por lo cual nuestros hallazgos sugieren que la asociación encontrada como factor de riesgo puede deberse a que induce una mayor expresión del TLR4, lo cual puede estar induciendo un aumento en la producción de citocinas proinflamatorias conllevando a un proceso inflamatorio crónico de bajo grado.

Con respecto al polimorfismo A896G, el genotipo A/G fue más prevalente en los sujetos con obesidad en comparación con los sujetos control de manera significativa, sin encontrar el genotipo G/G. En relación a las frecuencias alélicas el alelo G fue más prevalente en los sujetos con obesidad en comparación con los sujetos control. Resultados similares fueron reportados por Balistreri *et al.*, (2014), en una población diabética, encontraron que el genotipo A/A predominó en la población, el genotipo A/G solo se observó en 31 pacientes (8.5%) mientras que ningún sujeto portó el genotipo G/G.

Mediante el análisis de asociación se encontró que los sujetos portadores del genotipo A/G del polimorfismo A896G mostraron alto riesgo de presentar obesidad en comparación con los sujetos control, teniendo 6.62 veces más posibilidad de desarrollar obesidad independientemente de la edad y género. Steinhard *et al.*, (2010), reportaron que este polimorfismo se asoció significativamente con síndrome metabólico (OR=2.03; IC 95%, 1.02-4.05; $p=0.045$). Hoy en día se ha descrito que el síndrome metabólico cursa por un proceso inflamatorio crónico de bajo grado al igual que la obesidad, además de ser enfermedades estrechamente relacionadas (Wellen and Hotamisligil., 2005), lo cual explica en parte la

asociación encontrada en nuestro grupo de estudio. Es importante mencionar que no se encontró el genotipo polimórfico en la población, sin embargo, los sujetos portadores del genotipo A/G ya portan el alelo de riesgo que hipotéticamente podría estar aumentando la susceptibilidad de desarrollar obesidad y comorbilidades asociadas en estos individuos. Se ha descrito que este polimorfismo induce un cambio conformacional en el dominio extracelular del receptor TLR4 ya que al darse el cambio de la base G en lugar de A induce un cambio de aminoácido isoleucina en lugar de treonina, eliminando una posible carga negativa, disminuyendo la capacidad de respuesta al LPS bacteriano, sugiriendo que esta baja afinidad por la endotoxina conlleva a una activación no apropiada del TLR4 (Rallabhandi *et al.*, 2006), lo cual induce una señalización mantenida río abajo activando a NF- κ B quien a su vez activa genes de citocinas proinflamatorias y por ende se desarrolla un proceso inflamatorio crónico de bajo grado explicando en parte los hallazgos encontrados. Sin embargo, Ferwerda *et al.*, (2007), reportaron de manera *ex vivo* en células de individuos de ascendencia africana, que aumenta la capacidad de respuesta al LPS. Explicando en parte que esta hiperreatividad conlleve a un mayor reconocimiento de LPS bacteriano. Pero cabe señalar que los autores sugieren que estas discrepancias pueden ser una ventaja en la lucha contra una enfermedad infecciosa y que por esta razón esta variante sigue presente en África donde las infecciones por patógenos son muy frecuentes. Este polimorfismo se ha asociado con otras enfermedades crónicas, por ejemplo, se ha descrito que aquellos sujetos portadores del genotipo A/G muestran una mayor susceptibilidad a enfermedades cardiovasculares (Buraczynska *et al.*, 2016). Sin embargo, el impacto de este polimorfismo en el riesgo de enfermedad cardiovascular es inconsistente, debido a que otros autores no han encontrado ningún efecto sobre el riesgo de estas enfermedades (Illig *et al.*, 2003; Norata *et al.*, 2005). Es posible que todas estas inconsistencias se puedan explicar por la interacción que pueda tener este polimorfismo con otros factores de riesgo.

Por otra parte se observó que aquellos individuos que portan el genotipo A/G del polimorfismo A896G aumenta en promedio el IMC 5.53 kg/m², la cintura 10.95

centímetros, la cadera 7.32 centímetros y LDL-c 29.87 mg/dL en comparación con los que tienen en genotipo AA. Weyrich *et al.*, (2010) reportaron en un estudio en pacientes diabéticos y no diabéticos que los individuos portadores del alelo G mostraron un aumento de la grasa corporal y en el tejido adiposo visceral sin embargo no encontraron una asociación significativa con el IMC, como lo observamos en nuestro grupo de estudio, sugiriendo que con tan solo ser portador de un alelo polimórfico de esta variante tiene un impacto en la composición de la grasa corporal y resistencia a la insulina, debido a que la expresión del TLR4 se incrementa en los macrófagos derivados del tejido adiposo visceral de individuos tanto obesos como diabéticos y tanto el tamaño de los adipocitos y los niveles de CRP (proteína C reactiva) sistémica se incrementan. Cabe mencionar que su población fue mayor a la nuestra y eran individuos diabéticos. Sin embargo, hoy en día se sabe que la diabetes es una comorbilidad que está estrechamente relacionada con la obesidad, lo cual puede explicar nuestros hallazgos. Al realizar un modelo ajustado por género y actividad física se observó que aquellos individuos portadores con tan solo un alelo de riesgo en el caso de los heterocigotos tienen 3.75 veces más posibilidad de tener HDL-c incrementado (cuadro 8). Nuestros hallazgos muestran resultados contrarios a los reportados por Cuda *et al.*, (2011), quienes no encontraron asociación del polimorfismo A896G con componentes del síndrome metabólico, sin embargo, observaron que aquellos sujetos portadores del alelo G presentaron niveles de insulina sérica significativamente más altos en comparación con los portadores del alelo A.

En estudios previos se ha demostrado que el polimorfismo C1196T induce un cambio conformacional en el dominio extracelular del receptor TLR4 disminuyendo la capacidad de respuesta al LPS bacteriano, conllevando a un desequilibrio entre la secreción de citocinas proinflamatorias, dando como resultado un proceso inflamatorio crónico de bajo grado. En este estudio, los genotipos para el polimorfismo C1196T encontrados fueron C/C y C/T sin encontrar en genotipo homocigoto polimórfico, De manera similar, Kim *et al.*, (2012), reportaron en una población coreana compuesta de 225 pacientes diabéticos y 153 controles ausencia del genotipo T/T. Sin embargo, Vogel *et al.*, (2005), reportaron que el

genotipo T/T se presenta con una frecuencia del 5%-10% en los caucásicos, sugiriendo que estas discrepancias podrían deberse al tamaño limitado de muestra y al origen étnico.

Con respecto a la asociación del polimorfismo con obesidad se encontró que los sujetos portadores del genotipo C/T tienen 8.95 veces más posibilidad de desarrollar obesidad en comparación con los portadores del genotipo C/C. Además, se observó que en aquellos individuos portadores del genotipo C/T aumenta en promedio el IMC 5.48 kg/m², cintura 13.47 centímetros, cadera 9.53 centímetros y colesterol LDL-c 40.79 mg/dL. Hasta el momento no hay ningún estudio disponible sobre la asociación de este SNP analizado del gen TLR4 y el riesgo de desarrollar obesidad, es por ello que los datos con respecto al papel de este polimorfismo son escasos. Sin embargo, si se ha asociado con mayor susceptibilidad a enfermedades infecciosas (Ziakas *et al.*, 2013). Además, se ha descrito que este SNP se asocia con una mayor susceptibilidad de enfermedad inflamatoria intestinal, caracteriza por un proceso inflamatorio crónico (Ao *et al.*, 2015; Franchimont *et al.*, 2004).

En este estudio se observaron tres combinaciones de alelos (los haplotipos conformados por los SNPs del gen *TLR4*, A-2570G en la posición 1, G-2081A en la posición 2, A896G en la posición 3 y C1196T en la posición 4) donde los más frecuentes en esta población fueron el AGAC, GGAC y AAAC. Hasta el momento no hay reportes sobre la frecuencia de haplotipos con estos polimorfismos siendo este el primer trabajo donde se reportan. En el haplotipo AAAC se observaron diferencias estadísticamente significativas con un OR=3.54, sugiriendo con esto que la presencia del alelo de riesgo A del polimorfismo G-2081A, ubicado en la segunda posición del haplotipo AAAC, confiere susceptibilidad a desarrollar obesidad en población guerrerense debido a su efecto en incrementar la expresión del gen *TLR4*. Cabe mencionar que en la actualidad no existen publicaciones con las cuales se pudiesen comparar los haplotipos. De acuerdo al coeficiente de desequilibrio de ligamiento se encontró un alto desequilibrio entre los polimorfismos (A-2570G y G-2081A) (G-2081A y C1196T) indicando que estos dos

bloques tienen una mayor probabilidad de heredarse en conjunto y ser útiles como marcadores genéticos.

En nuestro estudio faltaron incluir algunos datos de suma importancia como porcentaje de grasa, masa magra, masa grasa, para observar el efecto de estas variantes en la composición de la grasa corporal, determinar las concentraciones de LPS y citocinas proinflamatorias.

Con todos los datos obtenidos se comprobó nuestra hipótesis que: los polimorfismos A896G, C1996T y G-2081A se asociaron con obesidad y el incremento de parámetros antropométricos y bioquímicos. Finalmente se espera que en un futuro se comprendan mejor los mecanismos moleculares por los cuales estas variantes alteran la señalización y expresión del receptor TLR4 y así se pueda facilitar el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para la prevención y tratamiento de la obesidad.

Conclusiones

1. Los jóvenes con obesidad presentaron mayor prevalencia de alteraciones clínico-metabólicas (hiperglucemia, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, HDL-c alterado y LDL-c alterado).
2. Los alelos G del SNP (A896G), T del SNP (C1196T) y A del SNP (G-2081A) del gen *TLR4*, se asocian con obesidad en la población joven guerrerense.
3. Los alelos G del SNP (A896G) y T del SNP (C1196T) del gen *TLR4*, se asocian con el incremento de IMC, cintura, cadera y LDL-c.
4. El alelo A del SNP (G-2081A) del gen *TLR4* se asocia con el incremento de IMC, cintura, cadera y colesterol total.
5. El haplotipo AAAG de los polimorfismos A-2570G, G-2081A, A896G y C1196T del gen *TLR4*, se asocia con el desarrollo de obesidad en población joven guerrerense.

Perspectivas del trabajo

1. Extender el campo de la investigación para comprender mejor los mecanismos moleculares mediante los cuales estas variantes están favoreciendo el desarrollo de la obesidad
2. Investigar otros SNPs como el G-2026A y G-2604A localizados en la región codificante del gen *TLR4* que pudiesen estar implicados en la susceptibilidad al desarrollo de la obesidad.
3. Evaluar el perfil de citocinas proinflamatoria en jóvenes con obesidad
4. Analizar la microbiota intestinal y determinar la asociación con las concentraciones de LPS en pacientes con obesidad.

Anexos. Anexo 1. Encuesta.



UAGro
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO

LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN DE MICROBIOLOGÍA
Av. Lázaro Cárdenas S/N, Ciudad Universitaria. Chilpancingo, Gro.

“Proyecto: Polimorfismos del gen TLR4 y su relación con la Microbiota Intestinal en jóvenes con y sin obesidad”

Importante: Escribir letra clara y legible

Nombre completo: _____

Datos sociodemográficos

Sexo: F () M () Edad: ____ años Lugar de origen: _____

Señala el lugar de nacimiento de tu: Padre _____ Madre: _____

Abuelo paterno: _____ Abuela paterna: _____

Abuelo materno: _____ Abuela materna: _____

Señale si estudia o trabaja _____ Lugar _____

Dirección de su domicilio: _____

Teléfono: _____ Correo electrónico: _____

Redes sociales: _____ Fecha de nacimiento: _____

Antecedentes de nacimiento

Nació por: Cesárea () Parto normal () No recuerda ()

Alimentación al nacer: Leche materna () Fórmula láctea () Mixta () No recuerda ()

Si fue alimentado con leche materna ¿cuánto tiempo? (meses o años) _____

Medidas Antropométricas

Peso (kg)		Circunferencia de cintura (cm)	
Talla (metros)		Circunferencia de cadera (cm)	
IMC (kg/m ²)		Índice cintura cadera	

Datos clínicos

Temperatura corporal _____

Presión arterial: Diastólica _____ mmHg Sistólica _____ mmHg

¿Se encuentra actualmente en tratamiento con antibiótico o desparasitantes? _____

¿Cuándo fue la última vez que tomo tratamiento con antibióticos o desparasitantes? _____

¿Cuántas veces por año ha tomado un tratamiento con antibióticos o desparasitantes? _____

¿Qué tipo de antibióticos o desparasitantes ha consumido

(Ejemplo: Ampicilina, Vermox)? _____

¿Sabe si padece alguna enfermedad? _____ Señale cual _____

¿Ha tenido síntomas de colitis o gastritis?

Hábitos alimenticios

1. ¿Regularmente cuantas comidas realiza al día?

2. ¿Entre comidas realiza algún entremés o colación?

3. ¿Cuantas porciones de frutas y verduras consumen diariamente?

4. ¿Cuánto tiempo transcurre desde el momento en que se despierta al primer alimento del día? _____
5. ¿Cuánto tiempo como máximo pasa sin consumir alimentos?

6. ¿Realiza algún tipo de deporte o activación física?

7. ¿Consume actualmente algún tipo de suplemento alimenticio? _____
8. Señale su ingesta promedio de agua por día (Litros):

■ Dentro de su dieta alimenticia, señale el alimento que consume y con qué frecuencia lo hace:

	Rara vez (1-2/semana)	Frecuente (3-5/semana)	Siempre (> 5/semana)
a. Comida rápida (Pizza, tacos, hamburguesas, Kentucky, etc.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
b. Golosinas y frituras (Dulces, chocolates, sabritas, etc.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
c. Frutas y verduras	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
d. Carnes	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
e. Lácteos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
f. Refrescos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
g. Aceites y grasas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
h. Leguminosas (semillas)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
I. Cereales (pan, tortilla, espageti, hotcakes)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Antecedentes de enfermedades crónicas en la familia

Enfermedad	Mamá	Papá	Abuela materna	Abuelo paterno	Abuela paterna	Abuelo paterno
Obesidad						
Hipertensión arterial						

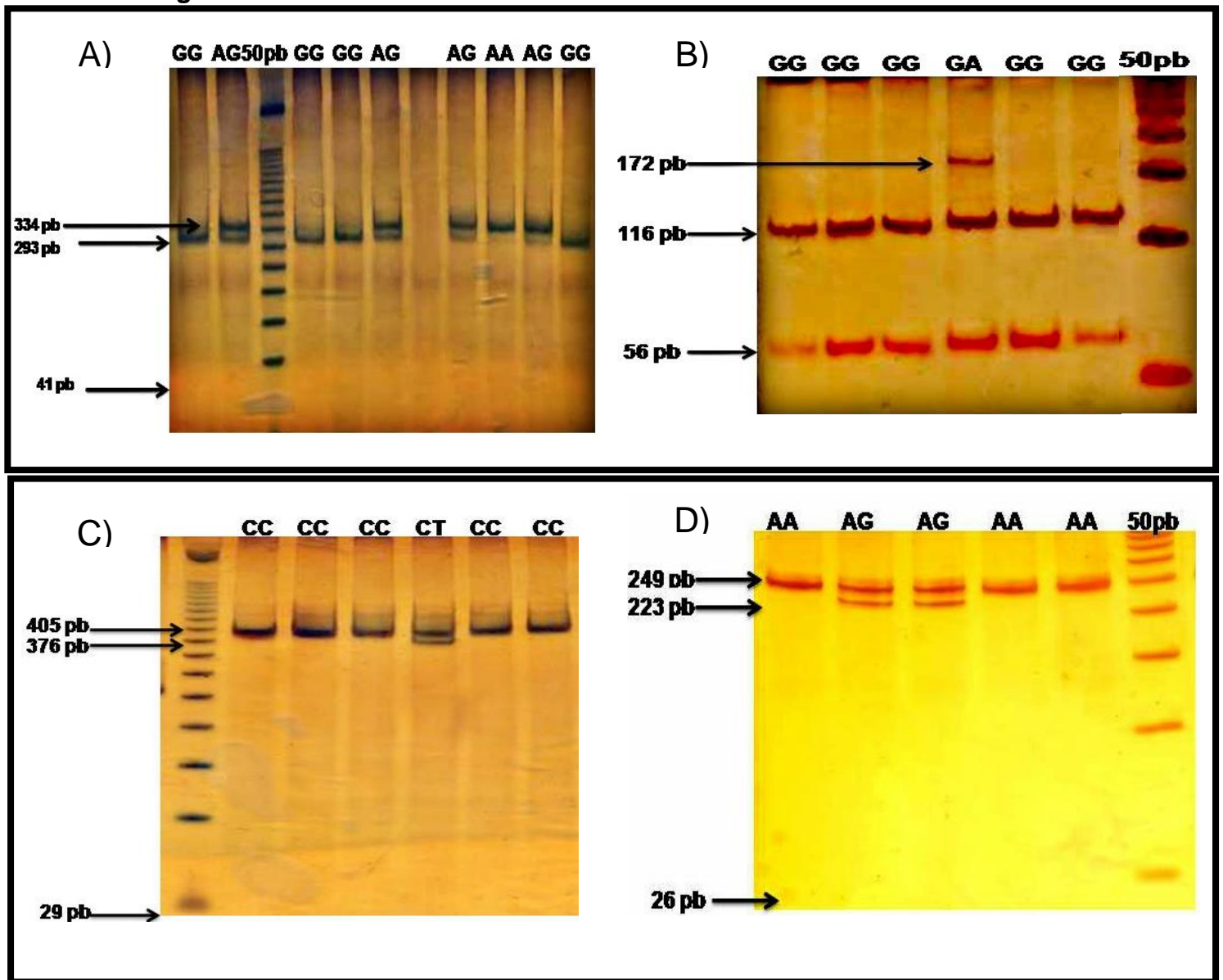
Anexo 2: Descripción: GoTaq®Green Master Mix

Es una solución premezclada lista para usar que contiene DNA-polimerasa *Taq* derivada de bacterias, dNTPs, MgCl₂ y tampones de reacción a concentraciones óptimas para la amplificación eficiente de plantillas de DNA por PCR. GoTaq®Green Master Mix contiene dos colorantes (azul y amarillo) que permiten monitorear el progreso durante la electroforesis. Las reacciones ensambladas con GoTaq®Green Master Mix tienen densidad suficiente para cargar directamente sobre geles de agarosa.

Se recomienda GoTaq®Green Master Mix para cualquier reacción de amplificación que se visualice mediante electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio. La mezcla maestra no se recomienda si alguna aplicación aguas abajo utiliza excitación de absorbancia o fluorescencia, ya que los colorantes amarillos y azules en el tampón de reacción pueden interferir con estas aplicaciones. Los colorantes absorben entre 225-300nm, haciendo lecturas A260 estándar para determinar la concentración de ADN no fiable. Los colorantes tienen picos de excitación a 488 nm y entre 600-700 nm que corresponden a las longitudes de onda de excitación utilizadas comúnmente en la instrumentación de detección de fluorescencia. Sin embargo, para algunos instrumentos, como un escáner de gel fluorescente que utiliza una longitud de onda de excitación de 488 nm, habrá interferencia mínima, ya que es el colorante amarillo que absorbe a esta longitud de onda. Los geles escaneados por este método tendrán un frente de colorante gris claro (correspondiente al frente de colorante amarillo) por debajo de los cebadores.

GoTaq® Green Master Mix, 2X: La GoTaq®DNAPolymerase se suministra en 2X Green GoTaq®Reaction Buffer (pH 8,5), 400 µMdATP, 400 µMdGTP, 400 µMdCTP, 400 µMdTTP y 3 mM MgCl₂. Green GoTaq®Reaction Buffer es un tampón patentado que contiene un compuesto que aumenta la densidad de la muestra, y colorantes amarillos y azules, que funcionan como tintes de carga cuando los productos de reacción se analizan mediante electroforesis en gel de agarosa. El colorante azul migra a la misma velocidad que los fragmentos de DNA de 3-5kb y el colorante amarillo migra a una velocidad más rápida que los cebadores (<50 pb), en un gel de agarosa al 1%.

Anexo 3: Figura 2. Genotipos para los polimorfismos A-2570G, G-2081A, A896G y C1196T del gen *TLR4*.



A) Productos de digestión con la enzima *TspRI*. se observan los genotipos AA: Fragmento de 334 pb; AG: Fragmento de 334 y 293 pb; GG: Fragmento de 293 pb. **B)** productos de digestión con la enzima *HpyCH4IV*. se observan los genotipos GG: Fragmento de 116 y 56 pb; GA: 172, 116 y 56 pb; AA: 172 pb. **C)** productos de digestión con la enzima *NcoI*. Se observan los genotipos AA: Fragmento de 249 pb; AG: Fragmento de 249 y 223 pb. **D)** Productos de digestión con la enzima *HinfI*. Se observan los genotipos CC: Fragmento de 405pb;CT: Fragmento de 405 y 37pb

Referencias bibliográficas

- Ao, R., Wang, Y., Zhnag, D.R. & Du, Y.Q. 2015. Role of TLR4 rs4986790A>G and rs4986791C>T polymorphisms in the risk of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Res Pract*, 2015, 141070
- Arbour, N.C., Lorenz, E., Schutte, B.C., Zabner, J., Kline, J.N., Jones, M., *et al.* (2000). TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet.* 25 (2): 187-91.
- Backhed, F., Manchester, J. K., Semenkovich, C. F. & Gordon, J. I.(2007). Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 979-84
- Balistreri, C.R., Bonfigli, A.R., Boemi, M., Olivieri, F., Ceriello, A., Genovese, S., *et al.*(2014). Evidences of +896 A/G TLR4 polyorphism as an indicative of prevalence of complications in T2DM patients. *MediatorsInflamm*, 973139.
- Barquera, S., Campos-neonato, I., Hernandez-Barrera, L., Flores, M., Durazo-Arvizu, R.,Kanter, R., *et al.*(2009).Obesity and central adiposity in Mexicanadults: resultsfromtheMexicanNationalHealth and NutritionSurvey 2006.instituto nacional de salud pública, Cuernavaca, Morelos, Mexico. *Salud pública de México*, 51, 595-603.
- Blasius, A.L. &Beutler, B. 2010. Intracellular toll-like receptors. *Immunity*, 32(3):305-15.
- Botos, I., Segal, D.M. & Davies, D.R. (2011). Th e structural biology of toll-like receptors. *Structure*; 19(4):447-59.
- Buck, S.S., Abdullah, S., Toshiyuki, M., Rey, E.F., Backhed, F., Manchester, K.J., *et al.* (2008). Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr4. *PNAS USA.*; 105(43):16767-16772.
- Buraczynska M, Zukowski P, Ksiazek K, Wacinski P and Dragan M. 2016. The effect of Toll-like receptor 4 gene polymorphism on vascular complications in type 2 diabetes patients. *DRCP*.166:7-13
- Cani, P. D., Bibiloni, R., Knauf, C., Waget, A., Neyrinck, A. M., Delzenne, N. M., *et al.*(2008). Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*, 57, 1470-81.
- Castellanos, M., Barca, F.J., Cabañas, M.D., Martín, P., García, M.,Muñoz, M. A., *et al.*, (2015). Obesity and anthropometric indicators in a simple of males with Acute Coronary Syndrome in a Health Area with inclusion of inmates: case-control study. *Rev Esp Sanid Penit*, 17, 20-29.
- Cuda, C., Badawi, A., Karmali, M. & El-Sohehy, A.(2011). Polymorphisms in Toll-like receptor 4 are associated with factors of the metabolic syndrome and modify the association between dietary saturated fat and fasting high-density lipoprotein cholesterol. *Metabolism*, 60, 1131-5.
- De La Serre, C. B., Ellis, C. L., Lee, J., Hartman, A. L., Rutledge, J. C. & Raybould, H. E. (2010). Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 299, G440-8.
- De Staercke, C., Lally, C., Austin, H., Winston, C., Dowling, N., Williams B., *et al.*(2007). The lack of association between four point mutations in the promoter region of the toll-like 4 receptor gene and myocardial infarction. *Thromb Res*, 119(1): 105-10
- Devaraj, S., Hemarajata, P. & Versalovic, J.(2013). The human gut microbiome and body metabolism: implications for obesity and diabetes. *Clin Chem*, 59, 617-28.
- Fei, N & Zhao, L. (2013). An opportunistic pathogen isolated from the gut of an obese human causes obesity in germfree mice. *ISME J*; 7(4):880-884.

Ferwerda B, McCall MB, Alonso S, Giamarellos-Bourboulis EJ, Mouktaroudi M, *et al.* (2007). TLR4 polymorphisms, infectious diseases, and evolutionary pressure during migration of modern humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 16645–16650.

Ferwerda, B., McCall, M. B., Verheijen, K., Kullberg, B. J., Van Der Ven, A. J., Van Der Meer, J. W., *et al.* (2008). Functional consequences of toll-like receptor 4 polymorphisms. *Mol Med*, 14, 346-52.

Franchimont, D., Vermeire, S., El Housni, H., Pierik, M., Van Steen, K., Gustot, T., *et al.* (2004). Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299Gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut*, 53, 987-92.

Ghoshal, S., Witta, J., Zhong, J., De Villiers, W. & Eckhardt, E. (2009). Chylomicrons promote intestinal absorption of lipopolysaccharides. *J Lipid Res*, 50, 90-7.

Goldani, H.A., Bettiol, H., Barbieri, M.A., Silva, A.A., Agranonik, M., Morais, M.B., *et al.* (2011). Cesarean delivery is associated with an increased risk of obesity in adulthood in a Brazilian birth cohort study. *Am J Clin Nutr.* 93 (6): 1344-7.

Gutierrez J, Rivera J, Shamah T, Oropeza C, Hernandez M. (2013). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición; Resultados por Entidad Federativa del Estado de Guerrero.

Gutiérrez J.P., Rivera-Dommarco J., Shamah-Levy T., Villalpando-Hernández S., Franco A., Cuevas Nasu L., Romero-Martínez M., Hernández-Avila M. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud. Pública (MX), 2012. P.113.

Huttenhower, C., Gevers, D., Knight, R., Abubucker, S., H-Badger, J., T-Chinwalla, A., *et al.* (2012). Structure, Function and Diversity of the Healthy Human Microbiome. The Human Microbiome Project Consortium. *Nature*; 486(7402): 207-214.

Illig T, Bongardt F, Schopfer A, *et al.* (2003). The endotoxin receptor TLR4 polymorphism is not associated with diabetes or components of the metabolic syndrome. *Diabetes*; 52:2861-4.

Kawai, T. & Akira S. 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on toll-like receptors. *Nat Immunol*, 11, 373-84

Kawasaki, T. & Kaway, T. (2014). Toll-like receptor signaling pathways. *Immunology*, 25, 2-8.

Kim. & Sears, D.D. (2010). TLR4 and Insulin Resistance. 34, 1-11.

Kim K-A, Gu W, Lee I-A, Joh E-H, Kim D-H. (2012). High Fat Diet-Induced Gut Microbiota Exacerbates Inflammation and Obesity in Mice via the TLR4 Signaling Pathway. *PLoS ONE* 7(10): e47713. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047713>

Lassenius, M. I., Pietilainen, K. H., Kaartinen, K., Pussinen, P. J., Syrjanen, J., Forsblom, C., *et al.* (2011). Bacterial endotoxin activity in human serum is associated with dyslipidemia, insulin resistance, obesity, and chronic inflammation. *Diabetes Care*, 34, 1809-15.

Long, H., O'Connor, B. P., Zemans, R. L., Zhou, X., Yang, I. V. & Schwartz, D. A. (2014). The Toll-like receptor 4 polymorphism Asp299Gly but not Thr399Ile influences TLR4 signaling and function. *PLoS One*, 9, e93550.

Manco, M., Putignani, L. & Bottazzo, G. F. (2010). Gut microbiota, lipopolysaccharides, and innate immunity in the pathogenesis of obesity and cardiovascular risk. *Endocr Rev*, 31, 817-44.

Medvedev, A.E. (2013). Toll-like receptor polymorphisms, inflammatory and infectious diseases, allergies, and cancer. *J Interferon Cytokine Res*, 33(9): 467-84.

Miller, S.A., Dykes, D. D., Polesky, H. F. (1998). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, 16, 1215.

Norata GD, Garlaschelli K, Ongari M, *et al.* (2005). Effect of the Toll-like receptor (TLR-4) variants on intima-media thickness and monocyte-derived macrophage response to LPS. *J Intern Med*; 258:21-7.

Weyrich P, Staiger H, Stancakova A, Machicao F, Machann J, Schick F., *et al.* (2010). The D299G/T399I Toll-like receptor 4 variant associates with body and liver fat: results from the TULIP and METSIM Studies. *PloS One*. 15; 5(11): e13980

Rallabhandi, P., Bell, J., Boukhalova, M., Medvedev, A., Lorenz, E., Arditì, M., *et al.* 2006. Analysis of TLR4 Polymorphic Variants: New Insights into TLR4/MD-2/CD14 Stoichiometry, Structure, and Signaling. *J Immunol*, 177 (1), 322-332.

Ragnarsdottir, B., Jonsson, K., Urbano, A., Gronberg-Hernandez, J., Lutay, N., Tammi, M., *et al.* (2010). Toll-like receptor 4 promoter polymorphisms: common TLR4 variants may protect against severe urinary tract infection. *PLoS One*, 5, e10734.

Rocha, D.M., Caldas, A.P., Oliveira, L.L., Bressan, J & Hermsdorff, H.H. (2016). Saturated fatty acids trigger TLR4-mediated inflammatory response. *Atherosclerosis*, 244, 211-5.

Rodríguez, L.A., Beares, I., López, c., González, M. P., Santa Cruz, C and López, M. (2012). Relevancia de TLR4 en la infección por virus de la hepatitis C. *Inmunología*; 31 (3): 65-77

Saad, M.J., Santos, A & Prada, P.O. (2016). Linking gut microbiota and inflammation to obesity and insulin resistance. *Physiology (Bethesda)*, 31(4): 283-93

Schneider, S., Hoppmann, P., Koch, W., Kemmner, S., Schmaderer, C., Renders, L., *et al.* (2015). Obesity-associated hypertension is ameliorated in patients with TLR4 single nucleotide polymorphism (SNP) rs4986790. *J Inflamm (Lond)*, 12, 57.

Shin, N. R., Whon, T. W. & Bae, J. W. 2015. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends Biotechnol*, 33, 496-503.

Silha, J.V., Krsek, M., Skrha, J.V., Scharda, P., Nyomba, B.L. & Murphy, L.J. (2003). Plasma resistin, adiponectin and leptin levels in lean and obese subjects: correlations with insulin resistance. *Eur J Endocrinol*, 149, 331-5.

Steinhardt, A. P., Aranguren, F., Tellechea, M. L., Gomez Rosso, L. A., Brites, F. D., Martínez-Larrad, M. T., *et al.* (2010). A functional nonsynonymous toll-like receptor 4 gene polymorphism is associated with metabolic syndrome, surrogates of insulin resistance, and syndromes of lipid accumulation. *Metabolism*, 59, 711-7.

Suganami, T., Tanimoto-Koyama, K., Nishida, J., Itoh, M., Yuan, X., Mizuarai, S., *et al.* (2007). Role of the Toll-like receptor 4/NF-kappaB pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27, 84-91.

Tilg, H. & Adolph, T. E. (2015). Influence of the human intestinal microbiome on obesity and metabolic dysfunction. *Curr Opin Pediatr*, 27, 496-501.

Vinolo, M., Rodriguez, G.H., Nachbar, T.R., Curi, R. (2011). Regulation of inflammation by Short Chain Fatty Acids. *Nutrients, Brazil*; 3(10):858-876

Vogel, S.N., AA, Awomoyi, Rallabhandi, P., Medvedev, A.E. (2005). Mutations in TLR4 signaling that lead to increase susceptibility to infection in humans: an overview. *J Endotoxin Res*. 11:333-339.

Vrieze, A., Holleman, F., Zoetendal, E. G., De Vos, W. M., Hoekstra, J. B. & Nieuwdorp, M. (2010). The environment within: how gut microbiota may influence metabolism and body composition. *Diabetologia*, 53, 606-13.

Wellen KE, Hotamisligil GS. (2005). Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 115: 1111–1119.

Yuan, C., Gaskins, A.J., Blaine, A.I., Zhang, G., Gillman, M.W., Missmer, S.A., *et al.* (2016). Association Between Cesarean Birth and Risk of Obesity in Offspring in Childhood, Adolescence, and Early Adulthood. *JAMA Pediatr*, 170(11): e162385.

Zhou, Q., Wang, C., Wang, X., Wu, X., Zhu, Z., Liu, B., *et al.* (2014). Association between TLR4 (+896A/G and +1196C/T) polymorphisms and gastric cancer risk: an update meta-analysis.

Ziakas, P. D., Prodromou, M. L., El Khoury, J., Zintzaras, E. & Mylonakis, E.(2013). The role of TLR4 896 A>G and 1196 C>T in susceptibility to infections: a review and meta-analysis of genetic association studies. *PLoS One*, 8, e81047.