

# Prevalencia del polimorfismo del nucleótido simple rs4704963 (T > C) del gen Early B-Cell Factor 1 en una población de pacientes diabéticos tipo 2 con obesidad

## Prevalence of Early B-Cell Factor 1 Gene rs4704963 Single Nucleotide Polymorphism (T>C) in a Population of Type 2 Diabetic Patients with Obesity

MARIO B. PRINCIPATO<sup>1</sup>, ROCÍO CASTILLA<sup>2</sup>, ALEJANDRA DUARTE<sup>3</sup>, JULIO C. BRAGAGNOLO<sup>1</sup>, GRACIELA ORTENSÍ<sup>1</sup>,  
MARÍA A VONWULFFEN<sup>1</sup>, JUSTO CARBAJALES<sup>1</sup>, RAFAEL S. ACUNZO<sup>1</sup>

### RESUMEN

**Introducción:** En estudios previos, se determinó para una población con agravamiento de la diabetes tipo 2 con obesidad (DBT+Ob) que sufría estrés una prevalencia del polimorfismo de nucleótido único (SNP) rs4704963 (T > C) del gen Early B-Cell Factor 1 (EBF1) del 16,5%.

**Objetivos:** Determinar la prevalencia de este SNP en pacientes con DBT+ Ob que acuden al Hospital Ramos Mejía de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y establecer si dicho polimorfismo se asocia con el estrés o la ocurrencia de eventos coronarios agudos.

**Material y métodos:** Se llevó a cabo un estudio observacional, prospectivo, sobre prevalencia del polimorfismo en 53 pacientes con DBT+Ob e índice de masa corporal (IMC) entre 28 y 41, atendidos en el citado hospital en un periodo de 15 meses. A cada paciente se le computó una escala de estrés percibido, además de evaluarlo mediante la escala de acontecimientos vitales estresantes.

Para el análisis estadístico, se realizaron las pruebas de Chi cuadrado y se calcularon los odds ratio (OR).

**Resultados:** La población evaluada (53 pacientes) tuvo una media de edad de 60,2 ± 9,77 años; 47,2% fueron hombres. De ellos, 8 individuos (15,1%) presentaron el SNP y todos fueron heterocigotas. Quince sujetos (28,3%) tuvieron síndrome isquémico agudo (SIA) y de estos solo uno (6,6%) tenía el SNP. No se halló relación estadísticamente significativa entre la presencia del SNP y la aparición de SIA (p = 0,282). Catorce pacientes (26,4%) presentaron estrés crónico moderado o grave, y no hubo relación entre este hallazgo y la presencia del SNP (p = 0,979).

**Conclusiones:** La prevalencia del SNP rs4704963 (T > C) del gen EBF1 en la población de DBT+Ob estudiada fue del 15,1% y no se halló relación estadísticamente significativa del SNP con el estrés ni con el SIA.

**Palabras clave:** Diabetes - Obesidad - Gen EBF1 - Polimorfismo - Síndrome isquémico agudo - Estrés

### ABSTRACT

**Background:** Previous studies established that in a population with exacerbation of type 2 diabetes with obesity (DBT+Ob) suffering from stress, the prevalence of early B-Cell Factor 1 (EBF1) gene rs4704963 single nucleotide polymorphism (SNP) (T>C) is 16.5%.

**Objectives:** The aim of this study was to determine the prevalence of this SNP in patients with DBT+Ob attending Hospital Ramos Mejía of the Autonomous City of Buenos Aires and to ascertain whether this polymorphism is associated with stress or acute coronary events.

**Methods:** An observational, prospective study on the prevalence of rs4704963 SNP was performed in 53 patients with DBT+Ob and body mass index between 28 and 41, seen in Hospital Ramos Mejía for a period of 15 months. Each patient was evaluated with a stressful life events scale and a perceived stress scale.

The chi-square test and odds ratio (OR) were used for statistical analysis.

**Results:** A total of 53 patients were included in the study. Mean population age was 60.2±9.77 years and 47.2% were men. Among these patients, 8 (15.1%) presented SNP and all were heterozygous. Fifteen patients (28.3%) had acute ischemic syndrome (AIS), and among these, only one (6.6%) had SNP. No statistically significant relationship was found between the presence of SNP and AIS (p=0.282). Fourteen patients (26.4%) presented moderate or severe chronic stress, and there was no relationship between this finding and the presence of SNP (p=0.979).

**Conclusions:** The prevalence of EBF1 gene rs4704963 SNP (T>C) in the DBT+Ob population was 15.1%. No statistically significant association was found between SNP and stress or AIS.

**Key words:** Diabetes - Obesity - EBF1 gene - Polymorphism - Acute ischemic syndrome - Stress

REV ARGENT CARDIOL 2018;86:326-332. <http://doi.org/10.7775/rac.es.v86.i5.13866>

**Dirección de correspondencia:** Justo Carbajales. Htal. J.M. Ramos Mejía. División Cardiología. Gral. Urquiza 609 CABA. Argentina - e-mail: redeslat@yahoo.com

<sup>1</sup>División Cardiología. Hospital General de Agudos J.M. Ramos Mejía. Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

<sup>2</sup>Instituto de Investigaciones Cardiológicas (ININCA) UBA-CONICET.

<sup>3</sup>Academia Nacional de Medicina.

Fuentes de apoyo: Fundación de Investigaciones Cardiológicas Einthoven

## Abreviaturas

<b>SNP</b>	polimorfismo de nucleótido único	<b>Ob</b>	obesidad
<b>EBF1</b>	Early B-Cell Factor 1	<b>IMC</b>	índice de masa corporal
<b>DBT</b>	diabetes tipo 2	<b>SIA</b>	síndrome isquémico agudo

## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares son un problema de salud pública de primer orden y representan la principal causa de muerte en nuestro país. La hipertensión arterial junto con la obesidad, el sedentarismo, la dislipidemia, el tabaquismo y la diabetes tipo 2 son factores de riesgo que están asociados con las muertes de origen cardiovascular. El 75% de los casos de enfermedad arterial coronaria se explican por la presencia de estos factores. (1)

Existe actualmente un aumento en la prevalencia de la obesidad y la diabetes tipo 2, favorecido por cambios en el estilo de vida, como la alimentación hipercalórica y la disminución de la actividad física.

Es reconocida la relación entre la diabetes tipo 2 asociada con obesidad y el desarrollo de enfermedad vascular. (2) El aumento de estos dos factores puede, generar una nueva epidemia de enfermedades cardiovasculares, no solo en Argentina, sino también en el resto del mundo.

En los últimos años también se ha puesto el foco en la importancia del estrés y su asociación con los síndromes isquémicos agudos. Dentro de estos, cobran importancia los resultados del estudio INTERHEART, que confirman al estrés como otro factor de riesgo coronario. (3)

Aunque los factores de riesgo psicosociales por sí mismos quizá no tengan un efecto directo en el desarrollo de la enfermedad cardiovascular, sí pueden contribuir indirectamente a esta, a través de mecanismos que involucran diversas vías biológicas. (4). Así por ejemplo, la exposición repetida a estrés psicosocial se ha relacionado con el desarrollo de obesidad visceral. (5) A su vez, se ha demostrado que los eventos estresantes pueden alterar la expresión génica mediante modificaciones epigenéticas, como la metilación de regiones promotoras de los genes. (6) Estos hallazgos apoyan la necesidad de comprender la relación entre predisposición genética, estrés psicosocial y factores metabólicos que actúan en combinación para aumentar el riesgo cardiovascular.

Uno de los genes que juega un papel importante en el riesgo de enfermedad cardiovascular es el del factor de transcripción Early B-Cell Factor 1 (EBF1). (7) Este factor participa en el desarrollo del sistema inmunitario (8), en la adipogénesis (9, 10), y actúa, además, como un importante regulador de la morfología adiposa, la lipólisis y el desarrollo de la resistencia a la insulina.

En un estudio de vínculo genético familiar, se determinó una asociación entre aquellos individuos que poseían el polimorfismo puntual (single nucleotid polymorphism: SNP) del gen EBF1 (rs4704963: cambio de T por C), ubicado en su región intrónica, con la aparición temprana de enfermedad coronaria. (7, 11)

Asimismo, en el estudio de Singh et. al. se mostró que los pacientes de origen caucásico que habitaban en EE. UU. y que sufrían estrés, además de portar dicho polimorfismo, tenían una mayor incidencia de obesidad central medida por la circunferencia de cadera y cintura. Sin embargo, estos autores no evaluaron la incidencia de estas mutaciones en pacientes con las mismas condiciones de obesidad y diabetes, y que habían sufrido eventos coronarios agudos. (12) Cabe destacar que no hay trabajos previos que hayan investigado esta relación en poblaciones de otras partes del continente, como ser América del Sur.

Es por ello que el objetivo de esta investigación fue determinar la prevalencia del polimorfismo de nucleótido simple rs4704963 (T > C) en el gen EBF1 en la población con diabetes y obesidad (DBT+Ob) que acude al Hospital Ramos Mejía, así como establecer si existe relación del polimorfismo EBF1 con la presencia de estrés y la ocurrencia de eventos coronarios agudos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se llevó a cabo un estudio observacional, prospectivo, sobre prevalencia del polimorfismo EBF1 en una población con diagnóstico de diabetes tipo 2 e índice de masa corporal (IMC) entre 28 y 41, en presencia o ausencia de síndrome isquémico agudo (SIA). Para el estudio se incluyeron de forma consecutiva 53 pacientes atendidos entre diciembre de 2015 y marzo de 2017 en el Hospital General de Agudos J. M. Ramos Mejía, de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Todos los pacientes se encontraban tratados con metformina.

La investigación respetó la Resolución N° 1490/07 del Ministerio de Salud, que aprobó la guía internacionalmente reconocida de "Buenas Prácticas de Investigación Clínica en Seres Humanos" y "Buenas Prácticas de Investigación Clínica" (GCP-ICH), así como la letra y el espíritu de las declaraciones de Nüremberg, Helsinki y sus enmiendas, incluidas las de Washington 2002, Tokio 2004, Seúl 2008 y Fortaleza 2013; también la Ley N° 3301 del Gobierno de la Ciudad de Buenos Aires sobre "Protección de Derechos de Sujetos en Investigaciones".

El estudio, junto con el formulario de consentimiento informado con la hoja de información para el paciente (FCI), fue aprobado por la Comisión de Ética en Investigación del Hospital J. M. Ramos Mejía. Se invitó a los pacientes a firmar el FCI, quienes conservaron el documento original. Los pacientes fueron identificados por sus iniciales, por un número y por el grupo al que pertenecían; la identidad real fue conocida únicamente por el médico integrante del proyecto, quien está alcanzado por la legislación del secreto médico y por la Ley N.° 25326 de Protección de Datos Personales.

Entre los 53 pacientes incorporados, todos ellos mayores de 18 años, había hombres y mujeres. Se los clasificó en dos grupos:

A- Pacientes con síndrome isquémico agudo dentro de los últimos 12 meses y que, al momento del evento, presentaban diabetes tipo 2 (DBT) y un índice masa corporal (IMC) entre 28 y .41

B- Pacientes con índice de masa corporal (IMC) entre 28 y 41 y diagnóstico de diabetes tipo 2 (DBT), que no sufrieron eventos coronarios.

No se incorporaron al proyecto los pacientes que dene-garon el consentimiento informado, los que presentaban patologías conocidas graves (excluida la cardiovascular), los que tenían una expectativa de vida menor de un año, los que se encontraban participando de otros protocolos de investigación en los 30 días previos a la toma de la muestra de sangre y aquellos en los que no era posible asegurar el contacto (personal o telefónico). También se excluyeron los sujetos con diabetes tipo 1, antecedente de abuso de alcohol o drogas en los últimos 6 meses, indicación de trasplante cardíaco, IMC menor de 28 o mayor de 41, clínica de insuficiencia hepática y aquellos con insuficiencia renal (valor de creatinina al ingreso mayor de 2 mg/dl).

Para el diagnóstico de diabetes tipo 2 (DBT) se tomaron los siguientes indicadores:

- Síntomas de diabetes (poliuria, polidipsia, pérdida de peso), con glucemia al azar (en cualquier momento del día) > 200 mg/dl
- Glucemia en ayunas (8 h) > 126 mg/dl
- Glucemia postsobrecarga de glucosa (75 g) > 200 mg/dl las 2 horas.
- Hemoglobina glicosilada Hb A1c  $\geq 6,5$

## PROCEDIMIENTOS

El equipo de salud mental del HGA J.M. Ramos Mejía estuvo a cargo de la aplicación de las siguientes escalas para evaluar las características sobre estrés: escala de estrés percibido (13, 14, 15) y escala de acontecimientos vitales estresantes. (16) La escala de estrés percibido (agudo) fue positiva si era  $\geq 28$ , la escala de acontecimientos vitales estresantes (crónicos) se consideró positiva con un valor  $\geq 200$ . Se determinó que el paciente tenía estrés cuando por lo menos una de las dos pruebas fue positiva.

Para el análisis genético, se partió de muestras de sangre a las cuales se les extrajo el ADN utilizando el kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification (Promega). La concentración de ADN se evaluó midiendo la absorción en un equipo Nanodrop (De novix) a 260 nm de longitud de onda.

Se utilizó este ADN para amplificar el segmento de interés por medio de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidada (*nested PCR*), de manera de aumentar la especificidad y abaratar los costos de secuenciación. Para la primera reacción de PCR se utilizaron los *primers* 5`AGGAGAACATGCTTTGCCGT3` (*forward*) y 5`AGACACTTCAGGCTGACACA3` (*reverse*), ambos producidos por Genbiotech, y la reacción de PCR se realizó del siguiente modo: desnaturalización inicial a 94 °C durante 2 min; 35 ciclos de desnaturalización a 92 °C durante 15 seg, apareamiento a 55 °C durante 15 seg

y extensión a 68 °C durante 70 seg; y extensión final a 68 °C durante 5 min.

Para la segunda reacción de PCR se utilizaron los *primers* 5`GCCAGGATTCACATATCTTTGGAC3` (*forward*) y 5`ACAGCTCTAAGCTTCCTCCC3` (*reverse*), también de Genbiotech, y la reacción de PCR consistió en una desnaturalización inicial a 94 °C durante 2min; 35 ciclos de desnaturalización a 92 °C durante 15 seg, apareamiento a 53 °C durante 15 seg y extensión a 68 °C durante 30 seg; y extensión final a 68 °C durante 5 min.

El amplicón fue secuenciado por MacroGen. Con los resultados obtenidos, se evaluó la presencia del polimorfismo de interés utilizando el programa DNA Baser.

Los pacientes fueron seguidos por el equipo médico del proyecto para evaluar la aparición de algún evento adverso, y cuando fue necesario, se realizaron otros estudios requeridos según la patología presente. Los pacientes que desistieron de esta posibilidad fueron invitados a concurrir una vez por año para conocer los eventos que podrían haber sufrido; quienes se negaron a concurrir fueron llamados telefónicamente por el equipo de profesionales. El paciente tuvo la libertad de rehusarse también a recibir llamados telefónicos.

## ESTADÍSTICA

El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa SPSS, versión 22.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.).

Las variables continuas fueron descriptas a través de medidas de tendencia central y de dispersión, en tanto que las variables categóricas fueron descriptas mediante frecuencias absolutas y relativas.

Para evaluar si existía asociación entre la presencia de polimorfismo y la ocurrencia de síndromes isquémicos agudos, se aplicaron pruebas de Chi cuadrado y se calculó el riesgo relativo (OR) con un intervalo de confianza (IC) del 95%. Se consideró estadísticamente significativa una  $p \leq 0,05$ .

## RESULTADOS

Las características basales y la presencia de factores de riesgo de los pacientes incorporados al estudio según el grupo considerado (con síndrome isquémico agudo o sin este) se presentan en la Tabla 1.

Como puede observarse, la población estudiada tuvo una media de edad de  $60,2 \pm 9,77$  años, el 47,2% fueron hombres. El IMC promedio fue de  $32,4 \pm 3,53$  kg/m<sup>2</sup>; 45,3% fueron tabaquistas, 60,4% hipertensos, y 56,6% tenían dislipidemia.

Del total de la población incluida, 15 pacientes (28,3%) habían tenido síndrome isquémico agudo (SIA). De estos, 9 (17%) presentaron SIA con supradesnivel

Variables	Total de pacientes DBT n = 53	Síndrome isquémico agudo Sin SIA n = 38	Síndrome isquémico agudo Con SIA n = 15
Edad (años)	60,2 $\pm$ 9,77	59,8 $\pm$ 10,25	61,3- $\pm$ 8,66
Proporción hombres (%)	47,2	26,4	20,8
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	32,4 $\pm$ 3,53	33,1 $\pm$ 3,41	30,6 $\pm$ 3,29
TBQ, n (%)	24 (45,3)	15 (28)	9 (17)
HTA, n (%)	32 (60,4)	19 (35,8)	13 (24,5)
DLP, n (%)	30 (56,6)	21 (39,6)	9 (17)

Tabla 1. Características de la población bajo estudio

persistente del ST y 6 (11,3%), SIA sin supradesnivel persistente del ST. Los 38 pacientes restantes no presentaron ningún evento coronario.

Del total de pacientes, 8 (15,1%) presentaron el SNP en forma heterocigota (Figura 1). No se encontró en esta población la forma homocigota.

De los 15 pacientes con SIA, solo uno (6,6%) presentó el polimorfismo, mientras que hubo 7 pacientes (18,4%) con SNP que no presentaron eventos coronarios. (Figura 2)

Como se puede observar, cuando se analizó la relación entre la presencia del SNP y la aparición de SIA considerando el modelo genético dominante, no se

halló relación entre ellos. El *odds ratio* fue de 3,161, la prueba de Cochran reveló ausencia de significación estadística ( $p = 0,282$ ).

Cuando se evaluó el nivel de estrés en los pacientes según si habían presentado o no SIA, no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas. En ambos grupos, aproximadamente el 74% presentó estrés leve, en tanto que alrededor del 26% registró estrés moderado o grave ( $p = 0,979$ ) (Figura 3).

Cuando se toma a la población con estrés y SNP, no se aprecian diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes que tuvieron SIA respecto de los que no lo tuvieron ( $p=0,837$ ).

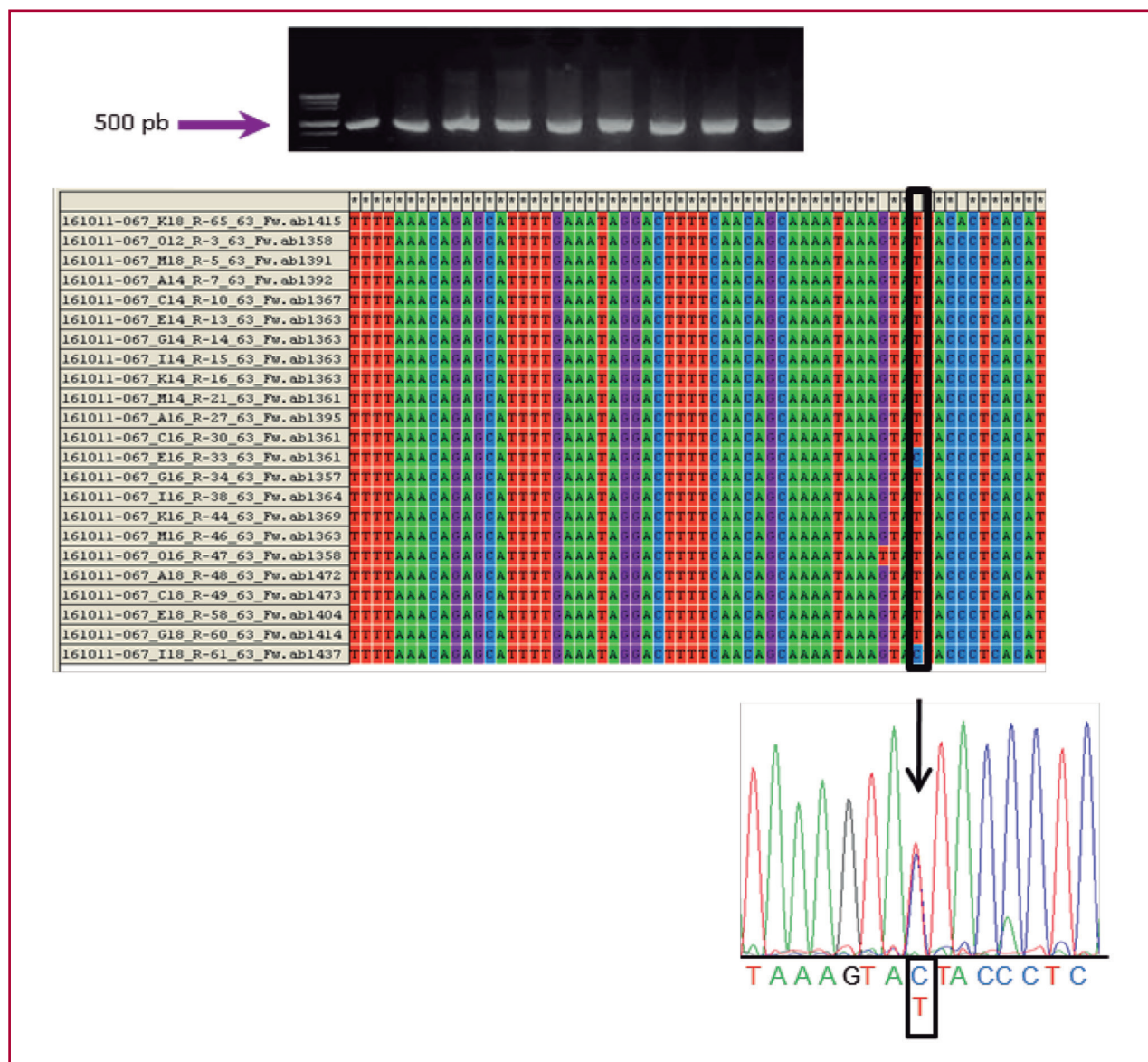
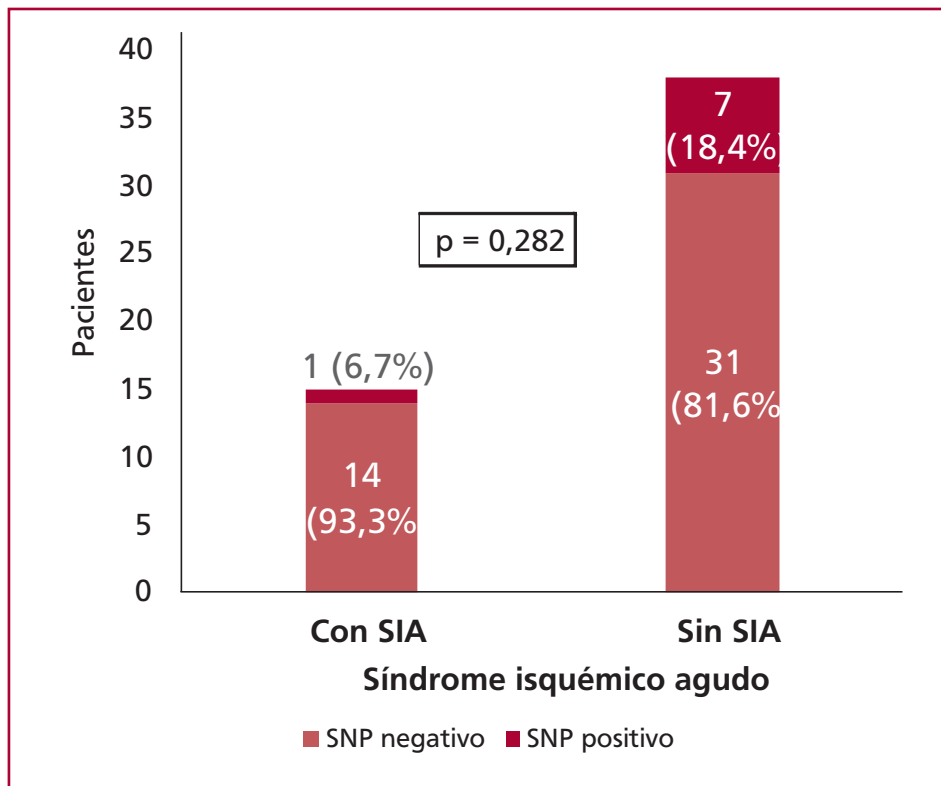
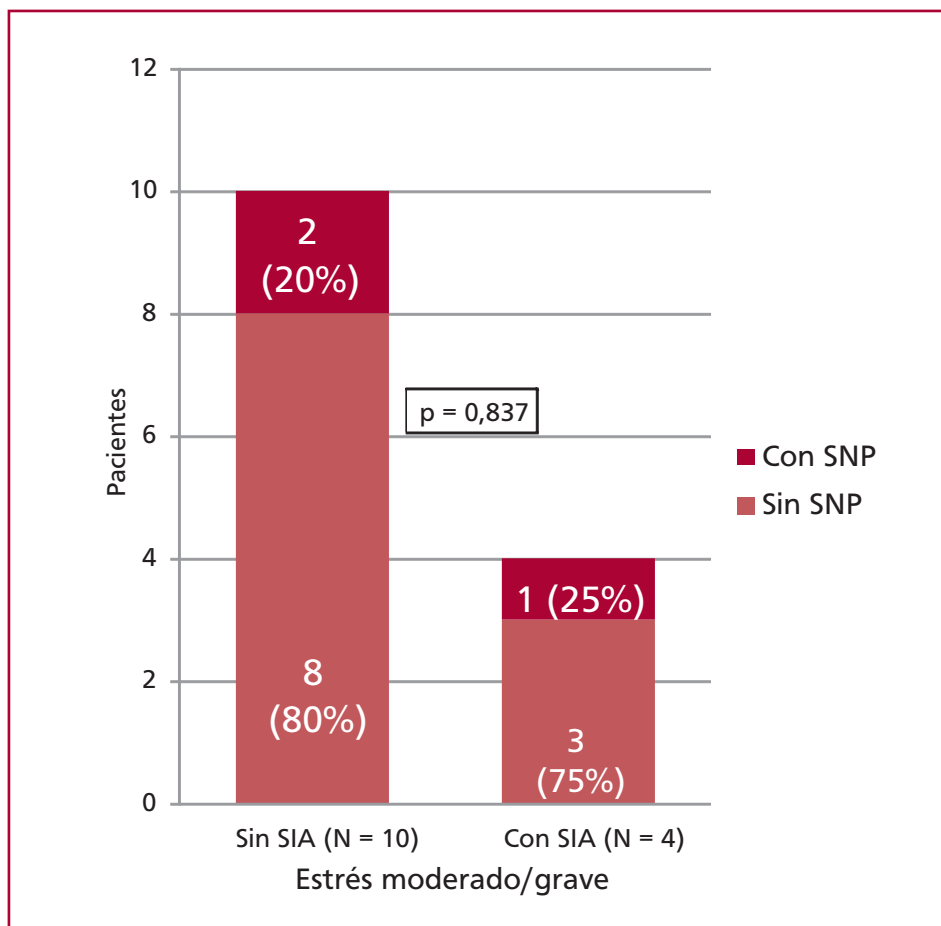


Fig. 1. Imagen representativa de la corrida electroforética de los amplicones obtenidos por *nested* PCR de diferentes pacientes y análisis de homología de las secuencias del gen EBF1. Se muestra en el inserto un electroferograma correspondiente a un paciente heterocigoto C/T respecto del SNP analizado.



**Fig. 2.** Prevalencia del SNP en los dos subgrupos de pacientes (con SIA y sin SIA).



**Fig. 3.** Prevalencia del estrés crónico y del SNP en los dos subgrupos de pacientes (con SIA y sin SIA). No se observaron diferencias significativas entre la presencia de estrés y de SNP ( $p = 0,837$ ) al comparar estos subgrupos.

## DISCUSIÓN

Este estudio buscó determinar la prevalencia del SNP rs4704963 (T > C) del gen EBF1 en pacientes que presentan DBT+Ob y su relación con la presencia de estrés y de eventos coronarios agudos, considerando un modelo genético dominante.

Nuestros resultados muestran una significativa prevalencia de este SNP en nuestra población: 15,1%. Este valor es similar al hallado por Singh et al. en la población caucásica que vive en EE.UU. (12) Todos los pacientes estudiados que presentaron SNP tenían sobrepeso u obesidad grado I o moderada, según la clasificación de obesidad de la Organización Mundial de la Salud. Ninguno de los pacientes con SNP presentó obesidad grave.

Cuando se analizó a los pacientes que tuvieron el test de acontecimientos vitales estresantes positivo, lo que significaba estrés moderado o grave de varios meses de evolución, un 21,4% de ellos presentó el SNP, pero ello no significó en la muestra poblacional una relación estadísticamente significativa entre estrés y presencia del SNP.

El EBF1 es un miembro de la familia de genes EBF, que se expresa ampliamente en muchos tejidos tales como linfocitos B, médula ósea, neuronas olfativas y adipocitos. En particular, el EBF1 juega un papel importante en la promoción de la adipogénesis. (18) Por otro lado, se ha demostrado que las concentraciones de leptina estuvieron significativamente disminuidas en ratones *knockout* para EBF1. (19)

La leptina producida en los adipocitos es una hormona esencial para la prevención de la obesidad, ya que regula el gasto energético, el apetito y el metabolismo, y los déficits de esta hormona derivan en el desarrollo de la obesidad. Además, cabe mencionar que, en general, el nivel sérico de leptina se incrementa por el estrés emocional. (20) Sin embargo, el estrés, al mismo tiempo, promueve la liberación de glucocorticoides, induciendo así la resistencia a la leptina. (21) En resumen, el estrés psicosocial puede provocar obesidad a pesar del aumento de los niveles de leptina, al inducir una resistencia a esta misma proteína. Por su parte, los polimorfismos de EBF1 podrían contribuir al proceso de obesidad central desencadenado por el estrés, al disminuir el nivel de leptina.

La enfermedad coronaria está altamente relacionada con la hipercolesterolemia, la obesidad y la diabetes tipo 2 y tiene en sí un rasgo hereditario, con el papel de los factores genéticos cada vez más evidente en el inicio temprano de la enfermedad. (22, 23)

Shah et al. estudiaron familias con altos niveles de LDL-colesterol y vieron que esto estaba relacionado con variaciones en el brazo largo del cromosoma 5 (5q.). (24) Posteriormente, Nolan et al. demostraron que variaciones en genes ubicados en una porción del cromosoma 5 (5q31-33), entre los que se encuentra el EBF1, estaban relacionadas con el inicio temprano de la enfermedad cardiovascular. Más aún, el SNP

rs4704963 (T > C), estudiado en nuestro trabajo, es uno de los polimorfismos relacionados con aterosclerosis y enfermedad cardiovascular. (25)

Si bien trabajos previos han relacionado a este SNP con la aparición de enfermedad vascular, este estudio es el primero que ha investigado si existe relación entre este polimorfismo y la aparición de SIA en una población con alta prevalencia de este polimorfismo, como lo es la de pacientes DBT+Ob no mórbidos. Esa relación no pudo ser establecida en este estudio.

## CONCLUSIONES

Este trabajo de genómica es el primero que analiza la prevalencia del SNP rs4704963 (T>C) del gen EBF1 en una muestra poblacional de DBT+Ob en América del Sur. La prevalencia que arroja este estudio es de 15,1%. No se halló en esta población una relación estadísticamente significativa entre el hecho de tener acontecimientos vitales estresantes y la presencia del SNP, ni tampoco una mayor incidencia de síndromes isquémicos agudos.

Se recomienda para futuras investigaciones que aborden este tema, la ampliación de los tamaños de muestra, a los efectos de verificar si dicha ampliación modifica los resultados de las pruebas estadísticas.

## Declaración de conflicto de intereses

Los autores no poseen conflicto de intereses.

(Véanse formularios de conflicto de intereses de los autores en la web / material suplementario).

## Agradecimientos

Laboratorios Roemmers: Dres. Matías Feldman y Omar Scapin

Fundación de Investigaciones Cardiológicas Einthoven:  
Dr Marcelo Elizari  
Dr. Alejandro Tomatti  
Dra. Analía Paolucci  
Dra. Paola Gonzalez  
TPC Natalia Ciampi  
Mag. Rodolfo KöllikerFrers  
Dr. Dan Adaszko

## BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization: Global health risk. ISBN 978 92 4 156387 1 :WHO Press 2009.
2. Mente A, Yusuf S, Islam S, McQueen MJ, Tanomsup S, Onen CL, et al; INTERHEART Investigators. Metabolic syndrome and risk of acute myocardial infarction: a case-control study of 26,903 subjects from 52 countries. *J Am Coll Cardiol* 2010;55:2390-8. <http://doi.org/b2tttdn>
3. Yusuf S, Islam S, McQueen MJ, Tanomsup S, Onen CL, Rangarajan S, et al; INTERHEART Investigators. Obesity and the risk of myocardial infarction in 27 000 participants from 52 countries: a case-control study. *INTERHEART study. Lancet* 2005;366:1640-9. <http://doi.org/fv3pkf>
4. Williams RB. Psychosocial and biobehavioral factors and their interplay in coronary heart disease. *Annu Rev Clin Psychol* 2008;4:349-65. <http://doi.org/c69mxj>
5. Speaker KJ, Flesher M. Interleukin-1 beta: a potential link be-

tween stress and the development of visceral obesity. *BMC Physiol* 2012;12:1-15. <http://doi.org/gb5mg8>

6. Labonte B, Yerko V, Gross J, Mechawar N, Meaney MJ, Szyf M, et al. Differential glucocorticoid receptor exon 1(B), 1(C), and 1(H) expression and methylation in suicide completers with a history of childhood abuse. *Biol Psychiatry*. 2012;72:41-8. <http://doi.org/f32ww6>

7. Nolan DK, Sutton B, Haynes C, Johnson J, Sebek J, Dowdy E, et al. Fine mapping of a linkage peak with integration of lipid traits identifies novel coronary artery disease genes on chromosome 5. *BMC Genet*. 2012 ;13:12. <http://doi.org/f3w3c5>

8. Lukin K, Fields S, Hartley J, Hagman J. Early B. Cell factor: regulator of B lineage specification and commitment. *Semin Immunol* 2008;20:221-7. <http://doi.org/d6wm3f>

9. Akerblad P, Lind U, Liberg D, Bamberg K, Sigvardsson M. Early B-cell factor (O/E-1) is a promoter of adipogenesis and involved in control of genes important for terminal adipocyte differentiation. *Mol Cell Bio*. 2002;22:8015-25. <http://doi.org/fsvbfs>

10. Fretz JA, Nelson T, Xi Y, Adams DJ, Rosen CJ, Horowitz MC. Altered metabolism and lipodystrophy in the early B-cell factor 1-deficient mouse. *Endocrinology* 2010;151:1611-21. <http://doi.org/bc2sq9>

11. Shah SH, Kraus WE, Crossman DC, Granger CB, Haines JL, Jones CJ, et al. Serum lipids in the GENECARD study of coronary artery disease identify quantitative trait loci and phenotypic subsets on chromosomes 3q and 5q. *Ann Hum Genet* 2006;70:738-48. <http://doi.org/dpkmzx>

12. Singh A, Babyak MA, Nolan DK, Brummett BH, Jiang R, Siegler IC, et al. Gene by stress genome-wide interaction analysis and path analysis identify EBF1 as a cardiovascular and metabolic risk gene. *Eur J Hum Genet* 2015;23:854-62. <http://doi.org/f7bcgk>

13. Remor E. Psychometric properties of a European Spanish version of the Perceived Stress Scale (PSS). *Span J Psychol* 2006;9:86-93. <http://doi.org/wj2>

14. Cohen S, Kamarck T, Mermelstein R. A global measure of perceived stress. *J Health Soc Behav* 1983;24:385-96. <http://doi.org/d2wgm5>

15. Cohen S & Williamson G. (1988). Perceived stress in a probability

sample of the U.S. In S. Spacapan & S. Oskamp (Eds.), *The social psychology of health: Claremont Symposium on Applied Social Psychology*. Newbury Park, CA: Sage.

16. Social Readjustment Rating Scale (SRRS) Source. Holmes, T.H. & Rahe, R.H. (1967). The social readjustment rating scale. *Journal of Psychosomatic Research*. 1967;11:213-18. <http://doi.org/cw7wzk>

17. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 2004;431:931-45. <http://doi.org/dph7kz>

18. Jimenez MA, Akerblad P, Sigvardsson M, Rosen ED. Critical role for Ebf1 and Ebf2 in the adipogenic transcriptional cascade. *Mol Cell Biol* 2007;27:743-57. <http://doi.org/bsvm63>

19. Fretz JA, Nelson T, Xi Y, Adams DJ, Rosen CJ, Horowitz MC. Altered metabolism and lipodystrophy in the early B-cell factor 1-deficient mouse. *Endocrinology* 2010;151:1611-21. <http://doi.org/bc2sq9>

20. Konishi N, Otaka M, Odashima M, Jin M, Wada I, Komatsu K, et al. Systemic stress increases serum leptin level. *J Gastroenterol Hepatol* 2006;21:1099-102. <http://doi.org/df4sgh>

21. Udden J, Bjorntorp P, Arner P, Barkeling B, Meurling L, Rossner S. Effects of glucocorticoids on leptin levels and eating behaviour in women. *J Intern Med* 2003;253:225-31. <http://doi.org/dxtn4r>

22. Zhang C, Rexrode KM, van Dam RM, Li TY, Hu FB. Abdominal obesity and the risk of all-cause, cardiovascular, and cancer mortality: sixteen years of follow-up in US women. *Circulation* 2008;117:1658-67. <http://doi.org/c7xd8f>

23. Levine AS, Morley JE. Stress-induced eating in rats. *Am. J. Physiol* 1981;241:R72-76. <http://doi.org/dpkmzx>

24. Shah SH, Kraus WE, Crossman DC, Granger CB, Haines JL, Jones CJ, et al. Serum lipids in the GENECARD study of coronary artery disease identify quantitative trait loci and phenotypic subsets on chromosomes 3q and 5q. *Ann Hum Genet* 2006 ;70:738-48. <http://doi.org/f3w3c5>

25. Nolan DK, Sutton B, Haynes C et al. Fine mapping of a linkage peak with integration of lipid traits identifies novel coronary artery disease genes on chromosome 5. *BMC Genet* 2012;13:12.