

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**POSIBLES GENES ASOCIADOS A LA OBESIDAD Y LA APNEA DEL SUEÑO
MEDIANTE EL RASTREO DE SNPs A NIVEL DE EXOMA**

LISETH YAMILE WILCHES BUITRAGO

Directora:

LILIANA OTERO MENDOZA. OD.MS.PhD Ciencias Biológicas.

BOGOTÁ, COLOMBIA

2015

NOTA DE ADVERTENCIA

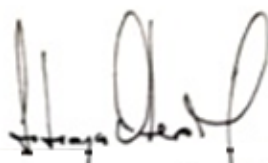
"La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia".

Artículo 23 de la Resolución No.13 de julio de 1946.

**POSIBLES GENES ASOCIADOS A LA OBESIDAD Y LA APNEA DEL SUEÑO
MEDIANTE EL RASTREO DE SNPs A NIVEL DE EXOMA**

LISETH YAMILE WILCHES BUITRAGO

APROBADO



Liliana Otero Mendoza.

OD.MS.PhD Ciencias Biológicas.

Director



María Lucía Gutiérrez Gómez.

BA.MS.PhD Ciencias Biológicas.

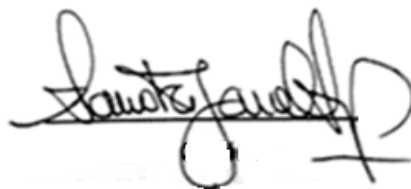
Jurado



Mariluz Gómez Rodríguez.

Bact.MSc.PhD Biología Molecular.

Jurado



Sandra Gutiérrez.

OD.MS.PhD Ciencias Biológicas.

Jurado

**POSIBLES GENES ASOCIADOS A LA OBESIDAD Y LA APNEA DEL SUEÑO
MEDIANTE EL RASTREO DE SNPs A NIVEL DE EXOMA**

LISETH YAMILE WILCHES BUITRAGO

APROBADO

Concepción Puerta B.;PhD.
Decana Facultad de Ciencias

Manuel Antonio Franco. MD;PhD.
Director de Posgrado

A Dios.

A mis padres y hermanos; gracias por su amor, ayuda y compañía.

A mi familia y amigos.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi directora Liliana Otero M., por su adecuada orientación y valioso conocimiento durante este periodo de formación.

Igualmente, agradezco la asistencia técnica de Ana María Bolívar, Jean Carlos Villamil, Ángela Hernández Rojas y Tatiana Ruíz en el Centro de Investigaciones Odontológicas (PUJ), y de Sindi López Velandia y Myriam Africano Manrique en la Clínica del Sueño (HUSI-PUJ). Gracias a las Drs. Sara Lázaro y Leah Kottyan del Departamento de Genómica (Cincinnati Children's Hospital Medical Center) por sus excelentes servicios de análisis.

Este proyecto fue financiado por COLCIENCIAS a través de concesión No. 501953731808, otorgado a Liliana Otero Mendoza.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	14
2. MARCO TEÓRICO	16
2.1 Obesidad	16
2.1.1 Definición y Epidemiología	16
2.1.2 Etiología.....	16
2.1.3 Estudios genéticos relacionados con obesidad	17
2.2 Apnea del Sueño	18
2.2.1 Definición y Epidemiología	18
2.2.2 Tipos	18
2.2.2.1 Apnea Obstructiva del Sueño (AOS).....	19
2.2.2.2 Apnea Central del Sueño (ACS)	19
2.2.2.3 Apnea Mixta del Sueño (AMS)	19
2.2.3 Factores de Riesgo - Estudios genéticos relacionados con Apnea del Sueño	19
3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	21
4. OBJETIVOS	22
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	22
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
5. MATERIALES Y MÉTODOS	23
5.1 Diseño de la Investigación	23
5.2 Población de estudio	23
5.3 Fenotipos Clínicos.....	23
5.4 Muestras de ADN	24
5.5 Secuenciación del exoma	24

5.6 Identificación de SNPs y Análisis de datos	25
6. RESULTADOS.....	27
6.1 Población de estudio	27
6.2 Fenotipos Clínicos.....	27
6.3 Secuenciación exómica, identificación de SNPs y Análisis de datos	28
6.4 Posibles redes genéticas subyacen la obesidad y AS	30
7. DISCUSIÓN	34
7.1 Obesidad y Apnea del Sueño en Colombia	34
7.2 Grupos de genes subyacen el puente genético entre obesidad y AS	35
8. CONCLUSIONES.....	39
9. PERSPECTIVAS.....	40
10. REFERENCIAS.....	41
11. ANEXOS	49

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. SNPs asociados significativamente con obesidad.	29
Tabla 2. SNPs asociados significativamente con Apnea del Sueño.....	30

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Diagrama de flujo que resume la metodología utilizada en este estudio..	26
Figura 2. Diagrama de flujo que describe los pasos de la secuenciación exómica .	26
Figura 3. Distribución de frecuencia de los fenotipos obesidad/Apnea del Sueño...	27
Figura 4. Gráfico de los SNPs exómicos asociados con obesidad.....	28
Figura 5. Gráfico de los SNPs exómicos asociados con Apnea del Sueño.....	29
Figura 6. Red de co-expresión de los genes asociados con los fenotipos obesidad/Apnea del Sueño.....	31
Figura 7. Red de interacción de los genes asociados con los fenotipos obesidad/Apnea del Sueño.....	32
Figura 8. Red de co-expresión e interacción de los genes TRIO, DOCK2 y ACLY .	32
Figura 9. Co-expresión e interacción del gen PNPLA1	33
Figura 10. Posible correlación entre los genes TRIO, DOCK y ACLY	37
Figura 11. Red de co-expresión e interacción de los genes FTO y SEC16B y el clúster TRIO, DOCK2 y ACLY	38

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. Modificaciones al protocolo del kit de aislamiento de ADN a partir de sangre.....	49
ANEXO B. Requisitos de las muestras de DNA para el envío a los servicios de secuenciación exómica.....	49
ANEXO C. Sabana revisión bibliográfica obesidad (Excel).....	Hoja1
ANEXO D. Sabana revisión bibliográfica Apnea del Sueño (Excel)	Hoja2
ANEXO E. Genes identificados para obesidad en el análisis de exoma (Excel) Hoja3	
ANEXO F. Genes identificados para Apnea del Sueño en el análisis de exoma (Excel)	Hoja4

RESUMEN

La obesidad actúa como factor de riesgo para la Apnea del Sueño; estas dos patologías severas, altamente prevalentes, no son diagnosticadas ni tratadas adecuadamente. Así mismo, no existe información acerca de las bases genéticas de la obesidad y Apnea del Sueño en Colombia. Este trabajo tiene como objetivo, identificar posibles SNPs asociados a obesidad y Apnea del Sueño, localizados en la región codificante para proteína del genoma de una cohorte de individuos colombianos. La asociación genética, se determinó realizando secuenciación exómica a una muestra constituida por 334 sujetos, diagnosticados previamente para obesidad, y Apnea del Sueño por medio de polisomnografía. Aunque el análisis de secuenciación exómica identificó variantes en regiones cromosómicas, asociadas significativamente con obesidad y Apnea del Sueño, no se evidenció ningún gen en común. Esta interrelación se determinó prediciendo la función conjunta de los genes asociados con las dos entidades, a través de un algoritmo web, encontrando posibles vías de señalización entre los genes asociados con las dos entidades, relacionadas principalmente con procesos oxidativos. Los resultados obtenidos, abren paso al conocimiento de la posible interacción de los genes asociados a la obesidad y Apnea del Sueño en una cohorte colombiana. Se requiere de más investigaciones para determinar y confirmar el aporte de estos genes al desarrollo de la obesidad y Apnea del Sueño dentro de esta población.

ABSTRACT

Obesity acts as a risk factor for Sleep Apnea; these two severe, highly prevalent pathologies, do not have an adequate diagnosis and treatment. Likewise, there is no information about the genetic basis of obesity and Sleep Apnea in Colombia. This work aims to identify possible SNPs associated with obesity and Sleep Apnea, located in the protein coding region of the genome of a cohort of Colombian individuals. Genetic association was determined by performing exome sequencing in a sample of 334 subjects, previously diagnosed for obesity, and Sleep Apnea through polysomnography. Although exome sequencing analysis identified a handful of variants within chromosomal regions significantly associated with obesity and Sleep Apnea, none of the genes was evidenced in a common way. This relationship was determined by predicting the joint function of the genes associated with the two entities through a web algorithm, finding potential signaling pathways between genes associated with obesity and Sleep Apnea, mainly related to oxidative processes. The obtained results give way to the knowledge of the possible interaction of genes associated with obesity and Sleep Apnea in a Colombian cohort. More research is needed to determine and validate the contribution of these genes to the development of obesity and Sleep Apnea within this population.

1. INTRODUCCIÓN

La obesidad es un problema mundial creciente, causado por la interacción de factores genéticos y medioambientales (Stevens *et al* 2012). Los factores hereditarios, aunque ampliamente estudiados, pero no claramente dilucidados, contribuyen de manera significativa a la presentación de esta patología, demostrando un comportamiento étnico-dependiente (Hinney 2010). El parámetro para determinar la prevalencia de obesidad y sobrepeso es el Índice de Masa Corporal (IMC); los individuos obesos son aquellos con un IMC ≥ 30 kg/m². Es factor de riesgo para el desarrollo de otras enfermedades crónicas como diabetes, enfermedad cardiovascular, apnea del sueño, hipertensión arterial, entre otras.

Así mismo, la Apnea del Sueño (AS), el trastorno más frecuente dentro del grupo de alteraciones del sueño. Está influenciado por diversos factores y asociado con altos porcentajes de co-morbilidad y mortalidad (Khazaie *et al* 2011). Los resultados obtenidos hasta el momento acerca de las bases genéticas, demuestran su susceptibilidad y heterogeneidad (Liu *et al* 2011).

La asociación entre obesidad y Apnea del Sueño es compleja, y su interrelación genética está poco documentada (Bhushan *et al* 2008, Schäfer *et al* 2002, Palmer *et al* 2004). Recientemente, las técnicas de secuenciación genómica y exómica se han convertido en medios atractivos para estudiar la base genética de las enfermedades complejas (aquellas causadas por variantes o mutaciones en más de un gen, que no siguen el modelo mendeliano de “un gen un fenotipo”) (Xiaojing *et al* 2013, Yang *et al* 2013, Need *et al* 2012). Estas metodologías tienen un gran potencial diagnóstico, basado en el poder de predicción de las frecuencias alélicas de las variantes genéticas que afectan un determinado fenotipo (Grody *et al* 2013). Debido a que los factores que afectan las frecuencias alélicas dentro las poblaciones, como la deriva genética, la selección natural y la historia demográfica, pueden alterar dicho potencial predictivo; es necesario realizar una adecuada descripción de la variación genética dentro de una población/etnia, para poder garantizar su utilidad diagnóstica. La secuenciación del exoma, por ejemplo, es útil para identificar de forma completa, las

variantes dentro de las regiones del genoma que codifican para proteína; incluyendo la cobertura de regiones intrónicas y promotoras.

Teniendo en cuenta la complejidad y el gran impacto epidemiológico que generan la obesidad y la Apnea del Sueño a nivel mundial, el presente estudio tiene como objetivo, identificar posibles SNPs asociados a estas dos entidades en una cohorte de individuos colombianos, a través de secuenciación exómica.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Obesidad

2.1.1 Definición y Epidemiología

La obesidad es una patología caracterizada por un exceso de grasa en el cuerpo. Se diagnostica a través del Índice de Masa Corporal (IMC), el cual se calcula, dividiendo el peso de una persona entre el cuadrado su talla (Sweeting 2007). Con un $IMC \geq 25$ kg/m^2 un individuo es considerado con sobrepeso; mientras que, los casos de obesidad se presentan con un $IMC \geq 30$ kg/m^2 (World Health Organization). En los últimos años se ha observado un aumento considerable en el número de casos de sobrepeso y obesidad en todo el mundo (World Health Organization); la proporción de adultos con obesidad aumentó entre 1980-2013 de 28.8% a 36.9% en los hombres, y de 29.8% a 38.0% en mujeres (Ng *et al* 2014). Su prevalencia ha aumentado también en niños y adolescentes de países en desarrollo, del 8.1% al 12.9% en niños y del 8.4% al 13.4% en niñas (Ng *et al* 2014). Para el año 2010 en Colombia, la proporción de casos de sobrepeso y obesidad en niños y jóvenes de 5 a 17 años fue de 13.4% y 4.1%, respectivamente. La población de 18 a 61 años se encontró en un 34.6% para sobrepeso y en 16.5% para obesidad; siendo la obesidad más prevalente en mujeres que en hombres (20.1% frente a 11.5%, respectivamente) (Encuesta Nacional de la Situación Nutricional en Colombia 2010 – ENSIN).

2.1.2 Etiología

La obesidad se desarrolla por un desequilibrio entre la ingesta y quema de calorías, condiciones que son únicas para cada individuo. Los factores ambientales y genéticos contribuyen a esta diferencia. El estilo de vida es una variable ambiental clave que afecta la obesidad; por ejemplo, comer en exceso, la ingesta continua de alimentos ricos en grasa, y una reducción en la actividad física se asocian

positivamente con ella. Los factores genéticos, por otra parte, aunque importantes, no son de identificación sencilla y muestran efectos altamente específicos a una población (Tan *et al* 2014). La importancia de esto reside en el hecho de que los factores hereditarios en conjunto representan el 40-70% de la variación en fenotipos relacionados con obesidad (Herrera *et al* 2011).

2.1.3 Estudios genéticos relacionados con obesidad

Como se mencionó anteriormente, la investigación referente a las bases genéticas de la obesidad (usando por ejemplo: Estudios de Asociación de Genoma Completo-GWAS; por sus siglas en inglés, y secuenciación exómica) (Below *et al* 2014, Angeli *et al* 2011), demuestra el importante papel que ejerce este factor para determinar cuáles individuos dentro de una etnia, son más susceptibles a desarrollarla en respuesta a un entorno particular. Al hacer una revisión de la literatura (meta-análisis y revisiones) (Anexo C) acerca de estudios genéticos de asociación, realizados en diferentes poblaciones, se puede evidenciar que hasta el momento se han identificado un amplio número de variantes (Polimorfismos de Único Nucleótido – SNPs; por sus siglas en inglés) relacionadas con obesidad, IMC o perímetro abdominal, dentro de genes que codifican para proteína, como: Fat Mass and Obesity Associated (FTO), Mitochondrial Carrier 2 (MTCH2), Neuronal Growth Regulator 1 (NEGR1), Melanocortin 4 Receptor (MC4R), Glucosamine-6-Phosphate Deaminase 2 (GNPDA2), SEC16 homolog B (*S. cerevisiae*) (SEC16B), Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF), Phosphotriesterase Related (PTER), Transmembrane Protein 18 (TMEM18) y Leptin Receptor (LEPR) (Robiou-du-Pont *et al* 2013, Kulyté *et al* 2011, Cauchi *et al* 2009); resaltando el comportamiento de la susceptibilidad genética dentro de las distintas etnias. Por ejemplo, FTO (16q12.2), que fue el primer gen identificado a través de GWAS (Frayling *et al* 2007, Scuteri *et al* 2007), muestra una asociación significativa con obesidad e IMC en Mexicanos, Europeos, Chinos e Hispano/Afro-Americanos (Zhao *et al* 2014, Mejía-Benítez *et al* 2013, Huang *et al* 2011).

Se referencian algunos estudios adicionales, no incluidos en la sabana de búsqueda de literatura de meta-análisis y revisiones.

2.2 Apnea del Sueño

2.2.1 Definición y Epidemiología

Un rasgo particular asociado con la obesidad es la Apnea del Sueño (AS). Este trastorno se caracteriza por episodios repetitivos de cese parcial o total del flujo de aire durante el sueño. Es diagnosticado comúnmente con la ayuda de una polisomnografía. Esta consiste en la grabación de los cambios fisiológicos que se producen durante el sueño (Olejniczak *et al* 2003), y determina el número de Apneas e Hipoapneas por hora de la persona (IAH: Índice de Apnea-Hipoapnea). De acuerdo con el índice se clasifica como Leve (IAH >5-15), Moderada (IAH >15 - 30) y Severa (IAH > 30) (Sleep-related breathing disorders in adults 1999). Es reconocida como un problema mundial, que ocurre con mayor frecuencia en hombres de mediana edad, principalmente de las poblaciones americanas e hispanas. La prevalencia de AS en niños oscila entre el 1 y 3%, en mujeres de mediana edad entre 2 a 4% y en hombres de mediana edad entre 4 a 9% (American Academy of Sleep Medicine). Las comorbilidades de esta entidad incluyen: hipertensión arterial, resistencia a la insulina y enfermedad cardiovascular (Monahan *et al* 2011, Bengtsson *et al* 2010, Medical Advisory Secretariat 2006). Así mismo, está asociada clínicamente con trastornos cognitivos, deterioro en la calidad de vida, y accidentes de tránsito, producto de la somnolencia (Roth *et al* 2010). En niños afecta el aprendizaje y la conducta (Naseem *et al* 2011).

2.2.2 Tipos

Dependiendo del mecanismo que lo ocasione, puede ser de tipo Obstructivo o Central (Ludka *et al* 2011).

2.2.2.1 Apnea Obstructiva del Sueño (AOS)

Se produce cuando los tejidos blandos alrededor de la vía aérea superior colapsan, obstruyendo parcial o completamente el flujo de aire. Esto provoca descensos en la saturación de oxígeno y despertares transitorios, que dan lugar a un sueño no reparador. Se caracteriza por la presencia de ronquidos y somnolencia diurna.

2.2.2.2 Apnea Central del Sueño (ACS)

Sucede por una alteración en el área del Sistema Nervioso Central encargada de controlar la respiración. Es menos frecuente y se caracteriza por ausencia de señal respiratoria y de esfuerzo respiratorio durante períodos cortos.

2.2.2.3 Apnea Mixta del Sueño (AMS)

Esta forma de apnea habitualmente comienza como Central y termina con un componente Obstructivo.

2.2.3 Factores de Riesgo - Estudios genéticos relacionados con Apnea del Sueño

Al igual que la obesidad, es una patología compleja determinada por factores genéticos, ambientales y del crecimiento-desarrollo (Casale *et al* 2009). El componente genético es significativo, atribuyéndosele el 35-40% de la variación dentro del fenotipo (Redline *et al* 2000). Aunque sus bases genéticas no han sido claramente dilucidadas (Palmer *et al* 2003, Redline *et al* 2000), los acercamientos en esta área, demuestran la presencia de diferencias étnicas en el modo de herencia (Buxbaum *et al* 2002). El conocimiento de los genes involucrados en diferentes razas, contribuye al entendimiento de los mecanismos mediante los cuales el fenotipo incrementa la susceptibilidad genética para AS. Resultados del estudio familiar de Cleveland (estudio epidemiológico-genético más grande de la Apnea del Sueño a nivel mundial, Redline *et al* 1995), sugieren que los Afroamericanos tienen mayor riesgo de AOS que los Caucásicos, debido a un exceso en los tejidos blandos de las vías aéreas superiores, que reduce el paso de aire. A diferencia de los

Asiáticos, donde al parecer la aparición de AOS está fuertemente influenciada por las características craneofaciales (Cakirer *et al* 2001).

Así mismo, los resultados de la literatura revisada (Anexo D) obtenidos a partir de GWAS, estudio de genes candidatos, entre otros; demuestran la agregación familiar (existe cuando los familiares de un individuo afectado corren un mayor riesgo de padecer la enfermedad que los familiares de un individuo no afectado) y predisposición genética de la Apnea del Sueño (Huang *et al* 2014). El primer estudio de genes candidatos de AOS (52 seleccionados), realizado en familias Europeo-Americanas y Afro-Americanas, identificó asociaciones significativas entre AOS y fenotipos intermedios como, obesidad, inflamación y control ventilatorio (Larkin *et al* 2010).

3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

La ingesta excesiva de calorías, acompañada de una vida sedentaria, en conjunto con las variaciones genéticas de cada persona, son factores que promueven el crecimiento de tejido adiposo y la obesidad. Durante los últimos años se ha observado un aumento considerable en la prevalencia de la obesidad en adultos y niños, convirtiéndose en uno de los principales problemas de salud pública en el mundo (Morabia *et al* 2006). Así mismo, algunas de las alteraciones metabólicas ocasionadas por esta entidad, dentro de las que cabe mencionar: dislipidemia, estrés oxidativo, resistencia a la insulina y disfunción endotelial, se convierten en factores de riesgo para el desarrollo de patologías como: diabetes, apnea del sueño y enfermedad cardiovascular (Bašić *et al* 2012).

La Apnea del Sueño es una entidad frecuente, relacionada con la obesidad, que presenta una etiología multifactorial, en donde varios genes, al parecer, interactúan con factores medioambientales. Está asociada igualmente con trastornos cardiovasculares, metabólicos, gastrointestinales y neuropsicológicos severos, que repercuten en altos costos socioeconómicos para la población (Drager *et al* 2013); existe una fuerte evidencia en la literatura, del alto porcentaje de pacientes que no son diagnosticados (Rajagopalan 2011), esto ocasiona un incremento en la morbimortalidad de las enfermedades anteriormente mencionadas, e impide las acciones de atención primaria. Por esta razón, la investigación actual está dirigida a lograr un adecuado diagnóstico y manejo terapéutico de las personas que la padecen (Böhning *et al* 2011).

Debido al gran porcentaje de subdiagnóstico de AS en Colombia, y la falta de conocimiento de la obesidad como factor de riesgo, se diseñó un proyecto de investigación para identificar posibles marcadores genéticos asociados con obesidad y AS (Polimorfismos de Único Nucleótido – SNPs), localizados en la fracción exómica del genoma de una cohorte de individuos colombianos.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL:

Identificar posibles SNPs asociados a obesidad y Apnea del Sueño, en una cohorte de individuos colombianos, a través de secuenciación exómica.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Predecir la relación entre los genes asociados a los fenotipos obesidad/AS por medio de una red de co-expresión.
- Predecir la relación entre los genes asociados a los fenotipos obesidad/AS por medio de una red de interacción.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Diseño de la Investigación

Este es un estudio analítico de corte transversal, realizado en conjunto con el Centro de Investigaciones Odontológicas (CIO) de la Pontificia Universidad Javeriana y el Hospital Universitario San Ignacio (HUSI).

5.2 Población de estudio

Un subgrupo de 340 individuos de origen Colombiano se incluyó en este estudio. Estos sujetos constituyen la cohorte de estudio del programa de investigación en curso: "Prevalencia y pruebas diagnósticas de Trastornos de Sueño, y su relación con riesgo Cardiovascular en Colombia, a diferentes altitudes", financiado por COLCIENCIAS. Todos los participantes fueron diagnosticados para AS con una polisomnografía nocturna practicada en la Clínica del Sueño del Hospital Universitario San Ignacio (HUSI). La información acerca de historial médico, uso de medicamentos y hábitos de sueño, se obtuvo a través de cuestionarios individuales. El peso se determinó con una balanza digital y la altura con un metro portátil; el IMC fue calculado como se indicó en el Marco Teórico. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Universitario San Ignacio y de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Javeriana. Se obtuvo el consentimiento de todos los individuos.

5.3 Fenotipos Clínicos

Los pacientes fueron clasificados de acuerdo a un IMC ≥ 30 kg/m² como obesos, y a un IAH > 5 eventos/h en la polisomnografía como AS positivo, en cuatro subgrupos: obeso AS; obeso no-AS; no-obeso AS; no-obeso no-AS.

5.4 Muestras de ADN

Las fuentes de ADN fueron: sangre y saliva. Las muestras de sangre se tomaron a 208 individuos utilizando tubos EDTA Vacutainer™ (BD, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.). Para los 132 pacientes restantes, se obtuvieron muestras de saliva utilizando los tubos de recolección Oragene• DISCOVER (OGR-500) (ADN-Genotek Inc., Ottawa, ON, Canadá). Todas las muestras de sangre y saliva se tomaron una vez que los sujetos dieran su consentimiento informado.

Se extrajo el ADN a partir de sangre usando el kit de aislamiento, UltraClean® Blood DNA Isolation Kit (Non-Spin) (MO BIO Laboratories, Inc., CA, EE.UU.); con un mínimo de modificaciones en el protocolo del fabricante (Anexo A). La recuperación a partir de muestras de saliva se realizó con el kit de purificación, prepIT•L2P Purification Kit (ADN-Genotek Inc., Ottawa, ON, Canadá); siguiendo las notas del protocolo del fabricante para asegurar un material genético de alta calidad. La concentración y calidad de cada muestra de ADN se midió con NanoDrop® (ND-1000 Spectrophotometer), se prepararon alícuotas a una concentración final de 50 ng/µl. para su posterior envío a los servicios de secuenciación (descripción de los requisitos de las muestras de DNA en Anexo B).

5.5 Secuenciación del exoma

La secuenciación exómica de cada muestra de ADN se llevó a cabo en el Departamento de Genómica del Hospital Infantil de Cincinnati (Center for Autoimmune Genetics and Etiology (CAGE) - Cincinnati Children's Hospital Medical Center). Los datos se generaron a través de la plataforma Illumina (Illumina HiSeq 2000 platform generating paired-end, 100-base long reads), que provee una secuenciación masiva y mayor rendimiento en la producción de datos. Previo al paso de secuenciación, se construyó una librería BAC utilizando el kit de captura exómica Nextera (Nextera Rapid Capture Exome kit - Illumina). Una vez completada la etapa de secuenciación para cada exoma enriquecido, los archivos idat correspondientes se guardaron para su posterior análisis bio-informático.

5.6 Identificación de SNPs y Análisis de datos

Todas las lecturas exómicas generadas por cada individuo fueron alineadas con la secuencia referencia del genoma humano (versión 37.68); disponible en el navegador Santa Cruz de la Universidad de California. Estas alineaciones se realizaron utilizando BWA (Li *et al* 2010). Posteriormente, se utilizó el programa SAMtools (Li *et al* 2009) para crear los archivos de secuencia de cada individuo, necesarios para la identificación de las variantes. Las variantes (SNPs) de la cohorte completa fueron identificadas con Genome Analysis Tool Kit (McKenna *et al* 2010, DePristo *et al* 2011).

El paso de “SNP call” (es decir, identificar en cada sujeto, las posiciones de los nucleótidos con dos alelos diferentes) se realizó con CASSI (Cincinnati Analytical Suite for Sequencing Informatics). Este análisis se llevó a cabo en un clúster computacional basado en Linux CCHMC700. Para cada “SNP call” se calculó la frecuencia de sus dos alelos segregantes. Siguiendo una evaluación de control de calidad, se removieron SNPs debido a: (i) baja tasa de identificación, (ii) alelo de menor frecuencia (MAF), y (iii) violación del equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE). Por último, se ejecutó otro punto de control por medio de un Análisis de Componentes Principales (ACP), con el fin de identificar los sujetos con ascendencia genética más disímil y excluirlos del estudio, evitando así, asociaciones equivocadas entre las variantes y etnias diferentes (Price *et al* 2010).

Después de excluir los SNPs que no pasaron los controles de calidad anteriormente mencionados, así como los sujetos genéticamente disímiles, la asociación entre cada genotipo/SNP y el rasgo de interés se determinó con un modelo de Regresión Logística. Para cada prueba de asociación se obtuvo el valor de P y Odds Ratio (OR) con el programa PLINK (Purcell *et al* 2007).

El resumen de la metodología usada en este estudio se provee en la Figura 1 y de los pasos de la secuenciación exómica en la Figura 2.

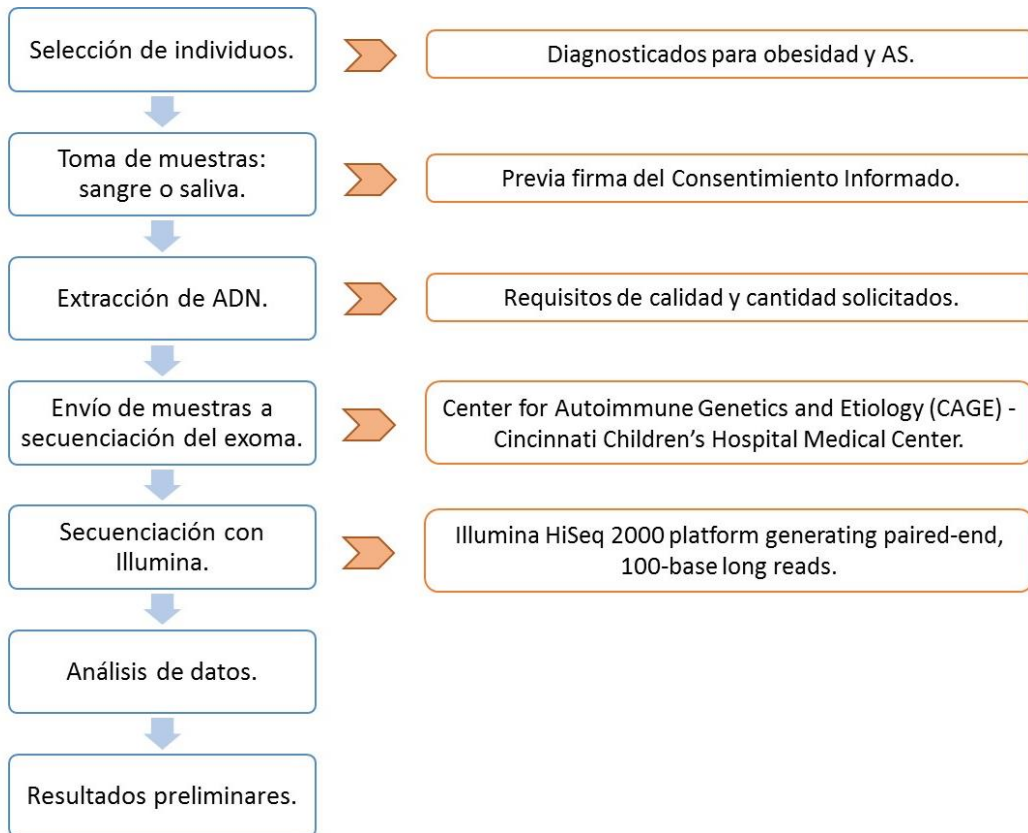


Figura 1. Diagrama de flujo que resume la metodología utilizada en este estudio.

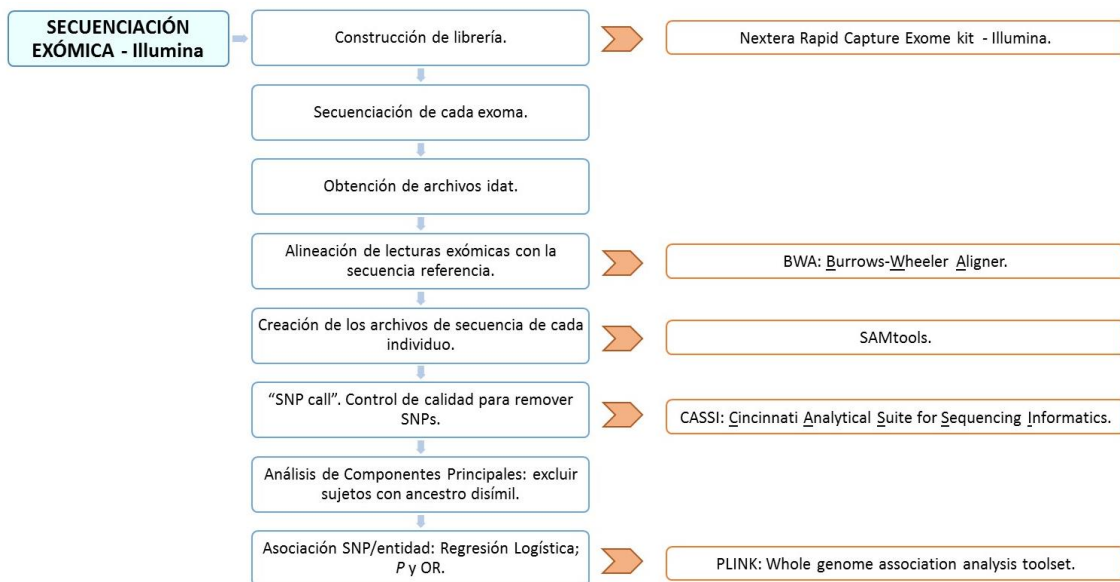


Figura 2. Diagrama de flujo que describe los pasos de la secuenciación exómica.

6. RESULTADOS

6.1 Población de estudio

La secuenciación exómic se llevó a cabo en 334 (correspondiente al 98% de los sujetos) de las 340 muestras enviadas inicialmente; las cuales cumplieron con los requisitos de calidad de ADN.

6.2 Fenotipos Clínicos

De acuerdo con la clasificación fenotípica, la distribución de la población disponible dentro de los subgrupos demostró un mayor número de hombres no obesos que presentaban AS (35.3% del total). Así mismo, el porcentaje de sujetos obesos AS positivos, fue mayor comparado, con los obesos no-AS, para ambos géneros. El resumen de las frecuencias en los subgrupos fenotípicos se proporciona en la Figura 3.

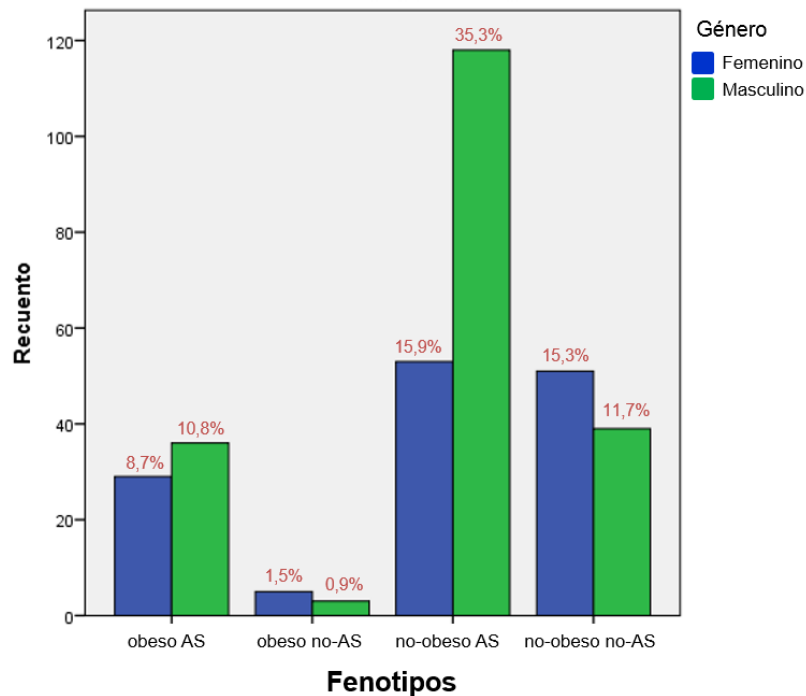


Figura 3. Distribución de frecuencia de los fenotipos obesidad/Apnea del Sueño.

6.3 Secuenciación exómica, identificación de SNPs y Análisis de datos

Se obtuvo un promedio de 94.5 millones de lecturas (rango 80-115 millones) por individuo, con una profundidad de 106 veces en las regiones objetivo. Aproximadamente, el 98% de estas lecturas fueron alineadas con la secuencia referencia.

Inicialmente fueron identificados 542.585 SNPs. 29 SNPs fueron removidos por una baja tasa de identificación ($> 0,95$), 294.604 fueron considerados como raros con muy baja frecuencia ($MAF > 0.01$), y 527 SNPs adicionales, no cumplían el supuesto de HWE ($P > 0,00001$); para un total de 247.425 SNPs útiles. Adicionalmente, el ACP resultó en la exclusión de 55 sujetos.

El análisis genético identificó 17 SNPs notablemente asociados con la obesidad ($p < 4.83E^{-06}$); distribuidos en 10 cromosomas diferentes. Las variantes, rs1350016 y rs4381763, ambas ubicadas en el cromosoma 2, estuvieron cerca de alcanzar el umbral de significancia exómica (Figura 4). Así mismo, se identificaron 8 genes asociados significativamente con riesgo de obesidad (Tabla 1).

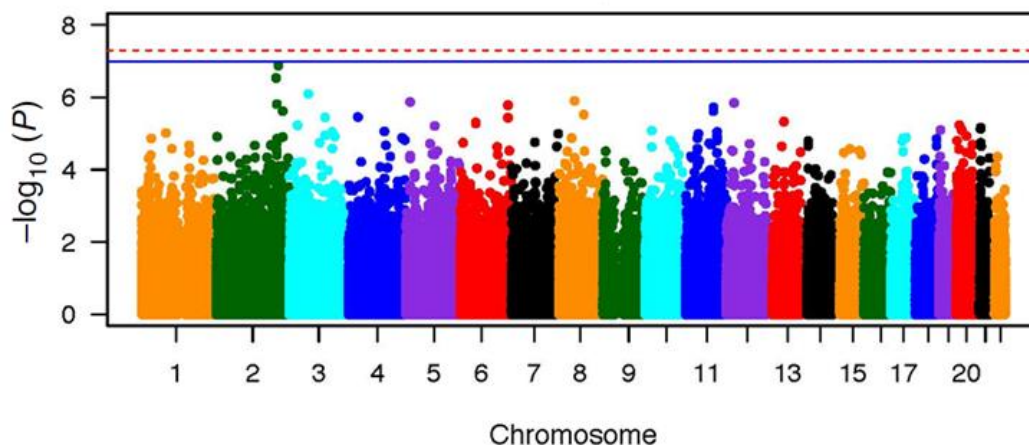


Figura 4. Gráfico de los SNPs exómicos asociados con Obesidad. Cada punto representa un SNP, con su ubicación genómica en el cromosoma correspondiente (eje X; cada barra de color representa un cromosoma) y el nivel de asociación (eje Y). Se indican: umbral de significancia de exoma-completo (línea roja discontinua; $P \leq 5 \times 10^{-8}$), y significancia sugerente (línea azul sólida; $P \leq 5 \times 10^{-7}$).

Tabla 1. SNPs asociados significativamente con Obesidad. CHR: cromosoma; bp: pares de bases - región genómica; MAF: alelo de menor frecuencia; P < 0.05; Context: contexto genómico.

CHR	SNP	bp	Minor Allele	MAF cases	MAF controls	Major Allele	P-value	Odds Ratio	Gene	Context
2	rs1350016	199402357	A	0.09877	0.01394	G	2.85E-07	7.75		
3	rs2292662	63897215	A	0.2125	0.07371	G	7.78E-07	3.391	ATXN7	intronic
8	rs4873152	51558988	A	0.2531	0.1016	G	1.22E-06	2.996	SNTG1	intronic
5	rs6554850	14251518	A	0.4074	0.2151	G	1.31E-06	2.508	TRIO	intronic
12	rs2130405	25589842	G	0.08125	0.00996	A	1.38E-06	8.79		
2	rs4381763	201776988	C	0.2875	0.1255	A	1.50E-06	2.812	ORC2	intronic
6	rs16890289	159846743	A	0.06173	0.003984	C	1.61E-06	16.45		
11	rs16917401	92076873	A	0.0679	0.005976	G	1.84E-06	12.12		
2	rs4674529	221241860	G	0.4679	0.2669	A	2.33E-06	2.415		
11	exm2259907	91873636	G	0.1173	0.0259	A	2.33E-06	4.998		
23	rs1009386	151521190	C	0.2193	0.06571	A	2.92E-06	3.994		
8	rs9298367	82441040	A	0.2469	0.1016	C	2.92E-06	2.899	FABP12	non-coding intronic
4	rs1353854	31158565	G	0.1437	0.03984	A	3.41E-06	4.046		
3	kgp8600449	119500664	A	0.09259	0.01594	G	3.50E-06	6.301	NR112	5utr
6	rs926657	159463452	A	0.1235	0.02988	G	3.58E-06	4.573	TAGAP	intronic
13	rs6561935	58039801	G	0.08642	0.01394	A	4.58E-06	6.689		
6	exm555531	52343899	G	0.1049	0.02191	A	4.83E-06	5.233	EFHC1	coding-nonsynonymous

Un total de 17 SNPs reveló alta asociación ($P < 4.70E^{-05}$) con AS. Sin embargo ninguno se encontró por encima del umbral establecido de significancia (Figura 5, Tabla 2). Estos SNPs se localizaron en 10 cromosomas diferentes, con una tendencia de enriquecimiento en el cromosoma 17. Los 5 SNPs asociados al cromosoma 17 se encuentran dentro de la misma región genómica (BP, Tabla 2) aún en diferentes genes. Igualmente, se identificaron 12 genes asociados significativamente con riesgo de AS (Tabla 2).

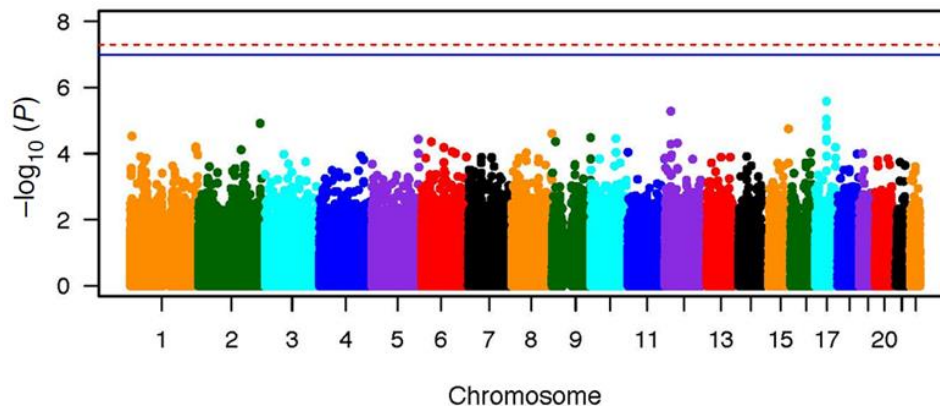


Figura 5. Gráfico de los SNPs exómicos asociados con Apnea del Sueño. Cada punto representa un SNP, con su ubicación genómica en el cromosoma correspondiente (eje X; cada barra de color representa un cromosoma) y el nivel de asociación (eje Y). Se indican: umbral de significancia de exoma-completo (línea roja discontinua; $P \leq 5 \times 10^{-8}$), y significancia sugerente (línea azul sólida; $P \leq 5 \times 10^{-7}$).

Tabla 2. SNPs asociados significativamente con Apnea del Sueño. CHR: cromosoma; bp: pares de bases - región genómica; MAF: alelo de menor frecuencia; P < 0.05; Context: contexto genómico.

CHR	SNP	bp	Minor Allele	MAF cases	MAF controls	Major Allele	P-value	Odds Ratio	Gene	Context
17	exm2253003	39983849	G	0.1045	0.2432	C	2.54E-06	0.3632	NT5C3B	coding-synonymous
12	exm989046	21391976	C	0.02489	0.1091	A	5.10E-06	0.2084	SLCO1B1	coding-nonsynonymous
17	rs9303319	40022809	A	0.1029	0.2358	G	8.75E-06	0.3715	KLHL11	5upstream
2	rs6754561	224839696	G	0.4796	0.3018	A	1.19E-05	2.132	SERPINE2	3downstream
17	rs3816122	40058212	G	0.1005	0.2252	A	1.47E-05	0.3842	ACLY	intronic
15	rs6497103	94225523	A	0.5045	0.3288	C	1.73E-05	2.078		
8	rs1735176	146074281	A	0.175	0.3198	G	2.42E-05	0.4511	ZNF7	3downstream
1	exm9852	6635306	A	0.03409	0.1171	G	2.86E-05	0.2661	TAS1R1	coding-nonsynonymous
9	rs10732688	140581700	C	0.4658	0.2973	A	3.20E-05	2.061	EHMT1	intronic
10	rs1329173	91949422	A	0.3103	0.4808	G	3.41E-05	0.486		
5	rs10045458	169486815	A	0.1086	0.2297	G	3.56E-05	0.4085	DOCK2	intronic
17	exm1323023	39983808	C	0.1	0.2182	G	3.59E-05	0.3981	NT5C3B	coding-nonsynonymous
17	exm1323024	39983820	G	0.09955	0.2162	A	4.04E-05	0.4008	NT5C3B	coding-nonsynonymous
9	rs7846724	12818692	A	0.1591	0.2955	G	4.24E-05	0.4511	LURAP1L	intronic
6	exm542229	36275458	A	0.2353	0.3874	G	4.30E-05	0.4866	PNPLA1	coding-nonsynonymous
6	rs4713956	36275458	A	0.2353	0.3874	G	4.30E-05	0.4866		
12	rs17095872	45811112	A	0.06335	0.1622	C	4.70E-05	0.3494	ANO6	intronic

6.4 Posibles redes genéticas subyacen la obesidad y AS

Aunque el listado de genes que demostró las más altas asociaciones con obesidad y AS no reveló ningún elemento en común, la relación genética entre estos dos fenotipos podría darse en sus interacciones (genes que actúan dentro de la misma vía metabólica o el mismo proceso biológico). Esta posibilidad se investigó sometiendo la lista de los 20 genes asociados, a una base de datos especializada en interacciones genéticas reportadas. Después de haber realizado la consulta en GeneMANIA (<http://www.genemania.org>) (Mostafavi *et al* 2008), se obtuvo una red densa de genes con dos criterios principales: co-expresión e interacción.

GeneMANIA (Gene Multiple Association Network Integration Algorithm) es una aplicación web flexible y de fácil manejo, desarrollada en la Universidad de Toronto (Donnelly Centre for Cellular and Biomolecular Research, University of Toronto), que predice la función de los genes en tiempo real (Warde-Farley *et al* 2010). Introduciendo una lista de consulta, GeneMANIA la amplía identificando genes funcionalmente asociados, usando bases de datos genómicas y proteómicas, disponibles y validadas (GEO, BioGRID, EMBL-EBI, Pfam, MGI Pathway Commons,

NCBI, I2D, InParanoid7). Algunos de los datos de asociación incluyen: interacciones genéticas, vías de señalización, redes de co-expresión y co-localización, y similitud de dominios proteicos. Así mismo, este algoritmo reporta el peso, que indica el valor predictivo de cada conjunto de datos obtenidos a partir de la consulta. Dentro de los organismos disponibles para analizar, se encuentran: *Arabidopsis thaliana*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Escherichia coli*, *Homo sapiens*, *Mus musculus* y *Saccharomyces cerevisiae* (Molina-Navarro et al 2014, Vlasblom et al 2014).

De acuerdo con la predicción para este estudio, 17 de los 20 genes se encontraron dentro de la red de co-expresión (Figura 6), y 12 de ellos en la red de interacción (Figura 7). Curiosamente, los genes FABP12, ANO6 y PNPLA1 permanecieron fuera de las dos redes. En ambas redes, independientemente, se evidenció un número considerable de conexiones entre los genes asociados con los fenotipos obesidad/AS, al igual que con los nuevos miembros encontrados por GeneMANIA.

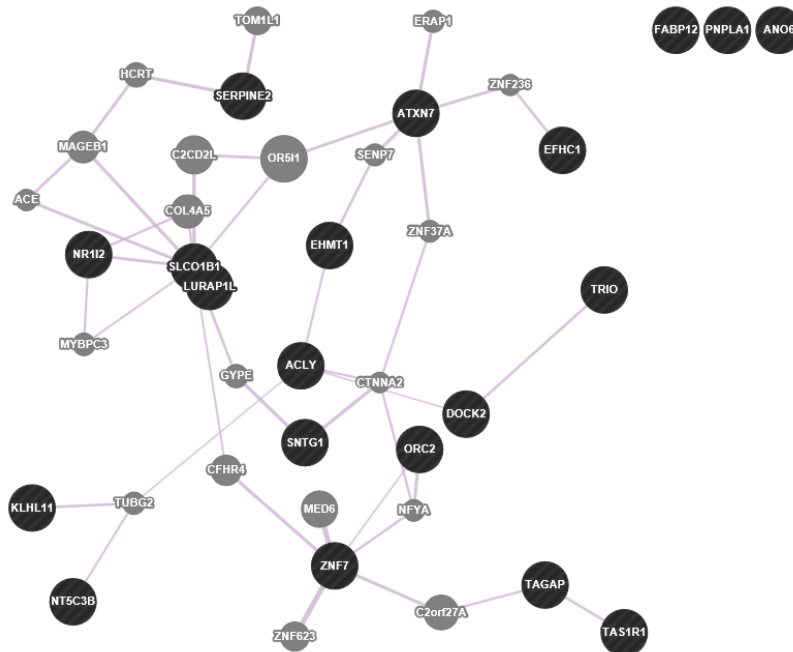


Figura 6. Red de co-expresión (línea violeta) de los genes asociados con los fenotipos obesidad/Apnea del Sueño. Las circunferencias de color gris oscuro indican los 20 genes asociados con los dos fenotipos. Circunferencias de color gris claro corresponden a nuevos genes encontrados por GeneMANIA, relacionados con el conjunto de genes introducidos. La diferencia en el tamaño de las circunferencias y el grosor de las líneas, representa el peso de la co-expresión entre los genes; los pesos se determinan automáticamente. El peso total de esta red es del 94.80 %.

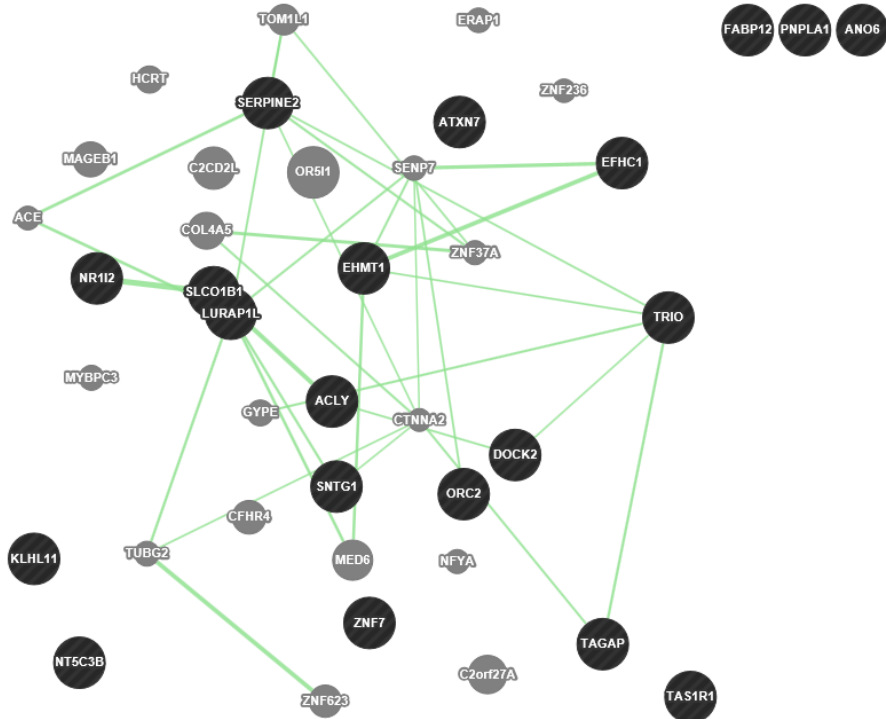


Figura 7. Red de interacción (línea verde) de los genes asociados con los fenotipos obesidad/Apnea del Sueño. Las circunferencias de color gris oscuro indican los 20 genes asociados con los dos fenotipos. Circunferencias de color gris claro corresponden a nuevos genes encontrados por GeneMANIA, relacionados con el conjunto de genes introducidos. La diferencia en el tamaño de las circunferencias y el grosor de las líneas, representa el peso de la interacción entre los genes; los pesos se determinan automáticamente. El peso total de esta red es del 5.20 %.

Al analizar la interrelación genética en las dos redes simultáneamente, la cantidad de elementos en común fue menor y no en todos los casos los genes introducidos se co-expresaban e interactuaban entre sí. Este evento fue visto únicamente en un subgrupo de tres genes (Figura 8); el clúster formado por: Trio Rho guanine nucleotide exchange factor (**TRIO**) (obesidad); Dedicator of Cytokines 2 (**DOCK2**) (AS) y ATP citrato liasa (**ACLY**) (AS).

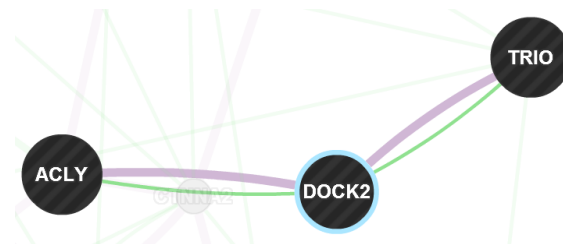


Figura 8. Red de co-expresión (línea violeta) e interacción (línea verde) de los genes TRIO, DOCK y ACLY, encontrada por GENEMANIA. Las líneas violetas son más gruesas, comparadas con las verdes, indicando probablemente que la co-expresión entre los genes es mayor que la interacción.

TRIO (5p15.2). La proteína codificada por este gen, está constituida por un dominio serina/treonina quinasa, y dos factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEF), dominios específicos para Rac y RhoA; este gen participa en distintas vías de señalización que controlan la proliferación celular (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7204>).

El gen DOCK2 localizado en 5q35.1, codifica para una proteína específica de la célula hematopoyética, indispensable para la quimiotaxis de los linfocitos, a través de la activación de Rac (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1794>).

ACLY (17q21.2), el último de los genes involucrados en el clúster, cataliza la formación de acetil-CoA y oxaloacetato; la acetil-CoA desempeña un papel importante en el metabolismo de la glucosa y los lípidos (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/47>).

Finalmente, PNPLA1 (Patatin-like Phospholipase Domain Containing 1) (6p21.31), uno de los genes que permanecieron fuera de las dos redes (Figura 9). Mostró una asociación estadísticamente significativa con AS en el análisis de secuenciación exómica ($P: 4.30E^{-05}$) (Tabla 2). Se ha relacionado su función con el metabolismo de los lípidos (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/285848>).

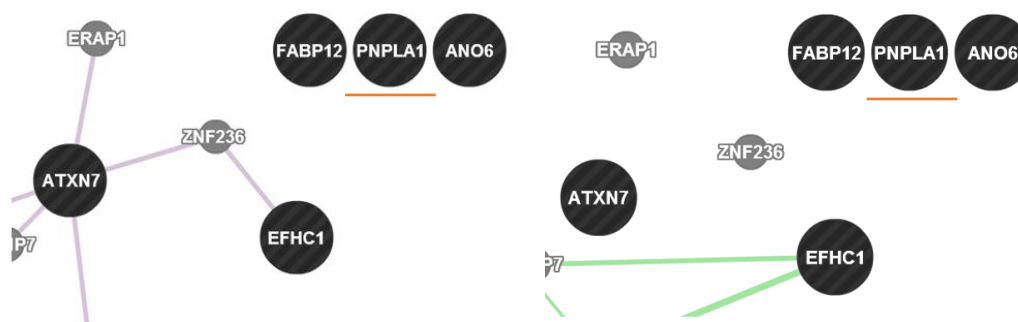


Figura 9. Co-expresión e interacción del gen PNPLA1. El gen PNPLA1 (subrayado con línea naranja) permaneció fuera de las redes de co-expresión (línea violeta) e interacción (línea verde).

7. DISCUSIÓN

El presente trabajo, abordó en un primer nivel, la asociación entre marcadores genéticos (SNPs) y las entidades: obesidad y Apnea del Sueño, en una población colombiana. Este enfoque reveló un número de variantes en genes que no estaban asociadas anteriormente con cualquier fenotipo en otras poblaciones, ofreciendo una nueva visión acerca de las agrupaciones y redes genéticas que pueden estar involucradas con estos dos fenotipos concurrentes en Colombia. Del mismo modo, los 20 genes aquí identificados (8 en obesidad y 12 en AS), están poco descritos y no han sido asociados previamente con estas patologías en Colombia, ni en ninguna otra población (Anexo E, Anexo F).

7.1 Obesidad y Apnea del Sueño en Colombia

La distribución de los dos fenotipos en la cohorte colombiana demostró un número considerable de casos positivos de AS tanto en el subgrupo que presentaba obesidad como en el que no la presentaba. En concordancia con la información existente, la AS fue más frecuente en hombres que en mujeres (Schwab 2005). Este hallazgo apoya el reconocimiento de esta entidad como un grave problema de salud pública. Debido a que los resultados obtenidos en este estudio son producto de un primer intento hacia la búsqueda de las bases genéticas de las dos patologías, no son suficientes para establecer una asociación fenotipo-genotipo definitiva; se necesitan investigaciones adicionales que permitan dilucidar el papel de estos genes, y de esta manera soportar la correlación.

7.2 Grupos de genes subyacen el puente genético entre obesidad y AS

Se encontró una posible interrelación entre estos dos fenotipos a través de la co-expresión y la interacción de tres genes: TRIO asociado con la obesidad, DOCK2 y ACLY con AS. Ninguno de los genes ha sido previamente asociado con obesidad, AS o cualquier otro fenotipo.

TRIO actúa sobre la vía de señalización JNK/p38. Hirosumi *et al* (2002) demostró que JNK es un mediador crucial de la obesidad *in vivo*. Recientemente, los resultados de Han *et al* (2013) revelaron el papel esencial de JNK en macrófagos para el establecimiento de la resistencia a la insulina, inducida por obesidad e inflamación. El estudio de Zhang *et al* (2012) proporcionó la primera evidencia sobre el papel protector de JNK contra la obesidad inducida por la dieta, después de su supresión selectiva en el tejido adiposo. Así mismo, el estrés del retículo endoplasmático y las vías de señalización asociadas, presentan un mecanismo fundamental relacionado con la actividad inducida de JNK por la obesidad, la respuesta inflamatoria y la resistencia a la insulina (Hotamisligil 2008). De igual manera, los estudios referentes a DOCK2, han señalado su papel como regulador positivo de Rac (una familia Rho GTPasa pequeña). La familia Rho de GTPasas pequeñas, incluyendo Rac, ha demostrado estar íntimamente asociada con la organización del citoesqueleto de actina, así como también, con los procesos oxidativos. Estos procesos de estrés oxidativo están mediados en gran parte por la activación de las vías JNK a través de la acción de Rac. Singh *et al* (2009) demostró que el estrés oxidativo es un mecanismo subyacente del trastorno del sueño en pacientes con AOS. Suzuki *et al* (2006) proporcionó evidencia que relaciona la ocurrencia de estrés oxidativo con AOS, y el papel de las especies reactivas de oxígeno en los cambios cardiovasculares asociados con la AOS. De acuerdo con la evidencia previamente mencionada, se construye la hipótesis, acerca de la interacción entre los potenciales genes candidatos reportados en este estudio (TRIO-DOCK), como posible vínculo entre obesidad y AS.

Relacionado con lo descrito anteriormente, la correlación entre los genes TRIO-DOCK, se podría explicar teniendo en cuenta lo siguiente. Las pequeñas GTPasas de la familia Rho (Ras homólogo) controlan diversos procesos celulares, incluyendo: remodelación del citoesqueleto de actina, dinámica de los microtúbulos, transcripción de genes, crecimiento y proliferación celular, y metabolismo de fosfolípidos. Funcionan como interruptores moleculares ciclando entre el estado inactivo (cargadas con GDP) y el activo (cargadas con GTP); ciclo regulado por tres tipos de proteínas: (i) Factores Intercambiadores de Nucleótidos de Guanina (Rho Guanine nucleotide Exchange Factors - GEF), (ii) GTPasa de Activación de Proteínas (GTPase Activating Proteins - GAP) y (iii) Inhibidores de la Disociación de Guanina (Guanine Dissociation Inhibitors - GDI) (Schmidt *et al* 2014). **TRIO** pertenece a la familia de las RhoGEFs, que se dividen en dos: (i) la familia de proteínas Dbl y (ii) la familia de proteínas **DOCK** (DHR-2/CZH), recientemente identificada (Côté *et al* 2002). Se necesita investigación adicional para dilucidar la forma exacta de su contribución a estas entidades.

Por otra parte, la relación entre ACLY y obesidad puede demostrarse por el hecho de que este gen cataliza la generación de acetil-CoA; un componente esencial de la biosíntesis endógena de ácidos grasos y colesterol. Pearce *et al* (1998) demostró que el colesterol en plasma y los niveles de triglicéridos se redujeron en presencia de inhibidores de ACLY. Los resultados del estudio de MacDonald *et al* (2013) suministró nueva evidencia sobre la importancia de ACLY en la síntesis de lípidos, simultánea a la secreción de insulina.

Esta evidencia preliminar, señala la posible correlación entre los genes TRIO-DOCK2; por el contrario, no existe alguna que sustente la correlación de los genes TRIO-ACLY (Figura 10). Se necesitan futuros trabajos que permitan establecer la actividad del clúster aquí encontrado (TRIO, DOCK2, ACLY).

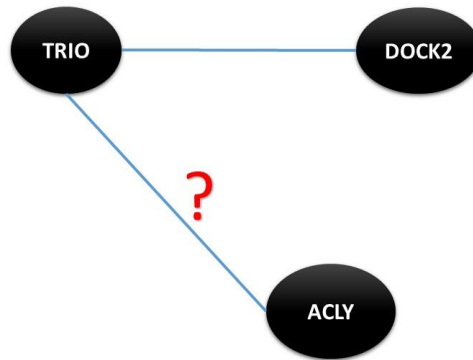


Figura 10. Posible correlación entre los genes TRIO, DOCK y ACLY. De acuerdo con la evidencia revisada se construye esta gráfica, para suponer que la interrelación entre los genes TRIO-DOCK2 está dada posiblemente porque pertenecen a un mismo grupo funcional; pero no existe alguna que sustente la los genes TRIO-ACLY.

Se han asociado polimorfismos en los genes de la familia Patatin-like Phospholipase (PNPLA) con el aumento en la secreción de insulina y obesidad. Goran *et al* (2010) reportó el efecto de una variante en PNPLA3 en la grasa del hígado de niños y adolescentes hispanos, y Johansson *et al* (2008) confirmó la asociación entre PNPLA3 y la obesidad en una población sueca. El presente estudio reveló una variante en PNPLA1 asociada significativamente con la AS. Sin embargo, como PNPLA1 permaneció fuera de las redes genéticas predichas por GeneMANIA; es necesario confirmar cómo este gen provoca su efecto sobre la obesidad.

Adicionalmente, al incluir en el algoritmo de los 20 genes, algunos de los ya reportados en obesidad, mencionados anteriormente (FTO, MTCH2, NEGR1, MC4R, GNPDA2, SEC16B, BDNF, PTER, TMEM18 y LEPR); se encontró la relación de dos de estos, con uno de los miembros del clúster (DOCK2). FTO en co-expresión y SEC16B en interacción (Figura 11). FTO descubierta como la primera N6-metiladenosina (m⁶A) RNA desmetilasa, que cataliza la demetilación de m⁶A en α -cetoglutarato y Fe²⁺ de manera dependiente. Este gen está asociado significativamente con la obesidad (Wang *et al* 2011). Igualmente, ha demostrado susceptibilidad para otros desordenes metabólicos y cáncer (Samaras *et al* 2010, Iles *et al* 2013, Kaklamani *et al* 2011). Por otro lado, el gen SEC16B (SEC16 homolog B (*S. cerevisiae*)) (1q25.2) participa en la organización de zonas de transición del retículo endoplasmático, y exportación de proteínas (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/89866>). Por medio de GWAS, se le han identificado

algunos SNPs que confieren susceptibilidad a la obesidad en Caucásicos y Japoneses (Hotta K *et al* 2009). De acuerdo con esto, y teniendo en cuenta que los mecanismos de asociación entre obesidad (FTO-SEC16B) y AS (DOCK2) no son claros, se podría sospechar que el efecto entre estos genes, estaría dado por procesos metabólicos relacionados con el retículo endoplasmático, al igual, con los epigenéticos. Del mismo modo, se requieren más estudios que permitan esclarecer su contribución a las dos patologías.

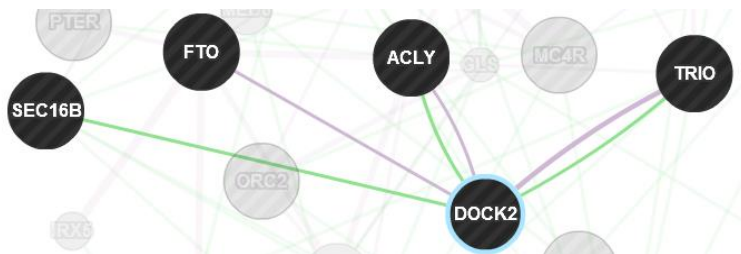


Figura 11. Red de co-expresión e interacción de los genes FTO y SEC16B y el clúster TRIO, DOCK2 y ACLY; hallada por GENEMANÍA. FTO se encontró en co-expresión (línea violeta) con DOCK2 y SEC16B en interacción (línea verde) con el mismo gen.

Emplear una aproximación algorítmica a partir de un listado de genes candidatos, de alguna manera informativos, permite en cierta medida resolver el conocido acertijo genotipo-fenotipo; sin embargo, es un acercamiento, y más preguntas surgen sobre la interpretación de estas relaciones.

8. CONCLUSIONES

- Este estudio proporciona un nuevo catálogo de SNPs altamente informativos, asociados con la obesidad y la Apnea del Sueño en una población Colombiana. Así mismo, propone un conjunto de genes y procesos metabólicos potencialmente relevantes para comprender la progresión de los dos fenotipos en esta población.
- Esta investigación respalda la secuenciación del exoma, como una opción práctica para el diagnóstico de enfermedades genéticas complejas, como la obesidad y Apnea del Sueño.

9. PERSPECTIVAS

- La utilidad de estos resultados va más allá de su objetivo clínico inmediato, pudiendo ser postulados como herramienta para entender cómo la variación genética que surge dentro de las poblaciones, contribuye al desarrollo de estas entidades mundialmente reconocidas.

- El siguiente paso de este trabajo es la genotipificación exhaustiva de los genes candidatos aquí reconocidos en una cohorte más grande de individuos colombianos obesos/AS, con el fin de validar su utilidad como predictores de las dos enfermedades en esta población.

10. REFERENCIAS

American Academy of Sleep Medicine. <http://www.aasmnet.org>.

Angeli CB, Kimura L, Auricchio MT, Vicente JP, Mattevi VS, Zembruski VM, Hutz MH, Pereira AC, Pereira TV, Mingroni-Netto RC. Multilocus analyses of seven candidate genes suggest interacting pathways for obesity-related traits in Brazilian populations. *Obesity (Silver Spring)*. 2011 Jun;19(6):1244-51. doi: 10.1038/oby.2010.325. Epub 2011 Jan 13.

Aurora Mejía-Benítez et al. Analysis of the contribution of FTO, NPC1, ENPP1, NEGR1, GNPDA2 and MC4R genes to obesity in Mexican children. *BMC Med Genet*. 2013; 14: 21. Published online 2013 February 1. doi: 10.1186/1471-2350-14-21.

Bašić M, Butorac A, Landeka Jurčević I, Bačun-Družina V. Obesity: genome and environment interactions. *Arh Hig Rada Toksikol*. 2012 Sep;63(3):395-405. doi: 10.2478/10004-1254-63-2012-2244.

Below JE, Cade BE, Aguilar D, Brown E, Highland HM, Redline S, Bell GI, Cox NJ, Hanis CL. Genome wide association and exome sequence data analysis for more than 100 traits in Mexican Americans. Abstract/Session Information for Program Number 54 - American Society of Human Genetics Meeting Management Office.

Bengtsson Boström K, Hedner J, Grote L, Melander O, von Wöhrn F, Råstam L, Groop L, Lindblad U. Polymorphisms in α - and β -Adrenergic Receptor Genes, Hypertension, and Obstructive Sleep Apnea: The Skaraborg Sleep Study. *Int J Hypertens*. 2010 Mar 30;2010. pii: 458410. doi: 10.4061/2010/458410.

Bhushan B, Guleria R, Misra A, Luthra K, Vikram NK. TNF-alpha gene polymorphism and TNF-alpha levels in obese Asian Indians with obstructive sleep apnea. *Respir Med*. 2009 Mar;103(3):386-92. doi: 10.1016/j.rmed.2008.10.001. Epub 2008 Nov 20.

Böhning N, Zucchini W, Hörstmeier O, Böhning W, Fietze I. Sensitivity and specificity of telemedicine-based long-term pulse-oximetry in comparison with cardiorespiratory polygraphy and polysomnography in patients with obstructive sleep apnoea syndrome. *J Telemed Telecare*. 2011;17(1):15-9.

Buxbaum SG, Elston RC, Tishler PV, Redline S. Genetics of the apnea hypopnea index in Caucasians and African Americans: I. Segregation analysis. *Genet. Epidemiol*. 2002; 22 (3):243-253.

Cakirer B, Hans MG, Graham G, Aylor J, Tishler PV, Redline S. The relationship between craniofacial morphology and obstructive sleep apnea in whites and in African-Americans. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2001;163 (4): 947-950.

Casale M, Pappacena M, Rinaldi V, Bressi F, Baptista P, Salvinelli F. Obstructive sleep apnea syndrome: from phenotype to genetic basis. *Curr Genomics*. 2009 Apr;10(2):119-26. doi: 10.2174/138920209787846998.

Cauchi S, Stutzmann F, Cavalcanti-Proença C, Durand E, Pouta A, Hartikainen AL, Marre M, Vol S, Tammelin T, Laitinen J, Gonzalez-Izquierdo A, Blakemore AI, Elliott P, Meyre D, Balkau B, Järvelin MR, Froguel P. Combined effects of MC4R and FTO common genetic variants on obesity in European general populations. *J Mol Med (Berl)*. 2009 May;87(5):537-46. doi: 10.1007/s00109-009-0451-6. Epub 2009 Mar 3.

Chen W, Ye J, Han D, Yin G, Wang B, Zhang Y. Association of prepro-orexin polymorphism with obstructive sleep apnea/hypopnea syndrome. *Am J Otolaryngol*. 2012 Jan-Feb;33(1):31-6. doi: 10.1016/j.amjoto.2010.12.005. Epub 2011 Mar 2.

Côté JF, Vuori K. Identification of an evolutionarily conserved superfamily of DOCK180-related proteins with guanine nucleotide exchange activity. *J Cell Sci*. 2002 Dec 15;115(Pt 24):4901-13.

DePristo MA, Banks E, Poplin R, Garimella KV, Maguire JR, Hartl C, Philippakis AA, del Angel G, Rivas MA, Hanna M, McKenna A, Fennell TJ, Kernysky AM, Sivachenko AY, Cibulskis K, Gabriel SB, Altshuler D, Daly MJ. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat Genet*. 2011 May;43(5):491-8. doi: 10.1038/ng.806. Epub 2011 Apr 10.

Drager LF, Togeiro SM, Polotsky VY, Lorenzi-Filho G. Obstructive sleep apnea: a cardiometabolic risk in obesity and the metabolic syndrome. *J Am Coll Cardiol*. 2013 Aug 13;62(7):569-76. doi: 10.1016/j.jacc.2013.05.045. Epub 2013 Jun 12.

Encuesta Nacional de la Situación Nutricional en Colombia 2010 – ENSIN. República de Colombia. Ministerio de la Protección Social. Instituto Colombiano de Bienestar Familiar. Dirección de Prevención. <http://www.minsalud.gov.co/>

Frayling TM et al. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science*. 2007 May 11;316(5826):889-94. Epub 2007 Apr 12.

Goran MI, Walker R, Le KA, Mahurkar S, Vikman S, Davis JN, Spruijt-Metz D, Weigensberg MJ, Allayee H. Effects of PNPLA3 on liver fat and metabolic profile in Hispanic children and adolescents. *Diabetes*. 2010 Dec;59(12):3127-30. doi: 10.2337/db10-0554. Epub 2010 Sep 17.

Grody WW, Thompson BH, Hudgins L. Whole-exome/genome sequencing and genomics. *Pediatrics*. 2013 Dec;132(Suppl 3):S211-5. doi: 10.1542/peds.2013-1032E.

Han MS, Jung DY, Morel C, Lakhani SA, Kim JK, Flavell RA, Davis RJ. JNK expression by macrophages promotes obesity-induced insulin resistance and inflammation. *Science*. 2013 Jan 11;339(6116):218-22. doi: 10.1126/science.1227568.

Herrera BM, Keildson S, Lindgren CM. Genetics and epigenetics of obesity. *Maturitas*. 2011;69:41-9.

Hinney A, Vogel CI, Hebebrand J. From monogenic to polygenic obesity: recent advances. *Eur Child Adolesc Psychiatry*. 2010 Mar;19(3):297-310. doi: 10.1007/s00787-010-0096-6. Epub 2010 Feb 3.

Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Görgün CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*. 2002 Nov 21;420(6913):333-6.

Hotamisligil GS. Inflammation and endoplasmic reticulum stress in obesity and diabetes. *Int J Obes (Lond)*. 2008 Dec;32 Suppl 7:S52-4. doi: 10.1038/ijo.2008.238. Review.

Hotta K et al. Association between obesity and polymorphisms in SEC16B, TMEM18, GNPDA2, BDNF, FAIM2 and MC4R in a Japanese population. *J Hum Genet*. 2009 Dec;54(12):727-31. doi: 10.1038/jhg.2009.106. Epub 2009 Oct 23.

Huang W, Sun Y, Sun J. Combined effects of FTO rs9939609 and MC4R rs17782313 on obesity and BMI in Chinese Han populations. *Endocrine*. 2011 Feb;39(1):69-74. doi: 10.1007/s12020-010-9413-6. Epub 2010 Nov 10.

Huang XY, Li H, Xu XM, Wang LX. Mitochondrial DNA mutation screening of male patients with obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome. *Exp Ther Med*. 2014 Aug;8(2):519-524. Epub 2014 Jun 4.

Iles MM, Law MH, Stacey SN, et al. A variant in FTO shows association with melanoma risk not due to BMI. *Nat Genet*. 2013;45:428–32, 432e1.

Johansson LE, Lindblad U, Larsson CA, Råstam L, Ridderstråle M. Polymorphisms in the adiponutrin gene are associated with increased insulin secretion and obesity. *Eur J Endocrinol*. 2008 Nov;159(5):577-83. doi: 10.1530/EJE-08-0426. Epub 2008 Aug 26.

Kaklamani V, Yi N, Sadim M, et al. The role of the fat mass and obesity associated gene (FTO) in breast cancer risk. *BMC Med Genet*. 2011;12:52.

Khazaie H, Najafi F, Rezaei L, Tahmasian M, Sepehry AA, Herth FJ. Prevalence of symptoms and risk of obstructive sleep apnea syndrome in the general population. *Arch Iran Med*. 2011;14(5):335-8.

Kulyté A, Rydén M, Mejhert N, Dungner E, Sjölin E, Arner P, Dahlman I. MTCH2 in human white adipose tissue and obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011 Oct;96(10):E1661-5. doi: 10.1210/jc.2010-3050.

Larkin EK, Patel SR, Goodloe RJ, Li Y, Zhu X, Gray-McGuire C, Adams MD, Redline S. A candidate gene study of obstructive sleep apnea in European Americans and African Americans. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010 Oct 1;182(7):947-53. doi: 10.1164/rccm.201002-0192OC. Epub 2010 Jun 10.

Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2010 Mar 1;26(5):589-95. doi: 10.1093/bioinformatics/btp698. Epub 2010 Jan 15.

Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R; 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics.* 2009 Aug 15;25(16):2078-9. doi: 10.1093/bioinformatics/btp352. Epub 2009 Jun 8.

Liu Y, Patel S, Nibbe R, Maxwell S, Chowdhury SA, Koyuturk M, Zhu X, Larkin EK, Buxbaum SG, Punjabi NM, Gharib SA, Redline S, Chance MR. Systems biology analyses of gene expression and genome wide association study data in obstructive sleep apnea. *Pac Symp Biocomput.* 2011:14-25.

Ludka O, Konecny T, Somers V. Sleep Apnea, Cardiac Arrhythmias, and Sudden Death. *Tex Heart Inst J.* 2011; 38(4): 340–343.

MacDonald MJ, Longacre MJ, Warner TF, Thonpho A. High level of ATP citrate lyase expression in human and rat pancreatic islets. *Horm Metab Res.* 2013 May;45(5):391-3. doi: 10.1055/s-0032-1329987. Epub 2012 Dec 7.

McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernysky A, Garimella K, Altshuler D, Gabriel S, Daly M, DePristo MA. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* 2010 Sep;20(9):1297-303. doi: 10.1101/gr.107524.110. Epub 2010 Jul 19.

Medical Advisory Secretariat. Polysomnography in patients with obstructive sleep apnea: an evidence based analysis. *Ontario Health Technology Assessment Series* 2006;6(13).

Molina-Navarro MM, Triviño JC, Martínez-Dolz L, Lago F, González-Juanatey JR, Portolés M, Rivera M. Functional networks of nucleocytoplasmic transport-related genes differentiate ischemic and dilated cardiomyopathies. A new therapeutic opportunity. *PLoS One.* 2014 Aug 19;9(8):e104709. doi: 10.1371/journal.pone.0104709. eCollection 2014.

Monahan K, Redline S. Role of obstructive sleep apnea in cardiovascular disease. *Curr Opin Cardiol*. 2011 Nov;26(6):541-7. doi: 10.1097/HCO.0b013e32834b806a.

Morabia A, Abel T. The WHO report "Preventing chronic diseases: a vital investment" and us. *Soz Praventivmed*. 2006;51:74.

Mostafavi S, Ray D, Warde-Farley D, Grouios C, Morris Q. GeneMANIA: a real-time multiple association network integration algorithm for predicting gene function. *Genome Biol*. 2008;9 Suppl 1:S4. doi: 10.1186/gb-2008-9-s1-s4. Epub 2008 Jun 27.

Naseem S, Chaudhary B, Collop N. Attention deficit hyperactivity disorder in adults and obstructive sleep apnea. *Chest*. 2001;119(1):294-6.

Need AC, Shashi V, Hitomi Y, Schoch K, Shianna KV, McDonald MT, Meisler MH, Goldstein DB. Clinical application of exome sequencing in undiagnosed genetic conditions. *J Med Genet*. 2012 Jun;49(6):353-61. doi: 10.1136/jmedgenet-2012-100819. Epub 2012 May 11.

Ng M. et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2014 Aug 30;384(9945):766-81. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60460-8.

Olejniczak PW, Fisch BJ. Sleep disorders. *Med Clin North Am*. 2003 Jul;87(4):803-33.

Palmer LJ, Buxbaum SG, Larkin EK, Patel SR, Elston RC, Tishler PV, Redline S. Whole genome scan for obstructive sleep apnea and obesity in African-American families. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004 Jun 15;169(12):1314-21. Epub 2004 Apr 7.

Palmer LJ, Redline S. Genomic approaches to understanding obstructive sleep apnea. *Respir Physiol Neurobiol*. 2003 May 30;135(2-3):187-205.

Pearce NJ, Yates JW, Berkhout TA, Jackson B, Tew D, Boyd H, Camilleri P, Sweeney P, Gribble AD, Shaw A, Groot PH. The role of ATP citrate-lyase in the metabolic regulation of plasma lipids. Hypolipidaemic effects of SB-204990, a lactone prodrug of the potent ATP citrate-lyase inhibitor SB-201076. *Biochem J*. 1998 Aug 15;334 (Pt 1):113-9.

Price AL, Kryukov GV, de Bakker PI, Purcell SM, Staples J, Wei LJ, Sunyaev SR. Pooled association tests for rare variants in exon-resequencing studies. *Am J Hum Genet*. 2010 Jun 11;86(6):832-8. doi: 10.1016/j.ajhg.2010.04.005. Epub 2010 May 13.

Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, Maller J, Sklar P, de Bakker PI, Daly MJ, Sham PC. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am. J. Hum. Genet*. 81, 559–575 (2007).

Rajagopalan N. Obstructive sleep apnea: Not just a sleep disorder. *J Postgrad Med.* 2011; 57:168-75.

Redline S, Tishler PV, Tosteson TO, Williamson J, Kump K, Browner I, Ferrette V, Krejci P. The familial aggregation of obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:682-7.

Redline S, Tishler PV. The genetics of sleep apnea. *Sleep Med Rev.* 2000 Dec;4(6):583-602.

Robiou-du-Pont S, Bonnefond A, Yengo L, Vaillant E, Lobbens S, Durand E, Weill J, Lantieri O, Balkau B, Charpentier G, Marre M, Froguel P, Meyre D. Contribution of 24 obesity-associated genetic variants to insulin resistance, pancreatic beta-cell function and type 2 diabetes risk in the French population. *Int J Obes (Lond).* 2013 Jul;37(7):980-5. doi: 10.1038/ijo.2012.175. Epub 2012 Oct 23.

Roth T, Bogan RK, Culpepper L, Doghramji K, Doghramji P, Drake C, Grauke JH, Knoepfmacher P, Sateia M, Silvershein D, Thorpy MJ. Excessive sleepiness: under-recognized and essential marker for sleep/wake disorder management. *Curr Med Res Opin.* 2010;26 Suppl 2:S3-24

Samaras K, Botelho NK, Chisholm DJ, et al. Subcutaneous and visceral adipose tissue FTO gene expression and adiposity, insulin action, glucose metabolism, and inflammatory adipokines in type 2 diabetes mellitus and in health. *Obes Surg.* 2010;20:108–13.

Schäfer H, Pauleit D, Sudhop T, Gouni-Berthold I, Ewig S, Berthold HK. Body fat distribution, serum leptin, and cardiovascular risk factors in men with obstructive sleep apnea. *Chest.* 2002 Sep;122(3):829-39.

Schmidt S, Debant A. Function and regulation of the Rho guanine nucleotide exchange factor Trio. *Small GTPases.* 2014;5:e29769. doi: 10.4161/sgtp.29769. Epub 2014 Jul 2.

Schwab RJ. Genetic determinants of upper airway structures that predispose to obstructive sleep apnea. *Respir Physiol Neurobiol.* 2005 Jul 28;147(2-3):289-98.

Scuteri A, Sanna S, Chen WM, Uda M, Albai G, Strait J, Najjar S, Nagaraja R, Orrú M, Usala G, Dei M, Lai S, Maschio A, Busonero F, Mulas A, Ehret GB, Fink AA, Weder AB, Cooper RS, Galan P, Chakravarti A, Schlessinger D, Cao A, Lakatta E, Abecasis GR. Genome-wide association scan shows genetic variants in the FTO gene are associated with obesity-related traits. *PLoS Genet.* 2007 Jul;3(7):e115.

Singh TD, Patial K, Vijayan VK, Ravi K. Oxidative stress and obstructive sleep apnoea syndrome. *Indian J Chest Dis Allied Sci.* 2009 Oct-Dec;51(4):217-24.

Sleep-related breathing disorders in adults: recommendations for syndrome definition and measurement techniques in clinical research. The Report of an American Academy of Sleep Medicine Task Force. *Sleep*. 1999 Aug 1;22(5):667-89.

Stevens GA, Singh GM, Lu Y, et al. Global Burden of Metabolic Risk Factors of Chronic Diseases Collaborating Group (Body Mass Index). National, regional, and global trends in adult overweight and obesity prevalences. *Popul Health Metr* 2012;10: 22.

Suzuki YJ, Jain V, Park AM, Day RM. Oxidative stress and oxidant signaling in obstructive sleep apnea and associated cardiovascular diseases. *Free Radic Biol Med*. 2006 May 15;40(10):1683-92. Epub 2006 Feb 2.

Sweeting HN. Measurement and definitions of obesity in childhood and adolescence: a field guide for the uninitiated. *Nutr J*, 2007, 6: 32.

Tan LJ, Zhu H, He H, Wu KH, Li J, Chen XD, Zhang JG, Shen H, Tian Q, Krousel-Wood M, Papasian CJ, Bouchard C, Pérusse L, Deng HW. Replication of 6 obesity genes in a meta-analysis of genome-wide association studies from diverse ancestries. *PLoS One*. 2014 May 30;9(5):e96149. doi: 10.1371/journal.pone.0096149. eCollection 2014.

Vlasblom J, Zuberi K, Rodriguez H, Arnold R, Gagarinova A, Deineko V, Kumar A, Leung E, Rizzolo K, Samanfar B, Chang L, Phanse S, Golshani A, Greenblatt JF, Houry WA, Emili A, Morris Q, Bader G, Babu M. Novel function discovery with GeneMANIA: a new integrated resource for gene function prediction in *Escherichia coli*. *Bioinformatics*. 2014 Oct 13. pii: btu671. [Epub ahead of print]

Wang K, Li WD, Zhang CK, Wang Z, Glessner JT, Grant SF, Zhao H, Hakonarson H, Price RA. A genome-wide association study on obesity and obesity-related traits. *PLoS One*. 2011 Apr 28;6(4):e18939. doi: 10.1371/journal.pone.0018939.

Warde-Farley D, Donaldson SL, Comes O, Zuberi K, Badrawi R, Chao P, Franz M, Grouios C, Kazi F, Lopes CT, Maitland A, Mostafavi S, Montojo J, Shao Q, Wright G, Bader GD, Morris Q. The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. *Nucleic Acids Res*. 2010 Jul;38(Web Server issue):W214-20. doi: 10.1093/nar/gkq537.

World Health Organization. <http://www.who.int/features/factfiles/obesity>

Xiaojing XU, Hui Z, Di X, Honghao Z, Zhaoqian L. Genome wide association study of obesity. *J Cent South Univ (Med Sci)* 2013, 38(1). doi:10.3969/j.issn.1672-7347.2013.01.018

Yang Y, Muzny DM, Reid JG, Bainbridge MN, Willis A, Ward PA, Braxton A, Beuten J, Xia F, Niu Z, Hardison M, Person R, Bekheirnia MR, Leduc MS, Kirby A, Pham P,

Scull J, Wang M, Ding Y, Plon SE, Lupski JR, Beaudet AL, Gibbs RA, Eng CM. Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of mendelian disorders. *N Engl J Med*. 2013 Oct 17;369(16):1502-11. doi: 10.1056/NEJMoa1306555. Epub 2013 Oct 2.

Zhang X, Xu A, Chung SK, Cresser JH, Sweeney G, Wong RL, Lin A, Lam KS. Selective inactivation of c-Jun NH2-terminal kinase in adipose tissue protects against diet-induced obesity and improves insulin sensitivity in both liver and skeletal muscle in mice. *Diabetes*. 2011 Feb;60(2):486-95. doi: 10.2337/db10-0650.

Zhao X, Yang Y, Sun BF, Zhao YL, Yang YG. FTO and obesity: mechanisms of association. *Curr Diab Rep*. 2014 May;14(5):486. doi: 10.1007/s11892-014-0486-0.

11. ANEXOS

ANEXO A. Modificaciones al protocolo del kit de aislamiento de ADN a partir de sangre. UltraClean® Blood DNA Isolation Kit (Non-Spin) (MO BIO Laboratories, Inc., CA, EE.UU.)

La recuperación se hizo utilizando la capa leucocitaria en vez de sangre entera.

1. En un primer paso, para obtenerlo, todo el tubo de la muestra sangre se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente.
2. Con una pipeta, se retiró cuidadosamente la capa leucocitos-plaquetas (buffy coat) ubicada entre la interfase plasma/eritrocitos.
3. A partir de esta parte, hasta el paso 21, el protocolo de aislamiento de sangre siguió siendo el mismo.
4. En el paso 22, las muestras se diluyeron en 50 µl de solución G4.

ANEXO B. Requisitos de las muestras de DNA para el envío a los servicios de secuenciación exómica.

- Calidad de ADN: pureza suficiente para proporcionar un $A_{260}/A_{280} \geq 1.8$.
- Cantidad de ADN: 10 µl de cada muestra a 50 ng/µl (cantidad total: 500 ng). Las muestras se diluyeron en la solución G4 (Tris in DNA Free Water) del kit de aislamiento UltraClean® Blood DNA Isolation Kit (Non-Spin).
- Envío: las muestras de ADN cargadas en placas de 96 pozos y almacenadas en hielo seco, fueron enviadas al Departamento de Genómica del Hospital Infantil de Cincinnati (Center for Autoimmune Genetics and Etiology (CAGE) of the Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, OH, USA) para secuenciación exómica y análisis de datos.