



Universidad Nacional de Misiones. Facultad de Ciencias Exactas,  
Químicas y Naturales. Departamento de Genética

Tesista

***María Belén Eyheramonho***

**Polimorfismo Asp299Gly del gen  
TLR4 (Toll-like receptor) y  
susceptibilidad genética para  
síndrome metabólico**

**Tesis presentada para obtener el título de  
“Licenciada en Genética”**

Director

***Dr. Gustavo Daniel Frechtel***

Co-Director

***Dr. Mariano Javier Taverna***

**Posadas, Misiones 2007**



Esta obra está licenciado bajo Licencia Creative Commons (CC) Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional. <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

**Tesina de Graduación para optar al título de Licenciada en Genética**  
**Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales**  
**Universidad Nacional de Misiones**

**"POLIMORFISMO ASP299GLY DEL GEN TLR-4  
(TOLL-LIKE RECEPTOR) Y SUSCEPTIBILIDAD  
GENÉTICA PARA SÍNDROME METABÓLICO"**

**Tesinista:** María Belén Eyheramonho

**Director:** Dr. Gustavo Daniel Frechtel

**Codirector:** Dr. Mariano Javier Taverna

**Lugar:** Cátedra de Genética y Biología Molecular – Facultad de  
Farmacia y Bioquímica – Universidad Nacional de Buenos Aires

**Año:** 2007

**Tesina de Graduación para optar al título de Licenciada en Genética**  
**Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales**  
**Universidad Nacional de Misiones**

**"POLIMORFISMO ASP299GLY DEL GEN TLR-4  
(TOLL-LIKE RECEPTOR) Y SUSCEPTIBILIDAD  
GENÉTICA PARA SÍNDROME METABÓLICO"**

**Tesinista:** María Belén Eyheramonho

**Director:** Dr. Gustavo Daniel Frechtel

**Codirector:** Dr. Mariano Javier Taverna

**Evaluadores:**

**Lugar:** Cátedra de Genética y Biología Molecular – Facultad de  
Farmacia y Bioquímica – Universidad Nacional de Buenos Aires

**Año:** 2007

“LA FE Y LA RAZÓN son como las dos alas con las cuales el espíritu humano se eleva hacia la contemplación de la Verdad. Dios ha puesto en el corazón del hombre el deseo de conocer la verdad y, en definitiva, de conocerlo a Él para que conociéndolo y amándolo, pueda alcanzar la plena verdad sobre sí mismo.”

*Juan Pablo II, “Fides et Ratio”, 1998*

“De la obra futura de los jóvenes que me escuchan dependerá el progreso de nuestras ciencias y de nuestros países. Espero que respondan brillante y dignamente a las esperanzas que depositamos en su acción venidera.”

*Bernardo Houssay, “Misión y Responsabilidad del Investigador Científico”, 1961*

## *Agradecimientos*

- A mi Familia, especialmente a papá y mamá, por su ejemplo y entrega. A Martín.*
- A mi Director, el Dr. Gustavo Frechtel, por haberme concedido esta oportunidad, y por ocuparse paternalmente de cada persona a su cargo.*
- A mi Codirector, el Dr. Mariano Taverna, por su esmero y dedicación.*
- A Florencia Aranguren, por colaborar en el reclutamiento de las muestras.*
- A Leonardo Gómez Rosso, por colaborar en los dosajes bioquímicos.*
- A Mariana Tellechea, por colaborar en la extracción del ADN. Por sus consejos y su disposición.*
- A Carolina Ramírez, por su amistad y sinceridad. Por su picardía y complicidad en la aventura del conocimiento.*
- A Gloria Cerrone, por su presencia alegre y maternal.*
- A Ariel, Sabrina, María Silvia, Mariela, Viviana, Gloria M., Verónica, Florencia, Marcela, Irene. Por las experiencias compartidas.*
- A Silvia, Andrea, Ana, Laura, Selva, Flavia y todas mis amigas. Por ayudarme en muchas cosas y de muchas maneras.*
- A Jimena y Gabriela. A todos mis compañeros y profesores de la Carrera.*
- Y sobre todo a Dios y la Virgen María, por haberme permitido hacer este trabajo y por ser Amigos que nunca fallan.*

# ÍNDICE

	<i>Página</i>
<i>RESUMEN</i> .....	5
<i>ABSTRACT</i> .....	6
<i>INTRODUCCIÓN</i> .....	7
<i>Concepto de Síndrome Metabólico</i> .....	7
<i>Etiopatogénesis</i> .....	10
<i>Obesidad e inflamación</i> .....	12
<i>Inflamación y genes candidatos</i> .....	14
<i>Vía de señalización de TLR-4</i> .....	15
<i>TLR-4: Obesidad, inflamación y resistencia a insulina</i> .....	16
<i>Estructura y variantes del gen TLR-4</i> .....	17
<i>Estudios de asociación y funcionales de los polimorfismos de TLR-4</i> .....	17
<i>OBJETIVOS</i> .....	19
<i>MATERIALES Y MÉTODOS</i> .....	20
<i>Diseño general</i> .....	20
<i>Selección de individuos</i> .....	20
<i>Fenotipificación</i> .....	20
<i>Análisis genéticos</i> .....	22
<i>Análisis estadístico</i> .....	22
<i>Utilización de recursos bioinformáticos</i> .....	23
<i>RESULTADOS</i> .....	24
<i>DISCUSIÓN</i> .....	30
<i>ANEXO I</i> .....	37
<i>ANEXO II</i> .....	38
<i>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i> .....	40

## RESUMEN

El síndrome metabólico (SM) es una entidad poligénica y multifactorial, en creciente prevalencia, caracterizada por una constelación de factores de riesgo de origen metabólico estrechamente asociados a la resistencia a la insulina, entre los que destaca la obesidad abdominal. Numerosas evidencias clínicas y experimentales indican que el síndrome metabólico constituye un factor de riesgo significativo para el desarrollo de diabetes de tipo 2 y enfermedad cardiovascular isquémica, y que se encuentra asociado a un estado inflamatorio subclínico generalizado. En el presente trabajo investigamos la asociación del polimorfismo Asp299Gly de TLR4, un receptor de membrana componente clave de la respuesta inmune innata, con el síndrome metabólico y sus diferentes variables metabólicas y antropométricas. Se estudiaron 300 muestras de ADN provenientes de donantes de sangre voluntarios en los cuales se definió la prevalencia de síndrome metabólico de acuerdo al criterio de ATPIII e IDF. El polimorfismo Asp299Gly fue estudiado por la técnica PCR-RFLP. La prevalencia de síndrome metabólico hallada en esta población fue de 29,7% según ATPIII y 40% según IDF. El polimorfismo 299Gly se encontró asociado a una menor insulinemia de ayunas ( $P = 0,0064$ ) y mayor insulinosensibilidad ( $P = 0,012$ ), no obstante no estuvo significativamente asociado al síndrome metabólico ni a ninguna de sus diferentes variables. Por otro lado, el polimorfismo 299Asp estuvo asociado a resistencia a insulina (coef.  $0,69 \pm 0,22$ ,  $F = 9,77$ ), que a su vez se correlacionó con trigliceridemia (coef.  $0,004 \pm 0,001$ ,  $F = 11,45$ ) y diámetro de cintura (coef.  $0,039 \pm 0,006$ ,  $F = 38,76$ ). La prevalencia de SM arrojó un resultado similar a otros trabajos publicados. Podemos concluir que el polimorfismo 299Gly presentaría un posible rol protector para el desarrollo de síndrome metabólico por estar asociado a una mayor insulinosensibilidad, por el contrario, el alelo 299Asp presentaría un posible rol de susceptibilidad para el desarrollo de síndrome metabólico por estar asociado a resistencia a la insulina. El análisis de polimorfismos en genes candidatos representa un importante aporte para el conocimiento fisiopatológico de estas entidades poligénicas, su prevención y abre una importante posibilidad de mejorar la terapéutica en forma personalizada.

## ABSTRACT

The metabolic syndrome (MS) is a multifactorial polygenic entity, in growing prevalence, characterized by a constellation of risk factors of metabolic origin closely related to insulin resistance, from which abdominal obesity is emphasized. Several clinical and experimental evidences indicate that metabolic syndrome is a significant risk factor for the development of type 2 diabetes and ischemic cardiovascular disease. Also, it is associated to a generalized subclinic inflammatory state as a component of the innate immune response. In this work, we investigated a key transmembrane receptor component of the innate immune response, particularly the association of the Asp299Gly TLR4 polymorphism with metabolic syndrome and its different anthropometric and metabolic variables. We studied 300 DNA samples come from voluntary blood donors in which the prevalence of metabolic syndrome according to ATPIII and IDF was defined. Asp299Gly polymorphism was studied by PCR-RFLP. The prevalence of metabolic syndrome in this population was 29.7% according to ATPIII and 40% according to IDF. On the one hand, 299Gly polymorphism was associated to a lower fasting insulin ( $P = 0.0064$ ) and a higher insulin sensitivity ( $P = 0.012$ ). However, it was not significantly related to neither metabolic syndrome nor their individual variables. On the other hand, 299Asp polymorphism was associated to insulin resistance (coef.  $0.69 \pm 0.22$ ,  $F = 9.77$ ), which was correlated to triglyceridemia (coef.  $0.004 \pm 0.001$ ,  $F = 11.45$ ) and waist circumference (coef.  $0.039 \pm 0.006$ ,  $F = 38.76$ ). The prevalence of MS threw a similar result to other published works. We can conclude that 299Gly polymorphism could present a possible protective role for development of metabolic syndrome for its association to higher insulin sensitivity; on the contrary, 299Asp allele could present a possible role of susceptibility for development of metabolic syndrome due to its association with insulin resistance. The analysis of polymorphisms in candidate genes represents an important contribution for the physiologic knowledge of these polygenic entities, its prevention and opens an important possibility to improve the therapeutic in personalized form.

## INTRODUCCIÓN

### Concepto de Síndrome Metabólico

El síndrome metabólico, también conocido como síndrome X o síndrome de resistencia a la insulina (Chew *et al.*, 2006), es una entidad heterogénea, poligénica y multifactorial, caracterizada por una constelación de factores de riesgo de origen metabólico (Grundy, 1999), estrechamente asociados a la resistencia a la insulina, y que comprenden, entre los más importantes, obesidad central, dislipidemia (hipertrigliceridemia y/o descenso del colesterol de HDL (*High Density Lipoprotein*, lipoproteína de alta densidad), hipertensión arterial e hiperglucemia, según los criterios diagnósticos del NCEP/ATP III (*Adult Treatment Panel III of the National Cholesterol Education Program*, 2001).

La **obesidad abdominal**, que se presenta clínicamente como una circunferencia de cintura aumentada y cuya prevalencia mundial se incrementa dramáticamente, es la forma de obesidad más relacionada al síndrome metabólico, que contribuye en forma significativa al empeoramiento del conjunto de complicaciones metabólicas derivadas del mismo. En un estado de exceso de tejido adiposo dichas variables metabólicas son potenciadas debido a la liberación al torrente sanguíneo de diferentes moléculas por parte de los adipocitos, además productos metabólicos como los ácidos grasos libres (Misra & Vikram, 2003; Grundy *et al.*, 2004; Shi, 2006) que, en un fenómeno conocido como “lipotoxicidad” son depositados en otros órganos alterando su función, como es el caso del hígado, los músculos y el páncreas (Gregor & Hotamisligil, 2007).

Han sido descritas dos formas corporales de obesidad: inferior o ginecoide y superior o androide. En individuos de sexo masculino la reserva adiposa es preferentemente intraabdominal en todas las edades, mientras que el depósito de tejido adiposo abdominal subcutáneo tiende a disminuir después de los 50 años de edad; en cambio, en las mujeres predomina la acumulación de tejido adiposo abdominal subcutáneo durante la juventud pero posteriormente prevalece la acumulación de tejido adiposo intraabdominal. Varios factores, pero principalmente el declive en las hormonas sexuales, influyen en el aumento de tejido adiposo intraabdominal respecto al subcutáneo (Misra & Vikram, 2003).

Uno de los métodos antropométricos utilizados actualmente para evaluar la obesidad regional es la medición de circunferencias corporales, que, si bien son estimadores imperfectos por incluir otros tejidos además del adiposo, no obstante son mediciones económicas y fáciles de realizar; así también, son útiles en la práctica clínica y en estudios epidemiológicos debido a su marcada correlación con los puntos de corte de variables metabólicas y cardiovasculares (Misra & Vikram, 2003). Por último, aunque no menos importante, la medición del diámetro de la cintura resulta más confiable que el índice de masa corporal (IMC), ya que individuos con el mismo IMC pueden presentar localizaciones muy diferentes de tejido adiposo (Wisse, 2004).

La **dislipidemia** comprende **hipertrigliceridemia** y **descenso del colesterol de HDL** que se manifiestan en análisis lipoproteicos de rutina y resultan aterogénicos (Grundy *et al.*, 2004).

Los triglicéridos son sintetizados en el Retículo Endoplásmico (RE) como respuesta a una acumulación celular de ácidos grasos provenientes de la dieta. Los triglicéridos, junto con el colesterol, son acumulados en lipoproteínas, estructuras esféricas rodeadas por una monocapa de fosfolípidos asociados a proteínas (Gregor & Hotamisligil, 2007). En un estado de resistencia a insulina no se produce la inhibición de la actividad de la lipasa hormona sensible, por lo que aumentan las concentraciones plasmáticas de ácidos grasos libres que actúan como sustrato para la síntesis hepática de triglicéridos, además de inhibir la lipólisis de lipoproteínas como VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*, lipoproteína de muy baja densidad) impidiendo de esta manera que disminuya su concentración plasmática (Ruan & Lodish, 2003).

Con la acumulación de LDL (*Low Density Lipoprotein*, lipoproteína de baja densidad) y macrófagos en la túnica íntima arterial comienza el proceso de formación de una placa aterosclerótica. En el espacio subendotelial las partículas de LDL son oxidadas y fagocitadas por los macrófagos, que se convierten así en células espumosas. A su vez, las células inflamatorias activadas liberan citoquinas que estimulan la infiltración adicional de macrófagos y la migración y proliferación de células musculares endoteliales. De esta manera aumenta la estenosis luminal con la consiguiente disminución trágica del flujo sanguíneo. Posteriormente, se produce la ruptura de la placa debido a su desestabilización mediante metaloproteinasas de matriz y muerte celular por apoptosis, con la consiguiente isquemia producida por el desencadenamiento de la cascada de coagulación (Fortunato & Di Taranto, 2007). El colesterol HDL actúa en el transporte reverso del colesterol promoviendo el flujo del mismo a partir de las

células espumosas, teniendo además efectos antioxidantes y antiinflamatorios, por lo tanto, al disminuir sus niveles plasmáticos se encontrarían inhibidas sus propiedades antiaterogénicas (NCEP/ATP III, 2002).

La **hipertensión**, que presenta un origen multifactorial (Grundy *et al.*, 2004), es otro importante factor de riesgo para enfermedad cardíaca isquémica. Sin embargo, ante la observación de la ausencia de efectividad del tratamiento antihipertensivo, Jeppensen *et al.* (2000) compararon pacientes con la dislipidemia característica de síndrome metabólico respecto a aquellos que presentaron valores normales de triglicéridos y HDL y obtuvieron como resultado que en pacientes con niveles altos de triglicéridos y bajos de HDL la presión sanguínea carece de valor predictivo para el desarrollo de enfermedad cardíaca isquémica. La aparente carencia de efectividad del tratamiento antihipertensivo podría deberse a que, si bien disminuye la presión arterial, no desaparecen el resto de factores de riesgo metabólicos que suelen estar asociados a la hipertensión, como es el caso de las dislipidemias y, principalmente, la resistencia a insulina con la consiguiente hiperinsulinemia (Reaven, 2003).

El estado de resistencia a insulina se refiere a una respuesta disminuida por parte de los tejidos a las concentraciones fisiológicas de insulina. La principal consecuencia de este fenómeno es la **hiperglucemia**, que se origina por la incapacidad de la insulina de inhibir la producción hepática de glucosa y de regular la captación y metabolismo de la glucosa por parte de los tejidos insulino-dependientes. Las células beta pancreáticas responden a este estado aumentando la producción de insulina, pero cuando la capacidad secretora de dichas células no resulta suficiente, aumenta la concentración plasmática de glucosa que conduce al desarrollo de diabetes tipo 2 (Ruan & Lodish, 2003). Cuando la hiperglucemia ha superado este umbral, se constituye en un importante factor independiente de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (Grundy *et al.*, 2004). Por otro lado, la glucosa podría promover un estado inflamatorio y trombótico generalizado, mediante un incremento de genes pro-inflamatorios y activadores de la cascada de coagulación (Dandona *et al.*, 2004).

Si bien muchos autores atribuyen la aparición del concepto de síndrome metabólico en la literatura científica a Gerald Reaven en 1988, en realidad la noción del mismo surgió ya en 1923, cuando Kylin describió la asociación entre hipertensión, obesidad y gota (Groop, 2000). Desde entonces, además de haber recibido diferentes denominaciones, este síndrome ha sido objeto de diferentes intentos de aproximación en lo que se refiere a los síntomas que lo constituyen, existiendo por lo tanto diferentes enunciados del

mismo; no obstante, aun cuando existen definiciones más recientes, la única consensuada debido a su simplicidad de aplicación y a que no enfatiza un simple criterio etiológico, y, por lo tanto, la única habitualmente utilizada en la práctica clínica y en investigación es la del NCEP/ATP III anteriormente citada. No obstante, también ha sido ampliamente utilizada una definición más reciente publicada en el año 2005 por la Fundación Internacional de Diabetes (IDF, *International Diabetes Foundation*) la cual es esencialmente similar a la del NCEP/ATP III, excepto que disminuye el umbral de hiperglucemia de acuerdo a la definición actualizada de la Asociación Americana de Diabetes (ADA, *American Diabetes Association*), así como el de la circunferencia de cintura, estableciendo diferentes umbrales de acuerdo al origen étnico y constituyéndola en una variable necesaria para el diagnóstico (Grundy *et al.*, 2005).

Numerosas evidencias clínicas y experimentales indican que el síndrome metabólico constituye un factor de riesgo significativo para el desarrollo de diabetes de tipo 2 y enfermedad cardiovascular isquémica (Kahn *et al.*, 2005), no habiéndose establecido con claridad si el riesgo que conlleva el síndrome, en su conjunto, es mayor que la suma de los riesgos que confiere cada componente individual, especialmente para el riesgo de enfermedad cardiovascular (Grundy *et al.*, 2004; Ford, 2005; Kahn *et al.*, 2005; Sundström *et al.*, 2006).

A su vez, al mismo tiempo que está implicado en la predisposición a patologías severas, este síndrome cobra importancia debido a su elevada y creciente prevalencia poblacional (20-35%) que varía según los criterios utilizados para definir el síndrome. Asimismo, esta prevalencia es marcadamente variable entre distintos grupos étnicos y etarios, existiendo también una prevalencia mayor en hombres que en mujeres, diferencia que se minimiza al utilizar los criterios diagnósticos del NCEP/ATP III (Chew *et al.*, 2006).

## **Etiopatogénesis**

El síndrome metabólico es la consecuencia de interacciones entre una miríada de factores ambientales (ingesta hipercalórica, sedentarismo, tabaquismo, etc.) y múltiples factores genéticos (ej. polimorfismo Pro12Ala del receptor PPAR- $\gamma$ ), así como fenómenos de interacción intergénica, aún poco estudiados (Groop, 2000).

En el contexto de la etiología de esta entidad cabe mencionar la hipótesis fisiopatológica que comprende dos conceptos conexos: el genotipo de la economía (*thrifty genotype*; Neel, 1962 *apud* Prentice, 2005) y el fenotipo de la economía (*thrifty phenotype*; Hales & Barker, 1992, 2001). El primero hace referencia a que entre nuestros antepasados cazadores-recolectores, habrían tenido mayor eficacia biológica aquellos individuos que portaran genes que les permitiesen maximizar la capacidad de almacenamiento energético como reservas adiposas, lo cual supondría una ventaja adaptativa en largos períodos de escasez de alimentos. De este modo, mediante los mecanismos de la selección natural, el genoma humano llevaría impresas las “huellas” de sus ancestros cazadores-recolectores que se habrían beneficiado por el genotipo de la economía, pero el mismo sería perjudicial en las condiciones presentes de abundancia alimenticia y causaría predisposición al síndrome metabólico y a otras comorbilidades (diabetes de tipo 2, enfermedades cardiovasculares, obesidad, etc.) (Groop, 2000).

En cuanto a la hipótesis del fenotipo de la economía, ésta propone que durante el período intrauterino, en condiciones de nutrición deficientes, el embrión/feto se adapta al medio adverso optimizando la utilización de nutrientes, lo cual llevaría a un fenotipo “económico” permanente mediante alteraciones, principalmente, en el desarrollo de las células beta pancreáticas (Oliver *et al.*, 2001), en la estructura hepática, en la masa y el tipo de fibras musculares, y en la densidad de receptores hormonales (Prentice, 2005). Asimismo, se ha postulado que este fenotipo sería ventajoso a lo largo de la vida del individuo con una alimentación frugal (Moore *et al.*, 2001), pero se volvería perjudicial en condiciones de abundancia alimenticia (Hales & Barker, 1992; Yajnik, 2000; Hales & Barker, 2001; Prentice, 2003). De este modo, en varios estudios se ha observado que individuos con bajo peso al nacer presentan un riesgo elevado de sufrir en la edad adulta síndrome metabólico y/o rasgos metabólicos del mismo (Forsen *et al.*, 2000; Jaquet *et al.*, 2000; Misra & Vikram 2003; Barker, 2004).

Se han sugerido diversos genes candidatos responsables del fenotipo de la economía, entre los que pueden destacarse el gen *PPAR- $\gamma$*  (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*, receptor gamma activado por el proliferador peroxisomal) que actúa como factor de transcripción para diversos genes del tejido adiposo, el gen  *$\beta$ 3-AR* (*beta-3 Adrenergic Receptor*, receptor  $\beta$ -3 adrenérgico) que está involucrado en el proceso de lipólisis y el gen *IRS-1* (*Insulin Receptor Substrate-1*, sustrato del receptor de insulina 1), que participa en la cascada de señalización de la insulina (Groop, 2000).

## Obesidad e inflamación

Numerosos estudios clínicos y experimentales han sugerido de manera unívoca que existen asociaciones e interrelaciones patogénicas entre obesidad, resistencia a la insulina, síndrome metabólico, diabetes de tipo 2 y la existencia de un estado inflamatorio generalizado subclínico, debido a hiperactividad de la inmunidad innata de aparición precoz. Efectivamente, existe una correlación positiva entre tejido adiposo, especialmente de tipo visceral, y activación del sistema inflamatorio (Berg & Scherer, 2005); se ha observado, en presencia de un exceso de tejido adiposo, un aumento significativo en la infiltración de macrófagos (Weisberg *et al.*, 2003) y en la activación de genes inflamatorios (Xu *et al.*, 2003); marcadores inflamatorios, en particular la interleuquina 6 (IL-6) y la proteína C reactiva (CRP, *C-Reactive Protein*), han sido asociados de manera independiente, en estudios longitudinales, a un riesgo elevado de síndrome metabólico y diabetes de tipo 2 (Freeman *et al.*, 2002; Mlinar *et al.*, 2007); el factor de necrosis tumoral *alpha* (TNF- $\alpha$ , *Tumor Necrosis Factor alpha*) puede producir resistencia a la insulina inactivando al receptor de insulina y a su sustrato (IRS-1); en efecto, se ha observado una asociación positiva entre el nivel de ARN mensajero de TNF- $\alpha$  en tejido adiposo e hiperinsulinemia (Hotamisligil *et al.*, 1993); la reducción en la secreción de la adiponectina, molécula antiinflamatoria producida en altas concentraciones y específicamente en el adipocito diferenciado, ha sido asociada a un riesgo elevado de síndrome metabólico y diabetes de tipo 2 (Weyer *et al.*, 2001; Trujillo & Scherer, 2005); la administración de agentes antiinflamatorios ha sido asociada a la prevención o mejora del síndrome metabólico (y/o de sus componentes) en humanos y modelos animales (Shoelson *et al.*, 2006); igualmente, la administración de agentes estimuladores de la sensibilidad a insulina, como rosiglitazona, han producido una disminución en la expresión de moléculas inflamatorias (Savage *et al.*, 2005). Estos hallazgos han estimulado la búsqueda de un genotipo “inflamatorio”, análogo al genotipo “económico”, es decir, conjunto de alelos responsable de la susceptibilidad para dicha inflamación. Este genotipo “inflamatorio” habría sido beneficioso en tiempos ancestrales, cuando las infecciones eran una de las principales causas de muerte, pero, en los tiempos actuales, se habría vuelto perjudicial debido a la irrupción pandémica de la ingesta hipergrasa y el sedentarismo, fenómenos proinflamatorios e inductores de resistencia a la insulina. A su vez, en esta era moderna, el advenimiento

de agentes antibióticos anuló el potencial efecto beneficioso de este genotipo “inflamatorio”.

Se han propuesto dos mecanismos principales que serían responsables de este estado inflamatorio crónico. Por un lado, la ingesta hipercalórica produce un aumento del estrés oxidativo mediante un incremento de especies de oxígeno reactivo (ROS, *Reactive Oxygen Species*) y favorece la expresión de moléculas proinflamatorias (Dandona *et al.*, 2004). Asimismo ciertas citoquinas, como el interferón gamma, producen un aumento en la expresión de la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS, *inducible Nitric Oxide Synthase*) que conduce a un exceso en la producción de óxido nítrico, contribuyendo al aumento de estrés oxidativo (Gotoh & Mori, 2006). Por otro lado, contribuiría a este estado inflamatorio generalizado la inhibición de la vía de señalización del receptor de insulina mediada por una concentración elevada de las citoquinas proinflamatorias TNF- $\alpha$  e IL-6 que, mediante inducción de la fosforilación de serinas e inhibición de la fosforilación de tirosinas del receptor de insulina y su sustrato (Dandona *et al.*, 2004), suprimirían los efectos anti-inflamatorios de dicha hormona pancreática (Dandona *et al.*, 2007).

Tanto el estrés oxidativo como la inflamación conducen a un estado de estrés celular conocido como estrés del retículo endoplásmico, exponenciado a su vez por una mayor exigencia de síntesis proteica, tanto en el adipocito en crecimiento como en las células beta pancreáticas, sobre todo de individuos con resistencia a insulina, en los que, además, el retículo endoplásmico es dañado por la privación de glucosa como también por niveles elevados de ácidos grasos libres en suero (Gregor & Hotamisligil, 2007).

El RE se encarga del procesamiento proteico y actúa a su vez como reservorio celular de calcio; ante una sobrecarga proteica y un desbalance en la homeostasis del calcio, producido por el exceso de óxido nítrico, se activa la cascada de señalización del estrés del RE, que tiene cuatro efectos principales: 1) disminución de la tasa general de síntesis proteica; 2) aumento de la síntesis de chaperonas; 3) degradación de las proteínas mal plegadas; y, en caso de no ser suficientes para la recuperación de la célula los tres procesos anteriores, 4) muerte celular por apoptosis. De este modo, tanto genes activados por factores de transcripción de la vía del estrés del RE (JNK, *c-jun N-terminal Kinase*; NF $\kappa$ B, *Nuclear Factor kappa B*), como el aumento de células muertas, produciría un incremento en la inflamación, completándose así un “círculo vicioso” de inflamación y resistencia a insulina (Gregor & Hotamisligil, 2007).

## Inflamación y genes candidatos

Al igual que para el genotipo de la economía, han sido propuestos diversos genes candidatos para el genotipo “inflamatorio”, particularmente receptores y citoquinas proinflamatorias, como el TNF- $\alpha$  y la IL-6, la serin-kinasa JNK1 y el supresor de la señalización de citoquinas SOCS3 (*Suppressor Of Cytokine Signaling 3*) (Dandona *et al.*, 2004; Savage *et al.*, 2005).

Últimamente ha cobrado especial interés el estudio genético-molecular de la familia TLR (*Toll-Like Receptors*), en particular TLR-4. Este receptor es una proteína de transmembrana que pertenece a una importante familia de receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) (Medzhitov *et al.*, 1997; Rock *et al.*, 1998; Medzhitov, 2001). TLR-4 se expresa principalmente en macrófagos, adipocitos, miocardiocitos, células musculares lisas y endoteliales, y en epitelios de las vías respiratorias (Zarembek & Godowski, 2002; Shi *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2006). Su estructura se caracteriza por presentar un dominio citosólico de aproximadamente 150 aminoácidos denominado TIR (*Toll/IL-1 Receptor*), un dominio transmembrana, y un dominio extracelular compuesto principalmente por arreglos de repeticiones ricas en leucina (LRR, *Leucine-rich repeat*) y un grupo de cisteínas, yuxtapuesto a la membrana celular, que flanquea el extremo carboxilo terminal del dominio LRR (Rock *et al.*, 1998; Imler & Zheng, 2004) (Figura 1). Esta proteína reconoce mayormente como su ligando a los lipopolisacáridos (LPS) de bacterias Gram-negativas (Poltorak *et al.*, 1998; Kawai *et al.*, 1999; Medzhitov, 2001), pero recientemente se ha observado que el componente lipídico de los LPS sería el responsable de dicha señalización, por lo que se ha vislumbrado que los ácidos grasos libres circulantes serían capaces de la activación de este receptor; dicha hipótesis ha sido confirmada repetidas veces experimentalmente, observándose mayor expresión de ARN mensajero de citoquinas proinflamatorias en células tratadas con ácidos grasos saturados en vez de insaturados, mientras que los ácidos grasos poli-insaturados omega-3 inhibieron completamente la expresión de TNF- $\alpha$  inducida por ácidos grasos (Lee *et al.*, 2001; Shi *et al.*, 2006).

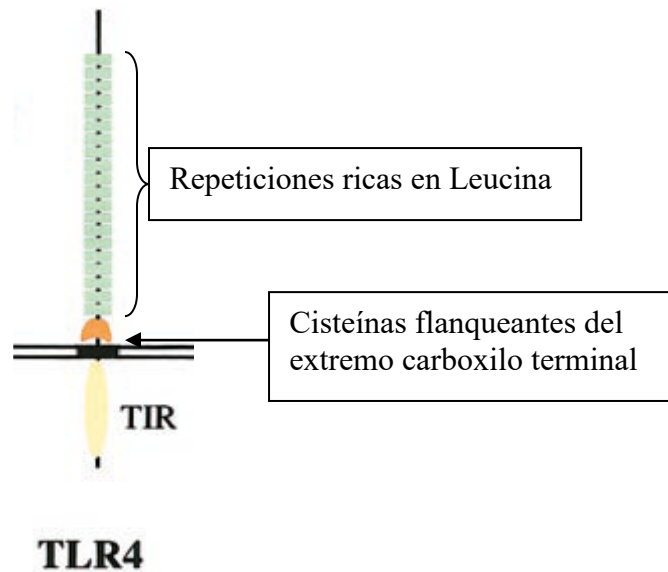


Figura 1. Diagrama esquemático del receptor TLR4. Tomado de Imler & Zheng, 2004.

#### Vía de señalización de TLR-4

TLR-4 requiere interactuar con dos correceptores para ser activado, CD14 y MD2. En un primer paso de la vía de señalización, el ligando se une a CD14 y posteriormente el complejo ligando/CD14 interactúa con el complejo TLR4/MD2 produciéndose una oligomerización del receptor (Rallabhandi *et al.*, 2006), entonces comienza una cascada de señalización compuesta por múltiples quinasas que resulta en la activación del complejo quinasa I- $\kappa$ B (IKK- $\alpha$  y - $\beta$ ) encargado de la fosforilación de I- $\kappa$ B, la proteína inhibidora del Factor Nuclear  $\kappa$  B (NF $\kappa$ B). Posteriormente a su fosforilación I- $\kappa$ B es degradada, liberando así a NF $\kappa$ B que ingresa al núcleo y actúa como factor de transcripción de diversos genes (Figura 2), entre ellos los responsables de dirigir la síntesis de potentes moléculas proinflamatorias como el TNF- $\alpha$ , la IL-6, la IL-8, la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1, *Monocyte Chemoattractant Protein-1*), las metaloproteinasas de matriz (MMPs, *Matrix Metalloproteinases*) y la iNOS (Kawai *et al.*, 1999; Schuster & Nelson, 2000; Berg *et al.*, 2004; Dandona *et al.*, 2007).

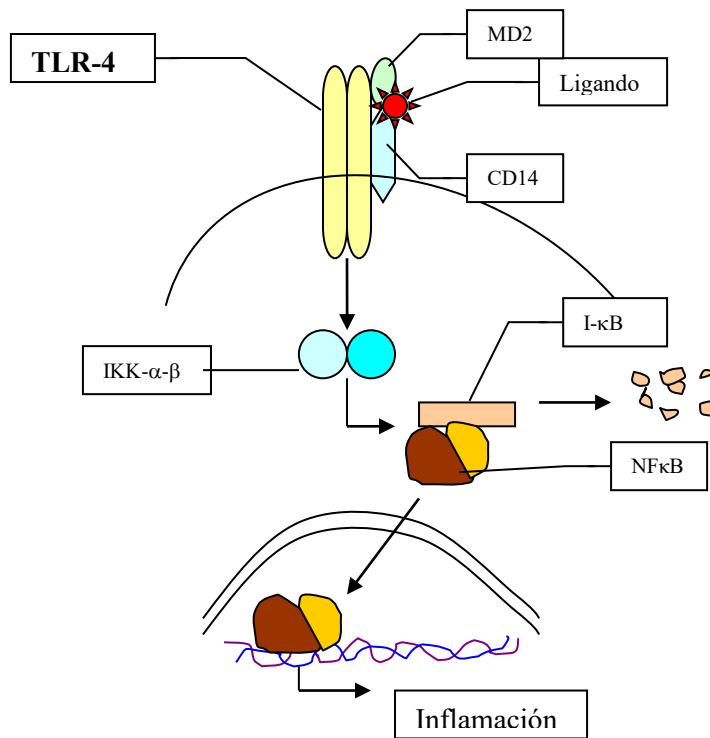


Figura 2. Diagrama esquemático simplificado de la vía de señalización de TLR-4.

#### **TLR-4: Obesidad, inflamación y resistencia a insulina**

Recientemente se ha sugerido que la vía de señalización de TLR-4 es un importante contribuyente a la resistencia a la insulina inducida por obesidad y, entre otros hallazgos experimentales que refuerzan esta hipótesis, se han obtenido evidencias de expresión funcional de TLR-4 en adipocitos y un aumento de la misma en modelos animales obesos (Shi *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2006). Más aún, se ha observado un potente incremento en la abundancia de ARNm de citoquinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$  e IL-6) en macrófagos y adipocitos de ratón estimulados con ácidos grasos, en contraposición con macrófagos y adipocitos de ratones *knock-out* y *knock-down*, respectivamente, para TLR-4 que recibieron el mismo estímulo, resultado que remarca la inducción de inflamación causada por ácidos grasos y mediada por TLR-4. Asimismo, se ha observado que ratones *TLR4*<sup>-/-</sup> no presentan activación de NFκB. Además, estos animales presentaron una atenuación en la inactivación del IRS-1 al ser comparados con ratones tipo salvaje, los cuales también desarrollaron resistencia a insulina, como pudo detectarse al realizarles el clamp hiperinsulinémico euglicémico posterior a una infusión de lípidos, mientras que los *TLR4*<sup>-/-</sup> fueron insulino-sensibles (Shi *et al.*, 2006).

## Estructura y variantes del gen *TLR-4*

El gen *TLR-4* mapea en el brazo largo del cromosoma 9 humano (9q32-33) (Rock *et al.*, 1998) y tiene una longitud de 13.159 pb (GenBank NC\_000009.10); codifica un ARN mensajero de 5503 pb que consta de 3 exones (1..234; 235..401; 402..5503) (GenBank NM\_138554.2); no obstante, algunos autores mencionan un cuarto exón alternativo, posicionado entre el primer y el segundo exón convencionales (Figura 3), pero al ser incorporado en el transcripto maduro dicho exón produciría una terminación temprana de la traducción (Smirnova *et al.*, 2000).

Han sido identificados 164 polimorfismos de nucleótido simple (SNPs, *Single Nucleotide Polymorphisms*) en el gen *TLR-4*, de los cuales los más estudiados son dos transiciones: + 896 A>G, que genera una sustitución de un residuo de ácido aspártico por uno de glicina en la secuencia aminoacídica (Asp299Gly, rs4986790), y +1196 C>T, que genera una sustitución de un residuo de treonina por uno de isoleucina en la secuencia proteica (Thr399Ile, rs4986791). Estas variantes alélicas se encuentran en la región que codifica el dominio proteico extracelular y presentan un desequilibrio de ligamiento entre el 85 y 95% (Kiechl *et al.*, 2002; Schmitt *et al.*, 2002) y en todas las poblaciones caucásicas estudiadas presentaron una frecuencia del 6 al 10% (Arbour *et al.*, 2000).

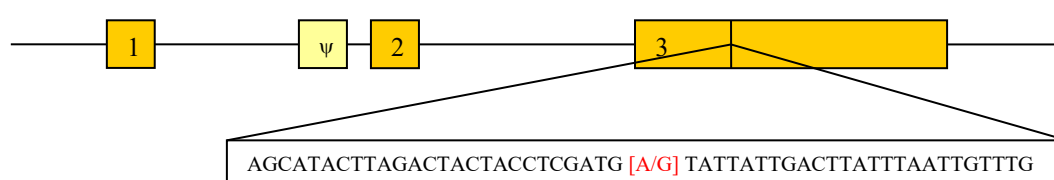


Figura 3. Diagrama esquemático del gen *TLR-4* mostrando los tres exones y un exón alternativo ( $\psi$ ). Se muestra además la secuencia que enmarca el polimorfismo rs4986790. Modificado de Smirnova *et al.* (2000).

## Estudios de asociación y funcionales de los polimorfismos de *TLR-4*

Se han estudiado los polimorfismos rs4986790 y rs4986791 en relación a diversas patologías, algunas de las cuales están estrechamente relacionadas al síndrome metabólico. Por ejemplo, el alelo Gly299 se ha asociado a menor riesgo de desarrollar

diabetes, enfermedad cardiovascular (Ameziane *et al.*, 2003; Kolek *et al.*, 2004; Balistreri *et al.*, 2004; Candore *et al.*, 2006) y aterosclerosis, menor engrosamiento de la íntima media arterial y bajos niveles de mediadores inflamatorios circulantes, por ejemplo, IL-6 y CRP (Kiechl *et al.*, 2002; Kolek *et al.*, 2004). Además, se ha observado su asociación a predisposición para shock séptico (Lorenz *et al.*, 2002a), susceptibilidad a brucelosis (Rezazadeh *et al.*, 2006), disminución del riesgo para periodontitis agresiva (James *et al.*, 2007), mayor riesgo de nacimiento prematuro (Lorenz *et al.*, 2002b), predisposición a enfermedades intestinales inflamatorias (Franchimont *et al.*, 2004; Gazouli *et al.*, 2005), resistencia a la enfermedad del legionario (Hawn *et al.*, 2005) y menor susceptibilidad a enfermedad de Alzheimer de aparición tardía (Minoretti *et al.*, 2006).

Es importante subrayar que un estudio alemán analizó la relación entre los polimorfismos citados del *TLR-4* y los componentes del síndrome metabólico arrojando resultados negativos (Illig *et al.*, 2003), pero dicho análisis se basó en una muestra poblacional de características muy diferentes a las del presente trabajo, presentando además ciertas carencias metodológicas, en particular una población heterogénea. Por otra parte, sus resultados no concuerdan con los obtenidos por otros autores.

Por otro lado, se han llevado a cabo análisis funcionales de los polimorfismos citados, que han producido resultados positivos. Arbour *et al.* (2000) observaron que la mutación Ile399 no interrumpe la vía de señalización de TLR-4 al recibir el estímulo de LPS, en cambio la mutación Gly299 sí lo hace. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Kiechl *et al.* (2002) que observaron mayor susceptibilidad a enfermedades infecciosas y menor riesgo de desarrollar aterosclerosis en pacientes portadores del polimorfismo Gly299, en relación a aquellos que poseían ambos polimorfismos (Gly299 e Ile399). Además, al realizar el experimento de rescate con el alelo salvaje, Arbour *et al.* (2000) observaron que se recuperó la respuesta al estímulo de LPS en células de las vías respiratorias obtenidas de pacientes con dichas mutaciones. Asimismo, Schmitt *et al.* (2002) observaron una respuesta fuertemente disminuida a LPS en monocitos homocigotas para la mutación Gly299 de TLR-4 basándose en la medición de la producción de TNF- $\alpha$ . También, Rallabhandi *et al.* (2006) observaron diferencias en la activación de NF $\kappa$ B al comparar células transfectadas con vectores de expresión de Asp299, por un lado, y Gly299, por el otro, sugiriendo que dicha diferencia podría deberse a una interacción deficiente de TLR-4 con un correceptor, con el ligando, o ambas alternativas.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivos principales:**

a) Analizar asociaciones potenciales entre el síndrome metabólico y el SNP (polimorfismo de nucleótido simple) rs4986790 de TLR4 en una población, tomada al azar, de donadores de sangre que concurren voluntariamente al Servicio de Hemoterapia del Hospital de Clínicas “José de San Martín” de la Universidad de Buenos Aires.

b) Investigar asociaciones entre el SNP rs4986790, la insulinemia en ayunas, la insulinorresistencia (medida por HOMA y QUICKI), los componentes individuales del síndrome metabólico y los niveles séricos de la adipocitoquina antiinflamatoria adiponectina, en aquella muestra poblacional.

### **Objetivos complementarios:**

a) Estudiar la prevalencia del síndrome metabólico, según la definición del NCEP/ATP III (*Third Report of the National Cholesterol Education Program’s Adult Treatment Panel III*), en una población, tomada al azar, de donadores de sangre que concurren voluntariamente al Servicio de Hemoterapia del Hospital de Clínicas “José de San Martín” de la Universidad de Buenos Aires (UBA).

b) Analizar las siguientes alteraciones metabólicas asociadas al síndrome metabólico: resistencia a la insulina (métodos HOMA y QUICKI, por medio de la determinación de glucemia e insulinemia en ayunas) y niveles séricos de adiponectina, en aquella muestra poblacional.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1. Diseño general**

Estudio epidemiológico no familiar transversal, de asociación genética entre el SNP rs4986790 de TLR4 y el síndrome metabólico en hombres adultos caucasianos sin antecedentes patológicos previos.

### **2. Selección de individuos**

Se analizó una muestra poblacional de 300 adultos argentinos, de sexo masculino, no emparentados, seleccionados al azar, que concurren al Servicio de Hemoterapia del Hospital de Clínicas “José de San Martín” de Buenos Aires con el fin de donar sangre. Los criterios de inclusión fueron: edad entre 18 y 75 años, raza caucásica, argentino nativo, ausencia de enfermedades conocidas (excepto obesidad, dislipidemias o hipertensión arterial) y ayuno nocturno previo de 12 horas. Todos los participantes de este proyecto firmaron el Consentimiento Informado, aprobado por el Comité de Ética de la institución de acuerdo a las disposiciones de la ANMAT y a las declaraciones de Helsinki y de la UNESCO.

### **3. Fenotipificación**

*Interrogatorio:* los participantes fueron interrogados sobre la existencia de componentes clínicos del síndrome metabólico: sobrepeso/obesidad, intolerancia a la glucosa, diabetes de tipo 2, hipertensión arterial, dislipidemias. Además, se interrogó sobre la presencia de estas manifestaciones clínicas en familiares de primer grado.

*Antropometría:* se estableció el grado de sobrepeso/obesidad por medio del índice de masa corporal (IMC), calculado con el peso y talla. Sobrepeso: 25-29,9 Kg/m<sup>2</sup>, obesidad leve: 30-34,9 Kg/m<sup>2</sup>, obesidad moderada: 35-39,9 Kg/m<sup>2</sup> y obesidad severa:  $\geq$  40 Kg/m<sup>2</sup>. Además se midió la circunferencia de cintura, indicador del grado de insulinosensibilidad y de adiposidad abdominal.

*Estudios bioquímicos:* se midió la insulinemia (método de radioinmunoensayo específico, kit Human Insulin-Specific RIA, Linco Research) y la glucemia (método de la glucosa oxidasa) en ayunas para cuantificar la insulinosensibilidad (QUICKI, *Quantitative Insulin Sensitivity Check Index*, y HOMA %S, *Homeostasis Model Assessment*) y la secreción de insulina (HOMA %B) (Katz *et al.*, 2000). El HOMA fue

calculado de manera automática con el software *HOMA Calculator Version 2.2* del *Oxford Centre for Diabetes Endocrinology and Metabolism* (Levy *et al.*, 1998).

El lipidograma (triglicéridos, colesterol total, colesterol LDL y colesterol HDL) fue realizado por medio de técnicas tradicionales en el plasma de cada individuo.

La adiponectina, principal molécula antiinflamatoria, fue medida en el suero de cada individuo usando el método RIA (kit Human Adiponectin Specific RIA, Linco Research).

*Identificación de individuos con síndrome metabólico:* para definir el síndrome metabólico se empleó la única definición validada, el *Third Report of the National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III (NCEP/ATP III)*, 3 o más de los siguientes criterios (Tabla I): obesidad abdominal, hipertrigliceridemia, colesterol HDL bajo, hipertensión arterial y glucemia en ayunas elevada (Grundy *et al.*, 2004). Posteriormente se realizó la comparación de los resultados con los obtenidos aplicando la definición del IDF anteriormente citada.

**Tabla I.** Criterios de inclusión para definir el síndrome metabólico, según el *NCEP/ATP III*.

<b>Criterio</b>	<b>Punto de Corte</b>
Circunferencia de cintura	≥102 cm en hombres ≥88 cm en mujeres
Triglicéridos	≥150 mg/dl
HDL	<40 mg/dl en hombres <50 mg/dl en mujeres
Presión arterial	≥130/85 o medicación antihipertensiva
Glucemia en ayunas	≥100 mg/dl *

\* El umbral de intolerancia a la glucosa (previamente ≥ 110 mg/dl) fue modificado de acuerdo a la definición actualizada de la Asociación Americana de Diabetes (ADA) (Grundy *et al.*, 2005).

*Grupos de estudio y control:* a partir de 300 individuos de sexo masculino, fenotipificados al azar, se crearon 4 grupos: por un lado, Grupo de Estudio con síndrome metabólico según la definición del NCEP/ATPIII y Grupo Control sin síndrome metabólico y, por otro lado, Grupo de Estudio con síndrome metabólico según la definición del IDF y el Grupo Control correspondiente.

#### 4. Análisis genéticos

*Extracción del ADN genómico:* se efectuó en leucocitos de sangre entera con la técnica CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) (Murray & Thompson, 1980).

*Genotipificación:* el SNP rs4986790 fue detectado por medio de la técnica RFLP-PCR, de acuerdo al protocolo de Gazouli *et al.* (2005). Específicamente, se efectuó la amplificación por PCR de la región nucleotídica de *TLR4* que contiene rs4986790, utilizando el *primer* anterógrado 5'-GATTAGCATACTTAGACTACTACCTCCCATG-3', y el *primer* retrógrado 5'-GATCAACTTCTGAAAAAGCATTCCCAC-3' (Invitrogen). La base subrayada en el *primer* anterógrado indica el nucleótido modificado a fin de generar un sitio de restricción para la enzima NcoI. El programa de ciclado de la PCR consistió en un primer paso de desnaturalización inicial a 94° durante 3 minutos, seguido de 40 ciclos de 94° durante 30 segundos, 55° durante 30 segundos y 72° durante 45 segundos, con un paso de elongación final a 72° durante 7 minutos. A continuación, el producto de PCR fue sometido a una digestión *overnight* utilizando la enzima de restricción NcoI (New England BioLabs). Para la identificación del genotipo, el producto de PCR digerido fue visualizado en un gel de agarosa al 3%, coloreado con bromuro de etidio, y expuesto a la luz ultravioleta previa corrida electroforética. El alelo mutado presentó la secuencia reconocida por NcoI (C/CATGG) y tuvo un tamaño de 223 pb (pares de bases), mientras que el alelo normal fue de 249 pb al no poseer el sitio de restricción (CCATGA) (Figura 4).

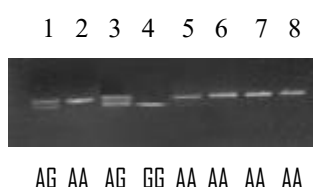


Figura 4. Fotografía de los productos de la digestión de *TLR4* con la enzima *NcoI*. Calle 1: Control positivo. Calle 2: Control negativo. Calle 3: Genotipo A/G. Calle 4: Genotipo G/G. Calles 5-8: Genotipo A/A.

#### 5. Análisis estadístico

Se utilizó el software SPSS (*Statistical Product and Service Solutions*) versión 11.5 para Windows. Los datos poblacionales y los dosajes bioquímicos se expresaron como media  $\pm$  desvío estándar. La ley de Hardy-Weinberg fue calculada para evaluar si existe desviación en la distribución de los genotipos de rs4986790. Se investigaron correlaciones entre rs4986790 y: a) el síndrome metabólico, b) los componentes

individuales del mismo, c) las características antropométricas y d) el perfil bioquímico (niveles de glucemia e insulinemia, HOMA %S y %B, QUICKI, adiponectinemia y perfil lipídico). Las variables paramétricas se estudiaron mediante ANOVA y test de Student. Los datos no paramétricos se analizaron usando los tests de Kruskal Wallis, Mann Whitney y chi cuadrado. Se efectuaron análisis genéticos de variancia para todas las variables cuantitativas por medio del procedimiento GLM (*Generalized Linear Model*). Análisis multivariados fueron efectuados para detectar interacciones plausibles y con el fin de descartar la participación de variables confusoras. Todos los análisis estadísticos no descriptivos fueron ajustados por la variable edad. El tamaño de la muestra fue adecuado (poder estadístico preestudio >80%) para discriminar una diferencia >30% en la frecuencia alélica (alelo menor) de rs4986790, entre los grupos de estudio y control. La  $P < 0,05$  fue considerada como estadísticamente significativa.

## 6. Utilización de recursos bioinformáticos

Se recurrió a dos bases de datos bioinformáticas construidas *in silico*, SIFT (*sorting intolerant from tolerant, a multistep prediction tool for amino acid substitutions*; clasificación de lo intolerante y lo tolerante, una herramienta predictiva en múltiples pasos para sustituciones de aminoácidos), y PolyPhen (*polymorphism phenotyping*, fenotipificación de polimorfismos), con el fin de predecir las potenciales consecuencias funcionales del SNP rs4986790.

Adicionalmente se analizaron los resultados disponibles en internet de un escaneo del genoma humano completo para diabetes tipo 2 en una cohorte Escandinava, denominado Iniciativa de la Genética de la Diabetes (DGI, *Diabetes Genetics Initiative*) llevada a cabo por varias instituciones en conjunto (*Broad Institute of Harvard and Massachusetts Institute of Technology (MIT), Lund University, and Novartis Institutes of BioMedical Research*). Se elaboró una base de datos con los polimorfismos más significativamente asociados a las siguientes características metabólicas ( $P < 0,0001$ ): glucemia de ayunas, HOMA-IR, circunferencia de cintura (casos y controles), hipertensión, presión sistólica, HDL y triglicéridos. Para cada variable metabólica se calculó el porcentaje de SNPs presentes en genes conocidos y a partir de los mismos se calculó el porcentaje de SNPs correspondientes a genes relacionados a procesos inflamatorios.

Los diferentes recursos informáticos utilizados son presentados en el Anexo I.

## RESULTADOS

La prevalencia del SNP rs4986790 en la muestra total (n = 300) fue 89,67% para Asp299Asp (n = 269), 10% para Asp299Gly (n = 30) y 0,33% para Gly299Gly (n = 1). La frecuencia del alelo menor fue de 0,053.

La distribución de rs4986790 respetó la ley de Hardy-Weinberg en la muestra total ( $\chi^2 = 0,028$ , P = 0,87).

La prevalencia del síndrome metabólico, de acuerdo a los criterios NCEP/ATPIII e IDF, fue de 29,7% (n = 89) y 40% (n = 120), respectivamente. La prevalencia de individuos con normopeso, sobrepeso y obesidad fue de 25,3% (n = 76), 48% (n = 144) y 26,7% (n = 80), respectivamente, y la prevalencia de individuos con sobrepeso u obesidad (IMC  $\geq$  25 kg/m<sup>2</sup>) fue de 74,7% (n = 224). Las características clínicas completas de la muestra total y de los subgrupos, con y sin síndrome metabólico, están resumidas en la Tabla II.

Tabla II. Características clínicas de la muestra total, y comparaciones de acuerdo a la presencia de síndrome metabólico.

	Total n = 300 (100%)	SM Positivo (NCEP/ATPIII) n = 89 (29,67%)	SM Negativo (NCEP/ATPIII) n = 211 (70,33%)	SM Positivo (IDF) n = 120 (40 %)	SM Negativo (IDF) n = 180 (60%)
Edad (años)	37,8 $\pm$ 10,8	44,0 $\pm$ 8,6	35,1 $\pm$ 10,5***	42,9 $\pm$ 9,5	34,3 $\pm$ 10,2***
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	28,2 $\pm$ 4,4	31,8 $\pm$ 4,4	26,6 $\pm$ 3,4***	30,9 $\pm$ 4,1	26,3 $\pm$ 3,5***
Normopeso (n, %)	76 (25,3)	2 (2,2)	74 (35,1) ***	2 (1,7)	74 (41,1) ***
Sobrepeso (n, %)	144 (48,0)	33 (37,1)	111 (52,6) *	61 (50,8)	83 (46,1)
Obesidad (n, %)	80 (26,7)	54 (60,7)	26 (12,3) ***	57 (47,5)	23 (12,8) ***
Diámetro de cintura (cm)	96,3 $\pm$ 11,9	106,5 $\pm$ 10,2	91,9 $\pm$ 9,8***	104,2 $\pm$ 9,7	90,9 $\pm$ 10,2***
Tabaquismo (n, %)	133 (44,3)	40 (44,9)	93 (44,1)	56 (46,7)	77 (42,8)
Presión arterial sistólica (mm Hg) §	127,1 $\pm$ 10,7	133,8 $\pm$ 8,6	124,3 $\pm$ 10,3***	132,5 $\pm$ 9,5	123,6 $\pm$ 10,1***
Presión arterial diastólica (mm Hg) §	80,4 $\pm$ 7,5	84,2 $\pm$ 6,8	78,8 $\pm$ 7,3***	83,2 $\pm$ 7,6	78,6 $\pm$ 6,9***
Glucemia de ayunas (mg/dl) §	93,0 $\pm$ 22,5	103,4 $\pm$ 37,3	88,6 $\pm$ 8,5***	100,7 $\pm$ 32,9	87,9 $\pm$ 8,0***
Colesterol total (mg/dl)	189,8 $\pm$ 42,9	207,6 $\pm$ 42,1	182,2 $\pm$ 41,1***	207,3 $\pm$ 42,6	178,1 $\pm$ 39,1***
Colesterol LDL (mg/dl) ¶	120,3 $\pm$ 34,5	129,7 $\pm$ 33,5	116,8 $\pm$ 34,3**	131,3 $\pm$ 33,1	113,9 $\pm$ 33,8***
Colesterol HDL (mg/dl) §	41,0 $\pm$ 11,0	35,3 $\pm$ 9,2	43,4 $\pm$ 10,9***	35,4 $\pm$ 8,9	44,7 $\pm$ 10,8***
Triglicéridos (mg/dl) §	142,9 $\pm$ 112,5	225,7 $\pm$ 152,7	107,9 $\pm$ 64,0***	210,5 $\pm$ 143,9	97,8 $\pm$ 47,3***
Insulinemia (uU/ml) # §	16,3 $\pm$ 10,3	22,9 $\pm$ 11,6	13,5 $\pm$ 8,2***	21,2 $\pm$ 12,1	13,2 $\pm$ 7,4***
Adiponectinemia (ng/ml) # §	11,3 $\pm$ 4,9	10,4 $\pm$ 5,0	11,7 $\pm$ 4,8	10,0 $\pm$ 5,3	12,1 $\pm$ 4,4**
HOMA-Beta (%) #	158,2 $\pm$ 53,1	174,2 $\pm$ 60,8	151,2 $\pm$ 48,0***	167,6 $\pm$ 59,0	152,2 $\pm$ 48,2***
HOMA-IR #	2,16 $\pm$ 1,10	2,89 $\pm$ 1,17	1,85 $\pm$ 0,91***	2,69 $\pm$ 1,22	1,83 $\pm$ 0,87***
QUICKI #	0,33 $\pm$ 0,06	0,30 $\pm$ 0,02	0,34 $\pm$ 0,06***	0,31 $\pm$ 0,05	0,34 $\pm$ 0,06**

¶ n = 287. # n = 214. Excepto para las variables de distribución no gaussiana (§), que fueron analizadas con el test de Mann-Whitney, el resto fueron examinadas con el test de Student. \* P < 0,05. \*\* P < 0,01. \*\*\* P < 0,0001

La Tabla III resume la prevalencia individual de los componentes del síndrome metabólico. El componente individual más frecuente, en la muestra total (n = 300), fue el criterio diámetro de cintura  $\geq 94$  cm (n = 170, 56,7%), tomado como punto de referencia para realizar la comparación entre ambos conceptos, NCEP/ATPIII e IDF, siendo el punto de corte para este último 90 cm. En la muestra con síndrome metabólico positivo de acuerdo a NCEP/ATPIII (n = 89, 29,67%), el componente individual más frecuente fue presión sistólica  $\geq 130$  mmHg y/o presión diastólica  $\geq 85$  mmHg (n = 76, 85,4%), en la muestra con síndrome metabólico negativo de acuerdo a NCEP/ATPIII (n = 211, 70,33%), fue HDL  $< 40$  mg/dl (n = 83, 39,3%), en la muestra con síndrome metabólico positivo de acuerdo a IDF (n = 120, 40%), fue diámetro de cintura  $\geq 94$  cm (n = 110, 91,7%) y en la muestra con síndrome metabólico negativo de acuerdo a IDF (n = 180, 60%), fueron diámetro de cintura  $\geq 94$  cm (n = 60, 33,3%) y presión sistólica  $\geq 130$  mmHg y/o presión diastólica  $\geq 85$  mmHg (n = 60, 33,3%).

Tabla III. Prevalencia individual de los componentes del síndrome metabólico

Criterio	Total n = 300 (100%)	SM Positivo (NCEP/ATPIII) n = 89 (29,67%)	SM Negativo (NCEP/ATPIII) n = 211 (70,33%)	SM Positivo (IDF) n = 120 (40 %)	SM Negativo (IDF) n = 180 (60%)
Diámetro de cintura $\geq 102$ cm (NCEP/ATPIII; n, %)	93 (31,0)	66 (74,2)	27 (12,8)	-	-
Diámetro de cintura $\geq 94$ cm (IDF; n, %)	170 (56,7)	-	-	110 (91,7)	60 (33,3)
Glucemia de ayunas $\geq 100$ mg/dl (n, %)	57 (19,0)	40 (44,9)	17 (8,1)	46 (38,3)	11 (6,1)
Trigliceridemia $\geq 150$ mg/dl (n, %)	93 (31,0)	63 (70,8)	30 (14,2)	75 (62,5)	18 (10,0)
HDL $< 40$ mg/dl (n, %)	151 (50,3)	68 (76,4)	83 (39,3)	93 (77,5)	58 (32,2)
Presión sistólica $\geq 130$ mmHg y/o presión diastólica $\geq 85$ mmHg	155 (51,7)	76 (85,4)	79 (37,4)	95 (79,2)	60 (33,3)

La Tabla IV resume las diferencias entre las características clínicas de la muestra total y la prevalencia del SNP rs4986790. En los individuos portadores del genotipo Asp299Asp (n = 269, 89,7%), la insulinemia de ayunas fue significativamente superior a la de los no portadores (n = 31, 10,3%); ( $16,9 \pm 10,5$  vs.  $11,1 \pm 5,8$  uU/ml, respectivamente, P = 0,0064). En los primeros, la secreción de insulina, expresada como HOMA-Beta, fue significativamente superior que en no portadores de Asp299Asp ( $161,0 \pm 53,8$  vs.  $132,2 \pm 38,6\%$ , respectivamente, P = 0,021). Asimismo, los individuos Asp299Asp positivos exhibieron niveles de insulinosensibilidad, expresados a través del HOMA-IR, significativamente inferiores que los individuos portadores de

Asp299Gly/Gly299Gly ( $2,23 \pm 1,12$  vs.  $1,58 \pm 0,72$ , respectivamente,  $P = 0,012$ ), aunque no se observaron diferencias entre ambos grupos en otro indicador de insulinosensibilidad, el QUICKI ( $0,33 \pm 0,06$  vs.  $0,35 \pm 0,04$ , respectivamente,  $P = 0,17$ ).

Tabla IV. Diferencias en las características clínicas de la muestra total de acuerdo a la prevalencia genotípica del SNP rs4986790

	Asp299Asp	Asp299Gly + Gly299Gly	P
N (%)	269 (89,7)	31 (10,3)	-
Edad (años)	$37,9 \pm 10,8$	$36,6 \pm 10,3$	0,53
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	$28,2 \pm 4,3$	$27,4 \pm 5,0$	0,33
Diámetro de cintura (cm)	$96,4 \pm 11,9$	$94,5 \pm 12,7$	0,38
Presión arterial sistólica (mm Hg)	$127,4 \pm 10,6$	$125,0 \pm 11,4$	0,23
Presión arterial diastólica (mm Hg)	$80,6 \pm 7,4$	$78,7 \pm 8,5$	0,30
Glucemia de ayunas (mg/dl)	$93,5 \pm 23,6$	$88,6 \pm 8,6$	0,33
Colesterol total (mg/dl)	$190,9 \pm 42,7$	$179,5 \pm 44,5$	0,48
Colesterol LDL (mg/dl)	$121,4 \pm 33,9$	$111,4 \pm 39,0$	0,14
Colesterol HDL (mg/dl)	$41,0 \pm 11,0$	$35,3 \pm 9,2$	0,28
Triglicéridos (mg/dl)	$143,0 \pm 108,6$	$142,2 \pm 143,7$	0,30
Insulinemia (uU/ml)	$16,9 \pm 10,5$	$11,1 \pm 5,8$	0,0064
Adiponectinemia (ng/ml)	$11,3 \pm 4,9$	$10,4 \pm 5,0$	0,48
HOMA-Beta (%)	$161,0 \pm 53,8$	$132,2 \pm 38,6$	0,021
HOMA-IR	$2,23 \pm 1,12$	$1,58 \pm 0,72$	0,012
QUICKI	$0,33 \pm 0,06$	$0,35 \pm 0,04$	0,17

Las Tablas V y VI muestran la ausencia de diferencias entre la prevalencia genotípica y alélica del SNP rs4986790 y el riesgo de síndrome metabólico de acuerdo a los criterios NCEP/ATPIII e IDF, respectivamente. Asimismo, tampoco existieron diferencias significativas entre la prevalencia individual de cada componente del síndrome metabólico y la distribución del SNP rs4986790 ( $P = NS$ , datos no exhibidos), ni entre esta última y la prevalencia de sobrepeso y/u obesidad ( $P = NS$ , datos no exhibidos) o el número de criterios para síndrome metabólico ( $P = NS$ , datos no exhibidos). Tampoco, en diversos modelos multivariados no exhibidos aquí, que incluyen entre otras las covariables edad e IMC, se ha asociado el SNP rs4986790 (Asp299Asp vs. Asp299Gly/Gly299Gly) a la variable dependiente síndrome metabólico, de acuerdo a NCEP/ATPIII e IDF ( $P = NS$ ). Sin embargo, la regresión multivariada paso a paso ascendente muestra que el HOMA-IR ha sido asociado, de manera independiente y significativa, a las variables Asp299Asp (coef.  $0,69 \pm 0,22$ ,  $F = 9,77$ ), trigliceridemia (coef.  $0,004 \pm 0,001$ ,  $F = 11,45$ ) y diámetro de cintura (coef.  $0,039 \pm 0,006$ ,  $F = 38,76$ ). Este resultado coincide, a su vez, con análisis de chi-cuadrado que muestran que la ausencia de Asp299Asp (y su alelo) se asocia significativamente a un

riesgo reducido de resistencia a la insulina, expresado por una mayor prevalencia de niveles de HOMA-IR por debajo de la mediana (1,90 en esta muestra,  $\chi^2 = 4,75$ , OR = 0,33 [IC 95% 0,12-0,90], P = 0,03, Tabla VII).

Tabla V. Prevalencia genotípica y alélica del SNP rs4986790 y riesgo de síndrome metabólico de acuerdo a los criterios NCEP/ATPIII

Genotipos/Alelos	SM Positivo NCEP/ATPIII n = 89 (29,67%)	SM Negativo NCEP/ATPIII n = 211 (70,33%)	$\chi^2$	OR (IC 95%)	P	P corregida
Asp299Asp (n, %)	83 (93,3)	186 (88,2)	1,76	1 (referencia)	0,18	0,26
Asp299Gly + Gly299Gly (n, %)	6 (6,7)	25 (11,8)		0,54 (0,22- 1,33)		
Asp299 (n, %)	171 (96,1)	397 (94,1)	0,98	1 (referencia)	0,32	0,43
Gly299 (n, %)	7 (3,9)	25 (5,9)		0,65 (0,28- 1,50)		

Tabla VI. Prevalencia genotípica y alélica del SNP rs4986790 y riesgo de síndrome metabólico de acuerdo a los criterios IDF

Genotipos/Alelos	SM Positivo IDF n = 120 (40%)	SM Negativo IDF n = 180 (60%)	$\chi^2$	OR (IC 95%)	P	P corregida
Asp299Asp (n, %)	111 (92,5)	158 (87,8)	1,73	1 (referencia)	0,19	0,26
Asp299Gly + Gly299Gly (n, %)	9 (7,5)	22 (12,2)		0,58 (0,26-1,29)		
Asp299 (n, %)	230 (95,8)	338 (93,9)	1,08	1 (referencia)	0,30	0,39
Gly299 (n, %)	10 (4,2)	22 (6,1)		0,67 (0,32-1,42)		

Tabla VII. Prevalencia genotípica y alélica del SNP rs4986790 y HOMA-IR

Genotipos/Alelos	HOMA-IR >1,90 (mediana) (n = 98)	HOMA-IR ≤ 1,90 (n = 106)	$\chi^2$	OR (IC 95%)	P	P corregida
Asp299Asp (n, %)	93 (94,9)	91 (85,8)	4,75	1 (referencia)	0,03	0,05
Asp299Gly + Gly299Gly (n, %)	5 (5,1)	15 (14,2)		0,33 (0,12- 0,90)		
Asp299 (n, %)	191 (97,4)	196 (92,5)	5,21	1 (referencia)	0,02	0,04
Gly299 (n, %)	5 (2,6)	16 (7,5)		0,32 (0,12- 0,86)		

La Tabla VIII sintetiza los resultados obtenidos al analizar los datos arrojados por el escaneo del genoma humano completo llevado a cabo por la Iniciativa de la Genética de la Diabetes mediante la tecnología de microarreglos.

Tabla VIII. Síntesis de los resultados del estudio DGI (P<0,0001).

	Nº total de SNPs	SNPs en genes conocidos	SNPs en genes relacionados a inflamación*	Genes **
Glucemia de ayunas	62	26 (41,94%)	13 (50%)	<i>LAMC2</i> (8 SNPs) <i>HPSE2</i> (1 SNP) <i>FHIT</i> (1 SNP) <b><i>CD28</i></b> (3 SNPs)
HOMA-IR	31	17 (54,84%)	7 (41,18%)	<b><i>DAPK1</i></b> (2 SNPs) <i>RYR3</i> (1 SNP) <i>CACNG3</i> (2 SNPs) <i>AKT3</i> (1 SNP) <i>TSPO</i> (1 SNP)
Circunferencia de cintura (casos)	49	18 (36,73%)	7 (38,89%)	<i>KCNAB1</i> (3 SNPs) <i>CACNA1C</i> (2SNPs) <b><i>CFH</i></b> (1 SNP) <i>PLCG2</i> (1 SNP)
Circunferencia de cintura (controles)	53	23 (43,4%)	2 (8,7%)	<i>DOK6</i> (1 SNP) <i>ATRN</i> (1 SNP)
Hipertensión	35	8 (22,86%)	1 (12,5%)	<b><i>TNIP1</i></b> (1 SNP)
Presión sistólica	34	13 (38,24%)	-	
HDL	61	18 (29, 51%)	2 (11,11%)	<b><i>LY96(MD-2)</i></b> (1SNP) <b><i>IKBKB</i></b> (1 SNP)
Trigliceridemia	61	21 (34,43%)	-	

\* Los porcentajes están basados en el número de SNPs correspondientes a genes conocidos.

\*\* Las denominaciones de los genes se encuentran en el Anexo II.

Como resultado de la búsqueda en PolyPhen se obtuvo un puntaje 1,865 para el SNP rs4986790, el cual corresponde a un impacto funcional posiblemente perjudicial (Tabla IX), mientras que no fue encontrado en la base de datos SIFT.

Tabla IX. Interpretación del impacto de los puntajes SIFT y PolyPhen. (Modificado de Bhatti *et al.*, 2006)

Puntaje SIFT	Impacto	Puntaje PolyPhen	Impacto
0 – 0,05	Intolerante	$\geq 2$	Probablemente perjudicial
0,051 – 0,1	Potencialmente intolerante	1,99 – 1,5	Posiblemente perjudicial
0,101 – 0,2	En el límite	1,49 – 1,25	Potencialmente perjudicial
0,201 – 1	Tolerante	1,24 – 1,00	En el límite
		0,99 – 0	Benigno

## DISCUSIÓN

El síndrome metabólico es una entidad caracterizada por una constelación de factores de riesgo de origen metabólico (Grundy, 1999) cuya creciente prevalencia varía de acuerdo al criterio empleado para su diagnóstico. Este concepto fue comprobado en el presente trabajo ya que al emplear los criterios diagnósticos IDF la prevalencia del síndrome fue notablemente mayor a la obtenida siguiendo los criterios del NCEP/ATPIII (40% vs. 29,7%, respectivamente). Dicha diferencia se debió a que 44 individuos con circunferencia de cintura  $\geq 94$  y  $< 102$  no cumplieron los requisitos diagnósticos para dicha variable según la definición del NCEP/ATPIII, pero si lo hicieron según los criterios IDF. Por otro lado, aquellos individuos con 3 ó 4 de los restantes criterios (Hipertensión, hiperglucemia, hipertrigliceridemia y niveles disminuidos de HDL) pero sin circunferencia de cintura aumentada son comprendidos por la definición del NCEP/ATPIII, pero la IDF los excluye, por considerar la circunferencia de cintura aumentada un requisito imprescindible para el diagnóstico (Grundy *et al.*, 2005). No obstante, este último caso muestra ser de rara ocurrencia debido a que el criterio diámetro de cintura aumentado fue el componente individual más frecuente en la población analizada.

Debido a las diferentes evidencias que en un estado de exceso de tejido adiposo, característico del síndrome metabólico existe un estado inflamatorio subclínico generalizado (Xu *et al.*, 2003; Berg & Scherer, 2005) se han comenzado a estudiar diferentes genes candidatos, como TNF- $\alpha$  y SOCS3, entre otros (Dandona *et al.*, 2004; Savage *et al.*, 2005). En el presente trabajo hemos decidido analizar la asociación entre síndrome metabólico y un polimorfismo de TLR4 debido a que la misma casi no ha sido investigada hasta la fecha, a pesar de tratarse de una molécula crucial en la respuesta inmune innata.

TLR4 es un correceptor de membrana que participa principalmente en la respuesta inmune innata a toxinas bacterianas, principalmente LPS de bacterias gram-negativas (Poltorak *et al.*, 1998). Diversos estudios funcionales del polimorfismo Asp299Gly de TLR4 realizados tanto *in vivo* como *in vitro* evidenciaron una respuesta disminuida a LPS en pacientes portadores de la variante 299Gly (Arbour *et al.*, 2000; Schmitt *et al.*, 2002; Rallabhandi *et al.*, 2006). Sin embargo, Erridge *et al.* (2003) observaron una carencia de asociación entre dicha variante y la vía de señalización de respuesta a LPS al realizar la estimulación *in vitro* de monocitos provenientes de pacientes portadores de una y otra variante. Dicha discordancia de resultados podría deberse a los distintos

tipos celulares utilizados en diferentes estudios (Hawn *et al.*, 2005), como también a una interacción del polimorfismo estudiado con otros polimorfismos presentes en diversas moléculas participantes en la transducción de señal (Franchimont *et al.*, 2004). Por su parte, Kinane *et al.* (2006) obtuvieron diferentes resultados funcionales al comparar distintos tipos celulares; dichos autores realizaron la inhibición de TLRs en una línea celular de monocitos estimulada con la bacteria gram-negativa *Porphyromonas gingivalis* y observaron de todos modos una elevada producción de citoquinas inflamatorias que proponen se debería a los numerosos receptores no-TLRs presentes en la membrana de dichas células, sugiriendo que esta sería la razón de la carencia de asociación observada por Erridge *et al.* (2003).

Asimismo, al analizar los resultados de su estudio funcional Arbour *et al.* (2000) concluyeron que la compleja respuesta fisiológica a los LPS inhalados podría deberse a la interacción de las variables de *TLR4* con otras variables genéticas y con factores adquiridos, debido a que no todos los individuos con la mutación tuvieron respuesta disminuida a LPS y no todos los que tuvieron dicha respuesta atenuada resultaron portadores de la variable genética estudiada.

Si bien James *et al.* (2007) observaron una cosegregación completa de los polimorfismos Asp299Gly y Thr399Ile tanto en los casos de periodontitis agresiva como en los controles, cabe destacar que en un estudio comparativo entre pacientes con shock séptico y un grupo control, no se observó diferencia en la prevalencia del polimorfismo doble Asp299Gly/Thr399Ile, sin embargo, el polimorfismo simple 299Gly estuvo presente sólo en individuos con shock séptico (Lorenz *et al.*, 2002a). Dicho aporte podría sumarse tanto a la evidencia de un rol funcional del polimorfismo en una respuesta inmune disminuida a LPS de bacterias gram-negativas, como a la posibilidad de una variación en dicha respuesta según la interacción genética implicada. El análisis de dichas interacciones complejas resulta muy dificultoso en el enfoque de búsqueda de genes candidatos individuales; para superar esta dificultad se están realizando diversas estrategias de investigación del genoma completo entre las cuales una de las más relevantes es la Iniciativa de la Genética de la Diabetes (DGI) anteriormente mencionada que analizó 386.731 SNPs en 1.464 pacientes con diabetes tipo 2 y 1.467 controles (DGI, 2007).

Dada la naturaleza poligénica del síndrome metabólico cabría esperar que, en múltiples estudios de asociación, se encontraran asociados al mismo distintos haplotipos, dependiendo principalmente del origen étnico de la población implicada. En

efecto, se han observado resultados tanto positivos como negativos al estudiar la asociación entre Asp299Gly e inflamación intestinal crónica, dependiendo del origen de la población en cuestión. Asimismo, se han observado diferentes haplotipos asociados a esta enfermedad en diversas poblaciones estudiadas (Franchimont *et al.*, 2004). Otras posibles causas de resultados discordantes entre distintos estudios de asociación serían la utilización de diferentes criterios de inclusión, como también de diferentes umbrales o puntos de corte para las variables implicadas (Balistreri *et al.*, 2004)

Por su parte, Hawn *et al.* (2005), observaron que el alelo 299Gly confiere resistencia a la enfermedad del legionario, un tipo de neumonía causada por la bacteria gram-negativa flagelada intracelular, *Legionella pneumophila*, sugiriendo que dicho polimorfismo tendría un rol benéfico o deletéreo patógeno dependiente. Asimismo, en otro estudio, el alelo 299Gly estuvo significativamente asociado a un menor riesgo de periodontitis agresiva, causada por un conjunto de especies bacterianas, principalmente gram-negativas anaerobias (James *et al.*, 2007), a pesar de que estudios previos no habían encontrado una asociación significativa (Brett *et al.*, 2005 & Schroder *et al.*, 2005 *apud* James *et al.*, 2007). Sin embargo, el rol protector de la variante 299Gly no se debió a una respuesta inmune aumentada, sino por el contrario disminuida, preservando así a los portadores de la misma de las consecuencias deletéreas de una respuesta inmune exacerbada. De este modo, los resultados de James *et al.* (2007) concuerdan con los obtenidos por otros autores respecto a una inmunidad innata atenuada en presencia del alelo 299Gly.

Sin embargo, al observarse el desarrollo de la enfermedad periodontal en portadores de esta variante alélica y, por encontrarse el tabaquismo entre uno de los factores que predisponen a la misma, los autores atribuyeron a este factor la causa del desarrollo de la enfermedad en los pacientes portadores del polimorfismo 299Gly (James *et al.*, 2007). Por otro lado, ante la evidencia que un polimorfismo de TLR5 aumentaba la susceptibilidad a la enfermedad del legionario sólo en individuos no fumadores, en contraposición con los fumadores, Hawn *et al.* (2005) estudiaron la misma variable en los subgrupos correspondientes para el polimorfismo Asp299Gly de TLR4, pero debido al número reducido de individuos analizados el estudio careció del poder estadístico suficiente para permitir un claro discernimiento de los resultados.

Por otra parte, basándose en las consecuencias funcionales del polimorfismo en heterocigosis observado tanto en su trabajo como en trabajos previos Hawn *et al.* (2005) sugirieron que el alelo Gly actuaría de manera dominante sobre el alelo de tipo salvaje,

al menos en cuanto respecta a las alteraciones de la respuesta inmune. No obstante, aunque no analizaron monocitos de individuos heterocigotas para el polimorfismo, Kinane *et al.* (2006) proponen que debido al exceso de expresión de TLR4 en dicho tipo celular no existiría diferencia significativa entre los portadores del genotipo salvaje y los heterocigotas Asp299Gly.

Ante diversas evidencias que el componente lipídico de los LPS sería el responsable de desencadenar la vía de señalización de TLR4 (Lee *et al.*, 2001; Shi *et al.*, 2006), y que ante un aumento de tejido adiposo con el consecuente aumento de AGNE (ácidos grasos no esterificados) y adipocitoquinas circulantes existe un estado inflamatorio crónico subclínico generalizado (Xu *et al.*, 2003; Berg & Scherer, 2005) que favorecería el desarrollo de resistencia a insulina (Hotamisligil *et al.*, 1993; Savage *et al.*, 2005), cabría esperar que la presencia de la variante 299Gly tuviera un rol protector para resistencia a insulina, síndrome metabólico y otras comorbilidades.

En efecto, cuando Kiechl *et al.* (2002) analizaron sujetos portadores del polimorfismo 299Gly comparándolos con un grupo de individuos no portadores de dicho polimorfismo, obtuvieron como resultado en los primeros un menor nivel de moléculas proinflamatorias, mayor incidencia de infecciones agudas (aunque no crónicas) y menor prevalencia de aterosclerosis. Asimismo, Balistreri *et al.* (2004) obtuvieron resultados positivos al analizar la asociación del mismo polimorfismo con un menor riesgo de desarrollar aterosclerosis.

También, Ameziane *et al.* (2003) observaron una asociación positiva entre el polimorfismo Asp299Gly y un riesgo reducido de eventos coronarios agudos, como también menores niveles plasmáticos de fibrinógeno y la molécula de adhesión celular vascular (VCAM)-1 (*v*ascular *c*ellular *a*dhesion *m*olecule).

Sin embargo, Illig *et al.* (2003) no obtuvieron evidencias de asociación entre el polimorfismo Asp299Gly y diversos marcadores inflamatorios ni con componentes individuales del síndrome metabólico, excepto una pequeña tendencia de la hipertensión que deja abierta la posibilidad de un rol protector del polimorfismo 299Gly. Dicho trabajo constituye el único antecedente de un estudio de asociación entre el polimorfismo Asp299Gly de TLR4 y los componentes individuales del síndrome metabólico. A pesar de ello, no analizó la posibilidad de asociación del polimorfismo con los índices de resistencia a insulina.

En lo que respecta al presente trabajo, la prevalencia del alelo 299Gly (5,3%) fue similar a la observada en trabajos previos realizados por diferentes autores (Lorenz *et*

*al.*, 2002a; Ameziane *et al.*, 2003; Illig *et al.*, 2003). No se encontró asociación entre el polimorfismo estudiado y el síndrome metabólico, ni con ninguno de sus componentes individuales, sin embargo, se observó en individuos portadores del alelo salvaje en estado homocigota una mayor insulinemia de ayunas, mayor secreción de insulina y menor insulinosensibilidad, según los índices HOMA-Beta y HOMA-IR, respectivamente, respecto a los individuos portadores de la mutación ya sea en estado homo o heterocigota. Dichos resultados apoyan la evidencia de una participación del sistema inmune en el proceso de desarrollo de resistencia a insulina, por lo que sería interesante corroborar en dichos pacientes los niveles séricos de marcadores inflamatorios, como TNF- $\alpha$ , IL-6 y CRP.

Por otro lado, debido a que en el presente estudio el HOMA-IR ha sido asociado de manera independiente y significativa tanto al genotipo que codifica Asp299Asp como a trigliceridemia y a circunferencia de cintura, resultaría interesante re-considerar la presencia de la resistencia a insulina en el contexto de la etiología del síndrome metabólico que ha sido discutida por diversos autores, algunos de los cuales proponen la denominación “síndrome de resistencia a insulina” por considerar dicho fenómeno la causa subyacente del resto de las variables involucradas (Grundy *et al.*, 2005). Nuestros resultados avalan una asociación entre el alelo 299Asp y un estado de resistencia a la insulina, según el índice HOMA-IR, que a su vez resultó asociado con trigliceridemia y circunferencia de cintura, sugiriendo un posible rol del alelo 299Asp en las variables bioquímicas y antropométricas relacionadas con el síndrome metabólico y su componente fisiopatológico esencial, como es la resistencia a la insulina.

No obstante, al analizar los resultados del QUICKI, otro indicador de insulinosensibilidad, no se hallaron diferencias significativas entre los individuos portadores de la variante Asp299Asp y aquellos que poseen Asp299Gly/Gly299Gly. Esta discordancia podría deberse a que el modelo HOMA computarizado actualmente utilizado posee soluciones no lineales, en contraposición al modelo HOMA originalmente utilizado (Wallace *et al.*, 2004), por lo cual, al tratarse de un modelo altamente correlacionado con el logaritmo del HOMA tradicional (Katz *et al.*, 2000) el QUICKI presentaría sus mismas limitaciones y desventajas con respecto al modelo computarizado del HOMA (Wallace *et al.*, 2004).

Finalmente, al analizar los resultados de la DGI disponibles en Internet no se encontró asociado a ninguno de los componentes individuales del síndrome metabólico ningún polimorfismo del gen *TLR4*, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en nuestro

trabajo. Tampoco apareció asociado a HOMA-IR algún polimorfismo de *TLR4*, sin embargo, los autores no mencionan la utilización del modelo computarizado del HOMA, habiendo analizado además esta característica sólo en el grupo control y no en los pacientes con diabetes tipo 2.

Es interesante remarcar que si bien en el estudio DGI no se encontró una asociación significativa con algún polimorfismo del gen *TLR4*, si se encontraron asociados a las características metabólicas analizadas varios polimorfismos correspondientes a genes relacionados a procesos inflamatorios, como *CD28*, *DAPK1*, *CFH*, *ATRN*, *TNIP1*, *MD-2* e *IKBKB*. Los dos últimos, que aparecieron asociados a bajos niveles de HDL, corresponden a moléculas directamente implicadas en la vía de señalización de *TLR4*. MD-2 es una proteína secretada que se une al dominio extracelular de TLR4 siendo necesaria para una óptima respuesta a LPS mediada por dicho receptor; además se ha sugerido su rol como chaperona participando en el transporte de TLR4 a la superficie celular (Rallabhandi *et al.*, 2006). IKBKB, más conocida como IKK- $\beta$  forma parte junto con IKK- $\alpha$  del complejo kinasa I- $\kappa$ B que se encuentra aguas abajo del receptor TLR4 y que se encarga de fosforilar la proteína inhibidora de NF $\kappa$ B permitiendo su activación como factor de transcripción de diversos genes involucrados en la inmunidad innata (Schuster & Nelson, 2000).

Estos resultados están en concordancia con diversos estudios que evidenciaron una mejoría en los niveles de resistencia a insulina y dislipidemias relacionadas a obesidad al inhibir la señalización de IKK- $\beta$  (Berg *et al.*, 2004). Asimismo, se observó que en un exceso de MD-2, que parecería competir con los LPS, es amplificada la vía de señalización de TLR4. Además, basándose en un modelo hipotético del ectodominio de TLR4, el cambio de un Aspartato por una Glicina en el residuo 299 afectaría la estructura proteica secundaria dificultando la interacción del receptor con su ligando (LPS) y/o con su correceptor MD-2 (Rallabhandi *et al.*, 2006). El resultado de nuestra búsqueda en la base de datos PolyPhen fue concordante con este modelo hipotético, ya que arrojó un impacto funcional posiblemente perjudicial para el SNP rs4986790.

En conclusión, nosotros no encontramos una asociación significativa entre el polimorfismo 299Gly y el síndrome metabólico ni ninguno de sus componentes individuales. Dicho alelo sí se encontró asociado a menores niveles de insulinemia de ayunas y mayores niveles de insulinosensibilidad, insinuando un posible rol protector de dicho polimorfismo para el desarrollo de síndrome metabólico. Por el contrario, el alelo

299Asp ha sido asociado a resistencia a la insulina, según el índice HOMA-IR, que estuvo correlacionado además con la trigliceridemia y la circunferencia de cintura, insinuando un posible rol de susceptibilidad para el desarrollo de síndrome metabólico. Se sugiere una revalorización del rol de la resistencia a insulina en el contexto del síndrome metabólico y una extensión de estudios de este tipo a otros genes involucrados en procesos inflamatorios. El análisis de polimorfismos en genes candidatos representa un importante aporte para el conocimiento fisiopatológico de estas entidades poligénicas, su prevención y abre una importante posibilidad de mejorar la terapéutica en forma personalizada.

## **ANEXO I. Recursos bioinformáticos utilizados.**

DGI (<http://www.broad.mit.edu/diabetes/>)

NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Oligo Calculator (<http://www.pitt.edu/~rsup/OligoCalc.html>)

PolyPhen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>)

Seattle SNPs (<http://pga.mbt.washington.edu/>)

SIFT (<http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html>)

SNP detection with mutagenic primers ([http://insilico.ehu.es/restriction/mutation\\_seq/](http://insilico.ehu.es/restriction/mutation_seq/))

SNPper (<http://snpper.chip.org/>)

SNPseek (<http://snp.wustl.edu/SNPseek/index.cgi>)

## **ANEXO II. Siglas empleadas en el texto.**

ADA (*American Diabetes Association*, Asociación Americana de Diabetes)  
AGNE (ácidos grasos no esterificados)  
AKT3 (Proteína kinasa B)  
ATRN (Atractina)  
 $\beta$ 3-AR (*beta-3 Adrenergic Receptor*, receptor  $\beta$ -3 adrenérgico)  
CACNA1C (Subunidad alpha 1C del canal de calcio dependiente de voltaje)  
CACNG3 (Subunidad gamma 3 del canal de calcio dependiente de voltaje)  
CFH (Factor H del complemento)  
CRP (*C-Reactive Protein*, proteína C reactiva)  
DAPK1 (Proteína kinasa 1 asociada a la muerte)  
DGI (*Diabetes Genetics Initiative*, Iniciativa de la Genética de la Diabetes)  
DOK6 (Proteína 6 de acoplamiento)  
FHIT (Gen trío frágil de histidina)  
GLM (*Generalized Linear Model*)  
HDL (*High Density Lipoprotein*, lipoproteína de alta densidad)  
HPSE2 (Heparanasa 2)  
HOMA (*Homeostasis Model Assessment*)  
IDF (*International Diabetes Foundation*, Fundación Internacional de Diabetes)  
I- $\kappa$ B (proteína inhibidora del Factor Nuclear  $\kappa$  B)  
IKKB (Kinasa B del complejo I- $\kappa$ B)  
IL-6 (Interleuquina 6)  
IMC (Índice de Masa Corporal)  
iNOS, (*Inducible Nitric Oxide Synthase*, sintasa de óxido nítrico inducible)  
IRS-1 (*Insulin Receptor Substrate-1*, sustrato del receptor de insulina 1)  
JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*)  
KCNAB1 (Canal de potasio)  
LAMC2 (Laminina gamma 2)  
LDL (*Low Density Lipoprotein*, lipoproteína de baja densidad)  
LPS (Lipopolisacáridos)  
LRR (*Leucine-Rich Repeat*, repeticiones ricas en leucina)  
LY96 (Antígeno linfocitario 96)

MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein-1*, proteína quimioatrayente de monocitos)

MMPs (*Matrix Metalloproteinases*, metaloproteinasas de matriz)

NCEP/ATP III (*Adult Treatment Panel III of the National Cholesterol Education Program*, 2001)

NF $\kappa$ B (*Nuclear Factor Kappa B*)

PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*, patrones moleculares asociados a patógenos)

PLCG2 (Fosfolipasa C, gamma 2)

PolyPhen (*Polymorphism Phenotyping*, fenotipificación de polimorfismos)

PPAR- $\gamma$  (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*, receptor gamma activado por el proliferador peroxisomal)

QUICKI (*Quantitative Insulin Sensitivity Check Index*)

RE (Reticulo Endoplásmico)

ROS (*Reactive Oxygen Species*, especies de oxígeno reactivo)

RYR3 (Receptor 3 de rianodina)

SIFT (*Sorting Intolerant From Tolerant, a multistep prediction tool for amino acid substitutions*; clasificación de lo intolerante y lo tolerante, una herramienta predictiva en múltiples pasos para sustituciones de aminoácidos)

SNPs, (*Single Nucleotide Polymorphisms*, polimorfismos de nucleótido simple)

SOCS3 (*Suppressor Of Cytokine Signaling 3*, supresor de la señalización de citoquinas)

SPSS (*Statistical Product and Service Solutions*)

TIR (*Toll/IL-1 Receptor*)

TLR (*Toll-Like Receptors*)

TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor alpha*, factor de necrosis tumoral *alpha*)

TNIP1 (Proteína de interacción con TNFAIP3)

TSPO (Proteína translocadora)

(VCAM)-1 (*Vascular Cellular Adhesion Molecule*, molécula de adhesión celular vascular)

VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*, lipoproteína de muy baja densidad)

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ameziane N, Beillat T, Verpillat P, Chollet-Martin S, Aumont MC, Seknadji P, Lamotte M, Lebret D, Ollivier V, de Prost D. Association of the Toll-Like Receptor 4 Gene Asp299Gly Polymorphism With Acute Coronary Events. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:61-64

Arbour NA, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, Frees M, Watt JL, Schwartz DA. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* 2000; 25:187-191

Balistreri CR, Candore G, Colonna-Romano G, Lio D, Caruso M, Hoffmann E, Franceschi C, Caruso C. Role of Toll-like receptor 4 in acute myocardial infarction and longevity. *JAMA* 2004; 292:2339–2340.

Barker, DJ. The developmental origins of adult disease. *J Am Coll Nutr* 2004; 23, 588S–595S

Berg AH, Lin Y, Lisanti MP, Scherer PE. Adipocyte differentiation induces dynamic changes in NF-kappaB expression and activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 287:E1178–E1188

Berg AH, Scherer PE. Adipose Tissue, Inflammation, and Cardiovascular Disease. *Circ Res* 2005; 96:939-949

Bhatti P, Church DM, Rutter JL, Struewing JP, Sigurdson AJ. Candidate Single Nucleotide Polymorphism Selection using Publicly Available Tools: A Guide for Epidemiologists. *American Journal of Epidemiology* 2006; 164(8):794-804

Candore G, Aquino A, Balistreri CR, Bulati M, Di Carlo D, Grimaldi MP, Listi F, Orlando V, Vasto S, Caruso M, Colonna-Romano G, Lio D, Caruso C. Inflammation, longevity, and cardiovascular diseases: role of polymorphisms of TLR4. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1067:282-7

Chew GT, Gan SK, Watts GF. Revisiting the metabolic syndrome. *MJA* 2006; 185(8):445-449

Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *TRENDS in Immunology* 2004; 25(1):4-7

Dandona P, Chaudhuri A, Mohanty P, Ghanim H. Anti-inflammatory effects of insulin. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007; 10:511–517

Diabetes Genetics Initiative of Broad Institute of Harvard and MIT, Lund University, and Novartis Institutes of BioMedical Research. *Science* 2007; 316:1331-1336

Erridge C, Stewart J, Poxton IR. Monocytes Heterozygous for the Asp299Gly and Thr399Ile Mutations in the Toll-like Receptor 4 Gene Show No Deficit in Lipopolysaccharide Signalling. *J Exp Med* 2003; 197(12):1787–1791

Ford ES. Risks for all-cause mortality, cardiovascular disease, and diabetes associated with the metabolic syndrome: a summary of the evidence. *Diabetes Care* 2005; 28(7):1769-78

Forsen T, Eriksson J, Tuomilehto J, Reunanen A, Osmond C, Barker D. The fetal and childhood growth of persons who develop type 2 diabetes. *Ann Intern Med* 2000; 133:176–182

Fortunato G, Di Taranto MD. Polymorphisms and the expression of genes encoding enzymes involved in cardiovascular diseases. *Clinica Chimica Acta* 2007; 381:21–25

Franchimont D, Vermeire S, El Housni H, Pierik M, Van Steen K, Gustot T, Quertinmont E, Abramowicz M, Van Gossum A, Devière J, Rutgeerts P. 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* 2004; 53:987-992

Freeman DJ, Norrie J, Caslake MJ, Gaw A, Ford I, Lowe GD, O'Reilly DS, Packard CJ, Sattar N. C-reactive protein is an independent predictor of risk for the development of diabetes in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Diabetes* 2002; 51:1596–1600

Gazouli M, Mantzaris G, Kotsinas A, Zacharatos P, Papalambros E, Archimandritis A, Ikonopoulou J, Gorgoulis VG. Association between polymorphisms in the Toll-like receptor 4, CD14, and CARD15/NOD2 and inflammatory bowel disease in the Greek population. *World J Gastroenterol* 2005; 11(5):681-685

Gotoh T, Mori M. Nitric Oxide and Endoplasmic Reticulum Stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26:1439-1446

Gregor M, Hotamisligil G. Adipocyte Stress: The Endoplasmic Reticulum and Metabolic Disease. *J Lipid Res* 2007; 48(9):1905-14

Groop L. Genetics of the metabolic syndrome. *British Journal of Nutrition* 2000; 83(1), S39–S48

Grundy SM, Brewer HB Jr, Cleeman JI, Smith SC Jr, Lenfant C; American Heart Association; National Heart, Lung, and Blood Institute. Definition of metabolic

syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation* 2004; 109(3):433-8

Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, Gordon DJ, Krauss RM, Savage PJ, Smith SC Jr, Spertus JA, Costa F. Diagnosis and Management of the Metabolic Syndrome: An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation* 2005;112:2735-2752

Grundy SM. Hypertriglyceridemia, insulin resistance, and the metabolic syndrome. *Am J Cardiol* 1999; 83:25F-9F

Hales CN, Barker DJP. The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull* 2001; 60:5–20

Hales CN, Barker DJP. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 1992; 35:595–601

Hawn, T. R., A. Verbon, M. Janer, L. P. Zhao, B. Beutler, and A. Aderem. Toll-like receptor 4 polymorphisms are associated with resistance to Legionnaires' disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 2487–2489

Hotamisligil G, Shargill N, Spiegelman B. Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity linked insulin resistance. *Science* 1993; 259:87–91

Illig T, Bongardt F, Schöpfer A, Holle R, Müller S, Rathmann W, Koenig W, Meisinger C, Wichmann HE, Hubert Kolb H, for the KORA Study Group. The Endotoxin Receptor TLR4 Polymorphism Is Not Associated With Diabetes or Components of the Metabolic Syndrome. *Diabetes* 2003; 52:2861-2864

Imler J, Zheng L. Biology of Toll receptors: lessons from insects and mammals. *J Leukoc Biol* 2004; 75:18–26

James JA, Poulton KV, Haworth SE, Payne D, McKay IJ, Clarke FM, Hughes FJ, Linden GJ. Polymorphisms of TLR4 but not CD14 are associated with a decreased risk of aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol* 2007; 34:111–117

Jaquet D, Gaboriau A, Czernichow P, Levy-Marchal C. Insulin resistance early in adulthood in subjects born with intrauterine growth retardation. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:1401–1406

Jeppesen J, Hein HO, Suadicani P, Gyntelberg F. High Triglycerides and Low HDL Cholesterol and Blood Pressure and Risk of Ischemic Heart Disease. *Hypertension* 2000; 36:226-232

Kahn R, Buse J, Ferrannini E, Stern M; American Diabetes Association; European Association for the Study of Diabetes. The metabolic syndrome: time for a critical

appraisal: joint statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care* 2005; 28:2289-304

Katz A, Nambi SS, Mather K, Baron AD, Follmann DA, Sullivan G, Quon MJ. Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:2402-10

Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 1999; 11:115–122

Kiechl S, Lorenz E, Reindl M, Wiedermann CJ, Oberhollenzer F, Bonora E, Willeit J, Schwartz DA. Toll-Like Receptor 4 Polymorphisms and Atherogenesis. *N Engl J Med* 2002; 347:185-92

Kinane DF, Shiba H, Stathopoulou PG, Zhao H, Lappin DF, Singh A, Eskan MA, Beckers S, Waige S, Alpert B and Knudsen TB. Gingival epithelial cells heterozygous for Toll-like receptor 4 polymorphisms Asp299Gly and Thr399Ile are hypo-responsive to *Porphyromonas gingivalis*. *Genes and Immunity* 2006; 7: 190–200

Kolek MJ, Carlquist JF, Muhlestein JB, Whiting BM, Horne BD, Bair TL, Anderson JL. Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism is associated with reductions in vascular inflammation, angiographic coronary artery disease, and clinical diabetes. *Am Heart J* 2004; 148(6):1034-40

Lee JY, Sohn KH, Rhee SH, Hwang D. Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 2001; 276:16683–16689

Levy JC, Matthews DR, Hermans MP. Correct homeostasis model assessment (HOMA) evaluation uses the computer program. *Diabetes Care* 1998; 21:2191-2

Lorenz E, Hallman M, Marttila R, Haataja R, Schwartz DA. Association between the Asp299Gly polymorphisms in the toll-like receptor 4 and premature births in the Finnish population. *Pediatr Res* 2002; 52:373–376

Lorenz E, Mira JP, Frees KL, Schwartz DA. Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. *Arch Intern Med* 2002; 162:1028–1032

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388:394–397

Medzhitov, R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2001; 1:135–145

Minoretto P, Gazzaruso C, Vito CD, Emanuele E, Bianchi M, Coen E, Reino M, Geroldi D. Effect of the functional toll-like receptor 4 Asp299Gly polymorphism on susceptibility to late-onset Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 2006; 391(3):147-9

Misra A, Vikram N. Clinical and pathophysiological consequences of abdominal adiposity and abdominal adipose tissue depots. *Nutrition* 2003; 19:457–466

Mlinar B, Marc J, Janež A, Pfeifer M. Molecular mechanisms of insulin resistance and associated diseases. *Clinica Chimica Acta* 2007; 375:20–35

Moore SE, Halsall I, Howarth D, Poskitt EME, Prentice AM. Glucose, insulin and lipid metabolism in rural Gambians exposed to early malnutrition. *Diabet Med* 2001; 18:646–53

Murray MG, Thompson WF. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* 1980; 8(19):4321-5

National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 2002; 106: 3143-3421

Neel JV. Diabetes mellitus: a thrifty\_ genotype rendered detrimental by “progress”. *Am J Hum Genet* 1962; 14:353–62

Oliver MH, Hawkins P, Breier BH, Van Zijl PL, Sargison SA, Harding JE. Maternal undernutrition during the periconceptual period increases plasma taurine levels and insulin response to glucose but not arginine in the late gestation fetal sheep. *Endocrinology* 2001; 142:4576–4579

Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B, Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998; 282:2085–2088

Prentice AM. Early influences on human energy regulation: Thrifty genotypes and thrifty phenotypes. *Physiology & Behavior* 2005; 86:640–645

Prentice AM. Intrauterine factors, adiposity, and hyperinsulinaemia. *BMJ* 2003; 327:880–1

Rallabhandi P, Bell J, Boukhvalova MS, Medvedev A, Lorenz E, Arditi M, Hemming VG, Blanco JC, Segal DM, Vogel SN. Analysis of TLR4 polymorphic variants: new

insights into TLR4/MD-2/CD14 stoichiometry, structure, and signaling. *J Immunol* 2006; 177(1):322-32

Reaven GM. Insulin Resistance/Compensatory Hyperinsulinemia, Essential Hypertension, and Cardiovascular Disease. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 88(6):2399–2403

Rezazadeh M, Hajilooi M, Rafiei A, Haidari M, Nikoopour E, Kerammat F, Mamani M, Ranjbar M, Hashemi H. TLR4 polymorphism in Iranian patients with brucellosis. *Journal of Infection* 2006; 53, 206-210

Rock, F. L., G. Hardiman, J. C. Timans, R. A. Kastelein, and J. F. Bazan. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 588–593

Ruan H, Lodish HF. Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2003; 14:447–455

Savage D, Petersen K, Shulman G. Mechanisms of Insulin Resistance in Humans and Possible Links With Inflammation. *Hypertension* 2005; 45:828-833

Schmitt C, Humeny A, Becker CM, Brune K, Pahl A. Polymorphisms of *TLR4*: Rapid Genotyping and Reduced Response to Lipopolysaccharide of *TLR4* Mutant Alleles. *Clinical Chemistry* 2002; 48(10):1661–1667

Schuster J, Nelson P. Toll receptors: an expanding role in our understanding of human disease. *J Leukoc Biol* 2000; 67:767–773

Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzamelis I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 2006; 116:3015–3025

Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 2006; 116:1793–1801

Smirnova I, Poltorak A, Chan EK, McBride C, Beutler B. Phylogenetic variation and polymorphism at the toll-like receptor 4 locus (TLR4). *Genome Biol* 2000; 1(1):002.1-002.10

Song MJ, Kim KH, Yoon JM, Kim JB. Activation of Toll-like receptor 4 is associated with insulin resistance in adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2006; 346: 739–745

Sundström J, Vallhagen E, Risérus U, Byberg L, Zethelius B, Berne C, Lind L, Ingelsson E. Risk associated with the metabolic syndrome versus the sum of its individual components. *Diabetes Care* 2006; 29(7):1673-4

Trujillo ME, Scherer PE. Adiponectin-journey from an adipocyte secretory protein to biomarker of the metabolic syndrome. *J Intern Med* 2005; 257(2):167–75

Wallace TM, Levy JC, Matthews DR. Use and Abuse of HOMA Modeling. *Diabetes Care* 2004, 27(6):1487-1495

Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest.* 2003; 112:1796–1808

Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, Tataranni PA. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(5):1930-1935

Wisse BE. The inflammatory syndrome: the role of adipose tissue cytokines in metabolic disorders linked to obesity. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15(11):2792-800

Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 2003; 112:1821–1830

Yajnik C. Interactions of perturbations in intrauterine growth and growth during childhood on the risk of adult-onset disease. *Proc Nutr Soc* 2000; 59:257–65

Zarembek KA, Godowski PJ. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol* 2002; 168:554-61

**Formulario de autorización de depósito de tesis/trabajo final integrador en la  
Comunidad Ciencias Exactas, Químicas y Naturales del RIDUNaM  
(Repositorio Institucional Digital de la UNaM)**

Por intermedio de la presente, el abajo firmante, AUTOR de la Tesis/TFI (Grado) titulada/o  
\*Relacionamiento Asp291gdy Del Gen. ILB-4 y Susceptibilidad Genética para Síndrome Metabólico\*

Da FE de la autoría y originalidad de la obra mencionada, que fue dirigida por, ...Gustavo Frechtel.....

presentada y defendida en la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones (FCEQyN-UNaM), el (fecha) 06/12/2007, Acta/Expdte. N° 1969-Q/07, con el fin de obtener el título de ...Licenciada en Genética.....

**Tildar según corresponda**

- Tesis de Posgrado  
 Doctorado     Maestría     Trabajo Final Integrador  
 Tesis de Grado

**Derechos patrimoniales**

Como autor, expreso mi conformidad en cuanto a la cesión gratuita de los derechos de reproducción y circulación de esta obra, en forma NO EXCLUSIVA, a la Facultad de Humanidades y Ciencias Sociales-UNaM. Dicha reproducción y circulación se podrá realizar, una o varias veces, en cualquier soporte, para todo el mundo, con fines sociales, educativos y científicos.





En virtud del carácter no exclusivo de esta cesión, el autor podrá reproducir y comunicar libremente la tesis o trabajo final integrador, a través de los medios que estime oportunos.

**Condiciones de acceso en línea**

- Autorizo el depósito de la tesis o trabajo final integrador en forma inmediata  
 Autorizo el depósito del documento con embargo por el plazo de \_\_\_\_\_ meses a partir de la defensa de la misma.

**Condiciones de uso de la tesis/TFI**

Será puesta a disposición pública bajo las siguientes condiciones de uso:

	(BY) Atribución — Debe reconocer los créditos de la obra de la manera especificada por el autor o el licenciante (pero no de una manera que sugiera que tiene su apoyo o que apoyan el uso que hace de su obra).
	(NC) No Comercial — No puede utilizar esta obra para fines comerciales.
	(SA) Permite trabajos derivados — Siempre que se mantenga la misma licencia.
	<b>Reconocimiento - NoComercial - CompartirIgual (by-nc-sa):</b> No se permite un uso comercial de la obra original ni de las posibles obras derivadas, la distribución de las cuales se debe hacer con una licencia igual a la que regula la obra original.

**Referencias**

- CC (Licencias Creative Commons)  
 BY (Atribución)  
 NC (No comercial)  
 SA (Compartir igual).

**Dados personales** (llenar un cuadro por cada autor)

Apellido y Nombres	Eyheramonho, María Belén
Teléfono/Celular	
Correo electrónico	maribeleny@yahoo.com.ar

Apellido y Nombres	
Teléfono/Celular	
Correo electrónico	

Apellido y Nombres	
Teléfono/Celular	
Correo electrónico	

 \_\_\_\_\_

Eyheramonho, M. Belén \_\_\_\_\_

DNI 30.248.708 \_\_\_\_\_