



**CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR**

***“CARACTERIZACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN
TRANSCRIPCIONAL DE GENES ASOCIADOS CON
OBESIDAD EN NIÑOS MEXICANOS”***

T E S I S

Que presenta

M. en C. MARCELA ULLOA MARTÍNEZ

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE

GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Director de Tesis:
Dr. Jaime García Mena

México, D.F.

Junio, 2015

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Zacatenco y en la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

Este trabajo fue financiado con apoyo de SSA/IMSS/ISSSTE-CONACYT 2012-180808; SALUD de CONACYT-2005-C02-14412 para Miguel Cruz López y Cinvestav-IPN; FONSEC SS/IMSS/ISSSTE-CONACYT-233361 para Jaime García Mena.

Se agradece la participación de las niñas, niños, madres y padres que hicieron posible esta investigación y el apoyo de las Unidades Deportivas del IMSS Cuauhtémoc e Independencia.

Se agradece el apoyo del Biol. Alberto Piña Escobedo por su asistencia técnica con reactivos, al Sr. Rodrigo García Gutiérrez por su asistencia con material de laboratorio y a la Sra. Antonia López Salazar por su apoyo administrativo.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca Doctoral con el número de registro 219072, que me otorgó para la realización de mis estudios y este proyecto.

Agradezco al Cinvestav-IPN por el apoyo otorgado para asistir al VI Curso Internacional sobre Obesidad celebrado en Noviembre 2012 en San Antonio, Texas, USA.

Agradezco a la Coordinación de Investigación en Salud del IMSS por el apoyo otorgado con folio 097-2012, durante el año 2012.

DEDICATORIA

A mi familia, por su apoyo incondicional en todo momento.

A mi esposo Andrés Fernando González Banda, gracias por acompañarme en este viaje maravilloso.

A mis hijas Andrea Lizeth y Autora Natalia, ustedes son mi inspiración y mi vida.

A mi madre Regina Martínez Guadalupe, gracias por darme la vida y todo su amor.

A mi padre (QEPD), gracias por darme la vida y lecciones para vivirla.

A mis hermanos Adriana, Gloria, Claudia y Marco Antonio, gracias por ser parte de mi mundo.

A Elvia Banda Rodríguez, gracias por llegar a ser mi segunda madre, por todo su apoyo y amor.

A Fernando González Colín, Sergio Isaac, Nancy Sahira y Luz Angélica, gracias por considerarme parte de su familia.

A mis niñas hermosas Diana Fernanda, Sidney Geraldine y Luz Renata, por darme tanta felicidad.

A todas las personas lindas con las cuales he tenido el privilegio de compartir momentos increíbles en el Cinvestav y en el IMSS.

A todos los que me apoyaron para escribir y concluir esta tesis.

CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	VI
LISTA DE FIGURAS.....	VII
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
Clasificación y tipos de obesidad.....	3
Sobrepeso y Obesidad.....	4
Genética de la obesidad.....	6
Genes candidato asociados con fenotipos de obesidad en niños y adolescentes.	8
ABCA1.....	8
ACDC (AIPOQ1).....	9
ADIPOR1, ADIPOR2.....	9
ADRB1.....	10
APOA4.....	11
ATRN.....	11
CALCR	12
FTO	12
GHRL.....	13
INSIG2	13
INSR.....	14
LEP.....	14
LEPR.....	15
MC3R.....	16
PPAR-alpha.....	16
PPAR-gamma.....	16
PPAR-gamma-C1-alpha.....	17
SORT1	17
UPC1.....	17
Polimorfismos y expresión génica	18
Sangre periférica y estudios de expresión.....	18
ALCANCE.....	20
JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	20
HIPÓTESIS GENERAL.....	20

OBJETIVO GENERAL	20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
MATERIALES Y MÉTODOS.	21
Diseño del estudio.....	21
Tamaño de la muestra.	21
Descripción por objetivos.	22
Objetivo 1. Estandarizar un proceso para la obtención de RNA a partir de sangre periférica.	22
Objetivo 2. Selección de niños sanos y obesos.	22
Objetivo 3. Medir los niveles de expresión de mRNA	23
Objetivo 4. Analizar estadísticamente los resultados.....	24
Objetivo específico 5. Validar los resultados de expresión	24
RESULTADOS ESPERADOS	24
RESULTADOS OBTENIDOS	24
Objetivo 1. Estandarizar un proceso para la obtención de RNA a partir de sangre periférica.	24
Objetivo 2. Selección de niños sanos y obesos.	25
Objetivo 3. Medir los niveles de expresión de mRNA de genes candidato seleccionados.....	30
Trabajo con equipo Open Array.....	34
Objetivo 4. Analizar estadísticamente los resultados en un modelo transversal analítico.	41
Genes constitutivos.	41
Niveles de expresión.	42
Objetivo específico 5. Validación de los resultados de expresión por PCR tiempo real.....	46
ANALISIS DE RESULTADOS	50
Pruebas bioquímicas.....	50
Expresión de genes.....	51
ABCA1	51
ATRN.....	53
INSIG2	54
INSR.....	56
PPAR α Y PPAR γ	58
SORT1	60
LEP, LEPR.....	62

ADIPOQ, ADIPOR1, ADIPOR2	63
ADRB1	66
FTO	67
GHRL	69
Validación por PCR tiempo real.	72
CONCLUSIONES	73
PERSPECTIVAS	74
BIBLIOGRAFÍA.	75
APÉNDICES.....	82
Apéndice 1. Tablas CDC 2000. Percentiles del IMC por edad por género.	82
Apéndice 2. Puntaje Z (Z-score). IMC por edad por género.	84
Apéndice 3. Carta de consentimiento informado.....	86
Apéndice 4. Carta de asentimiento informado.....	88
Apéndice 5. Cuestionario de generalidades.	90
Apéndice 6. Cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos.	93
Apéndice 7. Cuestionario de actividad física.....	103
Apéndice 8. Antropometría y composición corporal.	107
Apéndice 9. Geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.	108
Apéndice 10. Cuantificación por espectrofotometría.....	113
Apéndice 11. Curvas de amplificación obtenidas en el equipo Open Array.	115
ANEXOS	126
Anexo 1. Artículo.....	126

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de acuerdo a IMC (OMS 2015)	3
Tabla 2. Genes candidatos asociados con fenotipo de obesidad en niños y adolescentes.	8
Tabla 3. Clasificación de acuerdo a los criterios de la OMS.	21
Tabla 4. Perfil clínico para niños eutróficos, con sobrepeso y obesos. Unidad Cuauhtémoc.	28
Tabla 5. Perfil clínico para niños eutróficos, con sobrepeso y obesos. Unidad Independencia.	28
Tabla 6. Perfil clínico para niños eutróficos, con sobrepeso y obesos. Unidad Morelos.	28
Tabla 7. Características clínicas de niños sanos y obesos.	29
Tabla 8. Genes incluidos en la placa de expresión Open Array.	36
Tabla 9. Sondas TaqMan empleadas en qPCR	47
Tabla 10. Mezcla de reacción para PCR tiempo real.	47
Tabla 11. Programa de termociclado.	47

LISTA DE FIGURAS.

Figura 1. Comparativo de la prevalencia nacional de sobrepeso y obesidad en México.....	6
Figura 2. Comparativo de la prevalencia nacional de sobrepeso y obesidad en México.....	6
Figura 3. Muestreo en Unidad Deportiva Cuauhtémoc.	26
Figura 4. Muestreo en Unidad Deportiva Independencia.	26
Figura 5. Muestreo en Unidad Deportiva Morelos.	27
Figura 6. Extracción de RNA por el método de TriPure.....	30
Figura 7. Tratamiento con DNasa.	31
Figura 8. RNA en geles de agarosa.	32
Figura 9. Reacción de retrotranscripción.	33
Figura 10. Productos de PCR para B-actina.	33
Figura 11. Equipo Open Array.....	34
Figura 12. Placa Open Array.....	34
Figura 13. Diseño de placa Open Array.....	35
Figura 14. Llenado de la placa Open Array.	37
Figura 15. Cassette de ciclaje.....	38
Figura 16. Case Sealing Station.	38
Figura 17. Colocación de marcos de metal.	39
Figura 18. Image/PCR Cycler.	40
Figura 19. Curvas de amplificación genes constitutivos.....	41
Figura 20. Valores de Ct para los genes constitutivos.	42
Figura 21. Gráficas de expresión <i>ADIPOR1</i> , <i>ADRB1</i> , <i>FTO</i> y <i>GHRL</i>	43
Figura 22. Gráficas de expresión <i>ABCA1</i> , <i>ADIPOQ</i> , <i>ADIPOR2</i> y <i>ATRN</i>	44
Figura 23. Gráficas de expresión <i>INSIG2</i> , <i>INSR</i> , <i>LEP</i> y <i>LEPR</i>	45
Figura 24. Gráficas de expresión. <i>PPARα</i> , <i>PPARγ</i> y <i>SORT1</i>	46
Figura 25. Gráficas de expresión qPCR TaqMan.	48
Figura 26. Gráficas de expresión qPCR Open Array vs qPCR TaqMan de <i>FTO</i>	48
Figura 27. Gráficas de expresión qPCR Open Array vs qPCR TaqMan de <i>GHRL</i>	49
Figura 28. <i>ABCA1</i>	53
Figura 29. Interacciones de Atractina.	54
Figura 30. Interacciones de <i>INSIG2</i>	56
Figura 31. Señalización de insulina	58
Figura 32. Regulación metabólica de <i>PPARs</i>	60
Figura 33. Interacción de <i>SORT1</i>	61
Figura 34. Mecanismo de la Leptina y receptor de Leptina.....	63
Figura 35. Adiponectina y sus receptores.	65
Figura 36. Receptor Beta 1 Adrenérgico.....	66
Figura 37. Propuesta de mecanismo de acción para <i>FTO</i>	68
Figura 38. Mecanismo de acción de grelina.....	71

RESUMEN

La obesidad es una enfermedad crónica, es el resultado de un desequilibrio entre la ingesta y el gasto energético. Los efectos metabólicos causados por la obesidad pueden resultar en un mayor riesgo de padecer diabetes tipo 2, diversas formas de cáncer, enfermedad de hígado graso, trastornos hormonales, hipertensión, enfermedades cardiovasculares, y aumento de la mortalidad entre otros.

El análisis de la expresión de genes en una escala genómica es potencialmente significativo, ya que facilita la identificación de las vías moleculares asociadas con diversas enfermedades. La sangre periférica es un excelente modelo para estudios de expresión génica, ya que es considerado un tejido que puede ser afectado por el estado de salud del individuo.

En este trabajo, hemos estudiado y descrito los niveles de expresión transcripcional de varios genes candidatos en muestras de sangre periférica de niños sanos y niños obesos.

Nuestros resultados muestran diferencia en el nivel de expresión transcripcional de los genes FTO, GHRL, ADRB1 y AdipoR1; esto sugiere que estos genes están implicados en los procesos biológicos que llevan al desarrollo de la obesidad infantil. Por otra parte, se encontraron diferencias en los niveles de glucosa, insulina, triglicéridos, HDL, LDL y la presión sanguínea, lo que sugiere la aparición de un desequilibrio metabólico, el cual puede conducir al desarrollo de diversas enfermedades mencionadas anteriormente.

Las muestras de sangre periférica resultaron ser un tejido adecuado para los estudios de expresión génica y una herramienta prometedora en el campo de la transcriptómica.

ABSTRACT

Obesity is the result of a chronic, positive imbalance between energy intake and energy expenditure. The adverse metabolic effects caused by obesity may result in increased risk for type 2 diabetes, many forms of cancer, fatty liver disease, hormonal disturbance, hypertension, cardiovascular disease, and increased mortality among others.

The analysis of gene expression on a genomic scale is potentially significant since it facilitates a rapid progress on the identification of molecular pathways associated with several diseases. The peripheral blood tissue is an excellent model for gene expression studies, as it is considered to be a tissue affected by the health condition of the host.

In this work, we have studied and described the transcriptional level of expression of several candidate genes, using peripheral blood tissue.

Our results show the existence of differences in the transcriptional expression level of FTO, GHRL, ADRB1 and ADIPOR1 genes; this suggested these genes are involved in biological processes implicated in the development of childhood obesity. Moreover, differences were found in the levels of glucose, insulin, triglycerides, HDL, LDL and blood pressure, suggesting the onset of metabolic imbalance that can lead to the development of various diseases mentioned above.

The peripheral blood samples are suitable tissue for gene expression studies and promising tool in the field of transcriptomics.

INTRODUCCIÓN

La obesidad es el resultado de un desbalance entre la ingesta de calorías y su gasto por el individuo lo que conduce a un exceso de peso corporal, por la acumulación excesiva de masa grasa (WHO, 2015). Es una patología compleja relacionada con el estilo de vida, el ambiente y factores genéticos. El incremento de la prevalencia de obesidad es un fenómeno que se observa a nivel mundial, afecta a personas de diversas culturas y niveles económicos y sociales. Genera gran preocupación ya que los individuos obesos tienen un mayor riesgo de padecer enfermedades tales como diabetes tipo 2, algunas formas de cáncer, hígado graso, desordenes hormonales, hipertensión y enfermedades cardiovasculares, lo cual tiene como consecuencia un aumento en la mortalidad (Herrera y Lindgren, 2010).

Para la medición del sobrepeso y obesidad en adultos, el método más empleado es el Índice de Masa Corporal ($IMC = \text{peso} / \text{estatura}^2$) que es un indicador que combina dos mediciones antropométricas: el peso (kg) y la estatura (m^2), y con base en este cálculo se realiza la clasificación de la obesidad mostrada en la Tabla 1 (OMS, 2015). La medición en niños y niñas se hace con base en índices de peso para la edad, talla para la edad y peso para la talla contra tablas de referencia de crecimiento percentiladas considerando obesidad un percentil superior a 95 (CDC 2000).

Clasificación	IMC (kg/m²)
Bajo peso	<18.5
Normal	18.5-24.9
Sobrepeso	25-29.9
Obesidad I	30-34.9
Obesidad II	35-39.9
Obesidad III	≥40

Clasificación y tipos de obesidad

La obesidad de acuerdo a su origen se clasifica como exógena, la cual es causada por una ingesta calórica excesiva a través de la dieta, y la endógena, se

produce por disturbios hormonales y metabólicos; obesidad monogénica, aquella en la que se observa una obesidad extrema en ausencia de factores ambientales; obesidad sindromática son sujetos clínicamente obesos adicionalmente distinguidos por retraso mental, características dismórficas y desarrollo de anormalidades órgano-específicas, y finalmente obesidad poligénica u obesidad común la cual afecta a la población general, se presenta como resultado de un conjunto de factores sin una patología que la ocasione (Herrera y Lindgren, 2010).

La obesidad de acuerdo con sus aspectos celulares se clasifica en: hiperplásica e hipertrófica. La hiperplásica se caracteriza por el aumento del número de células adiposas, mientras que la hipertrófica por el aumento del volumen de los adipocitos. (Bastos et al., 2005).

Según el patrón de distribución de la grasa corporal la obesidad se clasifica en androide, central o abdominal (en forma de manzana) en donde el exceso de grasa se localiza preferentemente en la cara, el tórax y el abdomen, se asocia a un mayor riesgo de dislipidemias, diabetes, enfermedad cardiovascular y de mortalidad en general. (Consenso SEEDO, 2000). La obesidad ginoide o periférica (en forma de pera) en donde la grasa se acumula básicamente en la cadera y en los muslos. Este tipo de distribución se relaciona principalmente con problemas de retorno venoso en las extremidades inferiores (varices) y con artrosis de rodilla (genoartrosis). Obesidad de distribución homogénea: es aquella en la que el exceso de grasa no predomina en ninguna zona del cuerpo (Bastos *et al.*, 2005)

Sobrepeso y Obesidad

La prevalencia de sobrepeso y obesidad va en aumento como resultado de cambios en el estilo de vida, disminución de la actividad física y desarrollo socioeconómico entre otros. Además, es de gran preocupación observar que el grado de obesidad también está incrementando en niños y adolescentes en todo el mundo predisponiéndolos a un deterioro de su salud a una edad temprana. La obesidad es reconocida como una epidemia, y a pesar de los intensos esfuerzos actuales para reducir la obesidad mediante dieta, ejercicio, educación y terapia con fármacos, una

solución efectiva a largo plazo para esta epidemia aún no ha sido desarrollada (Herrera y Lindgren, 2010).

A nivel mundial, en 2014, más de 1900 millones de adultos de 18 o más años tenían sobrepeso, de los cuales, más de 600 millones eran obesos. Más de 42 millones de niños menores de cinco años de edad tenían sobrepeso. Si bien el sobrepeso y la obesidad tiempo atrás eran considerados un problema propio de los países de ingresos altos, actualmente ambos trastornos están aumentando en los países de ingresos bajos y medianos, en particular en los entornos urbanos (OMS 2015).

El control del exceso de peso corporal ya sea sobrepeso u obesidad, es reconocido actualmente como uno de los retos más importantes de Salud Pública en el mundo, dada su magnitud, la rapidez de su incremento y el efecto negativo que ejerce sobre la salud de la población que la padece, debido a que aumenta significativamente el riesgo de padecer enfermedades crónicas no transmisibles (SSA, 2010). Por ejemplo, se estima que 90% de los casos de diabetes tipo 2 son atribuibles al sobrepeso y la obesidad. Otras enfermedades crónicas no transmisibles relacionadas son la hipertensión arterial, dislipidemias, enfermedad coronaria, enfermedad vascular cerebral, osteoartritis, y los cánceres de mama, esófago, colon, endometrio y riñón, entre otras (SSA, 2010). En respuesta al crecimiento de esta epidemia, la Organización Mundial de la Salud (OMS) promovió la Estrategia Mundial sobre Alimentación Saludable, Actividad Física y Salud para la prevención de enfermedades crónicas a la cual México se adhirió en 2004. De 1980 a la fecha, la prevalencia de obesidad y sobrepeso en México se ha triplicado, en particular en la población adulta: 39.5% de los hombres y mujeres tienen sobrepeso y 31.7% tienen obesidad. Es decir, aproximadamente 70% de la población adulta tiene una masa corporal inadecuada. Adicionalmente, esta epidemia registra una elevada tasa de crecimiento entre la población infantil, lo que se ha traducido también en una alta prevalencia de sobrepeso y obesidad entre la población escolar de preescolar y primaria de todo el país y entre adolescentes (Figura 1 y 2).

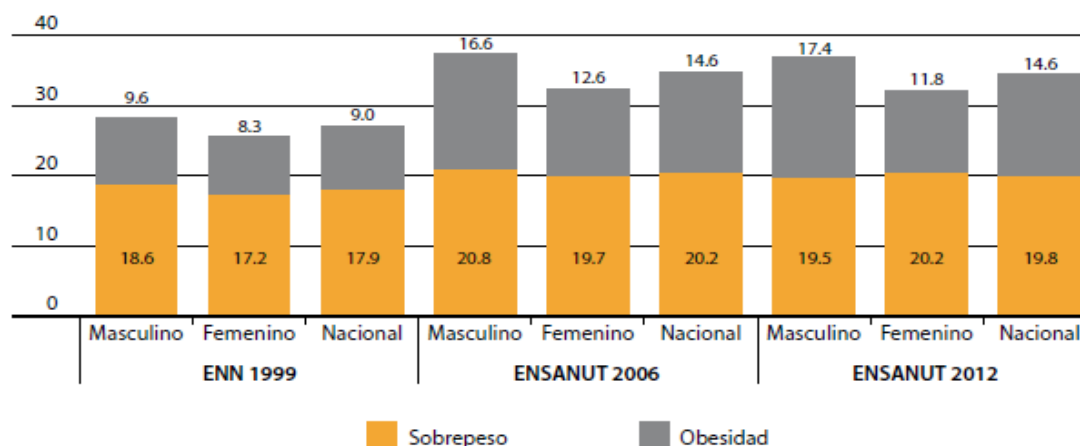


Figura 1. Comparativo de la prevalencia nacional de sobrepeso y obesidad en México.

Comparativo de la prevalencia nacional de sobrepeso y obesidad en población de 5 a 11 años de edad, de la ENN 99, ENSANUT 2006 Y ENSANUT 2012, por sexo, de acuerdo a los criterios propuestos por la OMS. México, ENSANUT 2012.

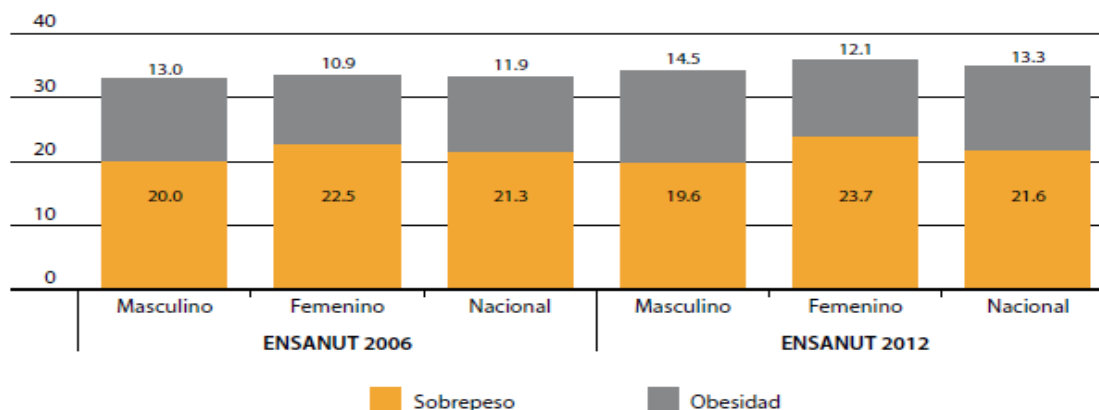


Figura 2. Comparativo de la prevalencia nacional de sobrepeso y obesidad en México.

Comparativo de la prevalencia nacional de sobrepeso y obesidad en población de 12 a 19 años de edad, de la ENSANUT 2006 y ENSANUT 2012, por sexo, de acuerdo con los criterios propuestos por la OMS. México, ENSANUT 2012.

Genética de la obesidad.

La obesidad es un padecimiento multifactorial que tiene bases genéticas pero requiere de la influencia de factores ambientales para manifestarse, resulta de la interacción de múltiples genes con el ambiente. De los genes implicados en la etiología de la obesidad se encuentran aquellos que codifican para péptidos orientados

en transmitir señales de hambre y saciedad, genes implicados en el crecimiento y diferenciación de los adipocitos y genes implicados en el control del gasto energético (Farooqi, 2011).

De las tres formas de obesidad, monogénica (mendeliana), sindrómica y común, la forma monogénica es aquella en la que el fenotipo de obesidad se deriva de cambios mutagénicos en un solo gen, la sindrómica es causada por una patología; y la denominada común agrupa todos aquellos casos donde existe un problema multifactorial donde se presenta un desequilibrio entre el consumo y el uso de la energía ingerida que puede deberse a factores ambientales o genéticos. Por lo que la obesidad común es considerada un padecimiento poligénico y multifactorial, que resulta de la interacción del genoma con el ambiente (Bell *et al.*, 2005; González-Jiménez, 2011).

Se han encontrado alrededor de 20 genes causantes de obesidad monogénica que resultan en una forma autosomal de la obesidad. De todas estas mutaciones, las de la vía leptina/melanocortina en el sistema nervioso central es crítica en la regulación de la homeostasis energética corporal y la obesidad en estos casos parece ser el resultado de incremento en el apetito y disminución de la saciedad. La obesidad sindrómica surge de defectos genéticos discretos o anormalidades cromosomales en varios genes y puede ser autosomal o ligada al cromosoma X (Herrera y Lindgren, 2010).

La agregación familiar, la cual indica que factores de riesgo para padecer ciertas enfermedades son más frecuentes en grupos familiares debido a los genes que comparten, es una característica prominente de la obesidad monogénica pero es menos evidente para la obesidad común. En general entre el 40% y 60% de las variaciones en los fenotipos relacionados con obesidad, como el índice de masa corporal (IMC), la suma de pliegues cutáneos, masa grasa y niveles de leptina, se han estimado que son debidos a la herencia (Lu *et al.*, 2008). Diversos estudios epidemiológicos de la obesidad común han demostrado que existe un componente genético en la susceptibilidad a la obesidad. Se tiene la hipótesis que los genes que alguna vez proveyeron una ventaja evolutiva (permitiendo una máxima eficiencia en el almacenamiento de nutrientes) cambiaron severamente al encontrarse expuestos a

un medio ambiente obesogénico, sin embargo ésta hipótesis aún debe ser probada y demostrada (Herrera y Lindgren, 2010). Se han realizado grandes esfuerzos para encontrar genes específicos para obesidad a través de la combinación de estudios de escaneo y de asociación de genes candidato.

Genes candidato asociados con fenotipos de obesidad en niños y adolescentes.

Actualmente se ha reportado la asociación de la obesidad a diversos genes candidato. En la Tabla 2 se enlistan algunos de estos genes asociados con obesidad en niños y adolescentes.

Tabla 2. Genes candidatos asociados con fenotipo de obesidad en niños y adolescentes.

Genes candidatos asociados con fenotipo de obesidad en niños y adolescentes.		
Gen	Fenotipo afectado	Referencia
<i>ABCA1</i>	Obesidad, IMC	Villarreal-Molina <i>et al.</i> , 2007.
<i>ACDC (ADIPOQ1)</i>	Obesidad, IMC, ICC	Fumeron <i>et al.</i> , 2004.
<i>ADIPOR1</i>	Obesidad, IMC	Rasmussen <i>et al.</i> , 2006.
<i>ADIPOR2</i>	Obesidad, IMC	Rasmussen <i>et al.</i> , 2006.
<i>ADRBI</i>	IMC, grasa corporal	Dionne <i>et al.</i> , 2002.
<i>APOA4</i>	Obesidad	Tso <i>et al.</i> , 2004.
<i>ATRN</i>	Obesidad, IMC	Yeo <i>et al.</i> , 2003.
<i>CALCR</i>	IMC	Nakamura <i>et al.</i> , 2001.
<i>FTO</i>	DT2 e IMC	Frayling <i>et al.</i> , 2007.
<i>GHRL</i>	Obesidad, resistencia a insulina	Scerif <i>et al.</i> , 2011.
<i>INSIG2</i>	Obesidad, IMC	Lyonet <i>et al.</i> , 2007.
<i>INSR</i>	Obesidad, IMC	Blüher <i>et al.</i> , 2002.
<i>LEP</i>	Obesidad, IMC	Jian <i>et al.</i> , 2004.
<i>LEPR</i>	IMC, grasa corporal, obesidad extrema en niños	Chagnonet <i>et al.</i> , 2000, Roth <i>et al.</i> , 1998.
<i>MC3R</i>	Obesidad, IMC	Lee <i>et al.</i> , 2007.
<i>PPAR-alpha</i>	Atenúa obesidad	Huang <i>et al.</i> , 2011.
<i>PPAR-gamma</i>	IMC, peso, masa grasa	Bell <i>et al.</i> , 2005.
<i>PPAR-gamma-C1-alpha</i>	Obesidad, IMC	Ridderstrale <i>et al.</i> , 2006.
<i>SORT1</i>	Obesidad, IMC	Kaddai <i>et al.</i> , 2009.
<i>UPC</i>	IMC, Obesidad	Bell <i>et al.</i> , 2005

IMC, índice de masa corporal; ICC, índice cintura cadera; DT2, diabetes tipo 2.

ABCA1

Este gen codifica para un transportador del casete de unión de ATP. La variante R230C/C230C de este gen ha sido asociada no solo con niveles disminuidos de HDL y apolipoproteína A-I, sino también con obesidad, síndrome metabólico y diabetes tipo 2 (Villarreal-Molina *et al.*, 2007) En China se realizó un estudio para investigar si la expresión de *ABCA1* es alterada en los monocitos de pacientes con sobrepeso y obesidad. Los resultados mostraron que la expresión de *ABCA1* disminuyó significativamente en estos pacientes. Esta reducción en la expresión de

ABCA1 se asocia con el deterioro en el eflujo del colesterol de los monocitos derivados de macrófagos en personas con sobrepeso y obesidad (Xu *et al.*, 2009).

ACDC (AIPOQ1)

Este gen tiene los dominios adipocito C1q y colágeno, en el cromosoma 3q27, encargados de la codificación de adiponectina, hormona derivada de los adipocitos con efectos antiinflamatorios, antiaterogénicos y de sensibilidad ante la insulina. Cuatro polimorfismos de una sola base (SNPs) de este gen (-11391 G/A, -11377 C/G, +45 T/G y +276 G/T) y sus haplotipos han sido asociados a obesidad, sensibilidad a la insulina, diabetes tipo 2 y enfermedad coronaria (Tankó *et al.*, 2005). En un estudio realizado en Italia se analizó la expresión del gen *ACDC* en 2 razas genéticamente distintas de puercos, Large White (LW) y Casertana (CE). La primera se caracteriza por un fenotipo “magro” mientras que la segunda presenta un fenotipo obeso. Entre estos se encontró una identidad del 100% en la secuencia del gen *ACDC*, sin embargo, la expresión de adiponectina fue superior en LW que en CE, presentando también diferencias cualitativas en mRNA, hallando tres transcritos adicionales (-1.7, -1.3 y -0.9kb) en LW. Se identificaron diferencias en los patrones de expresión de las isoformas de adiponectina, siendo particularmente abundante la isoforma de mayor peso molecular en LW. Estos datos proporcionan la primera evidencia de la correlación de los niveles de adiponectina y el fenotipo obeso en puercos, que presentan una respuesta patológica similar a la de los humanos tras la ingesta de dietas hipocalóricas (Daniele *et al.*, 2008)

ADIPOR1, ADIPOR2

Estos genes codifican para receptores de adiponectina. *ADIPOR1* es expresado principalmente en musculo esquelético, mientras que *ADIPOR2* se expresa principalmente en hígado. Estos receptores también son expresados en tejido adiposo donde *ADIPOR1* se expresa de 10 a 15 veces más que *ADIPOR2*, macrófagos y células beta pancreáticas (Oliveira *et al.*, 2011). Un estudio encontró que se presenta una pérdida de peso al aumentar la expresión de los genes receptores de adiponectina

en tejido adiposo humano; adicionalmente se demostró que ésta pérdida de peso induce una mejora en la sensibilidad a la insulina que puede ser mediada por una regulación de adiponectina (Rasmussen *et al.*, 2006)

ADRB1

Los receptores beta adrenérgicos han sido estudiados como genes candidatos para obesidad debido a que tienen un papel importante en la estimulación de la termogénesis y lipólisis. El principal sitio de expresión es el páncreas y tejido adiposo (Fujisawa *et al.*, 1998; Salopuro *et al.*, 2004). Son receptores acoplados a proteínas G, median los efectos funcionales de epinefrina y norepinefrina en varios tejidos. En un estudio realizado se encontró que el polimorfismo Gly389Arg de *ADRB1* se encuentra asociado con aumento en el peso y el índice de masa corporal en mujeres caucásicas debido a un aumento en la masa grasa (Dionne *et al.*, 2002).

Para determinar si el desbalance entre los receptores adrenérgicos alfa y los subtipos de receptores adrenérgicos beta *in vivo* podrían afectar el metabolismo o anatomía del tejido adiposo, se realizó un experimento en el cual produjeron ratones transgénicos con expresión de *ADRB1* humano en el tejido adiposo. Los ratones transgénicos con sobreexpresión de este gen ganaron peso con menor rapidez y produjeron depósitos adiposos más pequeños que el grupo control en respuesta a una dieta elevada en grasa, además de mantener el equilibrio entre los subtipos beta en los tejidos. En el grupo control se expresó 50 veces menos que el grupo transgénico. Esta evidencia sugiere que la sobreexpresión de *ADRB1* genera una actividad protectora ante el desarrollo de obesidad. (Soloveva *et al.*, 1997).

En general, tras la estimulación de los receptores adrenérgicos beta (subtipos 1,2 y 3), en adipocitos blancos se genera un estado en el cual la lipólisis es incrementada, principalmente por la producción de cAMP y la activación de lipasa sensible a hormonas entre otras rutas metabólicas. La presencia particular de los subtipos de receptores beta afecta el nivel de la lipólisis en el tejido adiposo. Mientras que los receptores beta 1 y beta 2 se han encontrado en un gran número de tejidos, el receptor beta 3 ha sido localizado predominantemente en masa grasa. En tejido adiposo de ratones, se ha encontrado una proporción aproximada de mRNA para

B1/B2/B3 de 3:1:150. Debido a esto se ha propuesto a B3 como el mayor regulador de lipólisis en esta especie. Sin embargo, ratones con mutaciones en el gen *ADRB3* muestran solo una ligera tendencia a la obesidad con respecto a ratones normales. Debido a esto es posible que también los receptores B1 y B2 regulen la lipólisis y más aún, tras el hallazgo de que en otras especies, incluida la especie humana, se presentan niveles mayores de B1 y B2 en tejido adiposo (Lafontan *et al.*, 1993).

APOA4

La apolipoproteína IV (*APOA4*) es secretada principalmente por el intestino asociada con los quilomicrones, su síntesis es estimulada por la absorción de grasa y probablemente es mediada por la formación de quilomicrones. La estimulación de la síntesis de *APOA4* en el yeyuno y el íleon es atenuada por una infusión intravenosa de leptina. En el hipotálamo, los niveles de esta apolipoproteína se reducen al existir una privación de los alimentos, y se restaura al ingerir grasas, por lo que puede tener un efecto fisiológico en el control de la ingesta de alimentos. Una administración intracerebroventricular del antisuero *APOA4* incrementa la ingesta de comida y decrementa los niveles de mRNA de *APOA4* hipotalámico, lo que implica que la alimentación normalmente es limitada por la apolipoproteína endógena. Se sugiere que también está involucrada en la regulación a largo plazo de la ingesta de comida y el peso corporal (Tso y Liu, 2004).

ATRN

La atractina o mahogany codifica para una proteína que está involucrada en la regulación del cambio de pigmentación por síntesis de eumelanina a feomelanina, por la vía de señalización *Mc1r-Agouti*. Son pocos los estudios acerca de la atractina como posible gene candidato para obesidad, sin embargo se propone que esta proteína tiene influencia en los receptores de melanocortina los cuales regulan la homeostasis de energía y de este modo puede tener un papel importante en el desarrollo de la obesidad (Yeo *et al.*, 2003).

CALCR

La calcitonina codifica para un receptor de alta afinidad para el péptido hormona calcitonina, pertenece a una subfamilia de receptores acoplados a proteínas G de siete pasos transmembranales. Polimorfismos en este gen han sido asociados con variaciones en la densidad mineral ósea y osteoporosis. Un estudio realizado en mujeres japonesas encontró que la presencia de un polimorfismo en la posición 1377, es un factor genético que regula el peso corporal (Nakamura *et al.*, 2001).

FTO

Es el gen asociado a masa grasa y obesidad. *FTO* codifica la proteína AlkB-demetilasa de ácidos nucleicos dependiente de 2-oxoglutarato con una fuerte preferencia por 3-metilimidina y 3-metiluracil en el DNA y RNA de una sola hebra respectivamente. Estudios de asociación del genoma completo han revelado que los SNP's rs9939609, rs17817449, rs1421085 y rs9930506 en el intron 1 de este gen, están asociados con un elevado riesgo de padecer obesidad. Se realizó un estudio en ratones que han perdido la función de *FTO* o la expresión de *Fto*. Se observó que una sobreexpresión de *Fto* lleva a un incremento, dependiente de la dosis, en la masa grasa y corporal independientemente del tipo de alimentación que tengan, ya sea estándar o alta en grasa. Estos resultados sugieren que el incremento en la masa corporal resulta principalmente por un aumento en la ingesta de alimentos. Del mismo modo los ratones con incremento en la expresión de *Fto* y con una dieta alta en grasa desarrollaron intolerancia a la glucosa. Los resultados sugieren que un incremento en la expresión de *Fto* es la causa de desarrollo de obesidad en ratones (Church *et al.*, 2010).

FTO posee una secuencia homologa a las proteínas de la familia AlkB, las cuales remueven directamente aductos de alquilo de bases dañadas utilizando un mecanismo de demetilación oxidativa. Se ha demostrado *in vitro* que puede demetilar 3-meT en ssRNA en presencia de hierro(II), alfa-cetoglutarato (α -KG) y dioxígeno. También se observó que su actividad demetiladora es más eficiente en ssRNA que en dsDNA 3-meT mediante las mismas condiciones, además tiene poca afinidad por dsDNA. Se propone que *FTO* cataliza la demetilación y ejerce una función reguladora de genes a nivel de RNA, de tal modo que una falla en su papel regulador

puede llevar a un fenotipo de obesidad relacionado con esta proteína. (Jia *et al.*, 2008).

GHRL

Este gen codifica para la proteína grelina la cual muestra un efecto orexigénico, se cree que actúa a nivel del hipotálamo regulando las vías del apetito, mientras que a nivel periférico produce un incremento del tejido adiposo y tiene un efecto diabetogénico en el hígado y páncreas. Se ha observado que los niveles de grelina en plasma son dependientes del índice de masa corporal y de la ingesta de alimentos, en individuos obesos se encuentran niveles reducidos al igual que en sujetos que presentan resistencia a la insulina (Scerif *et al.*, 2011)

INSIG2

Es el gen que codifica la proteína de señalización de insulina tipo 2, que en respuesta a los cambios en los niveles lipídicos en el retículo endoplasmático, impide el movimiento de esterol y sus funciones de unión proteica, procesamiento, liberación, factor de transcripción y regulación de la síntesis de lípidos. El SNP rs7566605 ha sido asociado con la obesidad, incremento de niveles de triglicéridos en ratas y fenotipos para obesidad en ratones. En el estudio realizado por Lyon *et al.* En 2007 se analizaron 9 cohortes de 8 poblaciones distintas se encontró evidencia de que individuos homocigotos con genotipo C/C en el SNP rs7566605 tienen un mayor Índice de Masa Corporal y riesgo elevado de padecer obesidad (Lyon *et al.*, 2007). En un estudio realizado en ratas Zucker (fa/fa) para evaluar el efecto de la sobreexpresión del gen *INSIG1* e *INSIG2* sobre la lipogénesis, se encontró una dramática reducción en la expresión de enzimas lipogénicas y de triglicéridos tanto en hígado como en plasma, asociada con la reducción nuclear de SREBP-1c (proteína regulada por esterol, factor de transcripción asociado a la membrana), debido a la sobreexpresión de dichos genes en hígado (Takaishi *et al.*, 2004).

INSR

Gen del receptor de la insulina. Diversos estudios han demostrado que la vía de señalización de la insulina juega un papel importante en el tejido adiposo, ya que participa en el almacenamiento de lípidos y regula la homeostasis de la glucosa. En un estudio realizado en ratones knock-out, que no presentan receptor de insulina en tejido adiposo, se observó que estos animales presentan una baja cantidad de masa grasa, además tienen protección contra obesidad debido a la edad y relacionada con intolerancia a la glucosa. De aquí se concluye que la señalización de la insulina en adipocitos es crítica para el desarrollo de la obesidad y es asociada con anomalías metabólicas (Blüher *et al.*, 2002).

LEP

La leptina es un gen candidato para obesidad debido a su papel principal en una vía que censa la adiposidad y también por su efecto fisiológico en el balance de energía. Aunque se han realizado varios estudios sobre las mutaciones en este gen, las variaciones dentro de la región codificante son extremadamente raras. En un estudio realizado se demostró que existe una fuerte asociación de variantes y haplotipos en la región 5' del gen LEP con el IMC ajustado para sexo y edad, y un rasgo de obesidad definida dicotómicamente, lo cual sugiere que existen variantes en la secuencia que son asociados con obesidad en la población en general (Jian *et al.*, 2004).

En un estudio realizado en ratones se encontró que la expresión de leptina es alta en aquellos que presentan una menor grasa corporal y fueron alimentados principalmente con proteínas. En contraste con los ratones C57B1/6J con un alimentación alta en grasa los cuales tienen una expresión de leptina menor en relación a la masa grasa. Una señal precisa que media la regulación de la expresión de leptina y la secreción no es claro, pero es conocido que la insulina tiene un papel importante. La secreción de leptina de adipocitos es estimulado por insulina y la estimulación de los receptores B3 adrenérgicos es conocido que inhibe la secreción de leptina estimulada por insulina. La expresión de leptina también está involucrada en la vía de señalización de adipocitocinas lo cual concuerda con lo reportado por

este grupo de investigación, en donde encontraron que este grupo de genes es el segundo grupo sobre regulados (Gautron et al., 2011).

LEPR

El gen *LEPR* codifica para un receptor de citocina clase I con un dominio transmembranal. El receptor es expresado en hipotálamo, plexo coroideo, cerebro, pulmón, musculo esquelético, riñón e hígado entre otros tejidos. Varios grupos han realizado estudios acerca de las mutaciones y polimorfismo en el gen *LEPR*, y se han descrito diversas variantes, Lys109Arg, Gln223Arg, Lys656Asn y Lys204Arg relacionadas con la obesidad (Roth et al., 1998).

En ratones y en humanos se han estudiado polimorfismos en los genes de leptina y receptor de leptina, relacionados con diferentes patrones de obesidad y diabetes. Sin embargo, en los humanos una obesidad severa debida a mutaciones en estos genes es poco frecuente. Aunque la obesidad generalmente se piensa como desorden monogénico, los niveles de leptina incrementan aunado al incremento de masa grasa, sugiriendo que la obesidad es un estado de resistencia a la leptina y que las variaciones genéticas en el receptor de la leptina o los efectos post-receptor pueden influenciar en la vía de señalización de la melanocortina y de este modo propiciar la tendencia para la acumulación de grasa y el desarrollo de la obesidad común (Óvilo et al., 2010).

En un estudio realizado en cerdos ibéricos obesos se observó que aquellos que presentaban el polimorfismo en el gen *LEPR* (1987C>T) presentaban un aumento en la deposición de grasa y esto llevaba a una intensa reducción de la expresión del gen *LEPR* en el hipotálamo, lo cual provee nueva evidencia funcional que soporta la causalidad de este SNP y un efecto fenotípico observado. Una baja expresión del gen *LEPR* se ajustó con la obesidad por resistencia a leptina observada en estos cerdos. Una reducción en la señalización de leptina puede ser considerada como una de las determinantes de las características del fenotipo obeso en este modelo animal (Óvilo et al., 2010).

MC3R

El receptor de melanocortina 3 (MC3R) se encuentra acoplado a proteínas G. Diversas funciones han sido atribuidas a los péptidos de melanocortina entre las que se encuentran regulación y homeostasis de energía, estas acciones son mediadas por la familia de receptores de melanocortina (Yeo *et al.*, 2003). Los ratones knock-out para *MC3R* son hipofágicos y muestran un fenotipo peculiar, aumento de la masa grasa y decremento de masa magra; de tal modo que una eficiencia alimenticia y la ausencia de hiperfagia contribuyen a un aumento de la masa grasa (Mencarelli *et al.*, 2011). Se ha observado que mutaciones en el receptor de melanocortina 3 no pueden resultar en una forma dominante autosomal de obesidad pero pueden contribuir como un factor predisponente a obesidad en la infancia, teniendo un papel importante en la regulación del peso (Lee *et al.*, 2007).

PPAR-alpha

Es una proteína receptora activada por proliferador de peroxisomas de tipo alfa. En un estudio realizado en ratones que carecen de acyl-CoA oxidasa 1 (Acox1), la primera enzima del sistema peroxisomal de la beta oxidación de ácidos grasos, se observa que incrementa el gasto energético y la masa magra como resultado de una activación sostenida de *PPARA* por ligandos endógenos del hígado que permanecen sin metabolizar en ausencia de Acox1, también se observa una reducción de insulina y glucosa en suero, una mejora en la tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina. Por lo que *PPARA* atenúa la obesidad y restaura la homeostasis de glucosa aminorando la resistencia a la insulina pero aumenta el riesgo a padecer cáncer de hígado (Huang *et al.*, 2011).

PPAR-gamma

Es una proteína receptora activada por proliferador de peroxisomas de tipo gamma. Regula la diferenciación de adipocitos. Este gen se encuentra asociado a obesidad, sobrepeso y masa grasa. Se encontró que el polimorfismo Pro12Ala está

asociado con un incremento en el riesgo de padecer obesidad en aquellas personas que presentan una alta ingesta de carbohidratos (Bell *et al.*, 2005).

PPAR-gamma-C1-alpha

Es una proteína receptora activada por proliferador de peroxisomas tipo gamma co-activada 1 alfa. El polimorfismo Gly482Ser en *PPARGC1A* se ha asociado con obesidad y diabetes tipo 2, este riesgo es dependiente del sexo y diversos factores del medio ambiente como la edad. El riesgo a obesidad aunado a la presencia del polimorfismo es más evidente en sujetos masculinos mayores con inactividad física (Ridderstrale *et al.*, 2006).

SORT1

Este gen codifica para una proteína receptora multi-ligando tipo 1, la cual es una proteína de la red transmembranal trans-Golgi; une a numerosos ligandos no relacionados que participan en un amplio rango de procesos celulares. Funciona como un receptor clasificador en el compartimento de Golgi y se considera que es requerido en los adipocitos para la formación de vesículas almacenadoras especializadas que contienen al transportador de glucosa SLC2A4/GLUT4 los cuales confieren un incremento en la sensibilidad a la insulina. En un estudio realizado en tejido adiposo de individuos obesos se observó que el mRNA y la proteína fueron regulados negativamente, también se encontró un decremento en pacientes diabéticos con obesidad mórbida. La sortilina tiene un papel esencial en el metabolismo de la glucosa en el adipocito controlando la localización de GLUT4. Una inflamación crónica de bajo grado en obesos puede contribuir a la resistencia a la insulina mediante la modulación de proteínas que controlan el tráfico de GLUT4 (Kaddai *et al.*, 2009).

UPC1

Son proteínas desacoplantes de la fosforilación oxidativa las cuales protegen a la mitocondria contra estrés oxidativo inducido por lípidos, además participa en la

termogénesis y balance de energía. Los niveles de expresión aumentan cuando los suministros de ácidos grasos a la mitocondria exceden su capacidad de oxidación. El haplotipo común en *UPC1* [GAG] se encuentra asociado con el índice cintura-cadera. El haplotipo [GGCdelCGTACC] en *UPC2* se ha asociado a reducción en masa grasa. Haplotipo común [CGTACC] en *UPC3* se encuentra asociado con reducción en peso corporal e IMC (Bell *et al.*, 2005).

Polimorfismos y expresión génica

Existen polimorfismos en los genes mencionados anteriormente que se han asociado con susceptibilidad para sobrepeso y obesidad, pero es común que no se explore el efecto de este polimorfismo sobre la expresión genética. Estudio de los SNP que afectan la expresión genética es de gran interés ya que las diferencias de la expresión entre un sujeto y otro pueden modificar el fenotipo. La variación de la expresión de múltiples genes puede determinar efectos fenotípicos profundos, algunos de los cuales pueden ser determinantes en la fisiopatología de enfermedades complejas como es el caso de la obesidad. Por lo que los patrones de expresión molecular a nivel de RNA mensajero son un complemento imprescindible para descifrar y comprender la función de múltiples genes que conforman el genoma humano (Hernández-Romano *et al.*, 2009).

Sangre periférica y estudios de expresión

La habilidad de obtener un patrón de expresión de genes a una escala genómica ha facilitado un rápido avance en la identificación de vías moleculares asociadas a diversas enfermedades. Para tal fin recientemente se han empleado muestras de sangre periférica. El perfil de expresión de genes en sangre periférica presenta la ventaja de ayudar a la comprensión de diversas enfermedades ya sea proporcionando biomarcadores para tener un mejor diagnóstico o bien para un mejor manejo clínico de diversos desordenes y también sugiriendo nuevos blancos terapéuticos (Baechler *et al.*, 2004).

La sangre periférica representan un excelente tejido para realizar estudios de expresión, cuenta con la ventaja de ser obtenida por un procedimiento no invasivo, se considera que es afectada por las condiciones del hospedero y que puede reflejar cambios causados por altos niveles de glucosa, insulina, ácidos grasos libres y mediadores bioactivos circulantes provenientes de otros tejidos (Takamura *et al.*, 2007; López-Orduña *et al.*, 2007). Además se ha demostrado que existe una concordancia alrededor del 70% entre los genes que se expresan en tejido adiposo, tejido muscular y sangre periférica (Bastarrachea *et al.*, 2008). Por lo tanto las muestras provenientes de sangre periférica permitirán identificar nuevos marcadores que puedan apoyar el diagnóstico y tratamiento de la obesidad y en dado caso encontrar novedosos blancos terapéuticos, todo con la finalidad de comprender mejor este tipo de enfermedad.

ALCANCE.

En este trabajo se realizó la caracterización de los niveles de expresión de mRNA de 20 genes asociados a obesidad, en muestras de sangre periférica de 80 niños sanos y 80 con obesidad.

JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La obesidad es un problema de salud, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. Una forma de abordar este problema es examinar diversos genes que pueden estar asociados con el padecimiento, por lo tanto nuestro interés es contar con la caracterización de un perfil de expresión que permita correlacionarlos con los demás parámetros presentes en obesidad.

HIPÓTESIS GENERAL.

En población infantil mexicana con obesidad, existen genes candidatos asociados cuya expresión transcripcional se encuentra alterada y se relacionada con el padecimiento.

OBJETIVO GENERAL

Cuantificar los niveles de expresión de los genes candidato seleccionados en células blancas de sangre periférica para evaluar su contribución a la obesidad.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- 1.- Estandarizar un proceso para la obtención de RNA a partir de sangre periférica.
- 2.- Selección de niños sanos y obesos con base a sus medidas antropométricas y la clasificación de acuerdo a las tablas de crecimiento CDC 2000 (Kuczmarski *et al.*, 2000) y la OMS.
- 3.- Medir los niveles de expresión de mRNA de los genes candidato seleccionados.
- 4.- Analizar estadísticamente los resultados en un modelo transversal analítico.
- 5.- Validar los resultados de expresión por PCR tiempo real.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Diseño del estudio

Se realizó un estudio transversal analítico, se incluyeron niños entre 6 y 14 años de edad procedentes de centros deportivos del IMSS (Instituto Mexicano del Seguro Social), para lo cual se realizó una invitación al público en general, sin importar si son o no derechohabientes; los niños que acudieron fueron caracterizados en los siguientes parámetros: medidas antropométricas (peso, talla, circunferencia de cintura, circunferencia de cadera y el índice de masa corporal), antecedentes heredo-familiares (hipertensión, obesidad, etc.) y perfil bioquímicos (glucosa, colesterol total, HDL, LDL, triglicéridos). La clasificación de sano, sobrepeso y obesidad se realizó de acuerdo al puntaje z de IMC por edad y sexo, conforme a las referencias de la OMS (Apéndice 2) y las tablas CDC2000 (Apéndice 1), con los siguientes puntos de corte descrito en la tabla 3.

Clasificación	Puntaje z
Normal	-2 a +1 DE*
Sobrepeso	>+1 DE
Obesidad	>+2 DE

*DE: desviación estándar

Se excluyeron del estudio aquellos niños que al momento del estudio se encontraran bajo tratamiento médico, que reportaran y/o presentaran algún tipo de enfermedad diferente a la obesidad. Se eliminaron del estudio los que no proporcionaron toda la información requerida, cuando la cantidad de muestra sanguínea no fue suficiente, los que no presentaron un consentimiento y asentimiento informado.

Tamaño de la muestra.

La muestra fueron 160 niños de ambos sexos, con edades de 6 a 14 años, los cuales acudieron a un centro deportivo del IMSS para realizar toma de medidas antropométricas y muestras sanguíneas, cuyo IMC para edad y sexo se encontró

dentro de los criterios establecidos conforme a las referencias de la OMS descritos en la tabla 4 y las tablas CDC 2000, fue requisito que los padres firmaran un consentimiento informado (Apéndice 3) y los niños un asentimiento informado (Apéndice 4).

Descripción por objetivos.

Objetivo 1. Estandarizar un proceso para la obtención de RNA a partir de sangre periférica.

Determinar las condiciones necesarias para la obtención de RNA ya que las muestras fueron extraídas en un lugar externo al laboratorio de trabajo, por lo que se requirió un manejo adecuado de las muestras sanguíneas para evitar la degradación del RNA. Se probaron diversas condiciones hasta encontrar las óptimas para almacenaje, transporte de muestras y extracción de RNA.

Objetivo 2. Selección de niños sanos y obesos.

Selección de niños sanos y obesos con base a sus medidas antropométricas y la clasificación de acuerdo a las tablas de crecimiento CDC 2000 y la OMS.

a. Criterios de selección y logística del trabajo de campo. Se realizó una valoración clínica y se llenaron cuestionarios (medidas antropométricas, antecedentes heredo-familiares), y se analizaron parámetros bioquímicos (glucosa, colesterol total, HDL, LDL). La clasificación de sano, sobrepeso y obeso se realizó de acuerdo al puntaje z de IMC por edad y sexo, conforme a las referencias de la OMS, con los puntos de corte descrito en la tabla 4 y las tablas CDC2000.

Se tomaron las siguientes consideraciones para participar en el estudio:

- i. Se solicitó a los padres la firma de la carta de consentimiento (Apéndice 3) y a los niños la carta de asentimiento informado (Apéndice 4).
- ii. Se aplicaron cuestionarios de generalidades (Apéndice 5), frecuencia de consumo de alimentos (Apéndice 6), actividades físicas (Apéndice 7) y se tomaron medidas antropométricas (Apéndice 8).

b. A los participantes se les solicitó acudir en ayuno de 12 horas para la obtención de las muestras de sangre (2 tubos con EDTA y 1 tubo para suero).

c. Se excluyeron del estudio a los participantes que refirieron o presentaron algún tipo de enfermedad diferente a la obesidad, también si se encontraron tomando algún tratamiento farmacológico. Se eliminaron del estudio cuando no contaron con toda la información solicitada, y cuando la cantidad de muestra sanguínea no fue suficiente para realizar los estudios requeridos.

Objetivo 3. Medir los niveles de expresión de mRNA de genes candidato seleccionados.

a. Aislamiento de RNA: Se realizó a partir de células blancas de sangre periférica. Se realizó un tratamiento con DNasa. La integridad, pureza y concentración se evaluó por espectrofotometría a 260/280 nm y fraccionamiento electroforético en geles de agarosa al 1.0 % teñidos con bromuro de etidio.

b. Obtención de cDNA: Se obtuvo empleando el sistema comercial High capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems PN 4368813).

c. Niveles de expresión: Diseño de placa de Open Array para expresión génica. Se diseñó una placa con todos los genes a estudiar, dicha placa contenía todo lo necesario para realizar de manera experimental PCR tiempo real y solo se adicionó la muestra para poder determinar niveles de expresión. El cDNA se utilizó para detectar por sondas TaqMan los niveles de expresión de los genes de estudio. Se utilizó el equipo Open Array Real-Time PCR System (Applied Biosystems), el análisis de fluorescencia se realizó utilizando el software del equipo.

Objetivo 4. Analizar estadísticamente los resultados en un modelo transversal analítico.

Los datos fueron expresados como el promedio \pm desviación estándar o mediana y rango intercuartil según sea el caso. Para realizar la comparación entre dos grupos se utilizó la prueba *t* de Student para distribución normal o U Mann-Withney para distribución no normal. Para la comparación de más de 2 grupos se utilizó ANOVA para varianzas iguales y Kruskal Wallis para varianzas diferentes. Los valores de $P \leq 0.05$ fueron considerados como estadísticamente significativos.

Objetivo específico 5. Validar los resultados de expresión por PCR tiempo real.

Se realizó la comprobación de los resultados de expresión para aquellos genes que presentaron un valor de $P \leq 0.05$. Se utilizaron sondas TaqMan y el análisis de fluorescencia se realizó con el software del equipo. Posteriormente se determinaron los niveles de expresión y se realizó la comparación de los datos obtenidos.

RESULTADOS ESPERADOS

Se esperaba observar una diferencia en los niveles de expresión de los genes propuestos analizados en niños obesos en comparación con los niños de peso normal. Estos resultados fueron de utilidad para comprender un poco más sobre la obesidad en población infantil.

RESULTADOS OBTENIDOS

Descritos por objetivo específico.

Objetivo 1. Estandarizar un proceso para la obtención de RNA a partir de sangre periférica.

Se determinaron las condiciones experimentales óptimas para extraer RNA de buena calidad a partir de muestras sanguíneas. Se realizaron pruebas en las cuales se almacenaron muestras sanguíneas bajo diversas condiciones para determinar la mejor

forma de manejo y transporte (ya que la toma se realiza fuera del laboratorio de trabajo) y así poder obtener RNA de buena calidad.

Después de varias pruebas se decidió que las muestras fueran tomadas con EDTA usando el sistema Vacutainer, el RNA se extrajo con el reactivo TriPure. Las mejores condiciones para obtener RNA de buena calidad fueron con sangre total fresca, sangre total congelada inmediatamente después de obtenida, sangre total con TriPure congelada a -70°C y sangre total con TriPure almacenada en hielo por 3 horas y posteriormente congelada a -70°C .

Por otra parte se realizó la prueba para obtener RNA con kits de extracción, sin embargo no se pudo trabajar con sangre congelada y cuando la muestra es almacenada en hielo por más de 3 horas se degrada el RNA, únicamente se obtienen buenos resultados con sangre fresca, sin embargo no es posible trabajar con sangre fresca (almacenada a lo más 30 minutos) debido a que el transporte de las muestras del lugar de la toma al laboratorio lleva más de 1 hora. Por lo anterior la forma en cómo se almacenaran las muestras será adicionando TriPure (Roche) y congelando inmediatamente con ayuda de hielo seco después de ser tomada.

Objetivo 2. Selección de niños sanos y obesos.

Se realizó la selección de niños sanos y obesos con base a sus medidas antropométricas y la clasificación de acuerdo a las tablas de crecimiento CDC 2000 y la OMS.

Se realizó muestreo en 3 Unidades Deportivas del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Unidad Deportiva Cuauhtémoc (UDC), Naucalpan, Estado de México, Unidad Deportiva Independencia (UDI), Delegación Magdalena Contreras, Distrito Federal y Unidad Deportiva Morelos (UDM), Delegación Gustavo A. Madero, Distrito Federal. Se tomó una muestra sanguínea con EDTA como anticoagulante y otra muestra sin anticoagulante, utilizando el sistema Vacutainer, se adicionó TriPure (Roche) y se congeló en hielo seco, posteriormente se almacenó a -70°C .

Se realizó la clasificación de sano o eutrófico, sobrepeso y obeso de acuerdo al puntaje Z de IMC por edad y sexo, y las tablas CDC 2000. Las gráficas obtenidas se observan en las Figuras 3, 4 y 5.

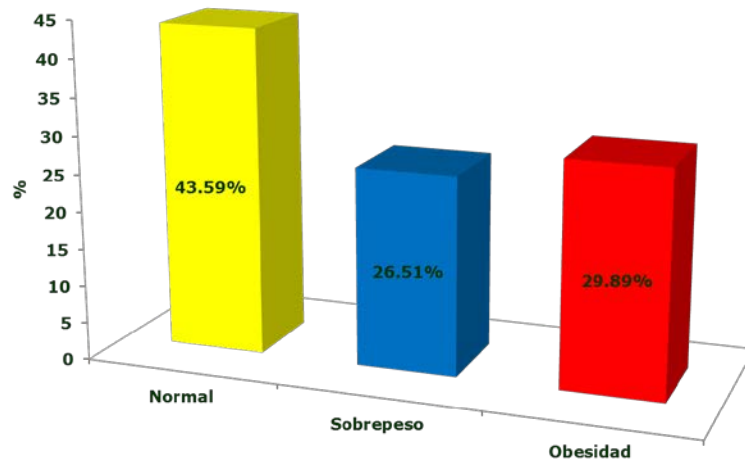


Figura 3. Muestreo en Unidad Deportiva Cuauhtémoc.

Porcentajes obtenidos al clasificar por percentiles de Índice de Masa Corporal para la edad y género. 563 niños.

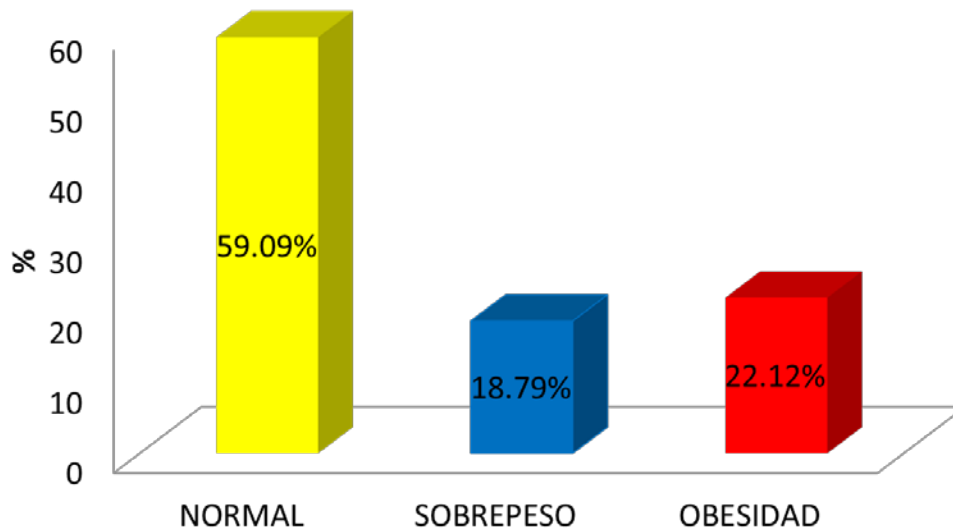


Figura 4. Muestreo en Unidad Deportiva Independencia.

Porcentajes obtenidos al clasificar por percentiles de Índice de Masa Corporal para la edad y género 660 niños.

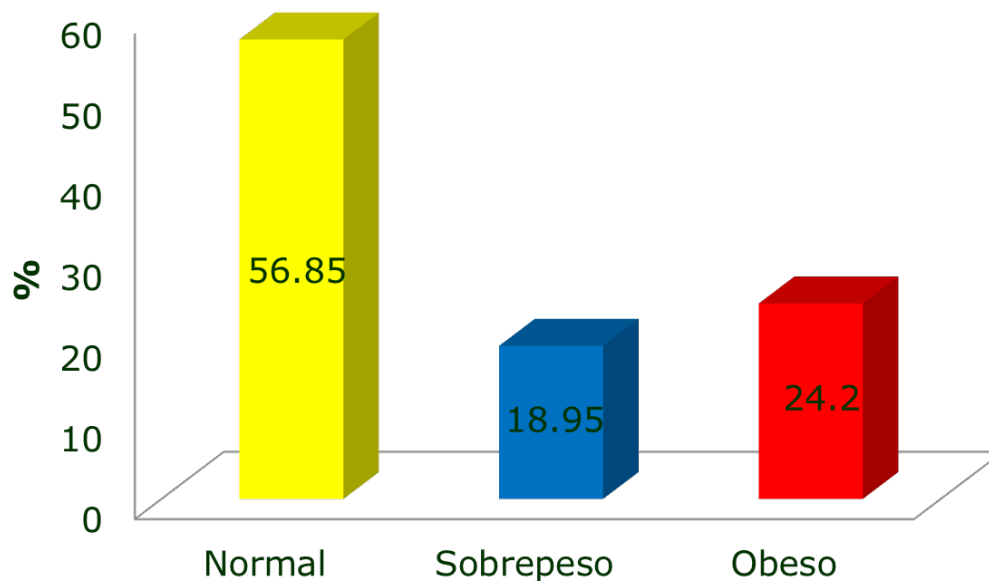


Figura 5. Muestreo en Unidad Deportiva Morelos.

Porcentajes obtenidos al clasificar por percentiles de Índice de Masa Corporal para la edad y género 876 niños.

Se examinaron las muestras sanguíneas sin anticoagulante para obtener un perfil bioquímico (colesterol, HDL, LDL, triglicéridos, glucosa), se tomaron dos mediciones de presión arterial y se obtuvo la media para cada niño. Posteriormente se realizaron análisis estadísticos de los datos obtenidos. Para cada grupo se determinó la media y la desviación estándar. Se empleó el Test de Levene para determinar homogeneidad de varianzas y la prueba de Kolmogorov-Smirnov para determinar la distribución de los datos (normalidad). Para comparar datos de los niños normales, con sobrepeso y obesos, se utilizó la prueba de ANOVA para varianzas iguales y Kruskal-Wallis para varianzas diferentes. Para comparar los niños sanos y obesos, se utilizó U de Mann-Whitney para distribución no normal y T de Student para distribución normal. Los datos obtenidos se muestran en las Tablas 4, 5 y 6.

Tabla 4. Perfil clínico para niños eutróficos, con sobrepeso y obesos. Unidad Cuauhtémoc.

Parámetro	NORMAL		SOBREPESO		OBESO		P
	\bar{x}	DE	\bar{x}	DE	\bar{x}	DE	
P. sistólica (mm Hg)	96.86	±8.66	99.60	±8.46	103.72	±9.63	<0.001
P. diastólica (mm Hg)	65.87	±7.21	67.79	±7.09	70.71	±7.30	<0.001
Glucosa (mg/dL)	81.05	±8.58	81.43	±7.03	82.34	±8.45	0.550
Colesterol (mg/dL)	152.13	±30.19	154.5	±34.26	161.40	±34.75	<0.001
Triglicéridos (mg/dL)	73.68	±31.23	93.03	±50.44	106.34	±50.65	<0.001
HDL (mg/dL)	50.99	±10.81	47.79	±12.78	44.15	±12.10	<0.001
LDL (mg/dL)	96.85	±22.18	102.41	±26.02	106.93	±26.71	<0.001

Unidad Deportiva Cuauhtémoc. HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein. Los resultados se presentan en promedios (\pm DE), Valor P ANOVA para varianzas iguales y Kruskal Wallis varianzas diferentes

Tabla 5. Perfil clínico para niños eutróficos, con sobrepeso y obesos. Unidad Independencia.

Parámetro	NORMAL		SOBREPESO		OBESIDAD		P
	\bar{x}	DE	\bar{x}	DE	\bar{x}	DE	
P. sistólica (mm Hg)	95.33	±10.77	97.58	±9.74	100.58	±11.07	<0.001
P. diastólica (mm Hg)	65.10	±9.06	67.22	±9.23	69.81	±8.57	<0.001
Glucosa (mg/dL)	77.16	±9.11	76.82	±9.37	78.75	±9.64	0.720
Colesterol (mg/dL)	141.41	±27.63	143.50	±31.72	154.77	±30.92	<0.001
Triglicéridos (mg/dL)	77.70	±35.29	97.81	±48.24	119.48	±61.42	<0.001
HDL (mg/dL)	50.55	±11.77	46.86	±10.50	44.50	±11.12	<0.001
LDL (mg/dL)	88.19	±19.65	91.73	±23.11	103.14	±23.94	<0.001

Unidad Deportiva Independencia. HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein. Los resultados se presentan en promedios (\pm DE), Valor P ANOVA para varianzas iguales y Kruskal Wallis varianzas diferentes

Tabla 6. Perfil clínico para niños eutróficos, con sobrepeso y obesos. Unidad Morelos.

Parámetro	NORMAL		SOBREPESO		OBESIDAD		P
	\bar{x}	DE	\bar{x}	DE	\bar{x}	DE	
P. sistólica (mm Hg)	99.29	±11.88	101.6	±13.2	99.93	±12.61	0.135
P. diastólica (mm Hg)	66.33	±9.16	67.27	±9.51	66.00	±9.03	0.283
Glucosa (mg/dL)	85.35	±8.85	86.63	±8.51	85.32	±7.77	0.272
Colesterol (mg/dL)	171.11	±33.49	176.10	±31.62	179.14	±32.28	0.006
Triglicéridos (mg/dL)	83.19	±34.51	101.44	±48.68	131.14	±65.49	<0.001
HDL (mg/dL)	58.65	±12.77	53.90	±12.93	49.34	±12.41	<0.001
LDL (mg/dL)	107.29	±25.65	114.19	±26.79	119.72	±28.68	<0.001

Unidad Deportiva Morelos. HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein. Los resultados se presentan en promedios (\pm DE), Valor P ANOVA para varianzas iguales y Kruskal Wallis varianzas diferentes

Con los resultados obtenidos mostrados anteriormente, se realizó la selección de casos y controles. Los controles fueron niños eutróficos, los casos niños obesos; para ambos se tomó en consideración que no tuvieran relación familiar alguna, que no estuvieran bajo tratamiento farmacológico y no presentarán o refirieran algún tipo de enfermedad al momento del estudio.

Con base en los criterios de selección se obtuvieron 160 muestras de las Unidades deportivas Independencia y Cuauhtémoc. Para estas muestras además de los parámetros mencionados anteriormente, se determinaron los valores de insulina y se realizó el cálculo de HOMA-IR=[(glucosa mg/dL)(insulina μ U/mL)]/405. Los datos obtenidos se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Características Clínicas de niños sanos y obesos.			
	Niños sanos	Niños Obesos	
Parámetros	IMC < 85pc	IMC \geq 95pc	P
	N=81	N=79	
Femenino(%)	52 (64.20)	35 (44.30)	
Edad (años)	8.41 \pm 1.60	9.19 \pm 1.73	0.004 [£]
Antropométricos			
Peso (kg)	32.69 \pm 10.41	48.65 \pm 14.28	<0.001 [£]
Estatura (cm)	1.33 \pm 0.12	1.42 \pm 0.13	<0.001 [¥]
IMC (kg/m ²)	18.07 \pm 3.16	23.53 \pm 4.21	<0.001 [£]
P. sistólica(mm Hg)	94.69 \pm 8.42	100.21 \pm 9.30	<0.001 [£]
P. diastólica(mm Hg)	63.24 \pm 7.77	67.81 \pm 7.36	<0.001 [£]
Metabólicos			
Glucosa (mg/dL)	79.98 \pm 9.05	83.20 \pm 10.02	0.034 [¥]
Colesterol (mg/dL)	146.82 \pm 26.29	156.51 \pm 26.67	0.225 [£]
Triglicéridos (mg/dL)	74.81 \pm 26.51	128.61 \pm 70.43	<0.001 [£]
HDL (mg/dL)	53.43 \pm 12.88	46.14 \pm 11.97	<0.001 [¥]
LDL (mg/dL)	93.36 \pm 20.16	104.15 \pm 27.64	0.006 [£]
Insulina (μ U/mL)	3.03 \pm 0.33	7.83 \pm 1.05	0.004 [£]
HOMA-IR	0.59 \pm 0.32	1.04 \pm 0.55	0.005 [£]

Los datos se presentan como la media \pm desviación estándar; valor de P [£]U Mann-Whitney variables continuas distribución no normal, [¥]T de Student variables continuas distribución normal; IMC: Índice de masa corporal; HDL: High Density Lipoprotein; LDL: Low Density Lipoprotein; pc: percentil.

Objetivo 3. Medir los niveles de expresión de mRNA de genes candidato seleccionados.

Se diseñó una placa para Open Array (Applied Biosystems) con la cual se podrá estudiar la expresión de 20 genes relacionados con obesidad (ver Tabla 2 de genes candidatos). La placa ya cuenta con todo lo necesario para realizar experimentalmente PCR tiempo real, solo se deberá adicionar la muestra y master mix.

Se inició con la extracción de RNA a partir de las muestras sanguíneas almacenadas con TriPure a -70°C . La muestra final de RNA se diluyo en H_2O DEPC. Se verificó su integridad y pureza en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio, cuantificación y relación de absorbancia a 260/280. Se realizó reacción de retrotranscripción y se obtuvo cDNA a una concentración final de $100\text{ng}/\mu\text{L}$. las muestras se almacenaron a -70°C .

Se siguió la siguiente metodología para extraer RNA por el método de TriPure: Figura 6.

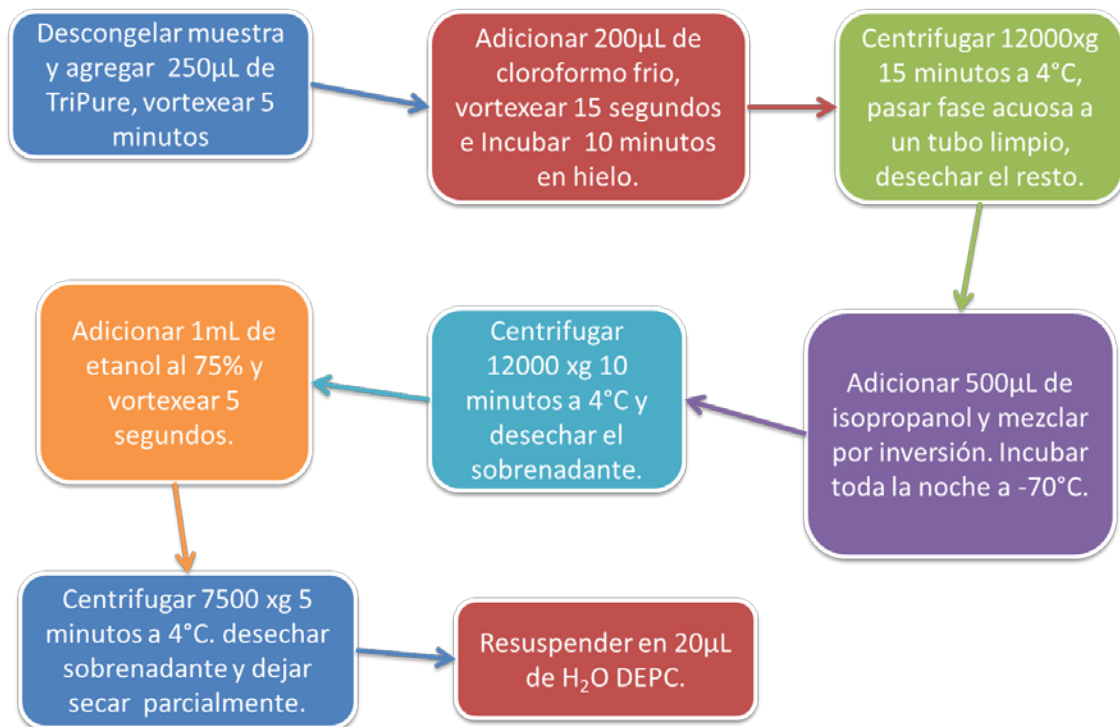


Figura 6. Extracción de RNA por el método de TriPure.

Las muestras de RNA fueron tratadas con DNasa siguiendo el siguiente protocolo (DNase I, RNase free, Fermentas): Figura 7.

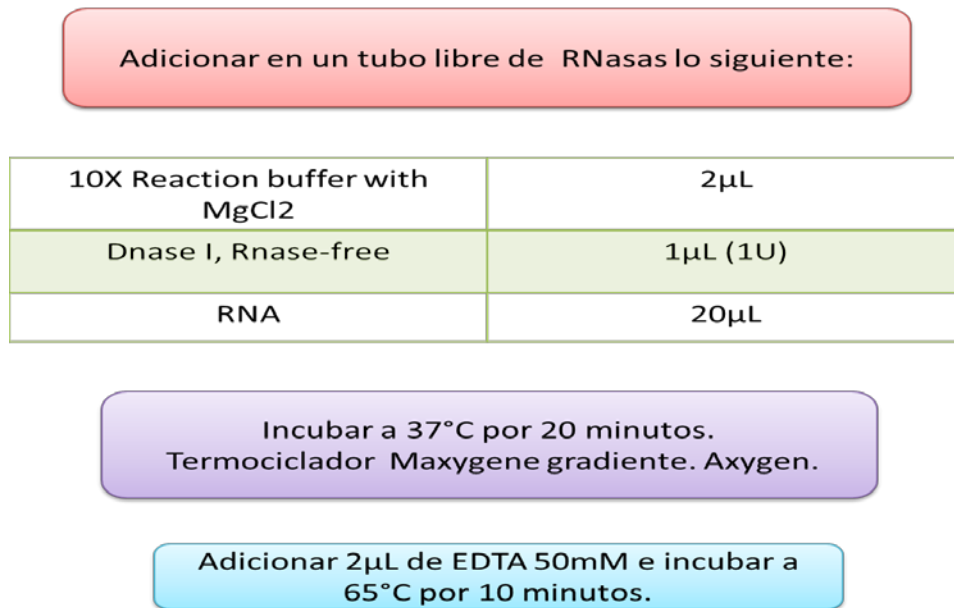


Figura 7. Tratamiento con DNasa.

Se realizó la cuantificación de las muestras utilizando de 2 μ L de la muestra, en el equipo Epoch Biotek. Se determinó la integridad y pureza del RNA en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio, y por medio de la relación 260/280. En la figura 8 se observan dos geles representativos, en el Apéndice 9 se presentan todos los geles de las muestras analizadas. En el Apéndice 10 se presentan todos los datos obtenidos de las cuantificaciones 260nm, 280nm y relación 260/280.

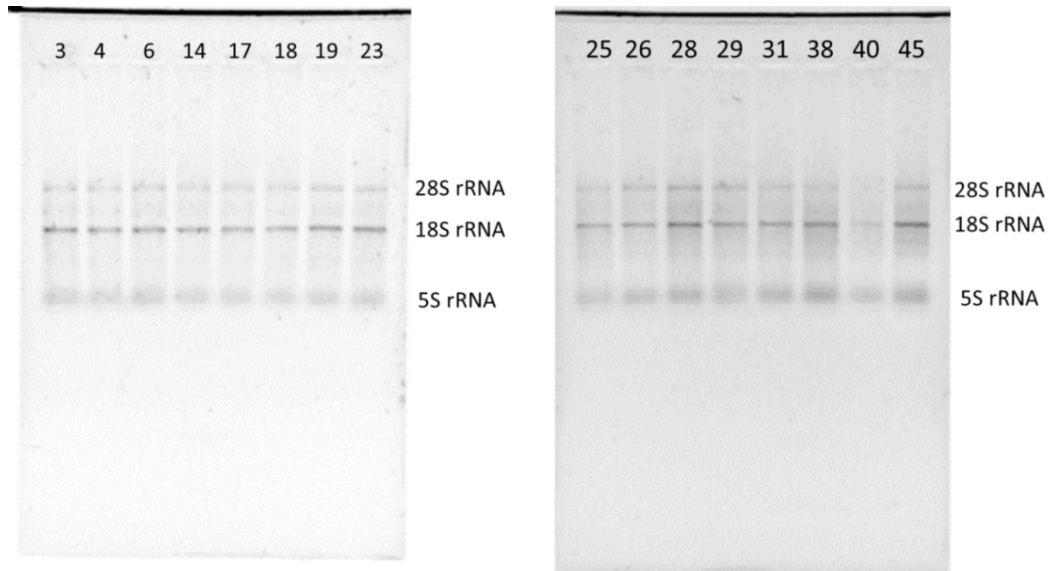


Figura 8. RNA en geles de agarosa.

Geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio, corridos a 90 volts por 30 minutos. La numeración indica el número de muestra utilizado como control interno

Se realizó la reacción de retrotranscripción con 2 μ g de RNA para obtener una concentración final de 100ng/ μ L en un volumen total de 20 μ L. El cDNA de almacenó a -70°C.

La reacción de retrotranscripción (RT) se llevó a cabo como se indica a continuación (Reactivo High capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems PN 437575): Figura 9.

REACCIÓN DE RETROTRANSCRIPCIÓN

High capacity cDNA Reverse Transcription kit. Applied Biosystems

Adicionar en un tubo libre de nucleasas los siguientes reactivos:

Reactivo	Cantidad
10X Reverse transcription buffer	2.0μL
25X dNTP's	0.8μL
10X Random primers	2.0μL
MultiScribe RT 50U/μL	1.0μL
RNA	2μg
Nuclease-free H2O	To 20μL

Ciclar con las siguientes condiciones:
 1. 25°C, 10 minutos.
 2. 37°C, 120 minutos.
 3. 3. 85°C, 5 minutos.
 4. 4. 4°C, 10 minutos.
 5. . Fin.
 Termociclador Maxygene gradiente. Axygen.

Figura 9. Reacción de retrotranscripción.

Se realizó verificación de la RT para lo cual se tomaron muestras al azar de cDNA y se realizó qPCR para β-actina. Los productos de PCR obtenidos se corrieron en un gel de agarosa al 2%, se tiñó con bromuro de etidio. Se obtuvo la siguiente imagen (Figura 10) donde se observa que si hay amplificación para β-actina por lo que se considera que la reacción de RT se llevó a cabo adecuadamente. El tamaño del producto esperado es de 587 pb.

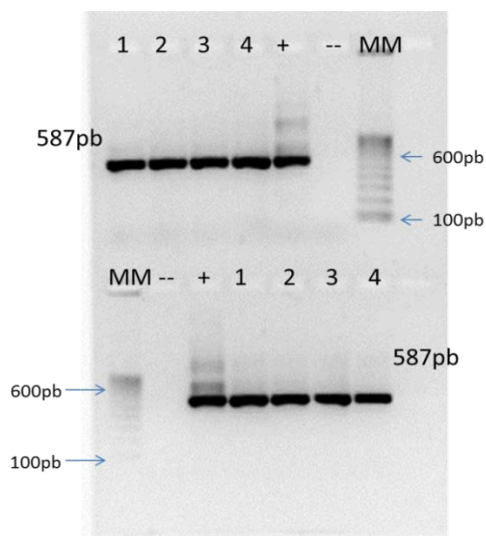


Figura 10. Productos de PCR para B-actina.

Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Corrido a 80 Volts, 40 mins. MM: marcador de peso molecular; +: Control positivo; --: Control negativo; 1, 2, 3, 4: muestras.

Trabajo con equipo Open Array

La tecnología del sistema Open Array se basa en PCR tiempo real, permite trabajar con varias muestras en una sola corrida con lo cual se minimiza la cantidad de reactivos utilizados por reacción. La Figura 11 muestra el equipo Open Array completo.



Figura 11. Equipo Open Array

Diseño de la placa de expresión génica para equipo Open Array.

La placa del equipo Open Array es de tamaño aproximado de un portaobjetos común, el material es de acero con 3072 perforaciones, divididos en 48 subarreglos de 64 pozos cada uno. Cada pozo tiene una capacidad de 33nL (figura 12).

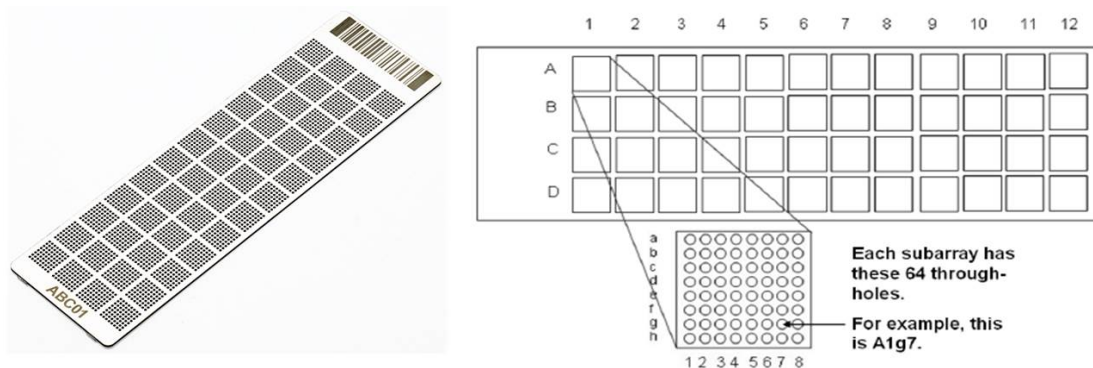


Figura 12. Placa Open Array

Dentro de la placa, el reactivo es retenido en los pozos por capilaridad, además cuenta con un tratamiento hidrofóbico en el exterior e hidrofílico en el

interior. El diseño de la placa se realiza indicando los genes a estudiar y los subarreglos requeridos, de este modo la placa tendrá en cada pozo los primers forward y reverse y sondas TaqMan correspondientes para cada ensayo (Figura 13).

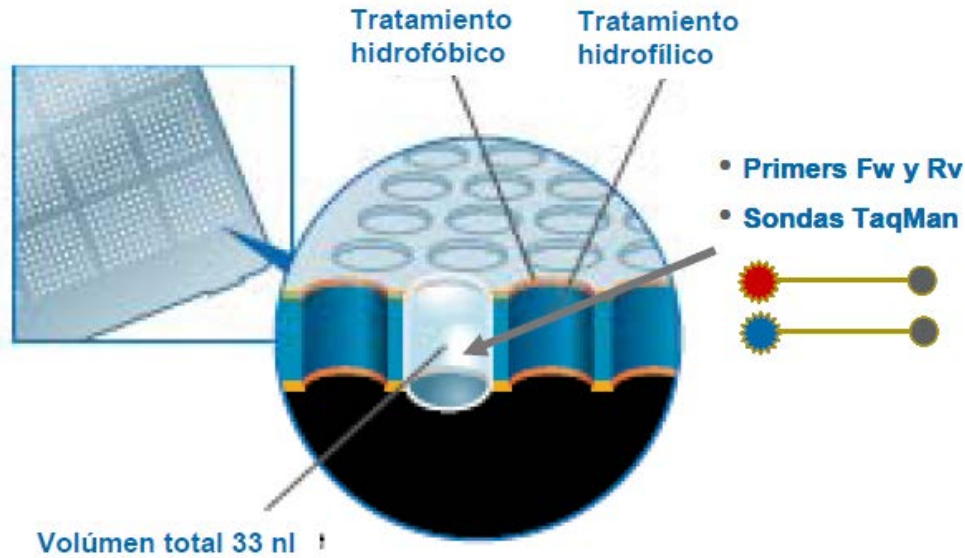


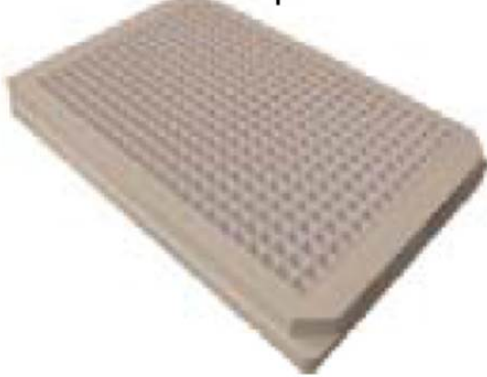
Figura 13. Diseño de placa Open Array.

Los genes incluidos en la placa y los números de ensayos correspondientes se enlistan en la Tabla 8.

Después de tener preparadas todas las muestras de cDNA, se inició con el trabajo en el equipo Open Array. Primero se preparó una placa de 384 pozos (Open Array 384-well Samples plates). En cada pozo se colocó 2.5µL de muestra cDNA y 2.5µL de Master Mix (GeneAmp Fast PCR Master Mix PN 4359187) y se mezcló por pipeteo suave 3 veces. Una vez llena toda la placa se selló y se centrifugó a 3500 rpm por 5 minutos. Posteriormente se quitó el sello de la placa y se colocó en el equipo AccuFill™, también se colocó la placa Open Array y se realizó la programación para poder llenar la placa Open Array (Figura 14).

Tabla 8. Genes incluidos en la placa de expresión de Open Array.			
Gene	Nombre	GenBank Accession number	Assay Expression ID
ABCA1	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1	NM_00502.3	Hs00194045_m1
ADIPOQ	Adiponectin, C1Q and collagen domain containing	NM_004797	Hs02564413_s1
ADIPOR1	Adiponectin receptor 1	NM_015999	Hs01114951_m1
ADIPOR2	Adiponectin receptor 2	NM_024551	Hs01047563_m1
ADRB1	Adrenergic, beta-1- receptor	NM_000684	Hs00265096_s1
APOA4	Apolipoprotein A-IV	NM_000482.3	Hs00166636_m1
ATRNL1	Attractin	NM_139321	Hs00390610_m1
CALCR	Calcitonin receptor	NM_001742	Hs00156229_m1
FTO	Fat mass and obesity associated	NM_001080432.2	Hs01057143_m1
GHRL	Ghrelin/obestatin prepropeptide	NM_016362	Hs00175082_m1
INSIG2	Insulin induced gene 2	NM_016133.2	Hs00379223_m1
INSR	Insulin receptor	NM_000208	Hs00961550_m1
LEP	Leptin	NM_000230	Hs00174877_m1
LEPR	Leptin receptor	NM_002303	Hs00174497_m1
MC3R	Melanocortin 3 receptor	NM_019888	Hs00252036_s1
PPAR- α	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha	NM_005036	Hs00947539_m1
PPAR- γ	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	NM_015869	Hs01115513_m1
UCP1	Uncoupling protein 1 (mitochondrial, proton carrier)	NM_021833	Hs00222453_m1
PPAR- γ -C1- α	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha	NM_013261	Hs01016722_m1
SORT1	Sortilin 1	NM_002959	Hs00907094_m1
TLR9	Toll like receptor 9	NM_017442.3	Hs00370913_s1
B-actin	Beta actin	NM_001101.3	Hs99999903_01
HPRT	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	NM_000194.2	Hs03929098_m1

Placa de 384 pozos



Placa Open Array



Llenado de la placa Open Array por el equipo AccuFill™



Figura 14. Llenado de la placa Open Array.

Después de ser llenada la placa Open Array, inmediatamente fue colocada en el cassette de ciclaje (Figura 15) y se selló con ayuda de luz UV en el Case Sealing Station (Figura 16).

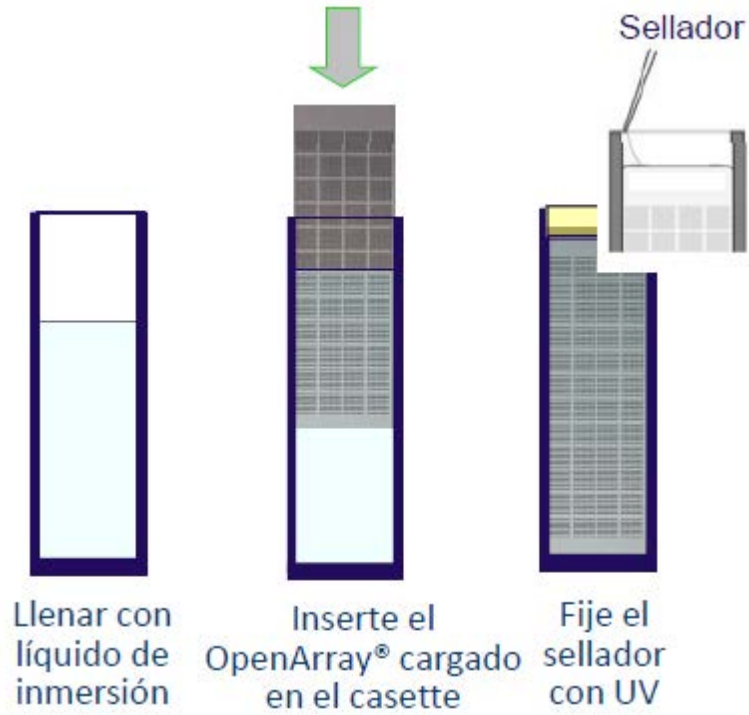
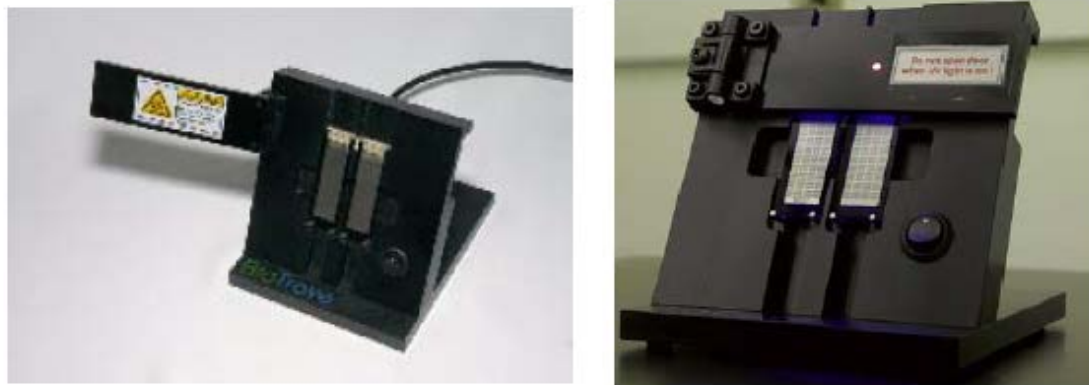


Figura 15. Cassette de ciclaje.



OpenArray® Case Sealing Station

Figura 16. Case Sealing Station.

Después de sellar, se limpió delicadamente el casete de ciclaje y se colocaron los marcos de metal (Figura 17).

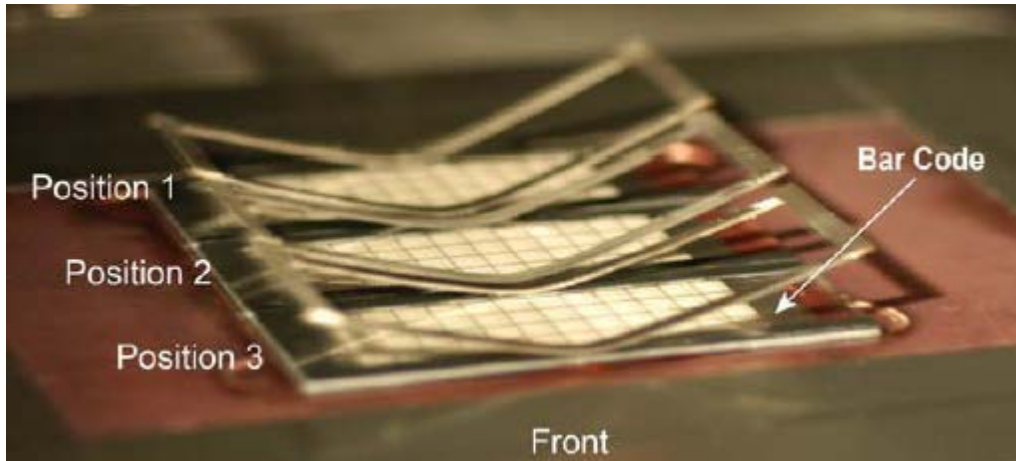


Figura 17. Colocación de marcos de metal.

Se acomodaron los casetes de ciclaje dentro del instrumento Image/PCR Cycler, se programó la corrida en la computadora y se inició el ciclado (Figura 18).



Figura 18. Image/PCR Cycler.

Terminada la corrida se analizaron las curvas de amplificación. En el Apéndice 11 se muestran las curvas de amplificación obtenidas.

Objetivo 4. Analizar estadísticamente los resultados en un modelo transversal analítico.

Genes constitutivos.

Uno de los puntos importante al analizar el perfil de expresión de los genes estudiados, es importante elegir un gen endógeno o constitutivo adecuado que pueda ser utilizado para normalizar los datos obtenidos (Dheda *et al.*, 2004).

Para elegir el mejor gen constitutivo se realizó la prueba con *Beta-Actina*, *HPRT1* (Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1) y *TLR9* (Toll-like receptor 9). Se analizaron las curvas de amplificación de 48 muestras de niños sanos y obesos (Figura 19) y se graficaron los resultados de los Ct (Cycle threshold) obtenidos (Figura 20), con lo cual se determinó que el gen con una menor variabilidad en la amplificación fue TLR9.

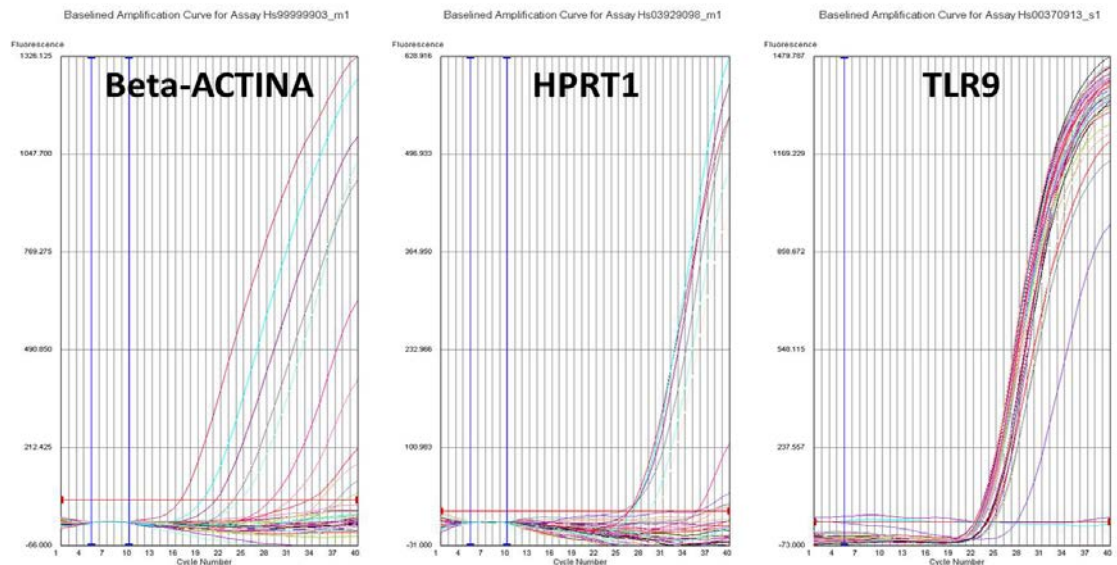


Figura 19. Curvas de amplificación genes constitutivos.

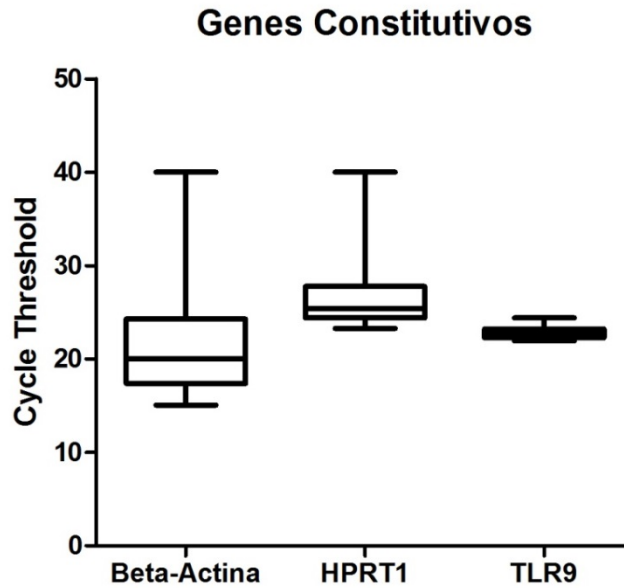


Figura 20. Valores de Ct para los genes constitutivos.

Niveles de expresión de los genes constitutivos probados, se presentan como las medianas (líneas); del percentil 25 al percentil 75 (cajas); el mínimo y máximo (bigotes).

En este estudio se utilizó el gen *TLR9* debido a que no presento variación significativa en las muestras de RNA proveniente de sangre periférica.

Niveles de expresión.

Se analizaron las curvas de amplificación para obtener el valor Ct (Cycle threshold) este valor es el ciclo en el cual la emisión de la intensidad del marcador fluorescente se eleva por encima del ruido de fondo en la fase exponencial de la reacción de PCR, es decir, el ciclo en el cual la producción de fluorescencia cruza el umbral establecido.

Se obtuvo el valor de Ct para cada una de las muestras y se normalizo con el valor de Ct de *TLR9* como indica la siguiente fórmula (Livak *et al.*, 2001):

$$\Delta Ct = Ct \text{ muestra} - Ct \text{ TLR9}$$

Posteriormente se obtuvo el valor de unidades relativas de expresión (URE) como se indica a continuación:

$$URE = 2^{-\Delta Ct}$$

Se realizó el análisis estadístico de las unidades relativas de expresión, comparando el grupo sanos contra obesos, utilizando la prueba U de Mann-Withney, considerando diferencia estadísticamente significativa a valores de $P \leq 0.05$ (López-Orduña *et al.*, 2007).

Se observó que los genes *ADIPOR1*, *ADRB1*, *FTO* y *GHRL* presentaron diferencia estadísticamente significativa con valores de $P=0.0317$, $P=0.0297$, $P=0.0348$ y $P=0.0060$ respectivamente. En la Figura 21 se muestran las gráficas correspondientes.

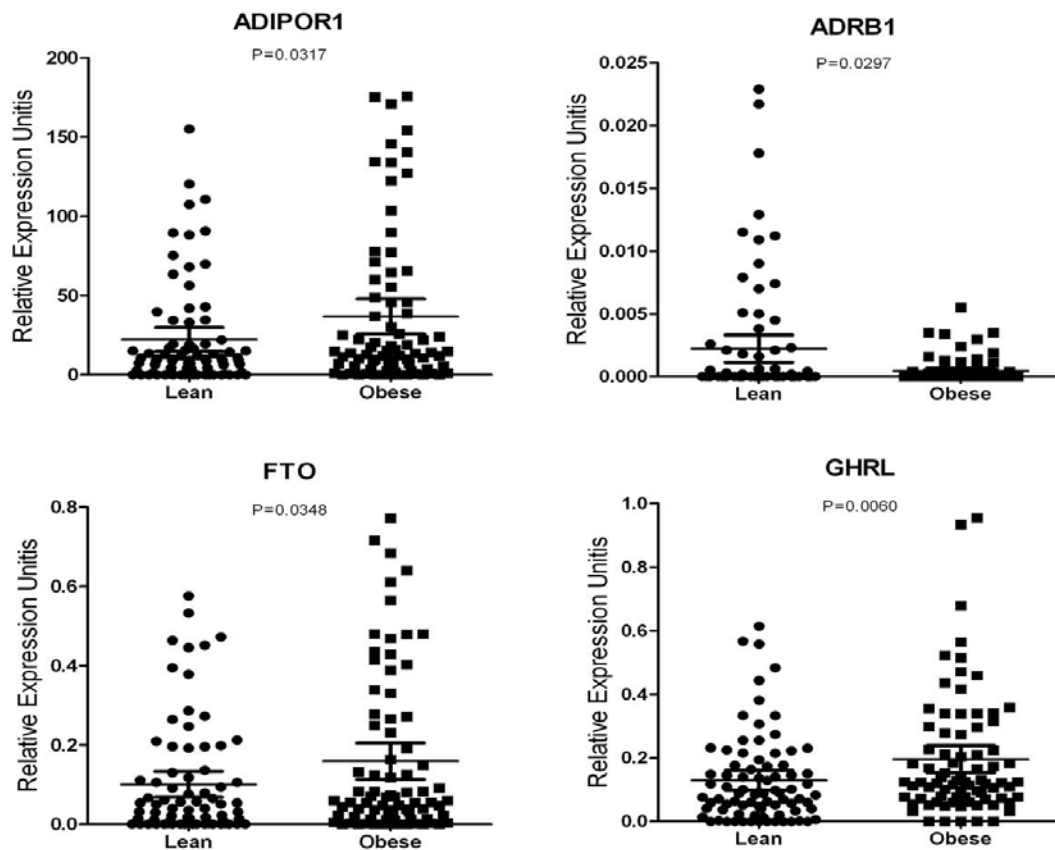


Figura 21. Gráficas de expresión *ADIPOR1*, *ADRB1*, *FTO* y *GHRL*.

Niveles de expresión de mRNA en células de sangre periférica de niños sanos y obesos. Los datos son expresados como unidades relativas de expresión (Unidades arbitrarias) usando *TLR9* como gen endógeno. Las barras representan el error estandar. Valores de $P < 0.05$ fueron considerados como estadísticamente significativos usando la prueba U de Mann-Whitney. Circulos negros niños sanos, cuadros negros niños obesos.

No se observó diferencia estadísticamente significativa para los genes *ABCA1* ($P=0.7887$), *ADIPOQ* ($P=0.5771$), *ADIPOR2* ($P=0.4715$), *ATRN* ($P=0.3645$), *INSIG2* ($P=0.0936$), *INSR* ($P=0.9156$), *LEP* ($P=0.1415$), *LEPR* ($P=0.5183$), *PPAR α* ($P=0.8735$), *PPAR γ* ($P=0.6408$), y *SORT1* ($P=0.1162$). En la Figura 22, Figura 23 y Figura 24 se observan las gráficas correspondientes.

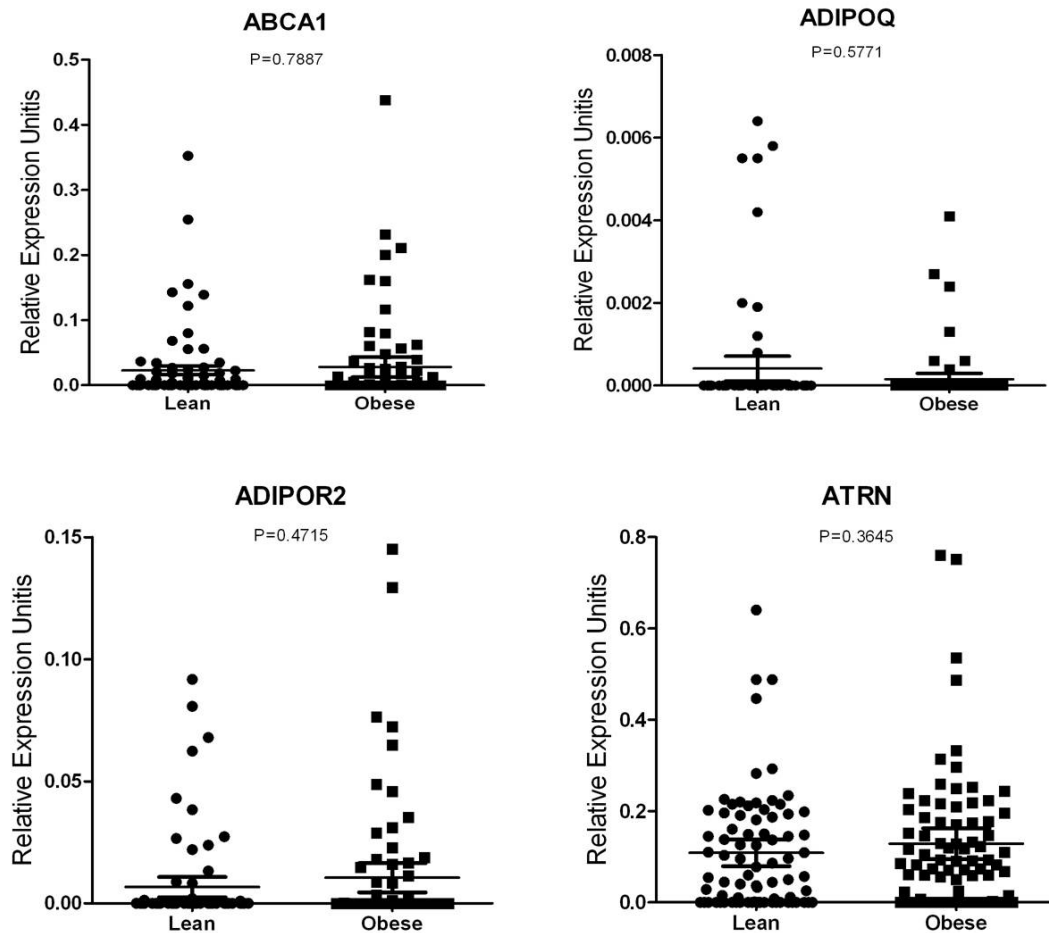


Figura 22. Gráficas de expresión *ABCA1*, *ADIPOQ*, *ADIPOR2* y *ATRN*.

Niveles de expresión de mRNA en células de sangre periférica de niños sanos y obesos. Los datos son expresados como unidades relativas de expresión (Unidades arbitrarias) usando *TLR9* como gen endógeno. Las barras representan el error estándar. Valores de $P < 0.05$ fueron considerados como estadísticamente significativos usando la prueba U de Mann-Whitney. Círculos negros niños sanos, cuadros negros niños obesos.

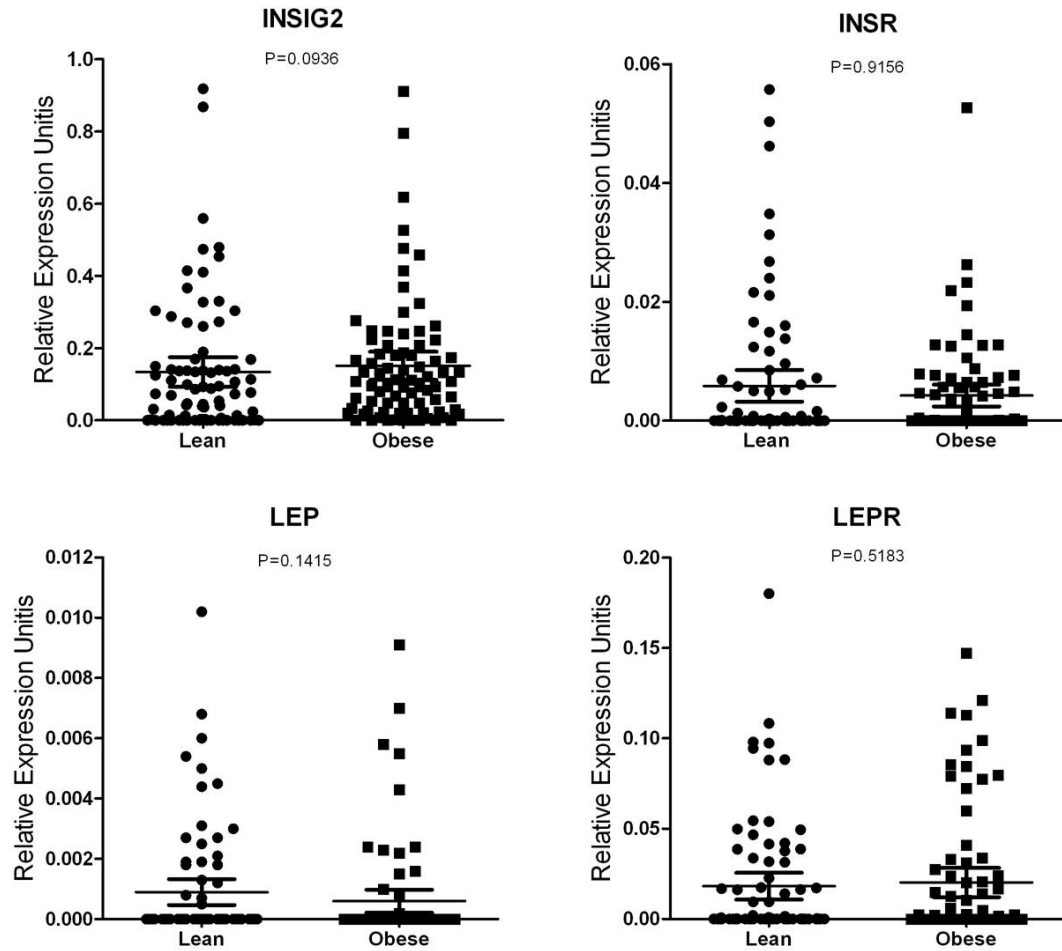


Figura 23. Graficas de expresión *INSIG2*, *INSR*, *LEP* y *LEPR*.

Niveles de expresión de mRNA en células de sangre periférica de niños sanos y obesos. Los datos son expresados como unidades relativas de expresión (Unidades arbitrarias) usando *TLR9* como gen endógeno. Las barras representan el error estandar. Valores de $P < 0.05$ fueron considerados como estadísticamente significativos usando la prueba U de Mann-Whitney. Círculos negros niños sanos, cuadros negros niños obesos.

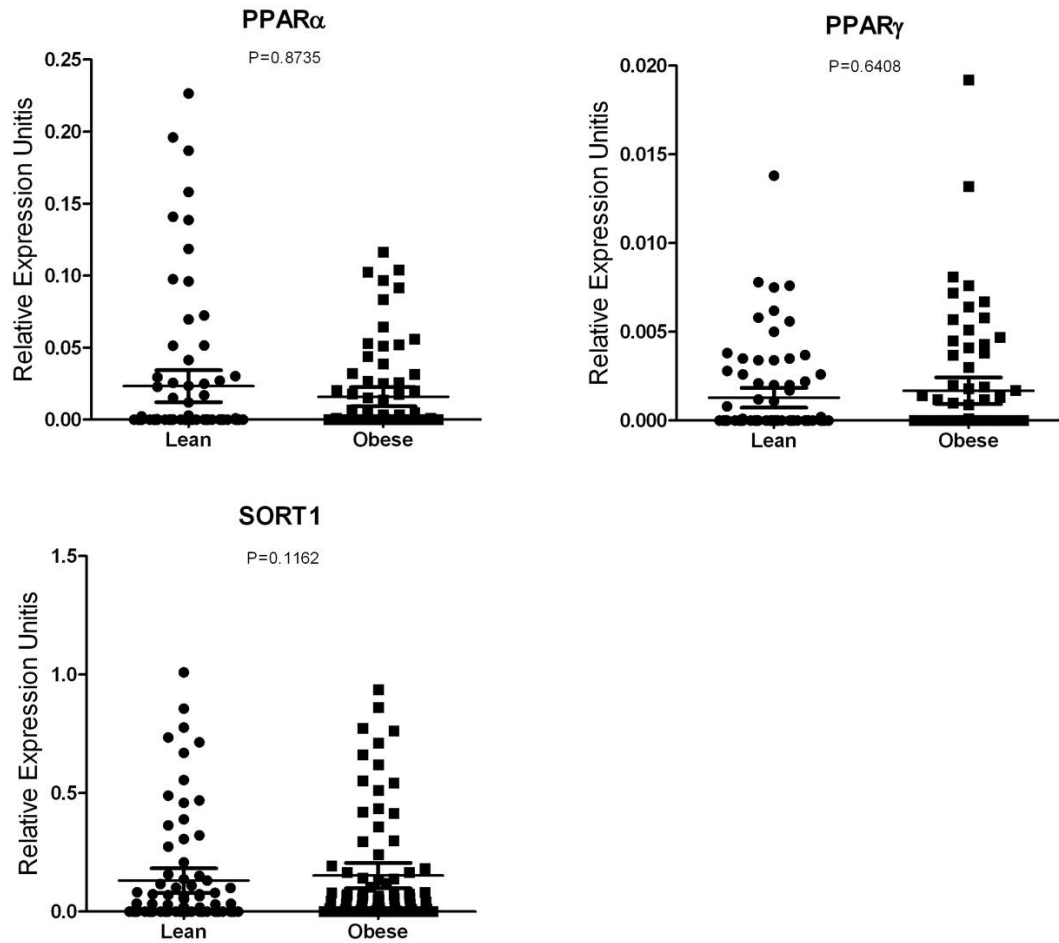


Figura 24. Gráficas de expresión. PPAR α , PPAR γ y SORT1.

Niveles de expresión de mRNA en células de sangre periférica de niños sanos y obesos. Los datos son expresados como unidades relativas de expresión (Unidades arbitrarias) usando *TLR9* como gen endógeno. Las barras representan el error estándar. Valores de $P < 0.05$ fueron considerados como estadísticamente significativos usando la prueba U de Mann-Whitney. Círculos negros niños sanos, cuadros negros niños obesos.

Finalmente con los datos obtenidos por nuestro método experimental, no fue posible determinar los niveles de expresión de los genes *APOA4*, *CALCR*, *MC3R*, *PPAR γ -C1- α* , y *UCP1*.

Objetivo específico 5. Validación de los resultados de expresión por PCR tiempo real.

Se realizó la comprobación de los resultados de expresión para los genes *FTO* y *GHRL*, como constitutivo *TLR9*. Se realizó una selección aleatoria de 20 muestras

de niños sanos y 20 muestras de niños obesos. Se utilizaron sondas TaqMan de Applied Biosystems (Tabla 9). Se utilizó el equipo 7900HT Fast Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems). La Reacción de PCR se realizó en una placa de 384 pozos. Se emplearon 30ng de cDNA por reacción y TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems PN 4304437), en un volumen total de 5µL (Tabla10). Se realizó la corrida con el programa de termociclado descrito en la Tabla 11.

Gene	GenBank	Assay Expression ID
<i>FTO</i>	NM_001080432.2	Hs01057143_m1
<i>GHRL</i>	NM_016362	Hs00175082_m1
<i>TLR9</i>	NM_017442.3	Hs00370913_s1

Reactivo	Concentración Stock	Concentración por reacción	Volumen por reacción (µL)
Master Mix	2X	1X	2.50
Sonda TaqMan	20X	1X	0.25
cDNA	100ng/µL	30ng	0.30
Agua DEPC	--		1.95
		Total	5.00

Paso	Indicaciones
1	50°C, 2 minutos.
2	95°C, 10 minutos.
3	95°C, 15 segundos.
4	60°C, 1 minuto.
6	Repetir paso 3 y 4, 40 veces.
7	Fin de ciclo.

Se realizaron triplicados de cada muestra, para el control negativo se utilizó agua estéril en lugar de cDNA. El análisis de fluorescencia se realizó con el software del equipo. Se determinó el Ct y se obtuvo un promedio de las tres medidas para cada muestra, los datos fueron normalizados con los valores Ct de *TLR9*. Posteriormente se

determinaron los niveles de expresión empleando el método $2^{-\Delta Ct}$ y se obtuvieron las gráficas mostradas en la Figura 25.

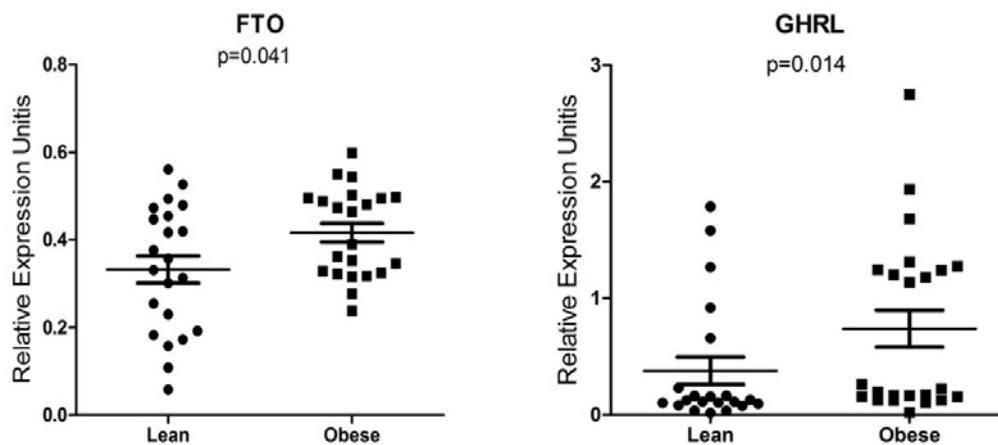


Figura 25. Gráficas de expresión qPCR TaqMan.

Niveles de expresión de mRNA en células de sangre periférica de 40 niños obesos y sanos. Los datos son expresados como unidades relativas de expresión (Unidades arbitrarias) usando *TLR9* como gen endógeno. Las barras representan el error estandar. Valores de $P < 0.05$ fueron considerados como estadísticamente significativos usando la prueba U de Mann-Whitney. Círculos negros niños sanos, cuadros negros niños obesos.

Posteriormente se realizó la comparación de los datos obtenidos con el sistema Open Array contra los datos obtenidos por qPCR (Figura 26 y Figura 27).

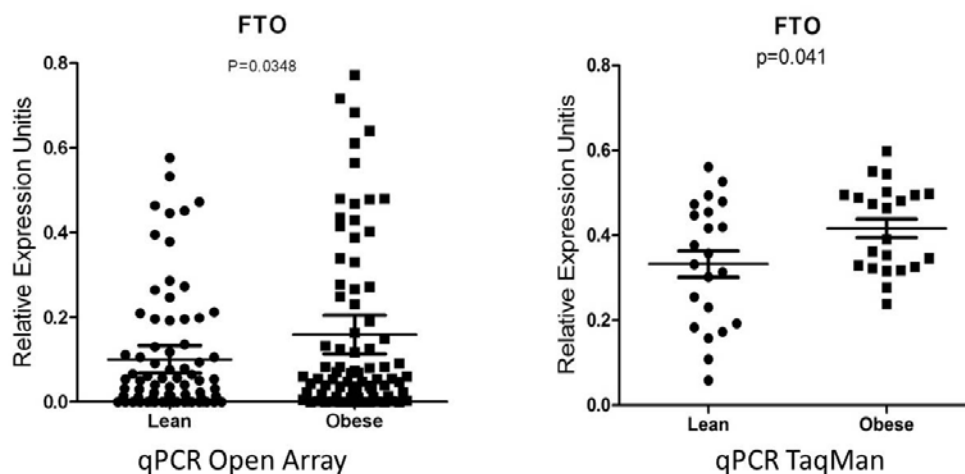


Figura 26. Gráficas de expresión qPCR Open Array vs qPCR TaqMan de FTO.

Comparación de los datos obtenidos por Open Array (gráfica izquierda) contra los datos obtenidos por qPCR (gráfica derecha). Los datos son expresados como unidades relativas de expresión (Unidades arbitrarias) usando *TLR9* como gen endógeno. Las barras representan el error estandar. Valores de $P < 0.05$ fueron considerados como estadísticamente significativos usando la prueba U de Mann-Whitney. Círculos negros niños sanos, cuadros negros niños obesos.

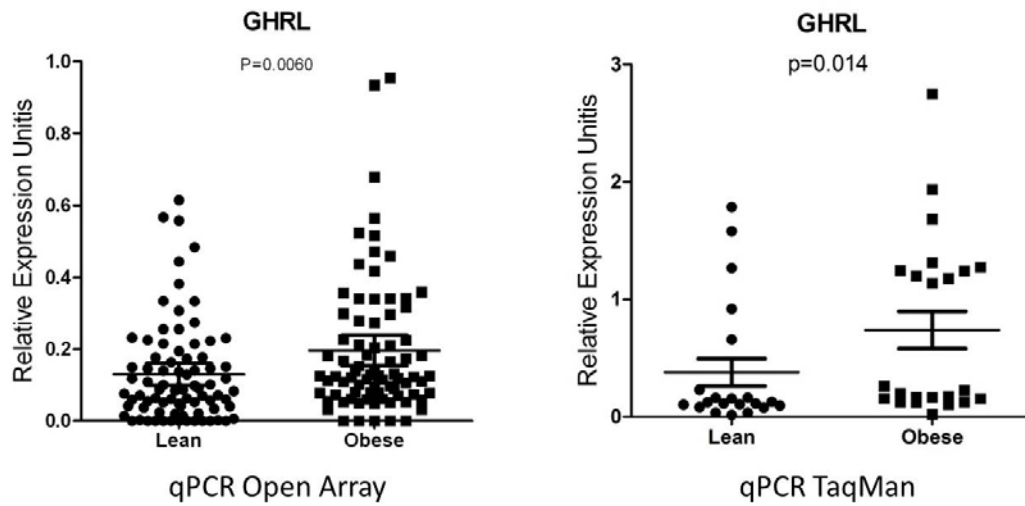


Figura 27. Gráficas de expresión qPCR Open Array vs qPCR TaqMan de GHRL.

Comparación de los datos obtenidos por Open Array (gráfica izquierda) contra los datos obtenidos por qPCR (gráfica derecha). Los datos son expresados como unidades relativas de expresión (Unidades arbitrarias) usando *TLR9* como gen endógeno. Las barras representan el error estándar. Valores de $P < 0.05$ fueron considerados como estadísticamente significativos usando la prueba U de Mann-Whitney. Círculos negros niños sanos, cuadros negros niños obesos.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Pruebas bioquímicas

En la actualidad la obesidad es considerada como un problema de salud pública; es una enfermedad de origen multifactorial que contribuyen con el desarrollo de otros padecimientos crónicos como son, enfermedad del hígado graso no alcohólico, enfermedades cardiovasculares e hipertensión entre otros (Zhu *et al.*, 2014). La obesidad infantil también ha ido en aumento y se considera que las causas pueden ser diversas, como un incremento en el consumo de calorías, aumento en el consumo de comida rápida y bebidas azucaradas, disminución de actividad física y disminución del consumo de frutas y verduras (Kyriazis *et al.*, 2012). Lo anterior, aunado a la carga genética que cada individuo posee, propicia el desarrollo de la obesidad tanto en adultos como en niños.

Una forma de abordar el problema de la obesidad es mediante el análisis de la expresión transcripcional en niños, considerando que la obesidad infantil es un factor que propicia la obesidad en la edad adulta; por lo que en este trabajo se analizó la expresión de 20 genes asociados con obesidad, empleando muestras de sangre periférica de niños Mexicanos con edades que comprenden de los 6 a los 14 años. Los niños fueron caracterizados adecuadamente mediante las tablas de la CDC 2000 y criterios de la OMS 2015 para ser clasificarlos en sanos y obesos.

A cada niño se le realizaron medidas de estatura, cintura, cadera, peso, presión arterial; además se les tomo una muestra de sangre periférica en ayunas para determinar los niveles de glucosa en sangre, colesterol, HDL, LDL, triglicéridos e insulina. Los puntos de corte utilizados fueron, glucosa menor que 100mg/dL; insulina menor que 15 μ U/mL; triglicéridos menor que 150mg/dL; HDL mayor que 40mg/dL; colesterol menor que 200 mg/dL, LDL menor que 130mg/dL presión arterial hasta 120/80 mmHg (Burguete-García *et al.*, 2014; Romero-Velarde *et al.*, 2007). Para el caso de los puntos de corte, no se tienen criterios totalmente estandarizados para población infantil mexicana, sin embargo se consideraron los puntos anteriores debido a que son los reportados por nuestro grupo de investigación en un esfuerzo por tratar de estandarizar criterios. Es importante utilizar valores de

referencia disponibles con base en las características de la población a estudiar, debido a que los valores son particulares para cada región.

Los resultados obtenidos de glucosa, triglicéridos, colesterol, HDL, LDL, insulina y presión arterial, se encuentran dentro de los parámetros de normalidad; sin embargo es de notar que existe una diferencia estadísticamente significativa en la presión arterial, glucosa, triglicéridos, LDL, insulina e índice HOMA; dichos valores se encuentran cercanos a los valores de corte superiores. Por otra parte HDL se encuentra cercano a los valores de corte inferiores. (Mejía-Benitez *et al.*, 2013; Norris *et al.*, 2011).

La obesidad pone en riesgo la salud del individuo y es una enfermedad que tienen un papel importante en el desarrollo del síndrome metabólico, el cual se caracteriza principalmente por niveles elevados de glucosa, niveles elevados de insulina e índice HOMA, aumento en la presión arterial, elevación de los triglicéridos y valores disminuidos de HDL (Posadas-Romero *et al.*, 2005; Burguete-García *et al.*, 2014; Rank *et al.*, 2013); por lo que los resultados obtenidos nos indican que los niños obesos presentan un desbalance metabólico que puede llevarlos a desarrollar otro tipo de padecimientos en un futuro próximo.

Expresión de genes

Los genes estudiados se clasificaron en tres grupos considerando su papel principal dentro del organismo para el desarrollo de la obesidad; los genes orexigénicos, *FTO* y *GHRL*, son aquellos que promueven el consumo de alimentos; los genes anorexigénicos, *ATRN*, *MC3R*, *SORT1*, *APOA4*, *LEP*, *LEPR*, *CALCR*, *INSR*, son aquellos que promueven una disminución en el consumo de alimentos; y aquellos relacionados con el gasto energético, *ABCA1*, *INSIG2*, *ADIP01*, *ADIP01*, *ADIP02*, *ADRB1*, *PPAR α* , *PPAR γ* , *PPAR γ C1 α* , *UPCI*.

ABCA1

Los niveles de LDL elevados en sangre son un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares; en contraste, los niveles elevados de

HDL constituyen un factor protección. Niveles reducidos de HDL pueden ser observados en sujetos con enfermedad coronaria precoz (Schaefer *et al.*, 1994). El HDL es sintetizado y secretado desde el hígado y el intestino como partículas nacientes de pre- β HDL, formadas por apolipoproteína A-I y fosfolípidos. Estas partículas nacientes atraviesan el endotelio vascular de los tejidos periféricos, desde los cuales remueven el exceso de colesterol libre celular por acción del transportador de membrana ABCA1 (Laris *et al.*, 2005).

El colesterol HDL naciente sintetizado en el hígado y en el intestino remueve eficientemente el colesterol libre desde las células de los tejidos periféricos por mecanismos dependientes de la actividad del transportador ABCA1. Posteriormente las partículas de HDL son procesadas por la enzima LCAT (lecithin-cholesterol acyltransferase) para generar la formación de HDL enriquecidas en ésteres de colesterol. Estas partículas de HDL maduras tienen al menos tres destinos metabólicos: 1) la enzima CETP (proteína de transferencia de ésteres de colesterol) estimula la transferencia de ésteres de colesterol desde HDL a VLDL (lipoproteínas de muy baja densidad), las cuales se transforman en LDL y son catabolizadas vía el receptor de LDL o el receptor LRP (proteína relacionada al receptor LDL); 2) las partículas de HDL son fuente directa de ésteres de colesterol para la célula por medio de receptores endocíticos de la familia del receptor de LDL o receptores específicos de HDL; y 3) las HDL entregan colesterol directamente al hígado y los tejidos esteroideogénicos a través del proceso de captación selectiva del colesterol HDL mediado por el receptor SR-BI (receptor scavenger clase B tipo I). El flujo del colesterol desde los tejidos periféricos por medio de las HDL plasmáticas hacia el hígado se conoce como transporte reverso del colesterol. Mientras el colesterol HDL removido por el hígado puede ser destinado para secreción biliar, el colesterol captado desde las HDL en los tejidos esteroideogénicos se utiliza para la síntesis de hormonas esteroiladas (Figura 28) (Laris *et al.* 2005; Tall *et al.*, 2000).

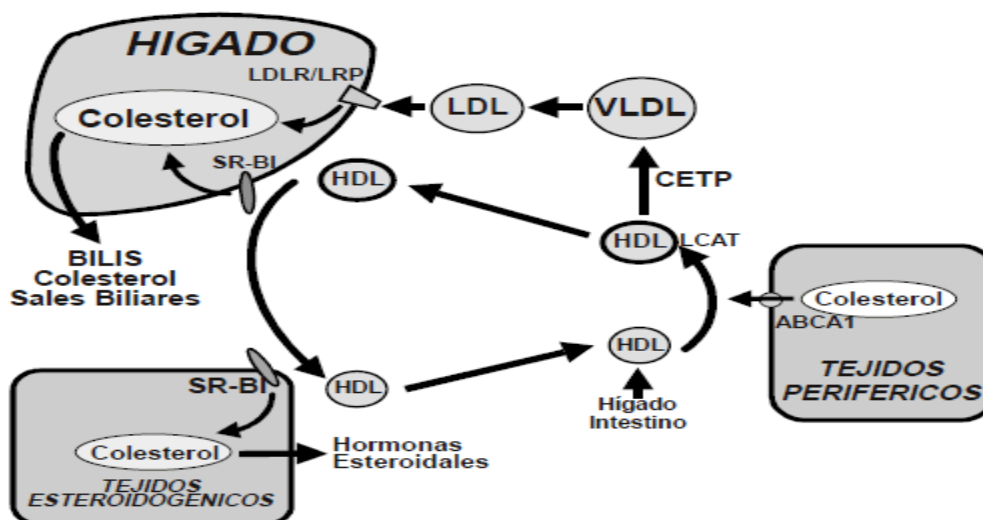


Figura 28. ABCA1

Metabolismo de HDL. SR-BI, scavenger receptor class B member 1; HDL, high-density lipoprotein; ABCA1, ATP-binding cassette sub-family A member 1; LCAT, lecithin-cholesterol acyltransferase; CETP, cholesteryl ester transfer protein; VLDL, Very low-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein. Modificado de Laris *et al.* 2005.

Un estudio realizado en China mostró que la expresión de *ABCA1* es menor en pacientes con sobrepeso y obesidad, y se asocia con el deterioro en el eflujo del colesterol en los monocitos (Xu *et al.*, 2009). En nuestro estudio no observamos diferencia estadísticamente significativa en la expresión de este gen.

ATRN

La atractina fue identificada como el producto del gen murino Mahogany. Las mutaciones en el gen *ATRN* son asociadas con alteración en la pigmentación y con obesidad, indicando que la atractina puede modular la función de MC1R (Receptor 1 de melanocortina y MC4R (receptor 4 de melanocortina). *ATRN* es una proteína transmembranal de 1428 aminoácidos con un largo dominio extracelular y una pequeña cola citosólica. Esta cola podría funcionar como un co-receptor para la proteína inhibitoria agouti. Se han descrito que influye en la regulación de diversos procesos fisiológicos (Gunn *et al.*, 2001).

El incremento de la adiposidad induce un aumento de la producción de leptina por el tejido adiposo. La leptina estimula neuronas del hipotálamo que coexpresan hormonas anorexigénicas como hormona estimulante melanocítica- α (α -MSH), un

producto de la escisión programada de pro-opiomelanocortina (POMC). Melanocortinas como α -MSH, son péptidos que promueven un balance energético negativo (catabólico), y ejercen sus funciones a través de su unión a miembros de una familia de receptores melanocortínicos. MC4R es un receptor involucrado, y el fenotipo correspondiente al bloqueo génico es la presencia de hiperfagia y obesidad. Por su parte MC1R al ser activado promueve la síntesis de eumelanina que da color a la piel y el pelo (He L *et al.*, 2001). La α -MSH se une a su receptor (MC4R) y provoca la expresión de efectores anorexigénicos e inhibe la expresión de efectores orexigénicos. AgRP (proteína relacionada a agouti) actúa como antagonista endógeno modulando los efectos de α -MSH; por su parte atractina potencia los efectos de AgRP (Gunn *et al.*, 2001). En la Figura 29 se muestran las posibles interacciones de ATRN. De los resultados obtenidos no se observó diferencia estadísticamente significativa en los niveles de expresión de ATRN.

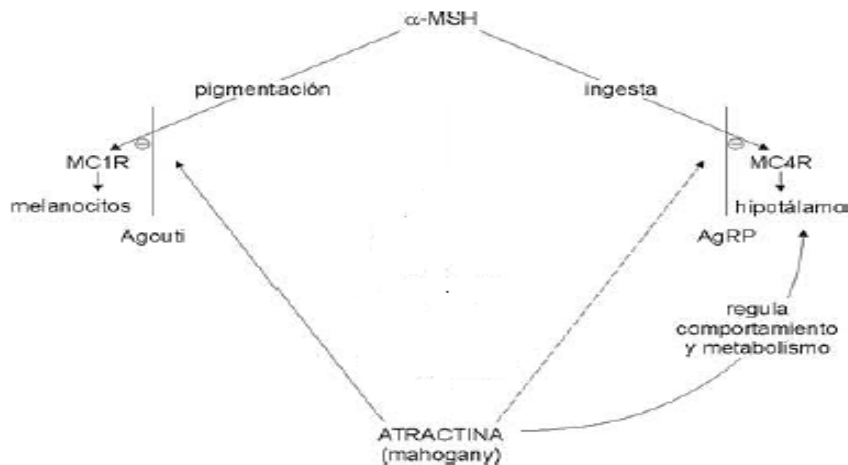


Figura 29. Interacciones de Atractina.

Interacciones de Atractina. α -MSH, alpha melanocyte-stimulating hormone; MC1R, melanocortin 1 receptor; MC4R, melanocortin 4 receptor; AgRP, Agouti- related peptide. Modificado de Jackson II 1999.

INSIG2

Es el gen que codifica la proteína de señalización de insulina tipo 2 (*INSIG2*), que en respuesta a los cambios en los niveles lipídicos en el retículo endoplasmático, impide el movimiento de esteroles y sus funciones de unión proteica, procesamiento,

liberación, factor de transcripción y regulación de la síntesis de lípidos (Takaishi *et al.*, 2004).

Las proteínas de unión a elementos regulatorios (SREBPs) son factores de transcripción de unión a membranas que activan genes codificantes de enzimas requeridas para la síntesis de colesterol, ácidos grasos insaturados, triglicéridos y fosfolípidos. Inmediatamente después de su síntesis en las membranas del retículo endoplásmico, SREBPs se unen a SCAP (proteínas que activan por ruptura de SREBP), una proteína de membrana que contiene un dominio sensible a esterol. En células con deficiencia de esteroides, SCAP escolta a SREBPs al aparato de Golgi, donde SREBPs son procesadas por dos proteasas de unión a membranas que liberan su porción activa dentro del citosol para que puedan entrar al núcleo. En células con gran cantidad de esteroides, SCAP sufre un cambio conformacional por medio de sus dominios sensibles a esterol, dando como resultado que SCAP sea retenido en el retículo endoplásmico evitando el procesamiento de SREBP y disminuyendo la síntesis de lípidos (Yabe *et al.*, 2002).

INSIG2 es una proteína inducida por insulina que se une a SCAP y facilita la retención, mediada por esterol, del complejo SCAP/SREBP en el retículo endoplásmico, promoviendo la disminución de la lipogénesis (Figura 30) (Takaishi *et al.*, 2004).

En los resultados obtenidos no observamos diferencia estadísticamente significativa en los niveles de expresión de *INSIG2*.

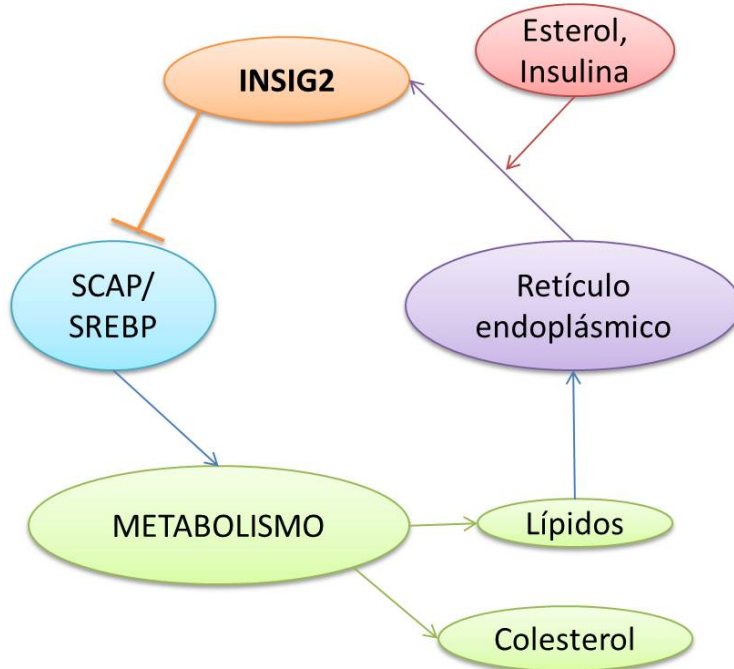


Figura 30. Interacciones de INSIG2.

Funciones de INSIG2. Modificado de Takaishi *et al.*, 2004.

INSR

La insulina inicia sus acciones biológicas por su unión a receptores específicos localizados en la membrana celular. El receptor de insulina (*INSR*) es una glucoproteína que pertenece a la familia de receptores para factores de crecimiento con actividad intrínseca de cinasa de Tyr, los cuales al ser estimulados por su ligando se autofosforilan en residuos de Tyr. *INSR* es un heterotetrámero compuesto por dos subunidades α y dos subunidades β unidas por puentes disulfuro. Las subunidades α se encuentran localizadas en el exterior de la membrana plasmática y contienen sitios de unión a la insulina, mientras que las subunidades β tienen una porción extracelular, una transmembranal y una porción intracelular en donde se localiza el dominio con actividad de cinasa de Tyr (Myers *et al.*, 2002). Una vez que la insulina interacciona con su receptor y es activado, inicia la cascada de señalización, dos vías principales de transducción son activadas, la vía de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) y la vía de las cinasas activadas por mitógeno (MAP cinasas). Ambas vías regulan la mayoría de las acciones de la insulina asociadas a la regulación del metabolismo energético. La activación del receptor de insulina activa al factor recambiador de nucléotidos de

guanina (GEF) capaz de activar a Ras. La activación de Ras (GTP-Ras) inicia el encendido de la cascada de las MAP cinasas. GTP-Ras se une y activa a Raf-1 que lleva a la fosforilación y activación de la vía que involucra el reclutamiento y activación de MEK y de las ERK1 (cinasa regulada extracelularmente) y ERK2. Las MAP cinasas tienen varios sustratos potenciales los cuales incluyen factores de transcripción y otras cinasas que participan principalmente en la regulación de la expresión genética en tejidos sensibles a insulina. Por otra parte la vía de la PI3K (fosfatidilinositol 3 cinasa) es el principal mecanismo por el que la insulina ejerce sus funciones en el metabolismo de la glucosa y de lípidos. El receptor una vez activado interacciona con IRS (insulin receptor substrate 1), el cual al ser fosforilado presenta sitios de unión y activación de proteínas que contienen dominios SH2 (homologo al dominio 2 de la oncoproteína Src), como PI3K. La PI3K consta de una subunidad reguladora (p85) y de una subunidad catalítica (p110). La interacción entre p85/IRS-1 da por resultado la activación de p110 y a consecuencia de ello, p110 tiene acceso a su sustrato PI(4,5)P2 (fosfatidilinositol 4,5 bifosfato), el cual es fosforilado en la posición 3 del inositol, generaldo PI(3,4,5)P3 (fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato), que sirve como sitio de unión para cinasas de Ser como PDK1 (Piruvato deshidrogenasa cinasa) y Akt (PKB, proteín cinasa B). El complejo proteico PDK2 activa Akt, induciendo una primera fosforilación de Ser473 que es seguida por una fosforilación en Thr308, esta última inducida por PDK1. Akt regula varios de los efectos metabólicos de la insulina a través por medio de la activación de diferentes sustratos que propagan la respuesta, como mTor y FOXO (Figura 31) (Gunter *et al.*, 2012; Virkamaki *et al.*, 1999).

La señalización de la insulina en adipocitos es crítica para el desarrollo de la obesidad y es asociada con anormalidades metabólicas (Blüher *et al.*, 2002).

Los resultados de expresión obtenidos no muestran diferencia estadísticamente significativa entre los niños sanos y obesos.

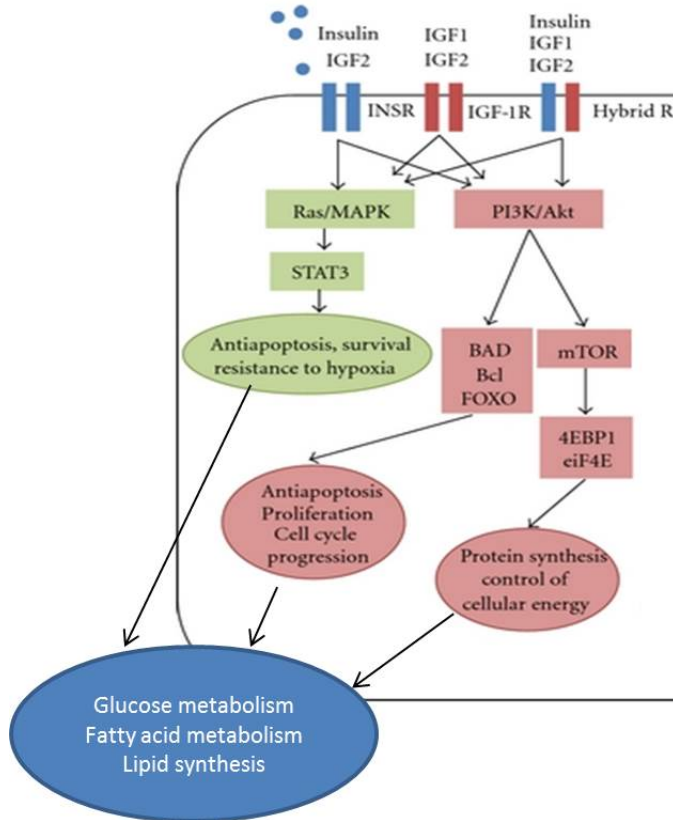


Figura 31. Señalización de insulina

Señalización de insulina. IGF2, IGF1, insulin-like growth factor 1 and 2; INSR, insulin receptor; MAPK, mitogen-activated protein kinase; PI3K/Akt, phosphoinositide 3-kinase; STAT3, signal transducer and activator of transcription 3. Modificado de Gunter *et al.*, 2012.

PPAR α Y PPAR γ

Los *PPAR* son receptores activados por proliferadores peroxisomales. Los peroxisomas son organelos de las células eucariotes que albergan enzimas que catalizan importantes reacciones metabólicas vinculadas al metabolismo de lípidos. La activación de *PPAR α* estimula la oxidación de ácidos grasos en tejidos que se caracterizan por su alta utilización de ácidos grasos como sustratos energéticos (hígado, corazón, riñones). Por otro lado *PPAR γ* regula la diferenciación de las células precursoras de los adipocitos y favorece la acumulación de triglicéridos en ellas. *PPAR α* modula la expresión constitutiva de genes que codifican enzimas mitocondriales del catabolismo de ácidos grasos y media la inducción de enzimas de β -oxidación mitocondrial y peroxisomal de ácidos grasos, también regula la

expresión de genes de la síntesis y transporte de colesterol. La acción regulatoria de PPAR α sobre el metabolismo de lípidos se ejerce sobre la captación, activación y β -oxidación mitocondrial/peroxisomal de ácidos grasos (Kelly *et al.*, 1998).

Tienen un papel importante en la regulación de las vías metabólicas involucradas en el mantenimiento del balance energético y en la utilización de sustratos, principalmente la oxidación de ácidos grasos, gluconeogénesis y termogénesis. PPAR γ es un factor transcripcional que participa en el proceso de adipogénesis; también regula la expresión de varias proteínas responsables de la acumulación de lípidos (triglicéridos) en los adipocitos (Schoonjans *et al.*, 1996).

PPAR α y PPAR γ participan en la regulación del proceso de termogénesis a través de la expresión de las proteínas desacoplantes *UCP-1*, *UCP-2* y *UCP-3* (*UCP*, uncoupling protein), que son responsables del aumento del gasto energético en respuesta al frío (Kelly *et al.*, 1998).

Los PPARs pueden ser activados por una dieta rica en ácidos grasos, y sus derivados metabólicos producidos en el organismo, de este modo actúan como sensores de lípidos, los cuales cuando se activan pueden regular la homeostasis de lípidos y glucosa a través de actividades coordinadas en el hígado, musculo y tejido adiposo (Figura 32) (Evans *et al.*, 2004).

Los resultados de los niveles de expresión no mostraron diferencia estadísticamente significativa al comparar la expresión de los niveles de PPAR α y PPAR γ de niños sanos y obesos.

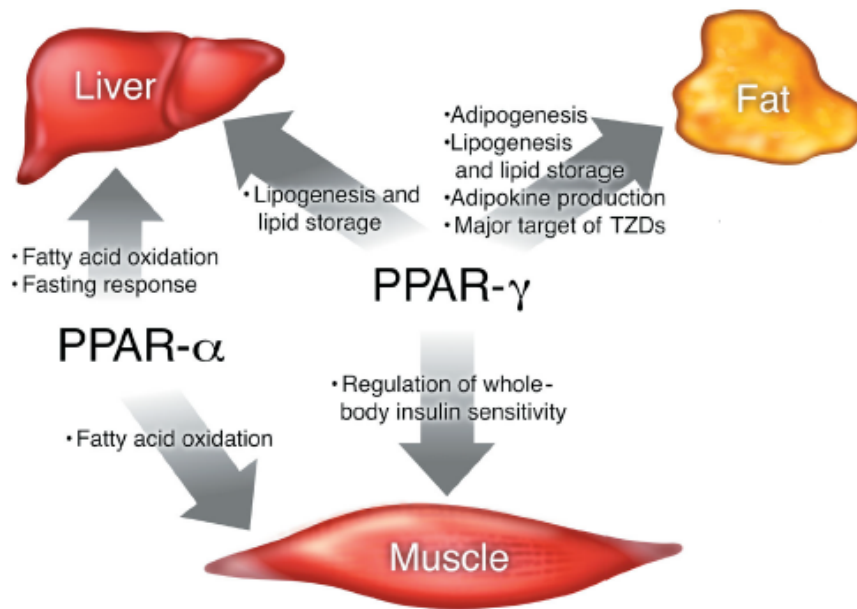


Figura 32. Regulación metabólica de PPARs.

Funciones metabólicas de *PPARα* y *PPARγ*. Modificado de Evans *et al.*, 2004.

SORT1

Sortilina es una proteína multifuncional que se encuentra en compartimentos intracelulares de la red trans-Golgi y endosomas tempranos, se ha observado que se une a APOA-V y lipoprotein lipasa. Se ha identificado a *SORT1* como regulador de la producción de lipoproteína hepática y LDL plasmático. Usando ratones transgénicos se determinó que el receptor facilita el tráfico y ensamble de VLDL en el compartimento distal Golgi de células hepáticas donde se lleva a cabo la formación de partículas ricas en triglicéridos a partir de APOB100 lipidadas. La formación de partículas de VLDL inicia con la lipidación de cadenas de polipeptidos apoB100 nacientes que comienzan a translocarse dentro del lumen del retículo endoplásmico. La lipidación de apolipoproteínas involucra la actividad de MTP. Partículas primordiales (pre-VLDL) son posteriormente lipidadas para formar una forma deficiente de triglicéridos a partir de VLDL que alcanzan el aparato de Golgi, donde se convierte a VLDL ricas en triglicéridos mediante la adición de triglicéridos. El ensamble y la liberación de VLDL1 requieren la interacción de apoB100 con sortilina madura que llega a ser activada proteolíticamente en el Golgi distal. La pérdida de la

actividad de sortilina inhibe la formación y la liberación de VLDL1 en el Golgi y por lo tanto impide el transporte vesicular de apoB100 a través de las vías secretorias, impidiendo la liberación de pre-VLDL del retículo endoplásmico. El proceso puede observarse en la Figura 33 (Kjolby *et al.*, 2010).

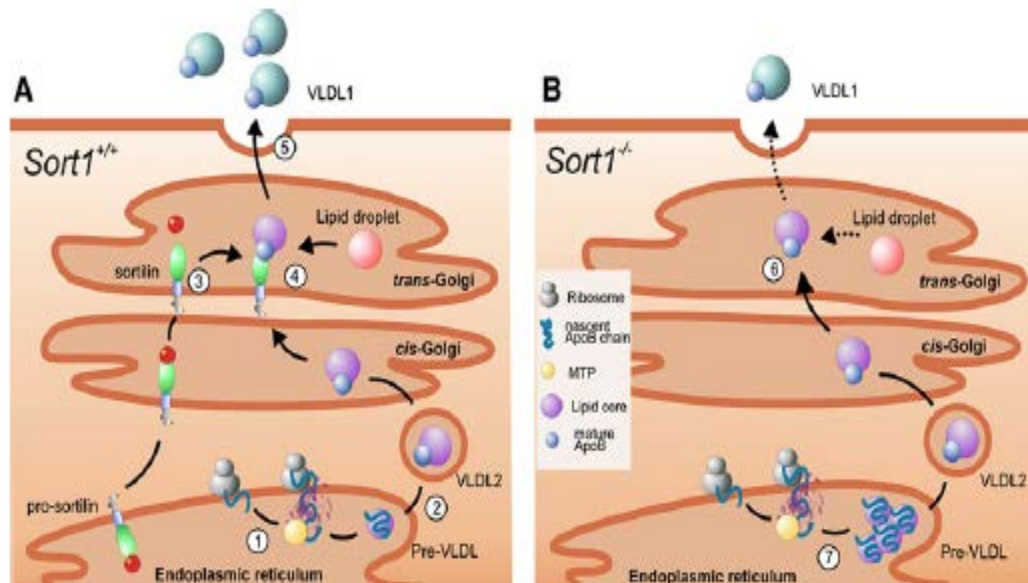


Figura 33. Interacción de SORT1.

Modelo de acción de sortilina en el exporte de lipoproteínas hepáticas, modificado de Kjolby *et al.*, 2010.

Por otra parte, en tejido adiposo y músculo se ha observado que sortilina tiene un papel esencial en el metabolismo de la glucosa, controlando la localización de GLUT4, un transportador de glucosa que tras el estímulo de insulina se transloca a la membrana plasmática favoreciendo el movimiento de glucosa desde la sangre al interior de los tejidos. La inflamación crónica presente en individuos obesos puede contribuir con la resistencia a la insulina mediante la modulación de proteínas que controlan el tráfico de GLUT4 (Kaddai *et al.*, 2009).

Los datos obtenidos de niveles de expresión de SORT1 no presentan diferencia estadísticamente significativa entre los niños sanos y obesos.

LEP, LEPR

La leptina (*LEP*) una adipocitocina, es una hormona peptídica secretada por el tejido adiposo blanco, la forma más frecuente de tejido adiposo en mamíferos. Es un regulador importante de la masa y el tejido adiposo, y del peso corporal. Actúa mediante la inhibición de la ingesta de alimentos y estimula el gasto energético. La leptina es secretada al torrente sanguíneo para ser transportada y actuar en sitios del cerebro específicos sensibles, se une a receptores de leptina (LEPR) en el hipotálamo. LEP inhibe las neuronas de las vías orexigénicas, principalmente el neuropéptido Y (NYP) y el péptido relacionado a agouti (AgRP). Por otra parte, también estimula las neuronas anorexigénicas pro-opiomelanocortina (POMC)/CART y transcritos regulados por amfetamina. POMC es procesada por la acción de la enzima prohormona convertasa 1 (PC1) obteniendo la hormona α -melanocito estimulante (α -MSH), la cual actúa sobre el receptor 4 de melanocortina (MC4R) para inhibir la ingesta de alimentos. AgRP es un antagonista de MC4R (Figura 34) (Gautron *et al.*, 2011; Myers *et al.*, 2010).

Los resultados obtenidos de los niveles de expresión génica no mostraron diferencia estadísticamente significativa, entre niños sanos y obesos, para los genes LEP y LEPR.

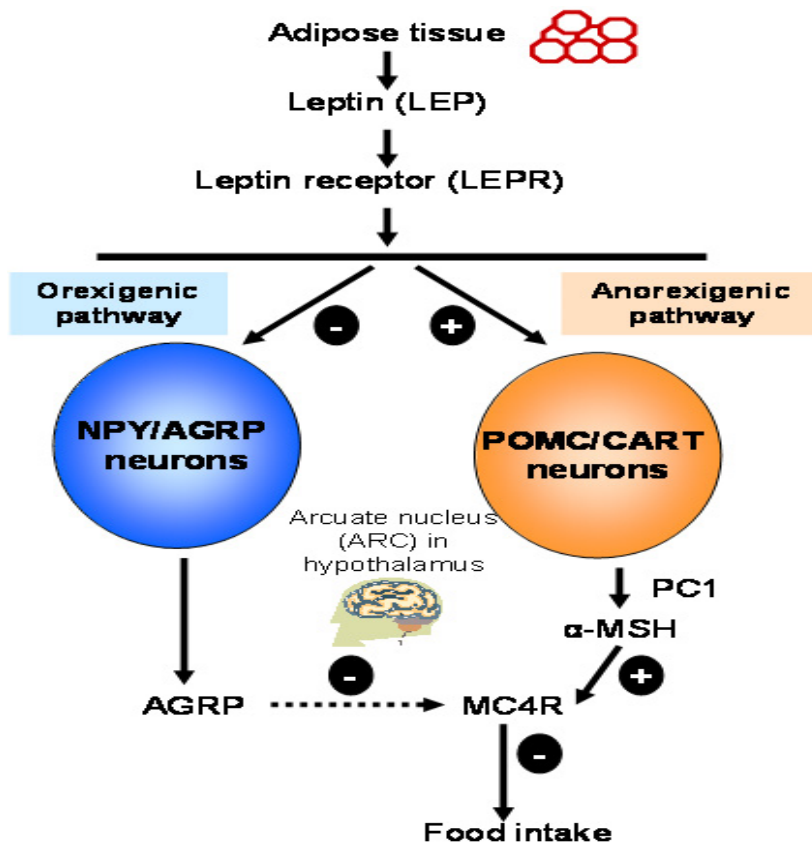


Figura 34. Mecanismo de la Leptina y receptor de Leptina.

Representación esquemática de la función de Leptina. α -MSH, alpha melanocyte-stimulating hormone; MC4R, melanocortin 4 receptor; AgRP, Agouti- related peptide NPY, neuropeptide Y; POMC, pro-opiomelanocortin; CART, amphetamine-regulated transcript ; PC1, pro-hormone convertase.

Modificado de Yee-How 2012.

ADIPOQ, ADIPOR1, ADIPOR2

La adiponectina (ADIPOQ) es una adipocitocina. Es una proteína que puede sufrir modificaciones postraduccionales de hidroxilación y glucosilación, dando lugar a su unidad estructural básica, un trímero fuertemente asociado, formado por la unión de 3 monómeros mediante un dominio globular. Estos trímero a su vez pueden asociarse en grupos de 4 a 6 mediante un dominio colágeno, formando estructuras altamente ordenadas y oligómeros. La síntesis y secreción de la adiponectina se regula por diferentes mecanismos. Se ha observado que la insulina y el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1) estimulan su expresión génica y secreción en

adipocitos cultivados in vitro. Los PPARs también están implicados en la regulación de la síntesis de adiponectina (Beltowski, 2003).

Una característica de la adiponectina es que su expresión en tejido adiposo y su concentración plasmática se reducen en individuos con sobrepeso y obesidad; dado que es estimulada por la insulina y es inhibida por el TNF- α , la resistencia a la insulina y el incremento en la expresión de TNF- α podrían contribuir a este efecto. Por el contrario, la reducción de peso corporal mediante dietas hipocalóricas o el tratamiento quirúrgico de la obesidad mórbida provocan una elevación de la adiponectina en plasma (Ouchi *et al.*, 2003).

Se han identificado 2 receptores de adiponectina, uno con dos proteínas transmembranales similares y con homología a receptores de unión a proteínas G conocidos como ADIPOR1 y ADIPOR2. ADIPOR1 tiene una expresión ubicua, aunque es más abundante en el músculo esquelético; mientras que ADIPOR2 se expresa con más abundancia en hígado. Cabe señalar que los trímeros pueden activar la vía AMPK en músculo, mientras que los hexámeros activan el factor nuclear kappa beta (NF- $\kappa\beta$); por otra parte interleucina 6(IL-6) y TNA- α son potentes inhibidores de su expresión y de su secreción (Ronti *et al.*, 2006).

Los efectos biológicos de la adiponectina son mediados por diversas vías de señalización que involucran moléculas como AMPK, PPAR γ , ERK, AKT, and P38. Además APPL1, APPL2, Ca²⁺ y SIRT1 emergen como efectores. La señalización de ADIPORs puede ser modulada por la interacción con dos proteínas adaptadoras, proteína adaptadora con dominio homólogo a pleckstrina, y motivo de cierre de leucina (APPL1 y APPL2). Después de la unión de adiponectina con sus receptores, APPL1 provoca la señalización a través de PPAR α , AMPK, AMPK/SIRT1, p38-MAPK, ERK1/2-MAPK y Akt. APPL2 se une a ADIPOR1 y ADIPOR2. La activación de ambos receptores resulta en la modulación de diferentes efectos biológicos como esteroidogenesis, recaptura de glucosa, supervivencia celular, oxidación de ácidos grasos, vasodilatación y citoprotección (Figura 35) (Reverchon *et al.*, 2013).

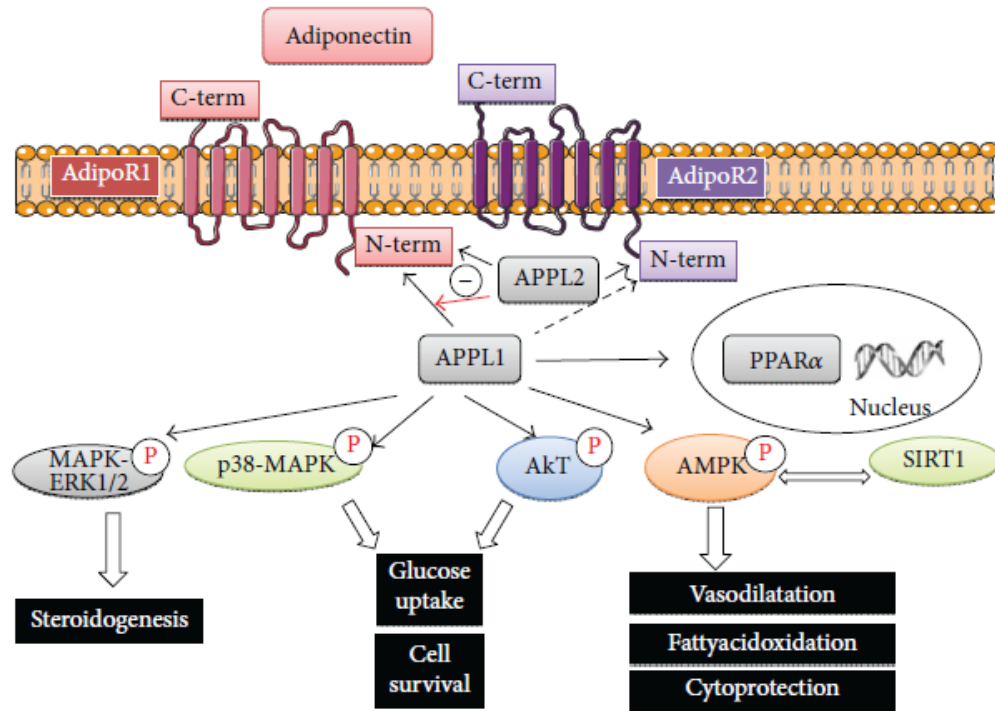


Figura 35. Adiponectina y sus receptores.

Señalización que se genera al ser activados *ADIPOR1* y *ADIPOR2* por adiponectina. AAPL1/2, adaptor protein containing pleckstrin homology domain, phosphotyrosine binding domain, and leucine zipper motif; PPAR α , peroxisome proliferator activated receptor alpha; SIRT1, sirtuina 1 (NAD-dependent deacetylase); AMPK, 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase; MAPK, mitogen-activated protein kinase; ERK1/2, extracellular signal-regulated kinase 1/2.

Los resultados de los niveles de expresión muestran que no existe diferencia estadísticamente significativa de *ADIPOR2* y *ADIPOQ*, por otra parte *ADIPOR1* se encuentra sobreexpresado. Un estudio en tejido adiposo humano mostró que su expresión es reducida en adultos obesos y al sufrir pérdida de peso la expresión incrementa significativamente; además al perder peso se observa una mejora en la sensibilidad a la insulina, la cual puede estar mediada por la un aumento en la concentración de adiponectina (Rasmussen *et al.*, 2006). Por otra parte también se ha reportado que altos niveles de expresión de *ADIPOR1* se asocian con resistencia a la insulina (Akingbemi, 2013), lo cual concuerda con los resultados elevados del índice HOMA observados en el grupo de niños obesos. Por lo que un aumento en los niveles de expresión del receptor observado en nuestro estudio, puede ser el resultado de un intento por parte del organismo de mantener la homeostasis.

ADRB1

Los receptores beta adrenérgicos pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G y son expresados en múltiples tejidos y células sanguíneas. Cuando ADRB1 se une a su agonista, se activa la adenilato ciclasa con lo cual ocurre un aumento del AMP cíclico (cAMP) y la consiguiente activación de PKA (Protein cinasa A). Posteriormente PKA fosforila múltiples proteínas, entre ellas los canales de calcio, al igual que múltiples factores de transcripción nuclear que ejercen diversas funciones. PKA fosforila residuos de serina de la lipasa sensible a hormona (HSL) y promueve su activación y translocación hacia los adiposomas, la insulina causa desfosforilación de HSL y su desactivación. HSL cataliza el paso limitante en la ruptura de triglicéridos y la lipólisis. El sistema AMP cíclico es de gran importancia para la regulación de la lipólisis en el tejido adiposo. cAMP es una molécula de señalización que contribuye con la conversión del adiposito y prosee un efecto sobre la regulación de varios genes (Figura 36) (Lafontan *et al.* 1993).

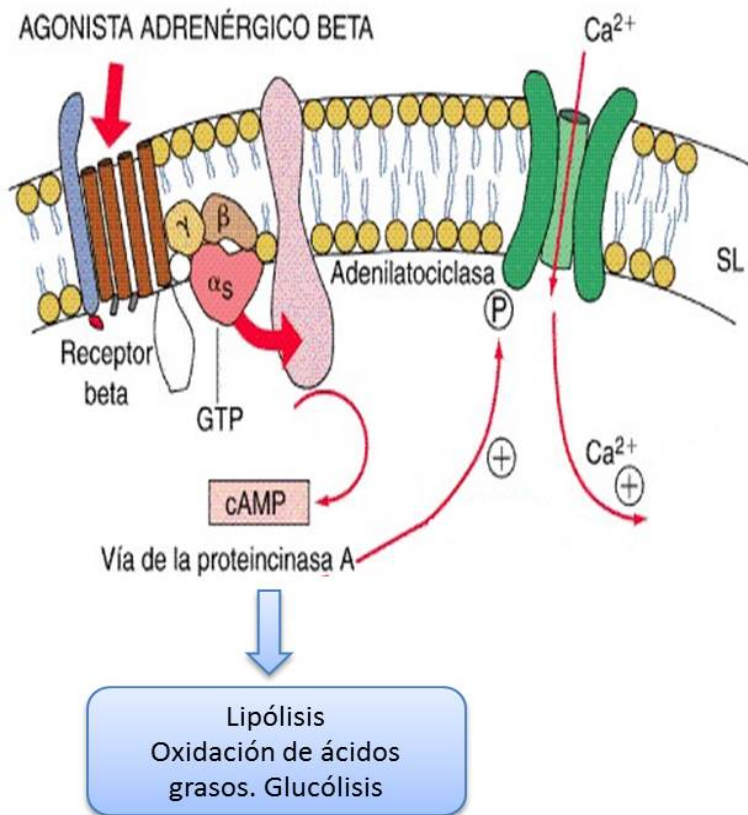


Figura 36. Receptor Beta 1 Adrenérgico.

Modificado de Harrison Principios de medicina interna 2012.

Los resultados obtenidos en los niveles de expresión de ADRB1 muestran un aumento en los niños sanos, este resultado es consistente con un estudio realizado en ratones que sugiere que su expresión es de suma importancia para prevenir la obesidad causada por una dieta alta en grasa (Soloveva *et al.*, 1997). Por otra parte al estimular el mecanismo de acción de ADRB1 puede llevar a un incremento en la lipólisis en el tejido adiposo blanco y termogénesis en el tejido adiposo café, principalmente por la producción de cAMP. Por otra parte los resultados de insulina elevados en niños obesos pueden contribuir a la inactivación de HSL (Lafontan *et al.* 1993), por lo que un aumento en la expresión el receptor beta 1 adrenérgico puede ser un mecanismo para contrarrestar los efectos de la insulina; de este modo el receptor puede afectar de manera importante el metabolismo de lípidos y al ser activado podría ayudar a prevenir el desarrollo de la obesidad.

Cabe destacar que no se encontraron trabajos sobre la expresión de ADRB1 en sangre periférica y su asociación con obesidad, con lo cual nuestro grupo de trabajo da un indicio muy importante de la participación de este receptor en el desarrollo de la enfermedad.

FTO

El gen *FTO* (fat mass and obesity associated) se expresa en la mayoría de los tejidos; se ha encontrado que se expresa ampliamente en el hipotálamo, un área del cerebro relacionada con la ingesta de alimentos. Se han identificado variantes en *FTO* que se asocian con obesidad y diabetes tipo 2; además de estar involucrado en la regulación del apetito y el peso corporal, también puede regular la transcripción de genes involucrados en el metabolismo mediante la demetilación de ácidos nucleicos. También se ha destacado que *FTO* puede ocasionar un aumento en la ingesta de alimentos y por otro lado puede tener efecto sobre el metabolismo. (Klötting *et al.*, 2008; Grunnet *et al.*, 2009).

La función celular afecta los niveles intracelulares de ATP, los cuales son controlados a través de una variedad de sensores y vías de señalización. Por otra parte el estado de energía intracelular es regulado por AMPK (activated protein kinase A),

el cual es de importancia ya que controla la ingesta energética y el metabolismo energético por medio de las neuronas del hipotálamo. AMPK es un sensor primario de los niveles intracelulares de ATP, es fosforilada al presentarse un incremento del ratio AMP/ATP por acción de la tirosincinasa LKB1, y es activada por inanición e inhibida por la leptina. Por otra parte AMPK controla la expresión de neuropeptidos, de este modo controla la ingesta de alimentos así como las funciones dentro del adipocito. Una disminución en la expresión de *FTO* en neuronas y adipocitos causa una alteración en los niveles de ATP celular, lo que conlleva a una alteración en la fosforilación de AMPK. Un decremento de AMPK fosforilada lleva cambios en el influjo de Ca^{2+} , lo que ocasiona una disminución del mRNA de NPY (neuropeptido Y) por acción de Akt (PKB), y por otra parte una disminución de STAT3. A su vez STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) modula POMC (pro-opiomelanocortina). Por una parte NPY aumenta la ingesta de alimentos y por otra parte POMC provoca el efecto contrario (Figura 37) (Pitman *et al.*, 2012).

Proposed Mechanism of Action of FTO in Controlling Obesity

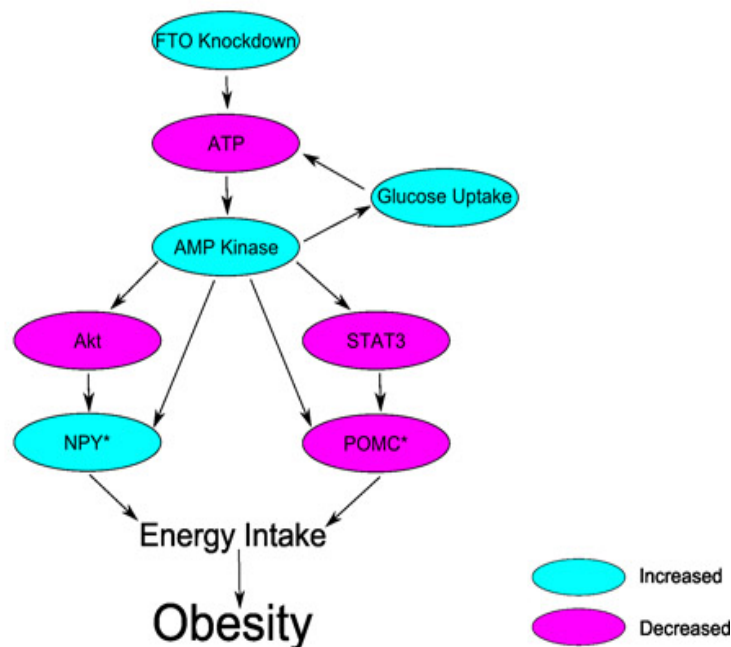


Figura 37. Propuesta de mecanismo de acción para FTO.

Posible mecanismo de acción de FTO (Pitman *et al.*, 2012). FTO, fat mass and obesity associated; ATP, adenosine triphosphate; STAT3, signal transducer and activator of transcription 3; Akt, protein kinase B (PKB); NPY, neuropeptide Y; POMC, pro-opiomelanocortin.

En el presente estudio, los niveles de expresión de *FTO* fueron elevados en niños obesos. Resultados similares se han reportado en estudios de modelos murinos y humanos adultos, donde se encontró una asociación con la expresión y el desarrollo de la obesidad. Por otra parte un estudio en población adulta mestiza mexicana arrojó que la expresión del gen es mayor en tejido adiposo subcutáneo de individuos obesos (Villalobos-Comparán *et al.*, 2008). Otro estudio demostró que mRNA *FTO* se encuentra asociado con el índice de masa corporal en personas adultas de origen Europeo, sugiriendo que la expresión puede ser regulada por la acumulación de grasa en el cuerpo, específicamente la expresión visceral puede contribuir al desarrollo de la obesidad (Klötting *et al.*, 2008). Además también se ha observado que la expresión de *FTO* se relaciona directamente con la ingesta de alimentos y el metabolismo (Church *et al.*, 2010).

La mayoría de los estudios realizados acerca del gen *FTO* concuerdan en el hecho de su asociación con el desarrollo de obesidad, síndrome metabólico y diabetes tipo 2; sin embargo no se tiene un mecanismo de acción específico que describa a detalle la forma en cómo trabaja dicho gen. De los resultados obtenidos podemos observar que los niños obesos presentan un aumento en los niveles de glucosa, la cual podría estar afectando los niveles de ATP, esto provocaría un aumento del NPY y por consiguiente un aumento en la ingesta de alimentos.

GHRL

La grelina es un péptido orexigénico que se deriva del tracto gástrico y afecta circuitos del cerebro involucrados en el balance energético; además la grelina activa un importante circuito de recompensa natural, así como el circuito inducido por drogas: el enlace de recompensa colinérgico-dopaminérgico. Por medio de la activación de este enlace, ocurre un incremento en la satisfacción recibida al ingerir alimentos ricos en carbohidratos y drogas; por lo que la grelina puede estar fuertemente asociada con un aumento en la ingesta de azúcares (Landgren *et al.*, 2011).

La saciedad se asocia con sensaciones de comodidad y bienestar, satisfacción y relajación. Las señales de saciedad para concluir la ingesta de alimentos se originan en el aparato digestivo, que también contribuye con el aumento del apetito y hambre. Se tienen señales de saciedad inducidas por la distensión, las cuales son transferidas desde el estómago hasta los centros hipotalámicos de regulación de la alimentación a través de fibras vagales aferentes, esto conduce a la estimulación de neuropéptidos anorexígenicos. Aunque las señales de saciedad se dan por una transducción de señales nerviosas entre el estómago y el hipotálamo, la recurrencia de apetito y el hambre se encuentra bajo control gástrico a través de una vía endocrina. En este punto la grelina estimula el apetito y la ingesta de alimentos; se observa una disminución de la grelina después de la ingesta de alimentos ricos en carbohidratos. La disminución inicial de la grelina plasmática posprandial podría sostener la estimulación de las señales de saciedad mediada por el vago, posteriormente con la elevación de la grelina, podría estimular nuevamente el apetito y la ingesta de alimentos (Erdmann *et al.*, 2004).

Los receptores de grelina se encuentran en neuronas aferentes y en el nervio vago principalmente. En el núcleo arcuato, la grelina estimula el apetito incrementando la actividad de neuronas orexigénicas: NPY/AgRP. Por otra parte, sus neurotransmisores inhiben la actividad de POMC así como la actividad de neuronas anorexigénicas en el núcleo paraventricular (AgRP es un antagonista de α -MSH). De este modo, NPY/AgRP estimulan una señal orexigénica que provocan una sensación de hambre. Por su parte la leptina y la insulina disminuyen la liberación de NPY/AgRP y POMC, y aumentan la liberación de α -MSH; esto lleva a la activación de vías anorexigénicas, provocando una sensación de saciedad (Figura 38) (Varela *et al.*, 2011; Erdmann *et al.*, 2005).

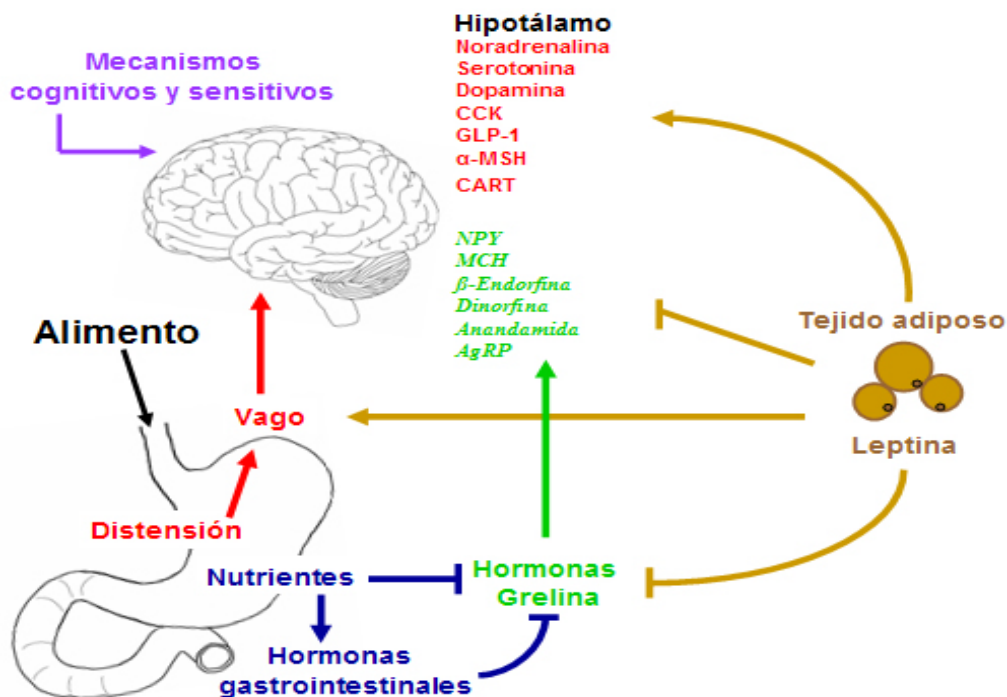


Figura 38. Mecanismo de acción de grelina.

Modificado de Erdmann *et al.*, 2004. CCK, colecistocinina; GLP-1, glucagón like peptide 1; α-MSH, alpha melanocyte stimulating hormone; CART, transcrito relacionado con cocaína-anfetamina; NPY, neuropeptide Y; MCH, hormona concentradora de melanina; AgRP, péptido relacionado con agoutí. Neurotransmisores/neuropéptidos anorexigénicos, color rojo; neuropéptidos orexigénicos, color verde.

En nuestro estudio los niveles de expresión de GHRL en niños obesos se encontraron elevados. Este gen se ha asociado con obesidad debido a que tiene un efecto diabetogénico en el hígado y en el páncreas, y también porque puede contribuir con el aumento en la ingesta de alimentos. En general los niveles de grelina se encuentran reducidos en pacientes obesos, lo cual se asocia con una concentración elevada de leptina; esto indica que el mecanismo para reducir la ingesta de alimentos, en caso de reservas suficientes de energía, está intacto (Scerif, *et al.*, 2011; Williams *et al.*, 2006). Lo anterior sugiere que la posición de la grelina dentro del sistema de control de la ingesta de alimentos tiene un papel aun mayor, el cual no ha sido elucidado completamente.

Validación por PCR tiempo real.

Con la finalidad de realizar una validación de los datos obtenidos en el equipo Open Array, se empleó PCR en tiempo real y sondas TaqMan; ésta técnica ha sido ampliamente usada para realizar las mediciones en la expresión de genes, debido a que tiene varias ventajas, como lo son la sensibilidad, especificidad y reproducibilidad (Barbaciору *et al.*, 2006).

Se analizaron los datos de expresión de FTO y GHRL; se observó que existe una concordancia de los datos obtenidos por Open Array con los datos obtenidos por PCR tiempo real, lo cual valida los datos arrojados por el equipo Open Array.

CONCLUSIONES

1. En nuestro estudio abordamos el problema de la obesidad mediante el análisis de la expresión de diversos genes que se encuentran asociados con la enfermedad, empleando muestras de sangre periférica de niños sanos y obesos.
2. Se realizó la caracterización fenotípica de niños con edades entre 6 y 12 años de edad.
3. Al analizar nuestra población de estudio, observamos que el 26% de los niños presentan obesidad y tan solo el 51.3% son sanos.
4. Se observó un aumento en los niveles de glucosa, insulina, LDL, triglicéridos y presión arterial; así como una disminución de HDL en niños obesos. Estos datos indican la de síndrome metabólico.
5. Los genes *FTO*, *GHRL*, *ADRB1* y *ADIPOR1* presentaron diferencia de expresión, lo cual indica que dichos genes pueden contribuir con el desarrollo de la obesidad en población infantil mexicana.

PERSPECTIVAS

1. Considerar la importancia de identificar y tratar el problema de sobrepeso y obesidad en la niñez.
2. Destacar que las alteraciones bioquímicas en los niños pueden desencadenar problemas de salud en la edad adulta.
3. Considerar utilizar muestras de sangre periférica para los estudios de expresión, en lugar de biopsias de diversos tejidos.
4. Contar con un panel o chip de riesgo para obesidad que pueda ser utilizado para prevenir y/o tratar dicho padecimiento.

BIBLIOGRAFÍA.

- Akingbemi BT. (2013) Adiponectin receptors in energy homeostasis and obesity pathogenesis. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 114:317-342.
- Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G, Gaffney PM, Moser K, Ortmann WA, Espe KJ, Balasubramanian S, Hughes KM, Chan JP, Begovich A, Chang SY, Gregersen PK, Behrens TW (2004). Expression levels for many genes in human peripheral blood cells are highly sensitive to ex vivo incubation. *Genes Immun.* 5(5):347-53.
- Barbaccioru CC, Wang Y, Canales RD, Sun YA, Keys DN, Chan F, Poulter KA, Samaha RR. (2006). Effect of various normalization methods on Applied Biosystems expression array system data. *BMC Bioinformatics.* 15;7:533.
- Bastarrachea RA, López-Alvarenga JC, Kent JW, Laviada-Molina HA, Cerda-Flores RM, Calderón-Garcidueñas AL, Torres-Salazar A, Nava-González EJ, Solís-Pérez E, Gallegos-Cabrales EC, Cole SA, Comuzzie AG. (2008) Transcriptoma en mexicanos: metodología para analizar el perfil de expresión genética de gran escala en muestras simultáneas de tejido muscular, adiposo y linfocitos obtenidas en un mismo individuo. *Gac Méd Méx.* 144(6): 473-479.
- Bastos, AA, González Bato, Molinero González O. y Salguero del Valle A. (2005). Obesidad, nutrición y actividad física. *Revista Internacional de Medicina y Ciencias de la Actividad Física y del Deporte.* 18.
- Bell CG, Walley AJ, Froguel P (2005). The genetics of human obesity. *Nature Reviews Genetics.* 6: 221-34.
- Beltowski J. (2003) Adiponectin and resistin – new hormones of white adipose tissue. *Med Sci Monit.* 9:RA55-RA61.
- Blüher M, Michael MD, Peroni OD, Ueki K, Carter N, Kahn BB, Kahn CR. (2002). Adipose tissue selective insulin receptor knockout protects against obesity and obesity-related glucose intolerance. *Dev Cell.*3(1):25-38.
- Buerguete-García AI, Valdés-Villalpando YN, Cruz M. (2014). Definiciones para el diagnóstico de síndrome metabólico en población infantil. *Gaceta Médica de México.* 150(1):79-87.
- Cauchi S, Choquet H, Gutiérrez-Aguilar R, Capel F, Grau K, Proenca C, Dina C, Duval A, Balkau B, Marre M, Potoczna N, Langin D, Horber F, Sorensen TIA, Charpentier G, Meyre D y Froguel P. (2008) Effects of TCF7L2 Polymorphisms on Obesity in European Populations. *Obesity Journal* 16 (2): 476-481.
- Cauchi S, Meyre D, Dina C, Choquet H, Samson C, Gallina S, Balkau B, Charpentier G, Pattou F, Stetsyuk V, Scharfmann R, Staels B, Frühbeck G, Froguel P. (2006). Transcription factor TCF7L2 genetic study in the French population: expression in human beta-cells and adipose tissue and strong association with type 2 diabetes. *Diabetes.* 55(10):2903-8.
- Church C, Moir L, McMurray F, Girard C, Banks GT, Teboul L, Wells S, Brüning JC, Nolan PM, Ashcroft FM y Cox RD. (2010) Overexpression of Fto leads to increased food intake and results in obesity. *Nature genetics* 42 (12): 1086-1093.
- Corbalan MS, Martí A, Forga L, Martínez-González MA & Martínez JA (2002). Beta(2)-adrenergic receptor mutation and abdominal obesity risk: effect modification by gender and HDL-cholesterol. *Eur J Nutr.*41:14-118.

- Daniele A, Cammarata R, Masullo M, Nerone G, Finamore F, D'Andrea M, Pilla F, Oriani G. (2008). Analysis of adiponectin gene and comparison of its expression in two different pig breeds. *Obesity* (Silver Spring). (8):1869-74.
- Dheda K, Huggett JF, Bustin SA, Johnson MA, Rook G, Zumla A. (2004). Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques*. 37(1): 112-119.
- Dina C, Meyre D, Gallina S, Durand E, Körner A, Jacobson P (2007). Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nature Genetics*. 39(6):724-6.
- Dionne IJ, Garant MJ, Nolan AA, Pollin TI, Lewis DG, Shuldiner AR & Poehlman ET (2002). Association between obesity and a polymorphism in the beta(1)adrenoceptor gene (Gly389Arg ADRB1) in Caucasian women. *Int J ObesRelatMetabDisord*. 26: 633-639.
- Edwards TL, Velez Edwards DR, Villegas R, Cohen SS, Buchowski MS, Fowke JH, Schlundt D, Long JR, Cai Q, Zheng W, Shu XO, Hargreaves MK, Jeffrey S, Williams SM, Signorello LB, Blot WJ, Matthews CE (2012). HTR1B, ADIPOR1, PPARGC1A, and CYP19A1 and Obesity in a Cohort of Caucasians and African Americans: An Evaluation of Gene-Environment Interactions and Candidate Genes. *Am J Epidemiol*. 175(1):11-21.
- Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2006. <http://www.insp.mx/ensanut/>.
- Endo K, Yanagi H, Hirano C, Hamaguchi H, Tsuchiya S & Tomura S (2000). Association of Trp64Arg polymorphism of the beta3-adrenergic receptor gene and no association of Gln223Arg polymorphism of the leptin receptor gene in Japanese schoolchildren with obesity. *Int J ObesRelatMetabDisord*. 24:443-449.
- Erdmann J, Lippl F, Wagenpfeil S, Schusdziarra V. (2005). Differential association of basal and postprandial plasma ghrelin with leptin, insulin, and type 2 diabetes. *Diabetes*. 54:1371-1378.
- Flores-huerta S. Obesidad abdominal y síndrome metabólico. 2008. *Gac Med Mex*. 65: 83.85.
- Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM (2007). A common variant in the FTO gene is associated to body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science*. 316: 889-94.
- Farooqi IS (2011). Genetic, molecular and physiological insights into human obesity. *Eur J Clin Invest*. 41: 451-5.
- Fujisawa T, Ikegami H, Kawaguchi Y and Ogihara T. (1998) Meta-analysis of the association of Trp64Arg polymorphism of beta3-adrenergic receptor gene with body mass index. *J ClinEndocrinolMetab*. 83(7): 2441-2444.
- Fujisawa T, Ikegami H, Kawaguchi Y and Ogihara T. (1998) Meta-analysis of the association of Trp64Arg polymorphism of beta3-adrenergic receptor gene with body mass index. *J ClinEndocrinolMetab*. 83(7): 2441-2444.
- Fumeron F, Aubert R, Siddiq A, Betoulle D, Pean F, Hadjadj S, Tichet J, Wilpart E, Chesnier MC, Balkau B, Froguel P. & Marre M (2004). Adiponectin gene polymorphisms and adiponectin levels are independently associated with the development of hyperglycemia during a 3-year period: the epidemiologic data on the insulin resistance syndrome prospective study. *Diabetes*. 53:1150-1157.

- Gautron L, Elmquist JK. (2011) Sixteen years and counting: an update on leptin in energy balance. *J Clin Invest.* 121(6):2087-2093.
- González-Jiménez E. (2011). Genes and obesity. *Endocrinol Nutr.* 58(9): 492-496.
- Grunnet LG, Nilsson E, Ling C, Hansen T, Pedersen O, Groop L, Vaag A, Poulsen P. (2009). Regulation and function of FTO mRNA expression in Human skeletal muscle and subcutaneous adipose tissue. *Diabetes.* 58: 2402-2408.
- Gunn TM, Inui T, Kitada K, Ito S, Wakamatsu K, He L, Bouley DM. (2001). Molecular and phenotypic analysis of attractin mutant mice. *Genetics.* 158: 1683-1695.
- He L, Gunn TM, Bouley DM, Lu XY, Watson SJ, Schlossman SF, Duke-Cohan JS, Barsh GS. (2001). *Nature Genetics.* 27: 40-47.
- Hernández-Romano J, Martínez-Barnette J, Valverde-Garduño V. (2009). *Salud Pùblica de México.* 51 supl 3: S455-S462.
- Herrera BM, Lindgren CM. (2010). The genetics of obesity. *CurrDiab Rep.* 10: 498-505.
- Huang J, Jia Y, Fu T, Viswakarma N, Bai L, Rao MS, Zhu Y, Borensztajn J, Reddy JK. (2011). Sustained activation of PPAR{alpha} by endogenous ligands increases hepatic fatty acid oxidation and prevents obesity in ob/ob mice. *FASEB J.*
- INSP: Instituto Nacional de Salud Pùblica en México, 2005. <http://www.insp.mx/>
- Jackson JJ. (1999). The mahogany mouse mutation: further links between pigmentation, obesity and the immune system. *Trends Genet.* 15(11): 429-31.
- Jia G, Yang CG, Yang S, Jian X, Yi C, Zhou Z and He C. (2008) Oxidative demethylation of 3-methylthymine and 3-methyluracil in single-stranded DNA and RNA by mouse and human FTO. *FEBS Lett.* 582(23-24): 3313-3319.
- Jiang Y, Wilk JB, Borecki I, Williamson S, DeStefano AL, Xu G, Liu J, Ellison RC, Province M. & Myers RH (2004). Common variants in the 5' region of the leptin gene are associated with body mass index in men from the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study. *American Journal of Human Genetics.* 75:220-230.
- Kaddai V, Jager J, Gonzalez T, Najem-Lendom R, Bonnafous S, Tran A, Le Marchand-Brustel Y, Gual P, Tanti JF, Cormont M.(2009). Involvement of TNF-alpha in abnormal adipocyte and muscle sortilin expression in obese mice and humans. *Diabetologia.* 52(5):932-40.
- Kelly LJ, Vicario PP, Thompson GM, Candelore MR, Doebber TW, Ventre J, Wu WS, Meurer R, Forrest MJ, Conner MW, Cascieri MA, Moller DE. (1998) *Endocrinology.* 139(12):4920-7.
- Kjolby M, Andersen OM, Breiderhoff T, *et al.* Sort1 encoded by the cardiovascular risk locus 1p13.3, is a regulator of hepatic lipoprotein export. *Cell Metabolism.* 2010. 12: 213-223.
- Klötting N, Schleinitz D, Ruschke K, *et al.*, (2008) Inverse relationship between obesity and FTO gene expression in visceral adipose tissue in humans. *Diabetologia.* 51: 641-647.
- Kyriazis I, Rekleiti M, Saridi M, Beliotis E, Toska A, Souliotis K, Wozniak G. Prevalence of obesity in children aged 6-12 years in Greece: nutritional behaviour and physical activity. 2012. *Acrh Med Sci.* 5:859-864.
- Kuczmarski RJ, Ogden CL, Guo SS, *et al.* 2000 CDC Growth Charts for the United States: methods and development. *Vital Health Stat* 2002; 246:1-190.

- Landgren S, Simms JA, Thelle DS, Strandhagen E, Bartlett SE, Engel JA, Jerlhag E. (2011). The ghrelin signalling systems involved in the consumption of sweets. *PloS One*. 6(3): e18170.
- Laris ME, Arteaga MA, Cuevas MA, Rigotti RA. (2005) HDL cholesterol: A new target in the treatment of lipid disorders and atherosclerosis? *Rev. Méd Chile*. 133(7).
- Lafontan M, Berlan M.(1993). Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. *J Lipid Res*. 34:1057–1091.
- Large V, Hellstrom L, Reynisdottir S, Lonnqvist F, Eriksson P, Lannfelt L&Arner P (1997). Human beta-2 adrenoceptor gene polymorphisms are highly frequent in obesity and associate with altered adipocyte beta-2 adrenoceptor function. *J Clin Invest*. 100: 3005-3013.
- Lee YS, Poh LK, Kek BL, Loke KY. (2007). The role of melanocortin 3 receptor gene in childhood obesity. *Diabetes*. 56(10):2622-30.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*. 25: 402-308.
- López-Orduña E, Cruz M, García-Mena J. (2007) The transcription of MGAT4A glycosyltransferases in increased in white cells of Peripherals blood of type 2 diabetes patients. *BMC Genetics*.8:73.
- López-Orduña E, García-Mena J, García-Macedo R, Stumvoll M, Cruz M. (2007) CANP10 mRNA splicing and decay is not affected by a SNP associated with susceptibility to type 2 diabetes. *BiochemBiophys Res Commun*. 358(3): 831-836.
- Lyon HN, Emilsson V, Hinney A, Heid IM, Lasky-Su J, Zhu X, Thorleifsson G, Gunnarsdottir S, Walters GB, Thorsteinsdottir U, Kong A, Gulcher J, Nguyen TT, Scherag A, Pfeufer A, Meitinger T, Brönnner G, Rief W, Soto-Quiros ME, Avila L, Klanderman B, Raby BA, Silverman EK, Weiss ST, Laird N, Ding X, Groop L, Tuomi T, Isomaa B, Bengtsson K, Butler JL, Cooper RS, Fox CS, O'Donnell CJ, Vollmert C, Celedón JC, Wichmann HE, Hebebrand J, Stefansson K, Lange C, Hirschhorn JN (2007). The association of a SNP upstream of INSIG2 with body mass index is reproduced in several but not all cohorts. *PLoSGenet*. 27;3(4):e61.
- Mejía-Benítez A, Klünder-Klünder M, Yengo L, et al. Analysis of the contribution of FTO, NPC1, ENPP1, NEGR1, GNPDA2 and MC4R genes to obesity in Mexican children. *BMC Med Genet* 2013; 14: 21.
- Mencarelli M, Dubern B, Alili R, Maestrini S, Benajiba L, Tagliaferri M, Galan P, Rinaldi M, Simon C, Tounian P, Hercberg S, Liuzzi A, Di Blasio AM, Clement K. (2011). Rare melanocortin-3 receptor mutations with in vitro functional consequences are associated with human obesity. *HumMol Genet*. 15;20(2):392-9.
- Myers MG Jr, White MF (2002). The molecular basis of insulin action. En: *Insulin signaling: from cultured cells to animal models*. Editor: Gruenberg G, Zick Y, Taylor and Francis. New York, pp 55-87.
- Myers MG Jr, Leibel RL, Seeley RJ, Schwartz MW. (2010) Obesity and leptin resistance: distinguishing cause from effect. *Trends Endocrinol Metab*. 21(11):643-651.
- NCBI: National Center for Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- Norris AL, Steinberger J, Steffen LM, Metzger AM, Schwarzenberg SJ, Kelly AS. Circulating oxidized LDL and inflammation in extreme pediatric obesity. *Obesity (Silver Spring)* 2011; 19: 1415-1419.

- Oliveira C, Mattos ABM, Biz C, Oyama LM, Ribeiro EB, Oller do Nascimento CM. (2011) High-fat diet and glucocorticoid treatment cause hyperglycemia associated with adiponectin receptor alterations. *Lipids Health Dis.* 2011; 10: 11.
- OMS (2010): Organización Mundial de la Salud, Obesidad y Sobrepeso. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/index.html>.
- Óvilo C, Fernández A, Fernández AI, Folch JM, Varona L, Benítez R, Nuñez Y, Rodríguez C, Silió L (2010). Hypothalamic expression of porcine leptin receptor (LEPR), neuropeptide Y (NPY), and cocaine- an amphetamine- regulated transcript (CART) genes is influenced by LEPR genotype. *Mamm Genome.* 21(11-12): 583-91.
- Ouchi M, Kihara S, Funahashi T, Matsuzawa Y, Walsh K. (2003) Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease. *Curr Opin Lipidol.* 14: 561-566.
- Pilvi TK, Storvik M, Louhelainen M, Merasto S, Korpela R, Mervaala EM (2008). Effect of dietary calcium and dairy proteins on the adipose tissue gene expression profile in diet-induced obesity. *J Nutrigenet Nutrigenomics.* 2008;1(5):240-51.
- Pitman RT, Fong JT, Billman P, Piru N. (2012). Knockdown of the fat mass and obesity gene disrupts cellular energy balance in a cell-type specific manner. *PLoS One.* 7(6): e38444.
- Qi L, Cho YA. (2008) Gene-environment interaction and obesity. *Nutr Rev.* 66(12):684-94.
- Rank M, Siegrits M, Wilks DC, Langhof H, Wolfarth B, Haller B, Koenig W, Halle M. 2013. The cardio-metabolic risk of moderate and severe obesity in children and adolescents. *J. Pediatrics.* 163(1): 137-142.
- Rasmussen MS, Lihn AS, Pedersen SB, Bruun JM, Rasmussen M, Richelsen B. (2006) Adiponectin receptors in human adipose tissue: effects of obesity, weight loss, and fat depots. *Obesity (Silver Spring).* 14:28-35.
- Ridderstråle M, Johansson LE, Rastam L, Lindblad U. (2006). Increased risk of obesity associated with the variant allele of the PPARGC1A Gly482Ser polymorphism in physically inactive elderly men. *Diabetologia.* 49(3):496-500.
- Romero-Velarde E, Campollo-Rivas O, Celis de la Rosa A, Vásquez-Garibay EM, Castro-hernandez JF, Cruz-Osorio RM. (2007). Factores de riesgo de dislipidemia en niños y adolescentes con obesidad. *Salud Pública de México.* 49(2): 103-108.
- Ronti T, Lupattelli G, Mannario E. (2006) The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clin Endocrinol.* 64:355-365.
- Rosmond R, Bouchard C, & Bjorntorp P (2002). A C-1291G polymorphism in the alpha2A-adrenergic receptor gene (ADRA2A) promoter is associated with cortisol escape from dexamethasone and elevated glucose levels. *J Intern Med.* 251:252-257
- Roth H, Korn T, Rosenkranz K, Hinney A, Ziegler A, Kunz J, Siegfried W, Mayer H, Hebebrand J. & Grzeschik K (1998). Transmission disequilibrium and sequence variants at the leptin receptor gene in extremely obese German children and adolescents. *Hum Genet.* 103:540-546.
- Salopuro T, Lindström J, Eriksson JG, Valle TT, Hämäläinen H, Ilanne-Parikka P, Keinänen-Kiukaanniemi S, Tuomilehto J, Laakso M, Uusitupa M. (2004) Common variants in beta2 and beta3 adrenergic receptor genes and uncoupling protein 1 as predictors of the risk for type 2 diabetes and body weight changes. The Finnish Diabetes Prevention Study. *Clin Genet.* 66: 365-367.

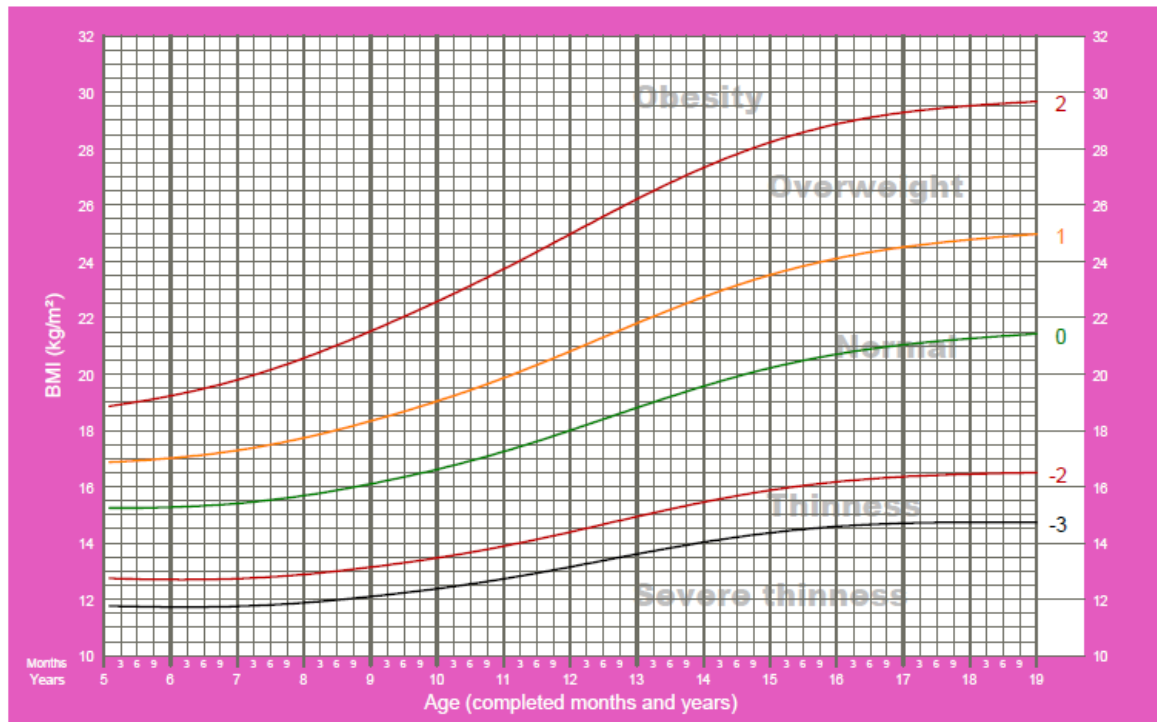
- Scerif M, Goldstone AP, Korbonits M. (2011) Ghrelin in obesity and endocrine diseases. *Mol Cell Endocrinol.* 340(1):15-25.
- Schaefer EJ, Genest JJ Jr, Ordovas JM, Salem DN, Wilson PW. (1994). Familial lipoprotein disorders and premature coronary artery disease. *Atherosclerosis.* 108 (1):S41-54.
- Schoonjans K, Staels B, Auwerx J. (1996) Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. *J Lipid Res.* 37(5):907-25.
- Secretaría de Salud (2010). Acuerdo Nacional para la Salud Alimentaria. Estrategia contra sobrepeso y obesidad. México.
- Soloveva V, Graves RA, Rasenick MM, Spiegelman BM, Ross SR. (1997). Transgenic mice overexpressing the beta 1-adrenergic receptor in adipose tissue are resistant to obesity. *Mol Endocrinol.* 11(1):27-38.
- Stanasila L, Abuin L, Dey J, Cotecchia S. (2008) Different internalization properties of the alpha1a- and alpha1b-adrenergic receptor subtypes: the potential role of receptor interaction with beta-arrestins and AP50. *Mol Pharmacol,* 74: 562-573.
- Tall AR, Jiang X, Luo Y, Silver D. (2000). Lipid transfer proteins. HDL metabolism, and atherogenesis. *Atheroscler Thromb Vasc Biol.* 20: 1185-8.
- Takaishi K, Duplomb L, Wang MY, Li J, Unger RH. (2004). Hepatic insig-1 or -2 overexpression reduces lipogenesis in obese Zucker diabetic fatty rats and in fasted/refed normal rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(18):7106-11.
- Takamura T, Honda M, Sakai Y, Ando H, Shimizu A, Ota T, Sakurai M, Misu H, Kurita S, Matsuzawa-Nagata N, Uchikata M, Nakamura S, Matoba R, Tanino M, Matsubara K, Kaneko S. (2007). *Biochem Biophys Res Commun.* 361(2): 379-384.
- Tankó LB, Siddiq A, Lecoœur C, Larsen PJ, Christiansen C, Walley A y Froguel P. (2005) ACDC/Adiponectin and PPAR-γ Gene Polymorphisms: Implications for Features of Obesity. *Obesity Research* 13 (12): 2113-2121.
- Tso P, Liu M. Apolipoprotein A-IV, food intake, and obesity. (2004) *Physiol Behav.* 83(4):631-43.
- Varela L, Vazquez MJ, Cordido F, Nogueiras R, Vidal-Puig A, Diéguez C, López M. (2011). Ghrelin and lipid metabolism: key partners in energy balance. *J Mol Endocrinol.* 46(2): R43-63.
- Van Rossum CT, Hoebee B, Seidell JC, Bouchard C, van Baak MA, de Groot CP, Chagnon M, de Graaf C & Saris WH (2002). Genetic factors as predictors of weight gain in young adult Dutch men and women. *J Obes Relat Metab Disord.* 26: 517-528.
- Villalobos-Comparán M, Flores-Dorantes MT, Villarreal-Molina MT, *et al.*, (2008). The FTO gene is associated with adulthood obesity in the Mexican population. *Obesity (Silver Spring).* 16: 2296-2301.
- Villarreal-Molina MT, Aguilar-Salinas CA, Rodríguez-Cruz M, Riaño D, Villalobos-Comparán M, Coral-Vazquez R, Menjivar M, Yescas-Gomez P, Königsoerg-Fainstein M, Romero-Hidalgo S, Tusie-Luna MT, Canizales-Quinteros S; Metabolic Study Group. (2007) The ATP-binding cassette transporter A1 R230C variant affects HDL cholesterol levels and BMI in the Mexican population: association with obesity and obesity-related comorbidities. *Diabetes.* Jul;56(7):1881-7.

- Virkamaki A, Ueki K, Kahn CR. (1999) Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest.* 103:931-943.
- WHO. World Health Organization. Global database on body mass index. Web Site: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>. Accessed February 2015.
- Williams DL, Grill HJ, Cummings DE, Kaplan JM. (2006). Overfeeding-induced weight gain suppresses plasma ghrelin levels in rats. *J Endocrinol Invest.* 29: 863-868.
- Xinli W, Xiaomei T, Meihua P & Song L (2001). Association of a mutation in the beta3-adrenergic receptor gene with obesity and response to dietary intervention in Chinese children. *Acta Paediatr.* 90:1233-1237.
- Xu M, Zhou H, Wang J, Li C, Yu Y. (2009). The expression of ATP-binding cassette transporter A1 in Chinese overweight and obese patients. *Int J Obes (Lond)*.33(8):851-6.
- Yabe D, Brown MS, Goldstein JL. (2002). Insig-2, a second endoplasmic reticulum protein that binds SCAP and blocks export of sterol regulatory element-binding proteins. *PNAS.* 99(20):12753-12758.
- Yamada K, Ishiyama-Shigemoto S, Ichikawa F, Yuan X, Koyanagi A, Koyama W & Nonaka K (1999). Polymorphism in the 5'-leader cistron of the beta2-adrenergic receptor gene associated with obesity and type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 84:1754-1757.
- Yee-How S. Satiety gene variants as markers for obesity. Web site: <https://www.utar.edu.my/contentRandD.jsp?catid=9&contentid=417&2ndcontentid=1957>. Accessed January 2015.
- Yeo GSH, Siddle K. Attractin more attention, new pieces in the obesity puzzle. (2003) *Biochem J.* 376(e7_e8).
- Zhu J, Su X, Li G, Chen J, Tang B, Yang Y. (2014). The incidence of acute myocardial infarction in relation to overweight and obesity: a meta-analysis. *Arch Med Sci.* 5: 855-862.

Apéndice 2. Puntaje Z (Z-score). IMC por edad por género.

BMI-for-age GIRLS

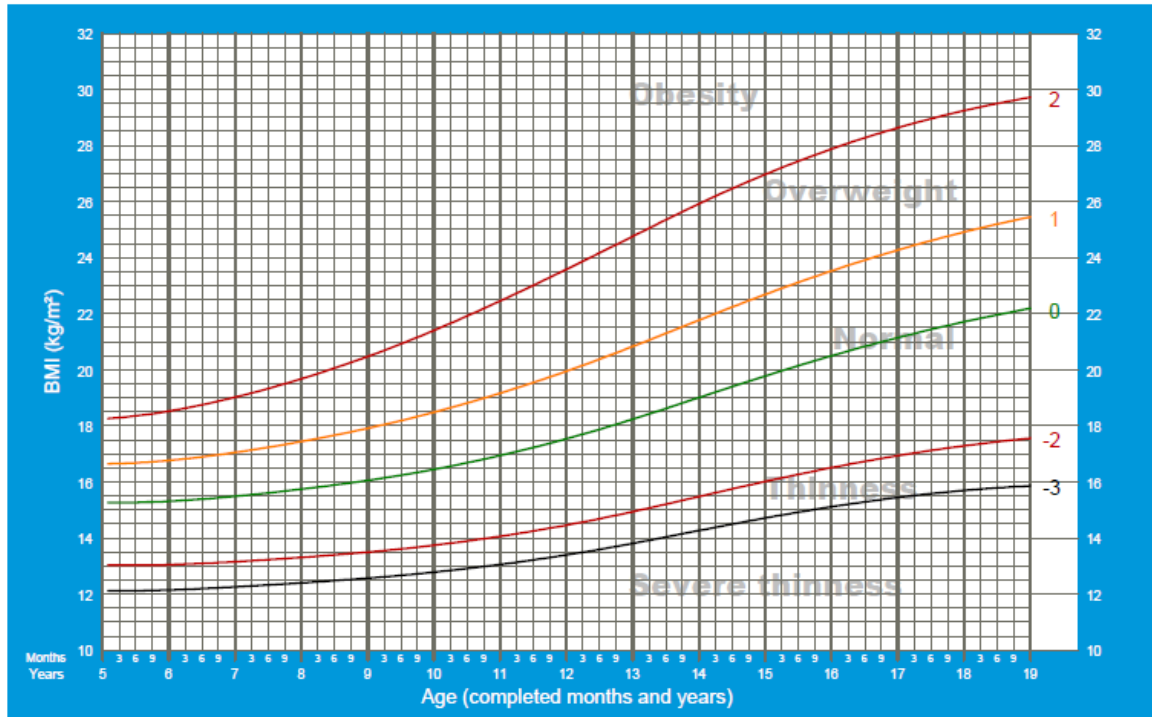
5 to 19 years (z-scores)



2007 WHO Reference

BMI-for-age BOYS

5 to 19 years (z-scores)



2007 WHO Reference

Apéndice 3. Carta de consentimiento informado.



PROYECTO: IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS Y BIOQUÍMICOS PRO-INFLAMATORIOS ASOCIADOS A LA OBESIDAD EN NIÑOS DE LA CIUDAD DE MÉXICO

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Lugar: _____

Fecha: día ____ / mes ____ / año ____

ESTIMADO PADRE DE FAMILIA:

La coordinación de prestaciones Sociales y División de bienestar Social, la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica del Hospital de Alta Especialidad Médica "Dr. Bernardo Sepúlveda" en Centro Médico Nacional Siglo XXI, el Instituto Nacional de Salud Pública y el CINVESTAV, realizan un estudio en niños de 6 a 14 años de edad, el cual ha sido aprobado por las autoridades del IMSS y el comité de ética. El motivo de la presente carta es invitar a tu hijo para que participe y a usted para que autorice su participación firmando esta carta. Sin embargo, antes que todo, le solicitamos que lea la siguiente información y nos pregunte cualquier duda. En caso de firmar esta carta, usted recibirá una copia de este documento.

PROPÓSITO DEL ESTUDIO. En nuestro país han aumentado en forma notable las personas con obesidad. Actualmente tienen sobrepeso y obesidad casi 3 de cada 10 niños y 8 de cada 10 adultos. Las personas con este problema padecen con mayor frecuencia diabetes tipo 2, hipertensión arterial y enfermedades crónicas degenerativas porque ya no se curan y derogan gastos a instituciones y familiares. Estas enfermedades actualmente son la primera causa de muerte de los adultos. Se sabe que la población está engordando por qué ha cambiado su forma de vivir en dos aspectos, uno, come mayor cantidad de alimentos poco saludables y menor cantidad de alimentos saludables y, dos, ya no hace ejercicio y las personas incluyendo los niños pasan muchas horas sentados frente a un televisor o una pantalla, en el automóvil o frente a un escritorio. Sin embargo, el hecho de que las personas estén expuestas a estos factores solo a algunas les llega a afectar, unas padecen obesidad y otras no. Es posible que la respuesta este en las diferentes formas de alimentarse o de ejercitarse, pero también la respuesta puede estar en los genes de cada persona ya que responden de diferente manera ante los factores del ambiente, algunos expresándose como obesidad y otros no. Por ahora, no se sabe como participan los factores genéticos para explicar porque hay tantas personas obesas particularmente en la población mexicana, a diferencia de otras partes del mundo. Esto nos obliga a realizar estudios científicos en los niños de nuestro país los cuales cubran los siguientes aspectos: cuestionarios de antecedentes heredofamiliares, en los cuales se comentan antecedentes de diabetes, hipertensión y otras enfermedades crónico degenerativas en la familia de los niños, cuestionario de actividad física y de la forma de alimentación, por medio de obtención de una muestra sangre se determinaran los aspectos bioquímicos como son glucosa, triglicéridos y colesterol entre otros que comentaremos más adelante y de esa misma muestra realizaremos estudio de genes que puedan predisponer a la obesidad y sus alteraciones, con este estudio podemos identificar factores de riesgo hacia estas enfermedades en etapas tempranas de la vida y prevenirlas.

LA INVESTIGACIÓN CONSISTE EN: A todos los niños se les tomaran mediciones antropométricas las cuales incluyen peso, talla y toma de presión arterial, medición de frecuencia cardiaca y medición de la circunferencia de la cintura y de la cadera así como la aplicación de cuestionarios de antecedentes heredofamiliares, de actividad física y de alimentación y finalmente se obtendrá una muestra de sangre de 15 ml en una sola ocasión, esta sangre se obtendrá estando el niño en ayuno de 12 horas. En la sangre se medirán las concentraciones de los siguientes compuestos: glucosa, insulina, colesterol, triglicéridos, colesterol HDL (bueno) y LDL (malo) y otras sustancias que producen células del tejido adiposo relacionadas con la inflamación. Además la sangre de su hijo se analizará para conocer si tiene algunos genes que pudieran producir obesidad, por ahora, a estos genes se les llama **candidatos** por que en otras poblaciones se han relacionado con la aparición de obesidad. Es importante que usted sepa que actualmente se realizan estudios similares por el mundo y a todas edades, para conocer lo que está ocurriendo con el problema de la obesidad y nuestro país no puede quedar atrás, también se necesita de esta información la cual es fundamental para prevenir esta enfermedad. En cuanto a los padres de familia solo se les realizara mediciones antropométricas y de presión arterial y así identificar datos clínicos en los padres.

1



QUE BENEFICIOS OBTENGO SI MI HIJO PARTICIPA EN EL ESTUDIO: El **beneficio directo** es el realizar un diagnóstico de salud en los niños evaluando el medio ambiente, los factores hereditarios, las mediciones antropométricas y bioquímicas, para detectar oportunamente alteraciones para prevenir complicaciones y gastos innecesarios. Se entregarán recomendaciones clínicas realizadas por médicos y serán entregadas a los padres de cada niño por escrito de manera confidencial. El **beneficio indirecto** es que se contribuirá al conocimiento de que genes pueden predisponer a la obesidad y conocer como hemos cambiado nuestros estilos de vida.

QUE RIESGOS SE TIENEN POR PARTICIPAR EN EL ESTUDIO: prácticamente ninguno, porque ninguna de las mediciones implica riesgos para la salud y por que el personal que hará las mediciones está entrenado para trabajar con los niños, en el caso del piquete para la obtención de sangre puede producir un poco de dolor y podría dejar algún moretón, sin consecuencias. La cantidad de sangre que se obtendrá los cuales son 15 ml no representa ningún riesgo para la salud de su hijo. Tampoco habrá riesgo por el uso del material, puesto que todo es estéril, único y desechable. El personal que obtiene la muestra de sangre está capacitado para trabajar con niños y estimamos que las molestias sean mínimas.

DERECHOS DEL PACIENTE Y RETIRO DEL ESTUDIO: La participación en el estudio es **completamente voluntaria**, quiere decir que no están obligados a tomar parte en el mismo si no lo desean. Si aceptan participar también **podrán retirarse en cualquier momento si así lo deciden**. Usted tendrá derecho a cualquier duda a los investigadores en sus oficinas o en los teléfonos anotados al final de esta carta. En caso de que usted participe, su identidad permanecerá anónima y de manera confidencial y los datos solo podrán utilizarse para fines declarados en este estudio. Usted será informado de cualquier hallazgo obtenido en la investigación. **Este estudio no tiene ningún costo.**

Nombre del padre o tutor

Firma o huella digital

Nombre del paciente

Firma o huella digital

Nombre del testigo 1

Firma o huella digital

Relación con el paciente

Nombre del testigo 2

Firma o huella digital

Relación con el paciente

Nombre quien recabo el consentimiento

Firma o huella digital

RESPONSABLE: Dr. Miguel Cruz López. Jefe de la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica. Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI IMSS. Tel 56276900 ext. 21477 y Dr. José de Jesús Peralta Romero al mismo número.

Apéndice 4. Carta de asentimiento informado.



PROYECTO: IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS Y BIOQUÍMICOS PRO-INFLAMATORIOS ASOCIADOS A LA OBESIDAD EN NIÑOS DE LA CIUDAD DE MÉXICO

CARTA DE ASENTIMIENTO INFORMADO

Lugar:

Fecha: día ___ / mes ___ / año ___

ESTIMADO NIÑO:

La coordinación de prestaciones Sociales y División de bienestar Social, la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica del Hospital de Alta Especialidad Médica "Dr. Bernardo Sepúlveda" en Centro Médico Nacional Siglo XXI, el Instituto Nacional de Salud Pública y el CINVESTAV realizan un estudio en niños de 6 a 14 años de edad, el cual ha sido aprobado por las autoridades del IMSS y el comité de ética. El motivo de la presente carta es invitarte a realizarte algunos estudios clínicos y autorices tu participación firmando esta carta. Sin embargo, antes que todo, te solicitamos que leas la siguiente información y nos preguntes cualquier duda. En caso de firmar esta carta, recibirás una copia de este documento.

PROPÓSITO DEL ESTUDIO. En nuestro país han aumentado en forma notable las personas con obesidad. Actualmente tienen sobrepeso y obesidad casi 3 de cada 10 niños y 8 de cada 10 adultos. Las personas con este problema padecen con mayor frecuencia diabetes tipo 2, hipertensión arterial y enfermedades crónicas degenerativas porque ya no se curan y derogan gastos a instituciones y familiares. Estas enfermedades actualmente son la primera causa de muerte de los adultos. Se sabe que la población está engordando por qué ha cambiado su forma de vivir en dos aspectos, uno, come mayor cantidad de alimentos poco saludables y menor cantidad de alimentos saludables y, dos, ya no hace ejercicio y las personas incluyendo los niños pasan muchas horas sentados frente a un televisor o una pantalla, en el automóvil o frente a un escritorio. Sin embargo, el hecho de que las personas estén expuestas a estos factores solo a algunas les llega a afectar, unas padecen obesidad y otras no. Es posible que la respuesta este en las diferentes formas de alimentarse o de ejercitarse, pero también la respuesta puede estar en los genes de cada persona ya que responden de diferente manera ante los factores del ambiente, algunos expresándose como obesidad y otros no. Por ahora, no se sabe como participan los factores genéticos para explicar porque hay tantas personas obesas particularmente en la población mexicana, a diferencia de otras partes del mundo. Esto nos obliga a realizar estudios científicos en los niños de nuestro país los cuales cubran los siguientes aspectos: cuestionarios de antecedentes heredofamiliares, en los cuales se comentan antecedentes de diabetes, hipertensión y otras enfermedades crónicas degenerativas en la familia de los niños, cuestionario de actividad física y de la forma de alimentación, por medio de obtención de una muestra sangre se determinaran los aspectos bioquímicos como son glucosa, triglicéridos y colesterol entre otros que comentaremos más adelante y de esa misma muestra realizaremos estudio de genes que puedan predisponer a la obesidad y sus alteraciones, con este estudio podemos identificar factores de riesgo hacia estas enfermedades en etapas tempranas de la vida y prevenirlas.

LA INVESTIGACIÓN CONSISTE EN: Se te tomaran mediciones antropométricas las cuales incluyen peso, talla y toma de presión arterial, medición de frecuencia cardiaca y medición de la circunferencia de la cintura y de la cadera así como la aplicación de cuestionarios de antecedentes heredofamiliares, de actividad física y de alimentación y finalmente se te pedirá una muestra de sangre de 15 ml en una sola ocasión esto es en un solo piquete, esta sangre se obtendrá estando en ayuno de 12 horas. De tu sangre se medirán las concentraciones de los siguientes compuestos: glucosa, insulina, colesterol, triglicéridos, colesterol HDL (bueno) y LDL (malo) y otras sustancias que producen células del tejido adiposo relacionadas con la inflamación. Además la sangre de se te analizaran algunos genes (información de herencia) que pudieran producir obesidad, por ahora, a estos genes se les llama **candidatos** por que en otras poblaciones se han relacionado con la aparición de obesidad. Es importante que sepas que actualmente se realizan estudios similares por el mundo y a todas edades, para conocer lo que está ocurriendo con el problema de la obesidad y nuestro país no puede quedar atrás, también se necesita de esta información la cual es fundamental para prevenir esta enfermedad.



Instituto Nacional de Salud Pública



QUE BENEFICIOS OBTENGO SI PARTICIPO EN EL ESTUDIO: El **beneficio directo** es el realizarte un diagnóstico de salud evaluando el medio ambiente, los factores hereditarios, las mediciones antropométricas y bioquímicas, para detectarte oportunamente alteraciones para prevenir complicaciones y gastos innecesarios. Se le entregaran recomendaciones clínicas realizadas por médicos a tus papas por escrito de manera confidencial. **El beneficio indirecto** es que contribuirás al conocimiento de que genes pueden predisponer a la obesidad y conocer como hemos cambiado nuestros estilos de vida.

QUE RIESGOS TENDRIA POR PARTICIPAR EN EL ESTUDIO: prácticamente ninguno, porque ninguna de las mediciones implica riesgos para tu salud y por que el personal que hará las mediciones está entrenado, en el caso del piquete para la obtención de sangre puede producirte un poco de dolor y podría dejarte algún moretón, sin consecuencias. La cantidad de sangre que se obtendrá los cuales son 15 ml no representa ningún riesgo para tu salud. Tampoco habrá riesgo por el uso del material, puesto que todo es estéril, único y desechable. El personal que obtiene la muestra de sangre está capacitado para trabajar con niños y estimamos que las molestias sean mínimas.

DERECHOS DEL PACIENTE Y RETIRO DEL ESTUDIO: La participación en el estudio es **completamente voluntaria**, quiere decir que no estás obligado a tomar parte en el mismo si no lo deseas. Si aceptas participar también **podrás retirarse en cualquier momento si así lo decides**. Tendrás derecho a cualquier duda a los investigadores en sus oficinas o en los teléfonos anotados al final de esta carta. En caso de que participes, tu identidad permanecerá anónima y de manera confidencial y los datos solo podrán utilizarse para fines declarados en este estudio. Serás informado de cualquier hallazgo obtenido en la investigación. **Este estudio no tiene ningún costo.**

Nombre del padre o tutor

Firma o huella digital

Nombre del paciente

Firma o huella digital

Nombre del testigo 1

Firma o huella digital

Relación con el paciente

Nombre del testigo 2

Firma o huella digital

Relación con el paciente

Nombre quien recabo el consentimiento

Firma o huella digital

RESPONSABLE: Dr. Miguel Cruz López. Jefe de la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica. Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI IMSS. Tel 56276900 ext. 21477 y Dr. José de Jesús Peralta Romero al mismo número.

Apéndice 5. Cuestionario de generalidades.



PROYECTO: GENÉTICA DE LA OBESIDAD EN LA INFANCIA Y LA ADOLESCENCIA

APARTADO I. DATOS GENERALES

1. IDENTIFICACIÓN

FECHA: _____ / _____ / _____ FOLIO _____
 día mes año

INSTRUCCIONES: Responda las preguntas con letra clara o colocando una X en el recuadro correspondiente. No escriba en el área sombreada.			
DATOS DEL NIÑO			
NOMBRE: _____			No llenar esta columna.
	Nombre (s)	Apellido paterno	Apellido materno
1.- SEXO:	M () 0 F () 1		
2.- FECHA DE NACIMIENTO	_____ / _____ / _____		
	día mes año		
3.- EDAD:	_____ años		
DIRECCIÓN DE VIVIENDA			
Calle, avenida o callejón		No. exterior	No. interior
Colonia		Delegación o municipio	C.P.
DATOS DE LOS PADRES			
NOMBRE DEL PADRE: _____			No llenar.
4.- EDAD:	_____ años		4
5.- ULTIMO NIVEL ESCOLAR CONCLUIDO:	1.- Ninguno	2.- Primaria	3.- Secundaria
	4.- Bachillerato o técnico	5.- Superior	6.- Posgrado
6.- OCUPACIÓN ACTUAL:	_____		6
NOMBRE DE LA MADRE: _____			No llenar.
7.- EDAD:	_____ años		7
8.- ULTIMO NIVEL ESCOLAR CONCLUIDO:	1.- Ninguno	2.- Primaria	3.- Secundaria
	4.- Bachillerato o técnico	5.- Superior	6.- Posgrado
9.- OCUPACIÓN ACTUAL:	_____		9
ENFERMEDADES DEL NIÑO			
10.- ¿PADECE EL NIÑO (A) ALGUNA DE LAS SIGUIENTES ENFERMEDADES?			No llenar.
1. Diabetes	2. Dislipidemias	3. Enfermedades del corazón	
4. Enf. Gastrointestinales	¿Cual? _____		10
5. Algún otra	_____		
11.- ¿ACTUALMENTE EL NIÑO (A) ESTA EN CUALQUIER TIPO DE TRATAMIENTO PARA BAJAR DE PESO?			
	1. Si ()	2. No ()	11
¿ACTUALMENTE EL NIÑO CURSA CON ALGUNA ENFERMEDAD INFECCIOSA? (Diarrea, tos, catarro, fiebre, etc.)			

12.- ¿TIENES ALGÚN FAMILIAR PARTICIPANDO EN ESTE ESTUDIO?		12	<input type="checkbox"/>
1. Si () 2. No () 3. No se ()			
¿Que parentesco tienen? Hermano () Prímo () Otro _____			
Sí la respuesta es No, pasa a la pregunta número 13.			
NOMBRE COMPLETO DEL FAMILIAR QUE ESTA PARTICIPANDO EN EL ESTUDIO			
Familia _____			
SEXO DEL FAMILIAR		Femenino () Masculino ()	
		EDAD DEL FAMILIAR:	
ANTECEDENTES HEREDOFAMILIARES			
13. ¿La MADRE padece alguna de las siguientes enfermedades?		14	No llenar.
1. Diabetes tipo 2 ()	6. Dislipidemias ()		<input type="checkbox"/>
2. Hipertensión arterial ()	7. Enfermedades gastrointestinales ()		<input type="checkbox"/>
3. Obesidad o sobrepeso ()	8. No sabe ()		<input type="checkbox"/>
4. Enfermedades del corazón ()	9. No aplica ()		<input type="checkbox"/>
5. Triglicéridos o/y colesterol altos ()			<input type="checkbox"/>
14. ¿El PADRE padece alguna de las siguientes enfermedades?		15	No llenar.
1. Diabetes tipo 2 ()	6. Dislipidemias ()		<input type="checkbox"/>
2. Hipertensión arterial ()	7. Enfermedades gastrointestinales ()		<input type="checkbox"/>
3. Obesidad o sobrepeso ()	8. No sabe ()		<input type="checkbox"/>
4. Enfermedades del corazón ()	9. No aplica ()		<input type="checkbox"/>
5. Triglicéridos o/y colesterol altos ()			<input type="checkbox"/>
15. ¿La ABUELA MATERNA padece alguna de las siguientes enfermedades?		14	No llenar.
1. Diabetes tipo 2 ()	6. Dislipidemias ()		<input type="checkbox"/>
2. Hipertensión arterial ()	7. Enfermedades gastrointestinales ()		<input type="checkbox"/>
3. Obesidad o sobrepeso ()	8. No sabe ()		<input type="checkbox"/>
4. Enfermedades del corazón ()	9. No aplica ()		<input type="checkbox"/>
5. Triglicéridos o/y colesterol altos ()			<input type="checkbox"/>
16. ¿El ABUELO MATERNO padece alguna de las siguientes enfermedades?		15	No llenar.
1. Diabetes tipo 2 ()	6. Dislipidemias ()		<input type="checkbox"/>
2. Hipertensión arterial ()	7. Enfermedades gastrointestinales ()		<input type="checkbox"/>
3. Obesidad o sobrepeso ()	8. No sabe ()		<input type="checkbox"/>
4. Enfermedades del corazón ()	9. No aplica ()		<input type="checkbox"/>
5. Triglicéridos o/y colesterol altos ()			<input type="checkbox"/>
17. ¿La ABUELA PATERNA padece alguna de las siguientes enfermedades?		14	No llenar.
1. Diabetes tipo 2 ()	6. Dislipidemias ()		<input type="checkbox"/>
2. Hipertensión arterial ()	7. Enfermedades gastrointestinales ()		<input type="checkbox"/>
3. Obesidad o sobrepeso ()	8. No sabe ()		<input type="checkbox"/>
4. Enfermedades del corazón ()	9. No aplica ()		<input type="checkbox"/>
5. Triglicéridos o/y colesterol altos ()			<input type="checkbox"/>
18. ¿El ABUELO PATERNO padece alguna de las siguientes enfermedades?		15	No llenar.
1. Diabetes tipo 2 ()	6. Dislipidemias ()		<input type="checkbox"/>
2. Hipertensión arterial ()	7. Enfermedades gastrointestinales ()		<input type="checkbox"/>
3. Obesidad o sobrepeso ()	8. No sabe ()		<input type="checkbox"/>
4. Enfermedades del corazón ()	9. No aplica ()		<input type="checkbox"/>
5. Triglicéridos o/y colesterol altos ()			<input type="checkbox"/>

DATOS PARA LOCALIZAR AL NIÑO

Nombre de responsable _____
Tel. casa: _____
Tel. cel: _____ Correo electrónico _____
Tel. oficina: _____

Nombre de otro contacto _____
Tel. casa: _____
Tel. cel: _____ Correo electrónico _____
Tel. oficina: _____

19.- ¿QUIÉN RESPONDIÓ ESTE CUESTIONARIO?							
1.- Padre	2. Madre	3. Hermano (a)	4. Abuelo (a)	5. Tutor	6. Otro	16	<input type="checkbox"/>

Apéndice 6. Cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos.



PROYECTO: GENÉTICA DE LA OBESIDAD EN LA INFANCIA Y LA ADOLESCENCIA

APARTADO II. FRECUENCIA DE CONSUMO DE ALIMENTOS

PIENSA EN QUE ALIMENTOS COMISTE EL ÚLTIMO AÑO (DIGAMOS DESDE SEMANA SANTA DEL AÑO PASADO). ¿PODRÍAS DECIR CON QUE FRECUENCIA CONSUMISTE LOS SIGUIENTES ALIMENTOS? No hay respuestas buenas o malas, solo importa conocer lo que haces. Por favor, cualquier duda pregunta al encuestador

SECCIÓN 1.- PRODUCTOS LÁCTEOS

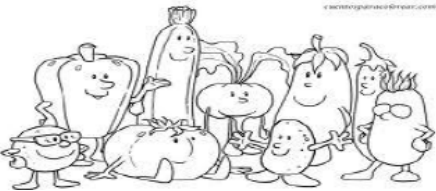


1. Un vaso de leche entera <input type="checkbox"/> Nunca (1) <input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6) <input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2) <input type="checkbox"/> 1 vez al día (7) <input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3) <input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8) <input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4) <input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9) <input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5) <input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		No llenar <input type="checkbox"/>	7. Una rebanada de Queso Amarillo <input type="checkbox"/> Nunca (1) <input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6) <input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2) <input type="checkbox"/> 1 vez al día (7) <input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3) <input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8) <input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4) <input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9) <input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5) <input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		No llenar <input type="checkbox"/>
2. Un vaso de leche light o descremada <input type="checkbox"/> Nunca (1) <input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6) <input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2) <input type="checkbox"/> 1 vez al día (7) <input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3) <input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8) <input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4) <input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9) <input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5) <input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)			No llenar <input type="checkbox"/>	8. Una taza de yogurt Natural (1): Sabor (2): <input type="checkbox"/> Nunca (1) <input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6) <input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2) <input type="checkbox"/> 1 vez al día (7) <input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3) <input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8) <input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4) <input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9) <input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5) <input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	
3. Un vaso de leche con chocolate en polvo <input type="checkbox"/> Nunca (1) <input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6) <input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2) <input type="checkbox"/> 1 vez al día (7) <input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3) <input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8) <input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4) <input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9) <input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5) <input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		No llenar <input type="checkbox"/>		9. Un Danonino o petizoo <input type="checkbox"/> Nunca (1) <input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6) <input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2) <input type="checkbox"/> 1 vez al día (7) <input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3) <input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8) <input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4) <input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9) <input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5) <input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	
4. Una rebanada de Queso Oaxaca <input type="checkbox"/> Nunca (1) <input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6) <input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2) <input type="checkbox"/> 1 vez al día (7) <input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3) <input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8) <input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4) <input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9) <input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5) <input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)			No llenar <input type="checkbox"/>	10. Un Yakult o Chamyto O Lalacult u otro <input type="checkbox"/> Nunca (1) <input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6) <input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2) <input type="checkbox"/> 1 vez al día (7) <input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3) <input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8) <input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4) <input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9) <input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5) <input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	
5. Una rebanada de Queso Manchego <input type="checkbox"/> Nunca (1) <input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6) <input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2) <input type="checkbox"/> 1 vez al día (7) <input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3) <input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8) <input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4) <input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9) <input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5) <input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		No llenar <input type="checkbox"/>		11. Un Activia Flora o Actimel o Svelty Gastro Protect <input type="checkbox"/> Nunca (1) <input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6) <input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2) <input type="checkbox"/> 1 vez al día (7) <input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3) <input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8) <input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4) <input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9) <input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5) <input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	
6. Una cda. de Queso crema (Philadelphia) <input type="checkbox"/> Nunca (1) <input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6) <input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2) <input type="checkbox"/> 1 vez al día (7) <input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3) <input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8) <input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4) <input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9) <input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5) <input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)			No llenar <input type="checkbox"/>	12. Una bola de helado o nieve de leche <input type="checkbox"/> Nunca (1) <input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6) <input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2) <input type="checkbox"/> 1 vez al día (7) <input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3) <input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8) <input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4) <input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9) <input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5) <input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	

SECCIÓN 2.- FRUTAS

13. Un plátano <input type="checkbox"/> Nunca (1) <input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6) <input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2) <input type="checkbox"/> 1 vez al día (7) <input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3) <input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8) <input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4) <input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9) <input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5) <input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		No llenar <input type="checkbox"/>	20. Un durazno o chabacano <input type="checkbox"/> Nunca (1) <input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6) <input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2) <input type="checkbox"/> 1 vez al día (7) <input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3) <input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8) <input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4) <input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9) <input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5) <input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		No llenar <input type="checkbox"/>
14. Una naranja <input type="checkbox"/> Nunca (1) <input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6) <input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2) <input type="checkbox"/> 1 vez al día (7) <input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3) <input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8) <input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4) <input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9) <input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5) <input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)			21. Una manzana <input type="checkbox"/> Nunca (1) <input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6) <input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2) <input type="checkbox"/> 1 vez al día (7) <input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3) <input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8) <input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4) <input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9) <input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5) <input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		
15. Un vaso de jugo de naranja o toronja <input type="checkbox"/> Nunca (1) <input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6) <input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2) <input type="checkbox"/> 1 vez al día (7) <input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3) <input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8) <input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4) <input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9) <input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5) <input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		No llenar <input type="checkbox"/>	22. Una pera <input type="checkbox"/> Nunca (1) <input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6) <input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2) <input type="checkbox"/> 1 vez al día (7) <input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3) <input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8) <input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4) <input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9) <input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5) <input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		No llenar <input type="checkbox"/>
16. Una rebanada de melón <input type="checkbox"/> Nunca (1) <input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6) <input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2) <input type="checkbox"/> 1 vez al día (7) <input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3) <input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8) <input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4) <input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9) <input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5) <input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)			23. Un mango <input type="checkbox"/> Nunca (1) <input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6) <input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2) <input type="checkbox"/> 1 vez al día (7) <input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3) <input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8) <input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4) <input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9) <input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5) <input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		
17. Una rebanada sandía <input type="checkbox"/> Nunca (1) <input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6) <input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2) <input type="checkbox"/> 1 vez al día (7) <input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3) <input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8) <input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4) <input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9) <input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5) <input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		No llenar <input type="checkbox"/>	24. Una mandarina <input type="checkbox"/> Nunca (1) <input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6) <input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2) <input type="checkbox"/> 1 vez al día (7) <input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3) <input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8) <input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4) <input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9) <input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5) <input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		No llenar <input type="checkbox"/>
18. Una rebanada de piña <input type="checkbox"/> Nunca (1) <input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6) <input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2) <input type="checkbox"/> 1 vez al día (7) <input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3) <input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8) <input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4) <input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9) <input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5) <input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)			25. Media taza de fresas <input type="checkbox"/> Nunca (1) <input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6) <input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2) <input type="checkbox"/> 1 vez al día (7) <input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3) <input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8) <input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4) <input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9) <input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5) <input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		
19. Una rebanada de papaya <input type="checkbox"/> Nunca (1) <input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6) <input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2) <input type="checkbox"/> 1 vez al día (7) <input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3) <input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8) <input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4) <input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9) <input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5) <input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		No llenar <input type="checkbox"/>	26. Media taza de uvas <input type="checkbox"/> Nunca (1) <input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6) <input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2) <input type="checkbox"/> 1 vez al día (7) <input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3) <input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8) <input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4) <input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9) <input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5) <input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		No llenar <input type="checkbox"/>
			27. Tres ciruelas <input type="checkbox"/> Nunca (1) <input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6) <input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2) <input type="checkbox"/> 1 vez al día (7) <input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3) <input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8) <input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4) <input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9) <input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5) <input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		
					

SECCIÓN 3.- VERDURAS

28. Un jitomate		No llenar <input type="checkbox"/>	35. Un nopal		No llenar <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)		<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)	
<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)		<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)	
<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)		<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)	
<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)		<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)	
<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		
29. Una papa		No llenar <input type="checkbox"/>	36. Medio aguacate		No llenar <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)		<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)	
<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)		<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)	
<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)		<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)	
<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)		<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)	
<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		
30. Una jícama		No llenar <input type="checkbox"/>	37. Una taza de brócoli		No llenar <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)		<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)	
<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)		<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)	
<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)		<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)	
<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)		<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)	
<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		
31. Un Pepino		No llenar <input type="checkbox"/>	38. Una cda. de salsa picante o chiles con tus alimentos		No llenar <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)		<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)	
<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)		<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)	
<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)		<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)	
<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)		<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)	
<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		
32. Una zanahoria		No llenar <input type="checkbox"/>	39. Chiles de lata		No llenar <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)		<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)	
<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)		<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)	
<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)		<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)	
<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)		<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)	
<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		
33. Una hoja de lechuga		No llenar <input type="checkbox"/>	40. Un Elote		No llenar <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)		<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)	
<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)		<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)	
<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)		<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)	
<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)		<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)	
<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		
34. Una taza de calabacitas o chayotes		No llenar <input type="checkbox"/>			
<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)				
<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)				
<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)				
<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)				
<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)				

SECCIÓN 4.- LEGUMINOSAS

41. Un plato de frijoles		No llenar	43. Un plato de lentejas		No llenar
<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)		<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)	
<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)	<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)		
<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)	<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)		
<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)	<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)		
<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		
42. 1/2 taza de chícharos		No llenar			
<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)				
<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)				
<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)				
<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)				
<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)				



SECCIÓN 5.- HUEVOS, CARNES Y EMBUTIDOS.

44. Un huevo		No llenar	46. Una pieza de pollo		No llenar
<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)		<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)	
<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)	<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)		
<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)	<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)		
<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)	<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)		
<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		
45. Una rebanada de jamón		No llenar	47. Platillo de carne de res		No llenar
Pavo (1):					
Cerdo (2):		<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)		
<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)	<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)		
<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)	<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)		
<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)	<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)		
<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)	<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		
<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)				

48. Platillo de carne de cerdo		No llenar	53. Un bistec de hígado		No
[] Nunca (1)			Res (1):		
[] Menos de 1 vez al mes (2)			Pollo (2):		
[] 1-3 veces al mes (3)	[] 5-6 veces a la sem. (6)		[] Nunca (1)	[] 5-6 veces a la sem. (6)	
[] 1 vez a la semana (4)	[] 1 vez al día (7)		[] Menos de 1 vez al mes (2)	[] 1 vez al día (7)	
[] 2-4 veces a la sem. (5)	[] 2-3 veces al día (8)	[] 1-3 veces al mes (3)	[] 2-3 veces al día (8)		
49. Media lata de atún en aceite o agua		No llenar	[] 1 vez a la semana (4)	[] 4-5 veces al día (9)	No
[] Nunca (1)			[] 2-4 veces a la sem. (5)	[] 6 ó + veces al día (10)	
[] Menos de 1 vez al mes (2)			54. Una pieza de chorizo o longaniza		
[] 1-3 veces al mes (3)	[] 5-6 veces a la sem. (6)		[] Nunca (1)	[] 5-6 veces a la sem. (6)	
[] 1 vez a la semana (4)	[] 1 vez al día (7)		[] Menos de 1 vez al mes (2)	[] 1 vez al día (7)	
[] 2-4 veces a la sem. (5)	[] 2-3 veces al día (8)	[] 1-3 veces al mes (3)	[] 2-3 veces al día (8)		
50. Un pedazo de chicharrón		No llenar	[] 1 vez a la semana (4)	[] 4-5 veces al día (9)	llenar
[] Nunca (1)			[] 2-4 veces a la sem. (5)	[] 6 ó + veces al día (10)	
[] Menos de 1 vez al mes (2)			55. Un filete de pescado		
[] 1-3 veces al mes (3)	[] 5-6 veces a la sem. (6)		[] Nunca (1)	[] 5-6 veces a la sem. (6)	
[] 1 vez a la semana (4)	[] 1 vez al día (7)		[] Menos de 1 vez al mes (2)	[] 1 vez al día (7)	
[] 2-4 veces a la sem. (5)	[] 2-3 veces al día (8)	[] 1-3 veces al mes (3)	[] 2-3 veces al día (8)		
51. Una salchicha		No llenar	[] 1 vez a la semana (4)	[] 4-5 veces al día (9)	No llenar
Pavo (1):			[] 2-4 veces a la sem. (5)	[] 6 ó + veces al día (10)	
Cerdo (2):			56. Una sardinas enlatada		
[] Nunca (1)	[] 5-6 veces a la sem. (6)		[] Nunca (1)	[] 5-6 veces a la sem. (6)	
[] Menos de 1 vez al mes (2)	[] 1 vez al día (7)		[] Menos de 1 vez al mes (2)	[] 1 vez al día (7)	
[] 1-3 veces al mes (3)	[] 2-3 veces al día (8)	[] 1-3 veces al mes (3)	[] 2-3 veces al día (8)		
[] 1 vez a la semana (4)	[] 4-5 veces al día (9)	[] 1 vez a la semana (4)	[] 4-5 veces al día (9)		
[] 2-4 veces a la sem. (5)	[] 6 ó + veces al día (10)	[] 2-4 veces a la sem. (5)	[] 6 ó + veces al día (10)		
52. Una rebanas de tocino		No llenar			No llenar
[] Nunca (1)					
[] Menos de 1 vez al mes (2)					
[] 1-3 veces al mes (3)	[] 5-6 veces a la sem. (6)				
[] 1 vez a la semana (4)	[] 1 vez al día (7)				
[] 2-4 veces a la sem. (5)	[] 2-3 veces al día (8)				
		[] 4-5 veces al día (9)			
		[] 6 ó + veces al día (10)			



SECCIÓN 6.- PLATILLOS TÍPICOS



57. Un Taco de Carnitas		No llenar <input type="checkbox"/>	64. Un hot dog		No llenar <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)		<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)	
<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)		<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)	
<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)		<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)	
<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)		<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)	
<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		
58. Un Taco de Barbacoa		No llenar <input type="checkbox"/>	65. Un sandwich		No llenar <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)		<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)	
<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)		<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)	
<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)		<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)	
<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)		<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)	
<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		
59. Un taco al pastor		No llenar <input type="checkbox"/>	66. Una torta		No llenar <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)		<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)	
<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)		<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)	
<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)		<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)	
<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)		<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)	
<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		
60. Un sope, quesadilla o gordita asada		No llenar <input type="checkbox"/>	67. Una rebanada de pizza		No llenar <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)		<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)	
<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)		<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)	
<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)		<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)	
<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)		<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)	
<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		
61. Un sope, quesadilla o gordita frita		No llenar <input type="checkbox"/>	68. Nuggets (3 piezas)		No llenar <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)		<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)	
<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)		<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)	
<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)		<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)	
<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)		<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)	
<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		
62. Un plato mediano de papas a la francesa		No llenar <input type="checkbox"/>	69. Un tamal		No llenar <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)		<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)	
<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)		<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)	
<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)		<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)	
<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)		<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)	
<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		
63. Una hamburguesa mediana		No llenar <input type="checkbox"/>	70. Un plato de pozole		No llenar <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)		<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)	
<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)		<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)	
<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)		<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)	
<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)		<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)	
<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		

SECCIÓN 7.- CEREALES



71. Una tortilla de maíz (que no sea en taco, ni quesadillas)		No llenar <input type="checkbox"/>	78. Un plato de sopa		No llenar <input type="checkbox"/>
[] Nunca (1) [] Menos de 1 vez al mes (2) [] 1-3 veces al mes (3) [] 1 vez a la semana (4) [] 2-4 veces a la sem. (5)	[] 5-6 veces a la sem. (6) [] 1 vez al día (7) [] 2-3 veces al día (8) [] 4-5 veces al día (9) [] 6 ó + veces al día (10)		[] Nunca (1) [] Menos de 1 vez al mes (2) [] 1-3 veces al mes (3) [] 1 vez a la semana (4) [] 2-4 veces a la sem. (5)	[] 5-6 veces a la sem. (6) [] 1 vez al día (7) [] 2-3 veces al día (8) [] 4-5 veces al día (9) [] 6 ó + veces al día (10)	
72. Una tortilla de harina (que no sea en taco ni quesadillas)		No llenar <input type="checkbox"/>	79. Un plato de pasta seca (espagueti)		No llenar <input type="checkbox"/>
[] Nunca (1) [] Menos de 1 vez al mes (2) [] 1-3 veces al mes (3) [] 1 vez a la semana (4) [] 2-4 veces a la sem. (5)	[] 5-6 veces a la sem. (6) [] 1 vez al día (7) [] 2-3 veces al día (8) [] 4-5 veces al día (9) [] 6 ó + veces al día (10)		[] Nunca (1) [] Menos de 1 vez al mes (2) [] 1-3 veces al mes (3) [] 1 vez a la semana (4) [] 2-4 veces a la sem. (5)	[] 5-6 veces a la sem. (6) [] 1 vez al día (7) [] 2-3 veces al día (8) [] 4-5 veces al día (9) [] 6 ó + veces al día (10)	
73. Una rebanada de pan de caja (tipo Pan Blanco Bimbo)		No llenar <input type="checkbox"/>	80. Una taza de avena		No llenar <input type="checkbox"/>
[] Nunca (1) [] Menos de 1 vez al mes (2) [] 1-3 veces al mes (3) [] 1 vez a la semana (4) [] 2-4 veces a la sem. (5)	[] 5-6 veces a la sem. (6) [] 1 vez al día (7) [] 2-3 veces al día (8) [] 4-5 veces al día (9) [] 6 ó + veces al día (10)		[] Nunca (1) [] Menos de 1 vez al mes (2) [] 1-3 veces al mes (3) [] 1 vez a la semana (4) [] 2-4 veces a la sem. (5)	[] 5-6 veces a la sem. (6) [] 1 vez al día (7) [] 2-3 veces al día (8) [] 4-5 veces al día (9) [] 6 ó + veces al día (10)	
74. Una rebanada de pan de caja integral (tipo Bimbo Integral)		No llenar <input type="checkbox"/>	81. Un plato de cereal sin azúcar (corn- flakes, cheerios, etc.)		No llenar <input type="checkbox"/>
[] Nunca (1) [] Menos de 1 vez al mes (2) [] 1-3 veces al mes (3) [] 1 vez a la semana (4) [] 2-4 veces a la sem. (5)	[] 5-6 veces a la sem. (6) [] 1 vez al día (7) [] 2-3 veces al día (8) [] 4-5 veces al día (9) [] 6 ó + veces al día (10)		[] Nunca (1) [] Menos de 1 vez al mes (2) [] 1-3 veces al mes (3) [] 1 vez a la semana (4) [] 2-4 veces a la sem. (5)	[] 5-6 veces a la sem. (6) [] 1 vez al día (7) [] 2-3 veces al día (8) [] 4-5 veces al día (9) [] 6 ó + veces al día (10)	
75. Un bolillo o telera (que no sea torta)		No llenar <input type="checkbox"/>	82. Un plato de cereal dulce (zucaritas)		No llenar <input type="checkbox"/>
[] Nunca (1) [] Menos de 1 vez al mes (2) [] 1-3 veces al mes (3) [] 1 vez a la semana (4) [] 2-4 veces a la sem. (5)	[] 5-6 veces a la sem. (6) [] 1 vez al día (7) [] 2-3 veces al día (8) [] 4-5 veces al día (9) [] 6 ó + veces al día (10)		[] Nunca (1) [] Menos de 1 vez al mes (2) [] 1-3 veces al mes (3) [] 1 vez a la semana (4) [] 2-4 veces a la sem. (5)	[] 5-6 veces a la sem. (6) [] 1 vez al día (7) [] 2-3 veces al día (8) [] 4-5 veces al día (9) [] 6 ó + veces al día (10)	
76. Una pieza de pan dulce (concha, dona)		No llenar <input type="checkbox"/>	83. Un plato de Cereal con fibra (All Bran, granola, etc.)		No llenar <input type="checkbox"/>
[] Nunca (1) [] Menos de 1 vez al mes (2) [] 1-3 veces al mes (3) [] 1 vez a la semana (4) [] 2-4 veces a la sem. (5)	[] 5-6 veces a la sem. (6) [] 1 vez al día (7) [] 2-3 veces al día (8) [] 4-5 veces al día (9) [] 6 ó + veces al día (10)		[] Nunca (1) [] Menos de 1 vez al mes (2) [] 1-3 veces al mes (3) [] 1 vez a la semana (4) [] 2-4 veces a la sem. (5)	[] 5-6 veces a la sem. (6) [] 1 vez al día (7) [] 2-3 veces al día (8) [] 4-5 veces al día (9) [] 6 ó + veces al día (10)	
77. Un plato de arroz		No llenar <input type="checkbox"/>	84. Una pieza de hot cake o pan francés		No llenar <input type="checkbox"/>
[] Nunca (1) [] Menos de 1 vez al mes (2) [] 1-3 veces al mes (3) [] 1 vez a la semana (4) [] 2-4 veces a la sem. (5)	[] 5-6 veces a la sem. (6) [] 1 vez al día (7) [] 2-3 veces al día (8) [] 4-5 veces al día (9) [] 6 ó + veces al día (10)		[] Nunca (1) [] Menos de 1 vez al mes (2) [] 1-3 veces al mes (3) [] 1 vez a la semana (4) [] 2-4 veces a la sem. (5)	[] 5-6 veces a la sem. (6) [] 1 vez al día (7) [] 2-3 veces al día (8) [] 4-5 veces al día (9) [] 6 ó + veces al día (10)	

85. Un paquet de Galletas Ritz u otras saladas		No llenar <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)	
<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)	
<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)	
<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)	
<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	



SECCIÓN 8.- BEBIDAS

86. Un refresco de cola en lata (Coca-Cola, Pepsi Cola)		No llenar <input type="checkbox"/>	90. Un vaso de agua de sabor azucarada hecha con Tang, Kool-aid, etc		No llenar <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)		<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)	
<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)		<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)	
<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)		<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)	
<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)		<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)	
<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	
87. Un refresco de sabor en lata (que no sea Coca o Pepsi)		No llenar <input type="checkbox"/>	91. Un vaso de malteada		No llenar <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)		<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)	
<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)		<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)	
<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)		<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)	
<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)		<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)	
<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	
88. Un vaso de agua Simple o natural		No llenar <input type="checkbox"/>	92. Un jugos industrializados (Boing, Frutsi, etc)		No llenar <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)		<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)	
<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)		<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)	
<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)		<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)	
<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)		<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)	
<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	
89. Un vaso de Agua frutas naturales (agua de naranja)		No llenar <input type="checkbox"/>	93. Una botella de bebida hidratante (Gatorade, Powerade, Enerplex)		No llenar <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)		<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)	
<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)		<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)	
<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)		<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)	
<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)		<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)	
<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	



sección 9.- GOLOSINAS Y POSTRES

94. Una rebanada de pastel		No llenar	99. Un pastelito con relleno cremoso (Gansito, Submarinos, Pingüinos, etc.)		No llenar
[] Nunca (1)	[] 5-6 veces a la sem. (6)		[] Nunca (1)	[] 5-6 veces a la sem. (6)	
[] Menos de 1 vez al mes (2)	[] 1 vez al día (7)	<input type="checkbox"/>	[] Menos de 1 vez al mes (2)	[] 1 vez al día (7)	<input type="checkbox"/>
[] 1-3 veces al mes (3)	[] 2-3 veces al día (8)		[] 1-3 veces al mes (3)	[] 2-3 veces al día (8)	
[] 1 vez a la semana (4)	[] 4-5 veces al día (9)	<input type="checkbox"/>	[] 1 vez a la semana (4)	[] 4-5 veces al día (9)	<input type="checkbox"/>
[] 2-4 veces a la sem. (5)	[] 6 ó + veces al día (10)		[] 2-4 veces a la sem. (5)	[] 6 ó + veces al día (10)	
95. Una cda. ate, miel, mermelada, cajeta o leche condensada		No llenar	100. Un paquete de Galletas (Lors, Chokis, Barritas, Canelitas, ect.)		No llenar
[] Nunca (1)	[] 5-6 veces a la sem. (6)		[] Nunca (1)	[] 5-6 veces a la sem. (6)	
[] Menos de 1 vez al mes (2)	[] 1 vez al día (7)	<input type="checkbox"/>	[] Menos de 1 vez al mes (2)	[] 1 vez al día (7)	<input type="checkbox"/>
[] 1-3 veces al mes (3)	[] 2-3 veces al día (8)		[] 1-3 veces al mes (3)	[] 2-3 veces al día (8)	
[] 1 vez a la semana (4)	[] 4-5 veces al día (9)	<input type="checkbox"/>	[] 1 vez a la semana (4)	[] 4-5 veces al día (9)	<input type="checkbox"/>
[] 2-4 veces a la sem. (5)	[] 6 ó + veces al día (10)		[] 2-4 veces a la sem. (5)	[] 6 ó + veces al día (10)	
96. Una barra de chocolate (Carlos V, Hershey, Tin Larín, etc)		No llenar	101. Un paquete de Palomitas de maíz		No llenar
[] Nunca (1)	[] 5-6 veces a la sem. (6)		[] Nunca (1)	[] 5-6 veces a la sem. (6)	
[] Menos de 1 vez al mes (2)	[] 1 vez al día (7)	<input type="checkbox"/>	[] Menos de 1 vez al mes (2)	[] 1 vez al día (7)	<input type="checkbox"/>
[] 1-3 veces al mes (3)	[] 2-3 veces al día (8)		[] 1-3 veces al mes (3)	[] 2-3 veces al día (8)	
[] 1 vez a la semana (4)	[] 4-5 veces al día (9)	<input type="checkbox"/>	[] 1 vez a la semana (4)	[] 4-5 veces al día (9)	<input type="checkbox"/>
[] 2-4 veces a la sem. (5)	[] 6 ó + veces al día (10)		[] 2-4 veces a la sem. (5)	[] 6 ó + veces al día (10)	
97. Una bolsa chica cacahuates (salados, japoneses o enchilados)		No llenar	102. Un dulce chico de chamoy, Lucas acidito o paleta enchilada		No llenar
[] Nunca (1)	[] 5-6 veces a la sem. (6)		[] Nunca (1)	[] 5-6 veces a la sem. (6)	
[] Menos de 1 vez al mes (2)	[] 1 vez al día (7)	<input type="checkbox"/>	[] Menos de 1 vez al mes (2)	[] 1 vez al día (7)	<input type="checkbox"/>
[] 1-3 veces al mes (3)	[] 2-3 veces al día (8)		[] 1-3 veces al mes (3)	[] 2-3 veces al día (8)	
[] 1 vez a la semana (4)	[] 4-5 veces al día (9)	<input type="checkbox"/>	[] 1 vez a la semana (4)	[] 4-5 veces al día (9)	<input type="checkbox"/>
[] 2-4 veces a la sem. (5)	[] 6 ó + veces al día (10)		[] 2-4 veces a la sem. (5)	[] 6 ó + veces al día (10)	
98. Una bolsa chica de frituras (de la calle, sabritas, doritos, fritos, cheetos, sabritones, etc.)		No llenar	103. Una Barra de cereal		No llenar
[] Nunca (1)	[] 5-6 veces a la sem. (6)		Azúcar (1):		
[] Menos de 1 vez al mes (2)	[] 1 vez al día (7)	<input type="checkbox"/>	Sin azúcar (2):		
[] 1-3 veces al mes (3)	[] 2-3 veces al día (8)		[] Nunca (1)	[] 5-6 veces a la sem. (6)	
[] 1 vez a la semana (4)	[] 4-5 veces al día (9)	<input type="checkbox"/>	[] Menos de 1 vez al mes (2)	[] 1 vez al día (7)	
[] 2-4 veces a la sem. (5)	[] 6 ó + veces al día (10)		[] 1-3 veces al mes (3)	[] 2-3 veces al día (8)	
			[] 1 vez a la semana (4)	[] 4-5 veces al día (9)	
			[] 2-4 veces a la sem. (5)	[] 6 ó + veces al día (10)	



SECCIÓN 10. - GRASAS

104. Una cucharadita de mantequilla o margarina (añadida a tus alimentos)		No llenar <input type="checkbox"/>	106. Una cucharada de mayonesa (añadida a tus alimentos)		No llenar <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)		<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)	
<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)	<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)		
<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)	<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)		
<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)	<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)		
<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		
105. Una cucharada de aderezo para ensalada (añadida a tus alimentos)		No llenar <input type="checkbox"/>			
<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)				
<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)				
<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)				
<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)				
<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)				

SECCIÓN 11. - SUPLEMENTOS

107. ¿Consumes alguna vitamina o suplemento alimenticio?		No llenar <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)	
<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)	
<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)	
<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)	
<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	

Apéndice 7. Cuestionario de actividad física.



PROYECTO: GENÉTICA DE LA OBESIDAD EN LA INFANCIA Y LA ADOLESCENCIA

Apartado III. Cuestionario de actividad física para escolares

Sección I. Clases de Actividad física en la Escuela.

A continuación te voy a hacer algunas preguntas sobre los juegos, deportes o ejercicios que practicas en la escuela durante la clase de actividad física.

1. En la escuela, ¿te dan clases de actividad física? Si ____ (1) No ____ (2)

Si la respuesta es NO, pase a la Sección II Clases de Actividad Física fuera de la Escuela

2. ¿Cuántos días a la semana tienes clase de educación física en la escuela?

Lunes ____ (1) Martes ____ (2)

Miércoles ____ (3) Jueves ____ (4)

Viernes ____ (5)

3. ¿Cuánto tiempo dura la clase de actividad física?

½ hr ____ (1) 1 hs ____ (2)

2 hs ____ (3) > 2 hs ____ (4)

4. ¿Tienes un maestro que te dirige durante las clases de actividad física en la escuela?

Si ____ (1) No ____ (2)

5. ¿Qué tipo de ejercicios realizan durante la clase de actividad física?

No llenar

||_|

||_|

||_|

||_|

||_|

Sección II. Clases de Actividad Física fuera de la Escuela.

A continuación te voy a hacer algunas preguntas sobre las clases de actividad física o ejercicios que practicas durante tu tiempo libre después del horario de escuela.

6. ¿Después de la escuela practicas o tomas clases de algún tipo de ejercicio, juego o deporte?

Si ____ (1)

No ____ (2)

Si la respuesta es NO, pase a la Sección III. Práctica de ejercicio, deporte o juego en el Tiempo libre.

7. ¿A qué edad empezaste a practicar o tomar clase de ejercicio o algún deporte? ____ Años

8. ¿Cuántos tipos de ejercicio tomas a la semana? _____ numero de clases

No llenar

||_|

||_|

||_|

A continuación te voy a preguntar sobre las clases de deportes o actividad física que tomas después del horario de la escuela, trata de recordar, cuánto tiempo en promedio dura la clase y durante cuántos días a la semana tomas la clase.

Clases	Frecuencia media durante la semana											No Llenar
	Horas/clase					Días de la semana						
	½ (1)	1 (2)	1.5 (3)	2 (4)	> 2 (5)	Lun (1)	Ma (2)	Mi (3)	Ju (4)	Vi (5)	Sa (6)	
9. Natación												_ _ _
10. Artes Marciales (Taekwondo, Kickboxing, Karate)												_ _ _
11. Baile (incluyendo clase de Belly-dance, ballet, hawaiano, Samba)												_ _ _
12. Fútbol soccer												_ _ _
13. Aeróbicos												_ _ _
14. Gimnasia olímpica												_ _ _
15. Atletismo												_ _ _
16. Tenis												_ _ _
17. Otros												_ _ _

especificar

Sección III. Práctica de ejercicio, deporte o juego en el Tiempo libre.
Trata de recordar después de que saliste de la escuela durante tu tiempo libre, que juegos, deportes o ejercicios practicas más frecuentemente durante la semana.

18. ¿Durante tu tiempo libre practicas alguna actividad deportiva o juego al aire libre o en algún centro deportivo? Si ____ (1) No ____ (2)

Si la respuesta es NO, pase a la Sección IV. Sedentarismo

No Llenar

||_|



Instituto Nacional
de Salud Pública



19. ¿Cuánto tiempo en promedio dedicaste en tu tiempo libre durante la semana y/o fin de semana a practicar las siguientes actividades fuera de la escuela en las últimas tres semanas?

Juegos y/o actividades	Frecuencia media durante la semana								Días de la semana				No llenar
	Nunca (1)	Minutos/día		Horas/día					1 (1)	2-3 (2)	4-5 (3)	> 6 (4)	
		5-20 (2)	20-40 (3)	< 1 (4)	1-1.5 (5)	2-3 (6)	4-6 (7)	7-10 (8)					
20. Futbol soccer													_ _ _
21. Basquetbol													_ _ _
22. Voleibol													_ _ _
23. Andar en bicicleta													_ _ _
24. Nadar													_ _ _
25. Patinar o andar en patineta													_ _ _
26. Correr													_ _ _
27. Caminar													_ _ _
28. Andar en bicicleta													_ _ _
29. Brincar la cuerda													_ _ _
30. Juegos como escondidas, encantados, avión, etc.													_ _ _
31. Video juegos (interactivos Wii, Kinect, X-box)													_ _ _
32. Otro													_ _ _

Especificar



Sección IV. Sedentarismo
A continuación te voy a preguntar sobre algunas de las actividades que realizas en tu casa, durante la semana y los fines de semana.

Trata de recordar en un día entre semana y fin de semana, cuantas horas al día en promedio pasas:

Actividades	Frecuencia media durante la semana								Días de la semana				No Llenar
	Nunca (1)	Minutos/día		Horas/día					1 (1)	2-3 (2)	4-5 (3)	> 6 (4)	
		5-20 (2)	20-41 (3)	< 1 (4)	1-1.5 (5)	2-3 (6)	4-6 (7)	7-10 (8)					
33. Sentado viendo TV, películas y/o videos													_ _ _
34. Sentado en la computadora y/o jugando videojuegos (Nintendo, Xbox, Playstation, etc)													_ _ _
35. Sentado leyendo y/o escuchando música													_ _ _
36. Sentado haciendo tareas													_ _ _
37. Transportándote en camión, pesero, coche o metro													_ _ _
38. Durmiendo la siesta													_ _ _
39. Durmiendo por la noche													_ _ _
40. Otro													_ _ _

Especificar

Gracias por tu participación

Apéndice 8. Antropometría y composición corporal.



PROYECTO: GENÉTICA DE LA OBESIDAD EN LA
INFANCIA Y LA ADOLESCENCIA

FOLIO

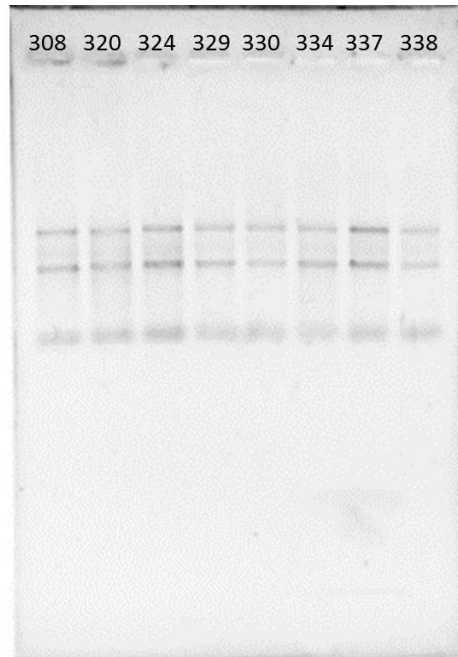
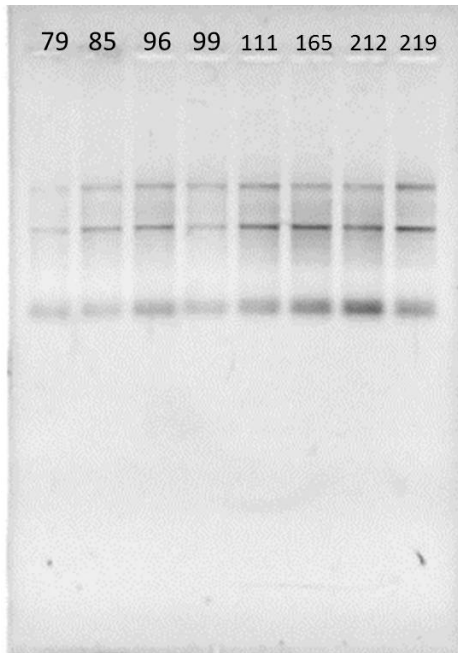
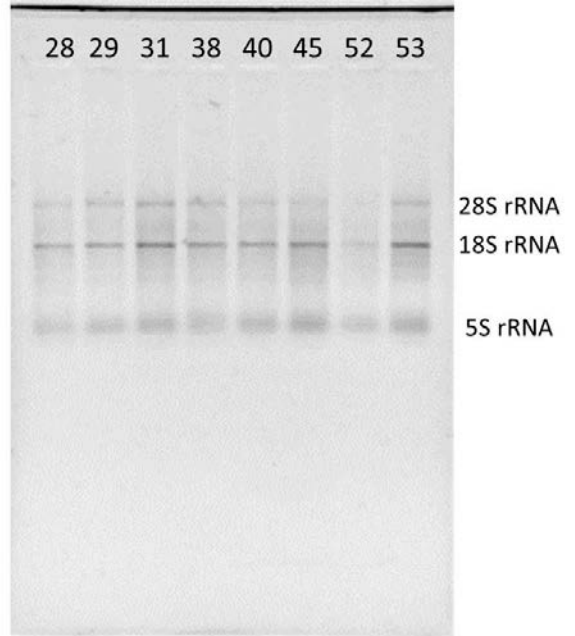
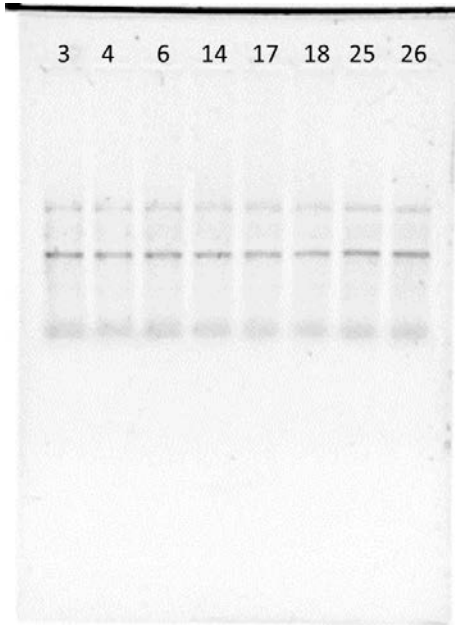
APARTADO IV. ANTROPOMETRÍA Y COMPOSICIÓN CORPORAL

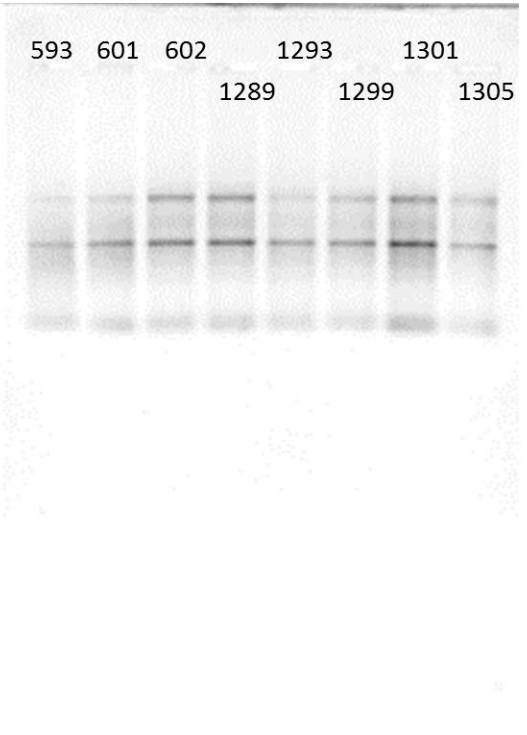
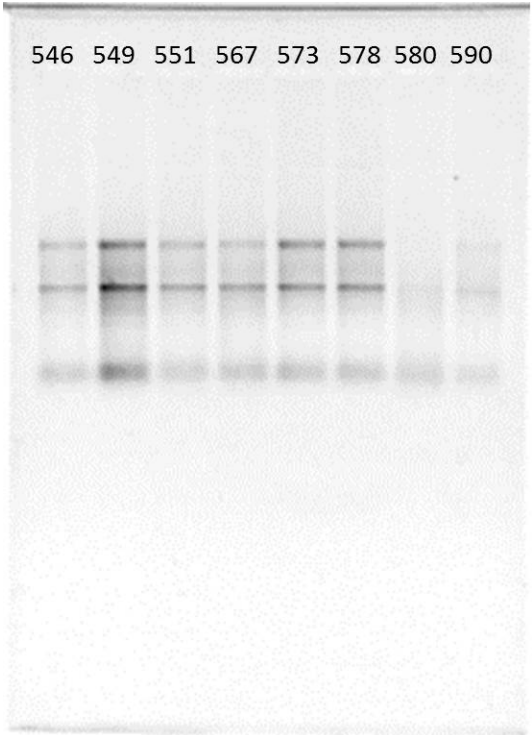
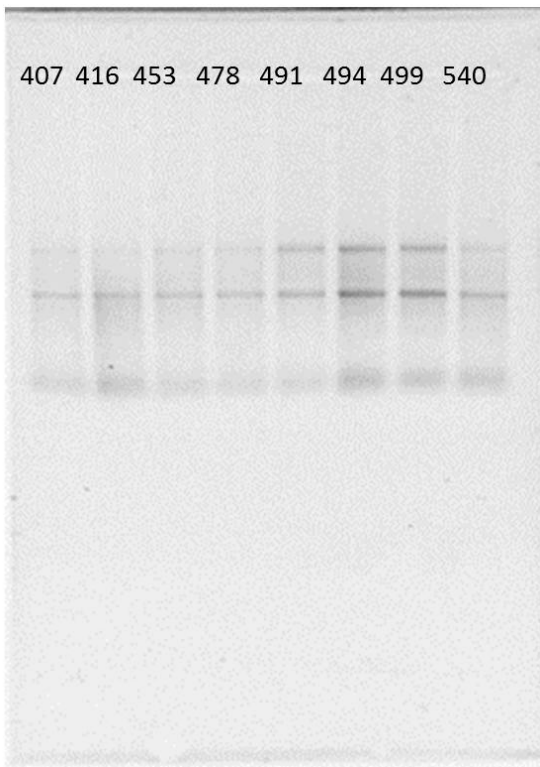
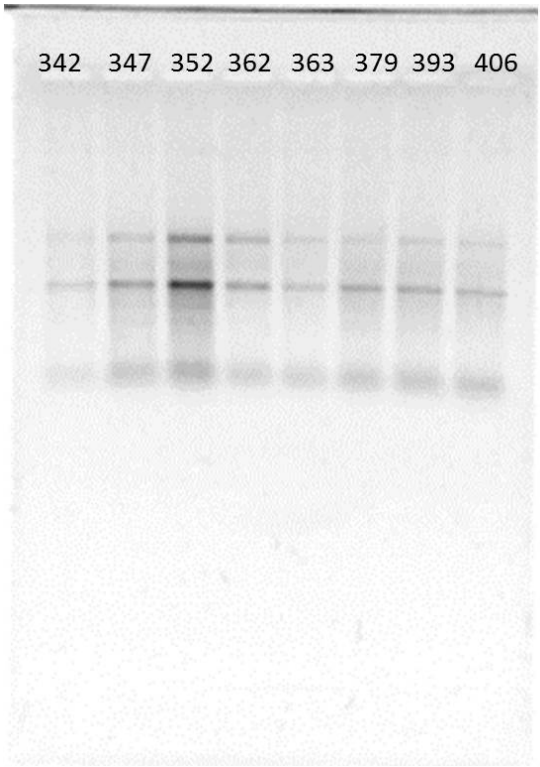
ANTROPOMETRÍA Y COMPOSICIÓN CORPORAL				
INSTRUCCIONES: Responda las preguntas con letra clara o colocando una X en el recuadro correspondiente. No escriba en el área sombreada.				
MEDICIONES FÍSICAS				
1.- Peso (kg) _____	1			<input type="checkbox"/>
2.- Talla (m) _____	2			<input type="checkbox"/>
3.- Circunferencia de cintura (cm) _____	3			<input type="checkbox"/>
4.- Circunferencia de cadera (cm) _____	4			<input type="checkbox"/>
MEDICIÓN POR BIOIMPEDANCIA: PORCENTAJE DE TEJIDO ADIPOSEO				
5. Extremidades superiores _____	5			<input type="checkbox"/>
6. Extremidades inferiores _____	6			<input type="checkbox"/>
7. Tronco _____	7			<input type="checkbox"/>
8 Total _____	8			<input type="checkbox"/>
9. Masa Magra _____	9			<input type="checkbox"/>
PRESIÓN ARTERIAL (mm/Hg). Dejar pasa un minuto entre cada una de las mediciones.				
10. Sistólica (1ra medición) _____	10			<input type="checkbox"/>
11. Diastólica (1a medición) _____	11			<input type="checkbox"/>
12. Sistólica (2a medición) _____	12			<input type="checkbox"/>
13. Diastólica (2a medición) _____	13			<input type="checkbox"/>
MUESTRA				
Se realizó la toma de muestra: Si () No ()				
Color del tubo: () Morado () Rojo () Otro				
Peso al nacer: _____				
Acantosis: Positiva () Negativa ()				

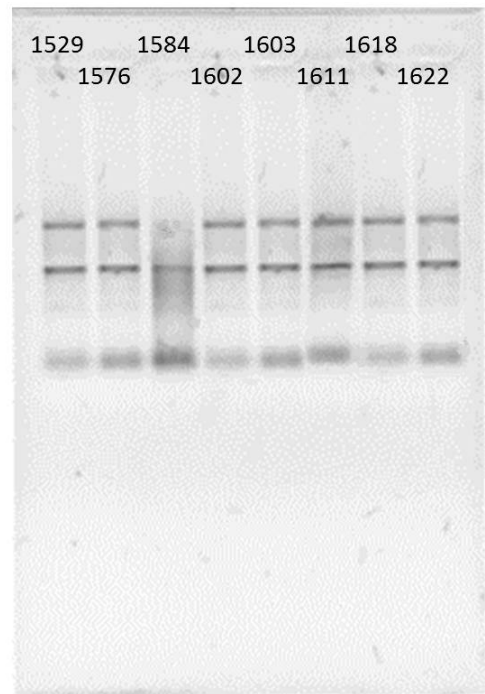
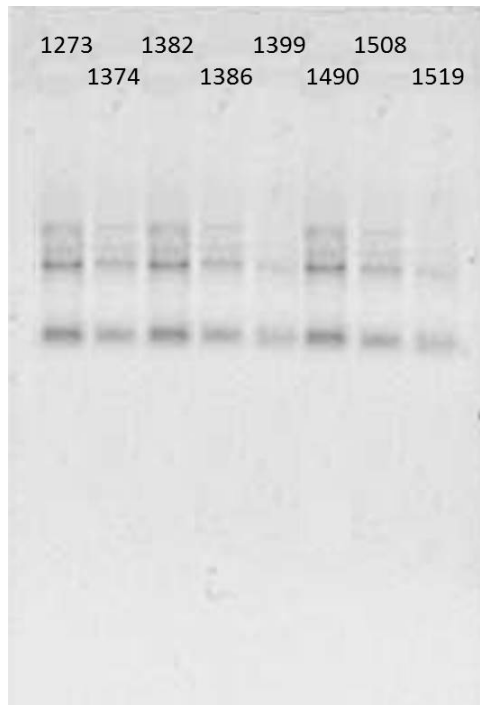
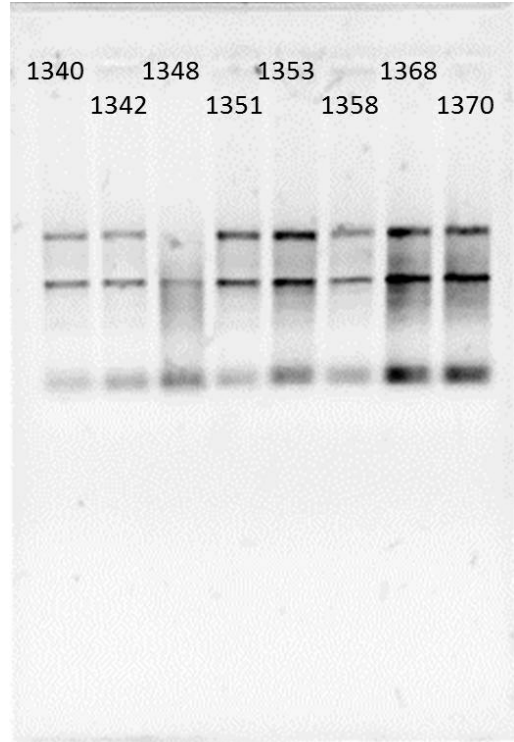
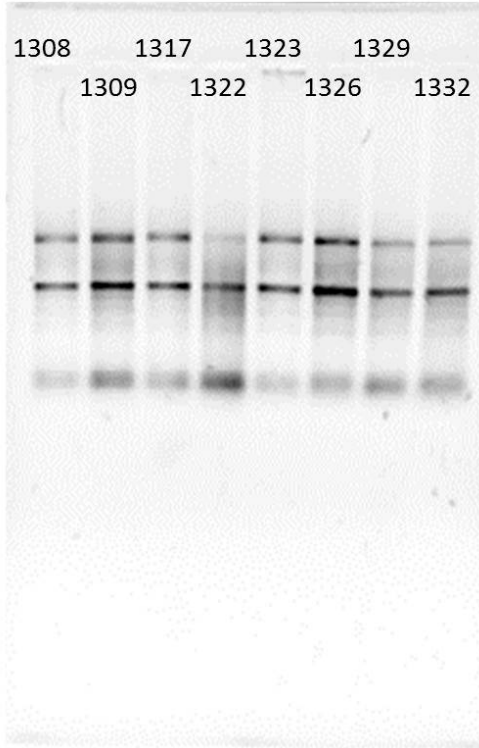
NOMBRE DE QUIÉN REALIZÓ LAS MEDICIONES	
Nombre	Firma

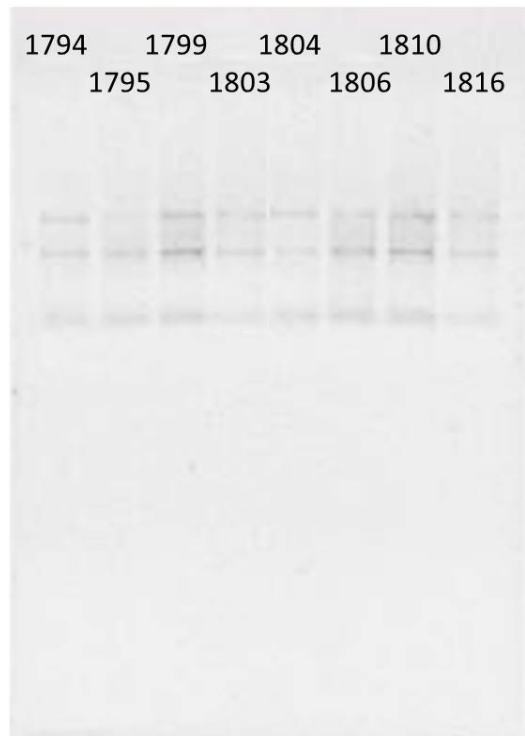
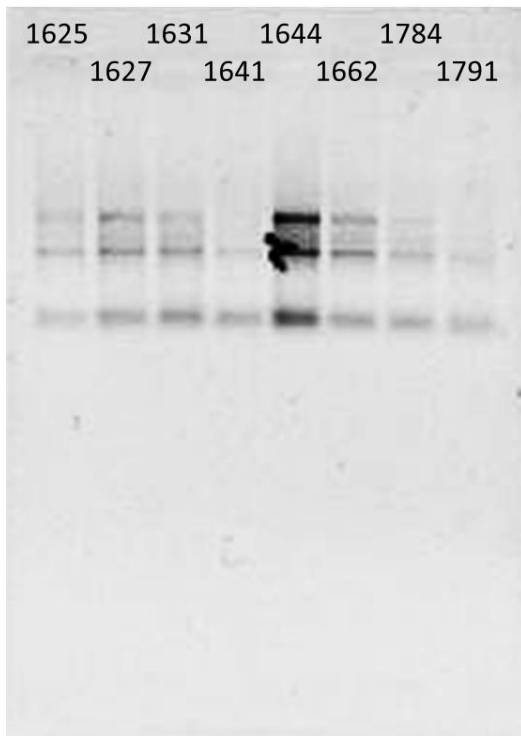
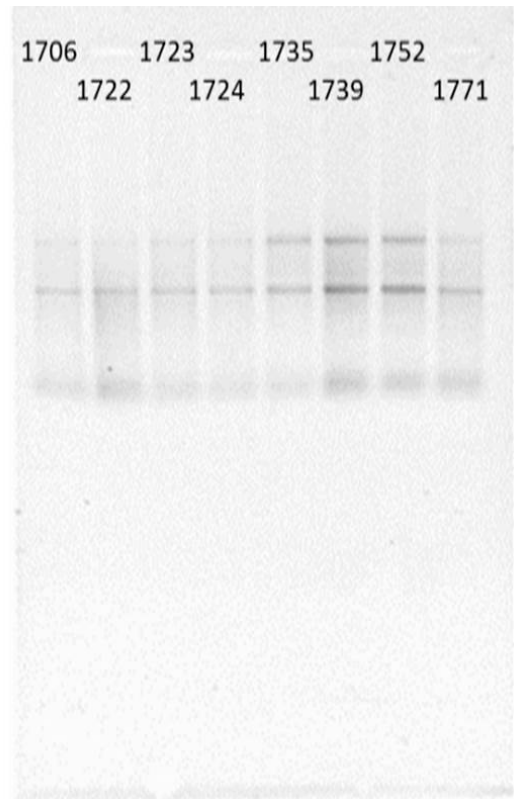
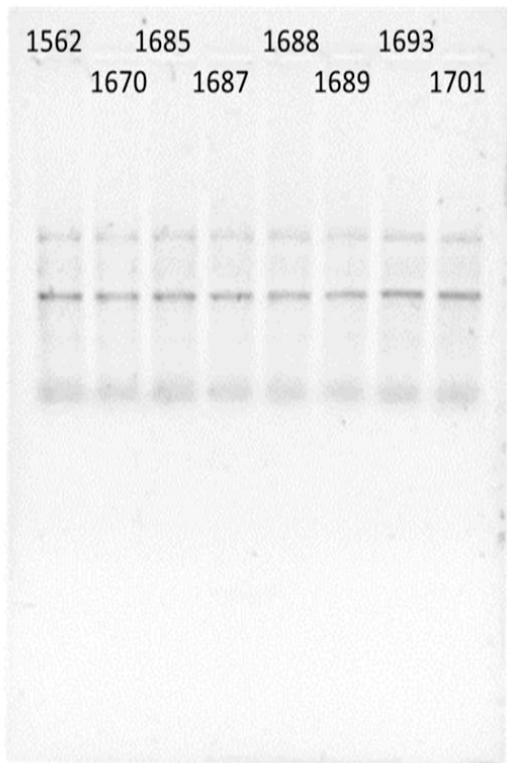
Apéndice 9. Geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

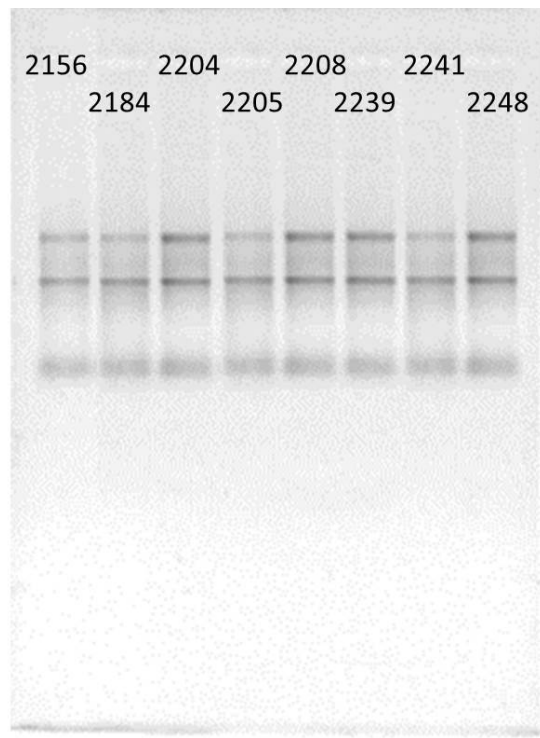
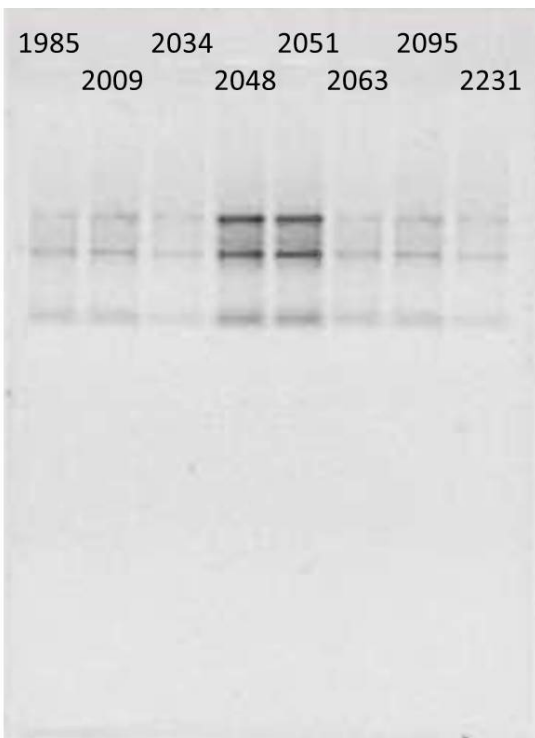
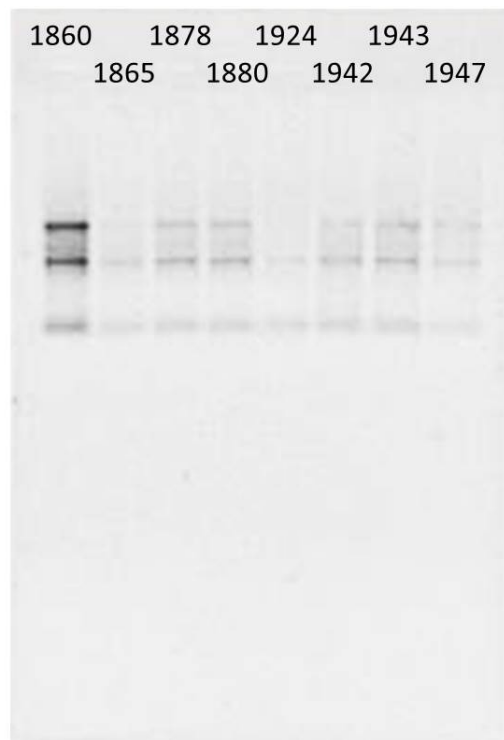
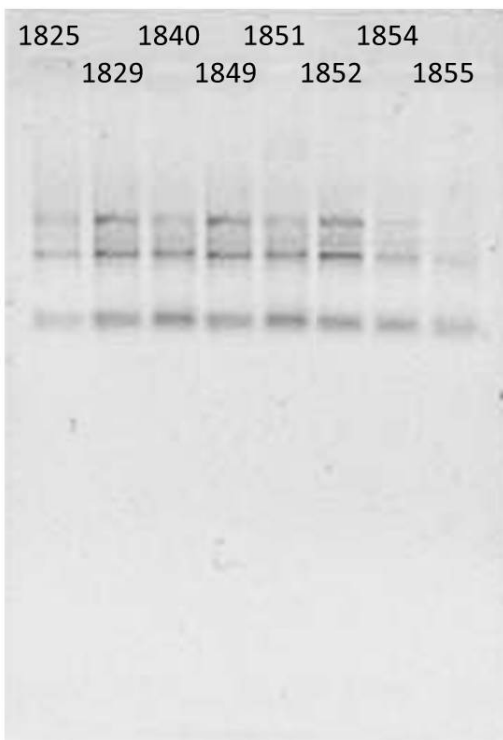
Se muestran los geles de agarosa donde se observa la integridad del RNA. Las corridas se realizaron a 90 volts por 30 minutos. La numeración mostrada indica el número de muestra interno.











Apéndice 10. Cuantificación por espectrofotometría.

La cuantificación se realizó utilizando 2µL de muestra en el equipo Epoch Biotek. La numeración mostrada indica el número de muestra interno.

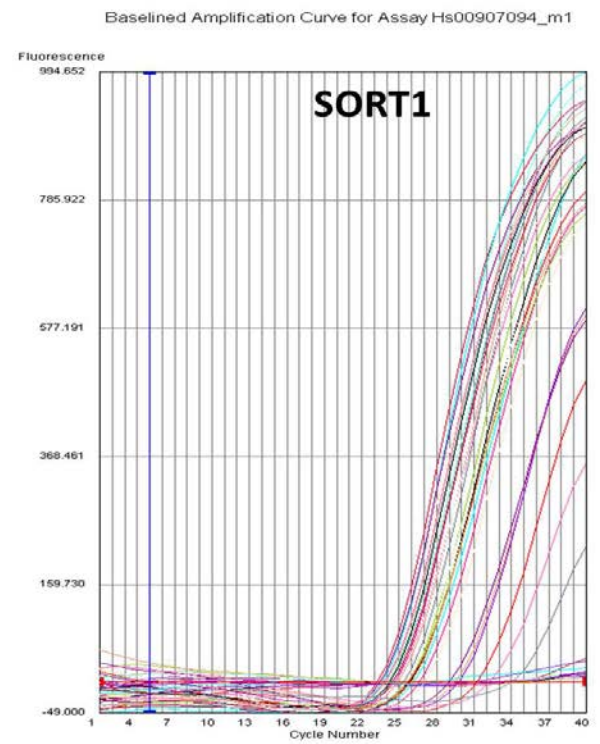
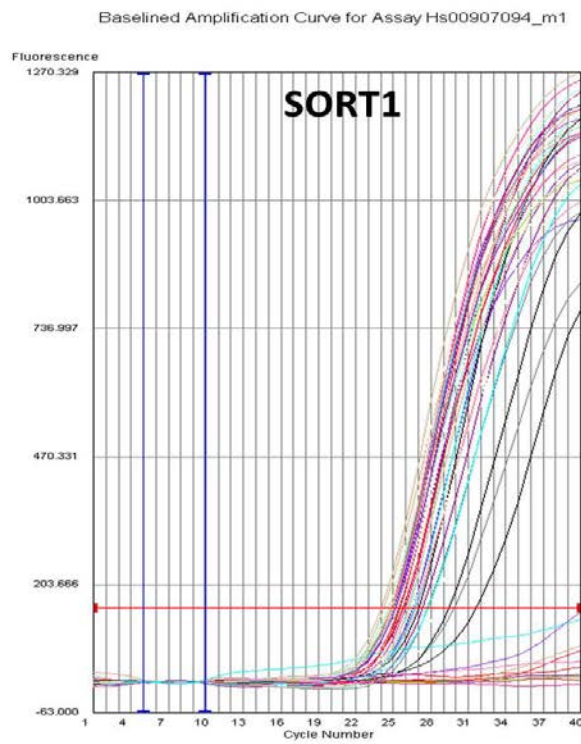
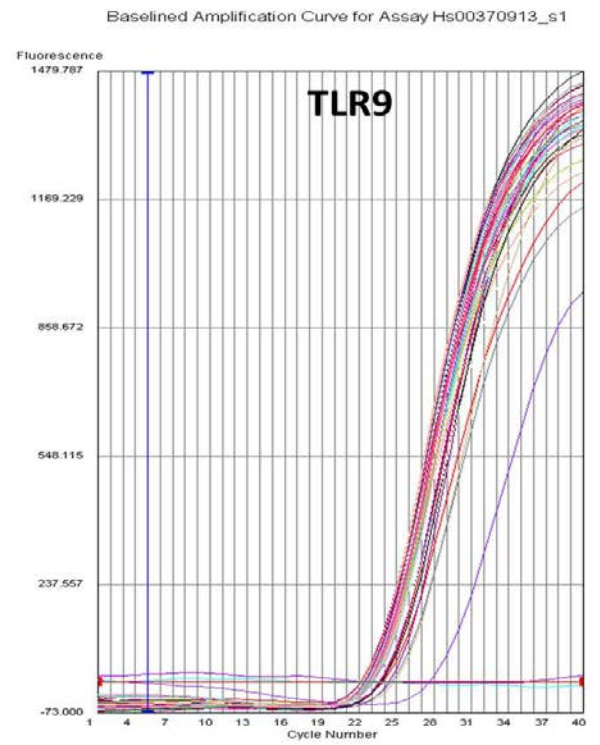
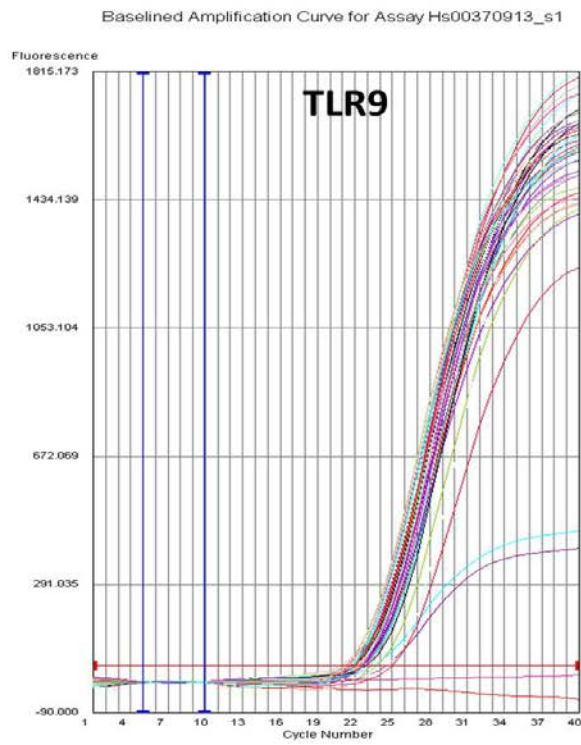
No.	Sample Read#	260	280	260/280	ng/µL
1	3	0.41	0.23	1.751	323.85
2	4	0.17	0.1	1.82	137.6
3	6	0.15	0.08	1.84	122.58
4	14	0.22	0.12	1.791	175.38
5	17	0.28	0.15	1.806	222.69
6	18	0.19	0.11	1.8	150.69
7	25	0.2	0.11	1.739	156.07
8	26	0.27	0.15	1.749	215.59
9	28	0.15	0.08	1.885	121.87
10	29	0.15	0.08	1.859	123.49
11	31	0.16	0.1	1.734	131.56
12	38	0.25	0.14	1.776	196.95
13	40	0.19	0.11	1.728	150.21
14	45	0.21	0.12	1.811	169.46
15	52	0.15	0.07	2.028	118.66
16	54	0.14	0.07	1.957	112.04
17	70	0.17	0.09	2.012	139.44
18	85	0.14	0.07	1.961	115.00
19	96	0.24	0.13	1.799	192.69
20	99	0.14	0.07	1.947	110.25
21	111	0.11	0.05	1.979	86.082
22	165	0.15	0.08	1.895	123.26
23	212	0.14	0.07	1.961	108.67
24	219	0.37	0.2	1.809	293.47
25	308	0.26	0.15	1.765	204.90
26	320	0.2	0.05	1.967	156.03
27	324	0.21	0.06	1.934	169.51
28	329	0.2	0.05	1.934	161.65
29	330	0.21	0.06	1.938	167.26
30	334	0.19	0.1	1.836	149.24
31	337	0.25	0.13	1.864	197.18
32	338	0.28	0.14	1.983	221.75
33	342	0.19	0.04	2.031	148.05
34	347	0.15	0.08	1.956	119.26
35	352	0.18	0.09	1.963	141.36
36	362	0.22	0.12	1.88	176.54
37	363	0.29	0.16	1.83	231.31
38	379	0.17	0.09	1.903	136.71
39	393	0.19	0.1	1.939	150.1
40	406	0.2	0.05	2.086	156.8

No.	Sample Read#	260	280	260/280	ng/µL
41	407	0.18	0.1	1.84	144.67
42	416	0.15	0.08	1.88	116.22
43	453	0.28	0.14	2.01	224.58
44	478	0.21	0.06	1.98	168.79
45	491	0.16	0.08	1.99	126.3
46	494	0.16	0.08	1.94	129.62
47	499	0.18	0.09	1.96	141.27
48	540	0.15	0.08	1.99	118.7
49	546	0.18	0.09	1.95	141.13
50	549	0.21	0.05	1.93	164.08
51	551	0.3	0.18	1.7	241.37
52	567	0.16	0.09	1.82	124.48
53	573	0.14	0.08	1.76	109.14
54	578	0.35	0.2	1.74	277.68
55	580	0.23	0.12	1.85	182.44
56	590	0.15	0.08	1.88	120.84
57	593	0.15	0.08	1.88	122.28
58	601	0.19	0.1	1.82	152.42
59	602	0.34	0.19	1.81	271.2
60	1289	0.21	0.1	2.00	164.1
61	1293	0.16	0.08	1.92	127.04
62	1299	0.19	0.1	1.94	152.39
63	1301	0.15	0.08	1.84	116.77
64	1305	0.19	0.1	1.93	150.8
65	1308	0.15	0.08	1.94	123.59
66	1309	0.17	0.09	1.94	137.7
67	1317	0.21	0.07	1.84	169.01
68	1322	0.26	0.14	1.81	205.43
69	1323	0.37	0.22	1.72	294.85
70	1326	0.35	0.2	1.75	276.34
71	1329	0.13	0.07	1.82	103.12
72	1332	0.23	0.13	1.88	180.05
73	1340	0.13	0.07	1.8	100.99
74	1342	0.18	0.1	1.77	142.81
75	1348	0.22	0.06	1.9	175.24
76	1351	0.38	0.21	1.82	301.32
77	1353	0.41	0.24	1.9	327.75
78	1358	0.55	0.33	1.72	437.89
79	1368	0.17	0.11	1.71	138.29
80	1370	0.15	0.09	1.74	122.54

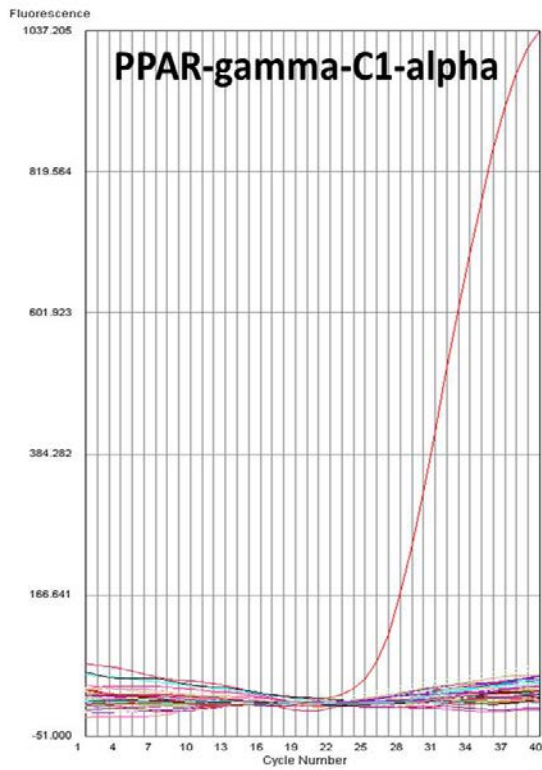
No.	Sample Read#	260	280	260/280	ng/ μ L
81	1373	0.14	0.08	1.856	114.32
82	1374	0.4	0.23	1.726	321.42
83	1382	0.17	0.1	1.738	135.7
84	1396	0.36	0.21	1.914	289.49
85	1399	0.22	0.06	1.816	92.735
86	1490	0.29	0.16	1.768	172.75
87	1508	0.26	0.15	1.73	211.5
88	1519	0.58	0.34	1.709	462.57
89	1529	0.21	0.11	1.868	163.75
90	1562	0.21	0.11	1.932	168.24
91	1576	0.19	0.1	1.855	151.61
92	1584	0.25	0.14	1.833	202.11
93	1602	0.18	0.09	1.952	139.6
94	1603	0.13	0.06	1.999	102.38
95	1611	0.16	0.09	1.913	130.77
96	1618	0.15	0.08	1.972	119.53
97	1622	0.2	0.1	1.994	161.5
98	1625	0.23	0.12	1.913	187.47
99	1627	0.23	0.12	1.877	181.58
100	1631	0.17	0.1	1.772	134.33
101	1641	0.2	0.11	1.779	157.99
102	1644	0.27	0.16	1.752	218.57
103	1662	0.22	0.06	1.953	178.32
104	1670	0.22	0.07	1.776	172.13
105	1685	0.25	0.14	1.751	197.9
106	1687	0.25	0.15	1.678	203.18
107	1688	0.32	0.18	1.78	255.36
108	1689	0.37	0.22	1.733	297.43
109	1693	0.55	0.32	1.712	440.15
110	1701	0.21	0.13	1.67	167.46
111	1706	0.39	0.23	1.721	314.51
112	1722	0.16	0.09	1.734	126.6
113	1723	0.16	0.09	1.762	126.04
114	1724	0.34	0.2	1.675	273.42
115	1735	0.24	0.14	1.701	193.91
116	1739	0.23	0.14	1.677	187.4
117	1752	0.2	0.12	1.7	161.25
118	1771	0.2	0.13	1.636	163.5
119	1784	0.3	0.18	1.622	237.75
120	1791	0.27	0.16	1.7	214.78

No.	Sample Read#	260	280	260/280	ng/ μ L
121	1794	0.19	0.11	1.7	152.93
122	1795	0.2	0.12	1.71	161.19
123	1799	0.21	0.12	1.65	164.49
124	1803	0.25	0.14	1.74	196.98
125	1804	0.22	0.13	1.73	172.96
126	1806	0.28	0.16	1.7	220.66
127	1810	0.55	0.33	1.66	440.3
128	1816	0.17	0.1	1.77	137.85
129	1825	0.35	0.22	1.61	282.3
130	1829	0.41	0.25	1.61	325.67
131	1840	0.22	0.13	1.67	177.99
132	1849	0.34	0.21	1.61	271.15
133	1851	0.22	0.14	1.64	177.68
134	1852	0.35	0.22	1.61	278.91
135	1854	0.22	0.13	1.71	177.16
136	1855	0.26	0.15	1.74	210.69
137	1860	0.2	0.12	1.76	162.56
138	1865	0.29	0.17	1.72	227.9
139	1878	0.58	0.33	1.75	462.74
140	1880	0.31	0.18	1.75	244.00
141	1924	0.21	0.12	1.77	163.75
142	1942	0.18	0.11	1.75	147.6
143	1943	0.23	0.13	1.75	182.43
144	1947	0.19	0.11	1.74	152.25
145	1958	0.25	0.14	1.73	198.34
146	2009	0.26	0.15	1.78	209.6
147	2034	0.35	0.21	1.69	276.92
148	2048	0.23	0.13	1.78	180.58
149	2051	0.18	0.1	1.86	140.57
150	2063	0.28	0.16	1.82	225.31
151	2095	0.42	0.24	1.74	334.51
152	2131	0.17	0.1	1.79	136.03
153	2156	0.23	0.13	1.76	183.4
154	2184	0.27	0.15	1.78	215.91
155	2204	0.2	0.11	1.73	158.04
156	2205	0.35	0.21	1.66	277.59
157	2208	0.26	0.15	1.71	208.76
158	2239	0.31	0.18	1.72	247.6
159	2241	0.25	0.14	1.82	201.14
160	2248	0.27	0.16	1.69	211.8

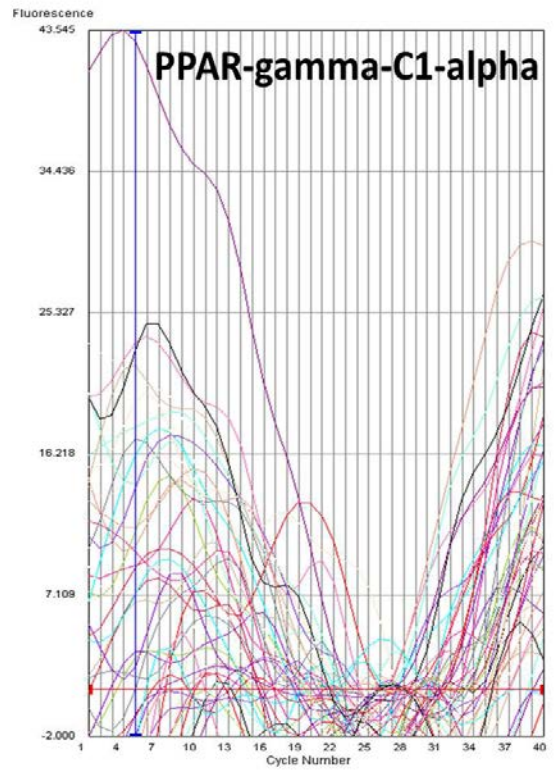
Apéndice 11. Curvas de amplificación obtenidas en el equipo Open Array.



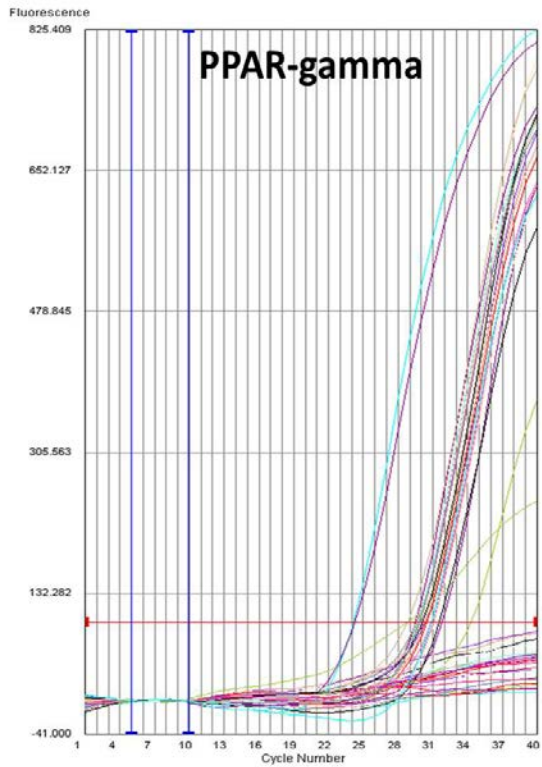
Baselined Amplification Curve for Assays Hs00907094_m1 and Hs010167



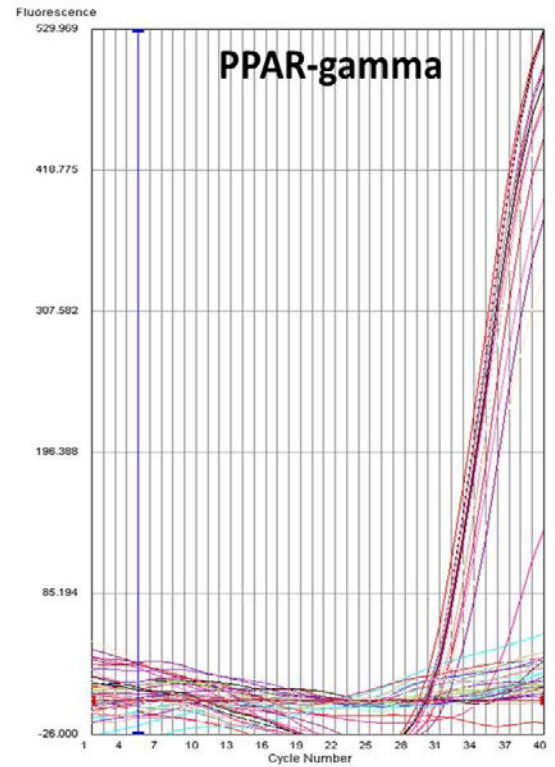
Baselined Amplification Curve for Assay Hs01016722_m1



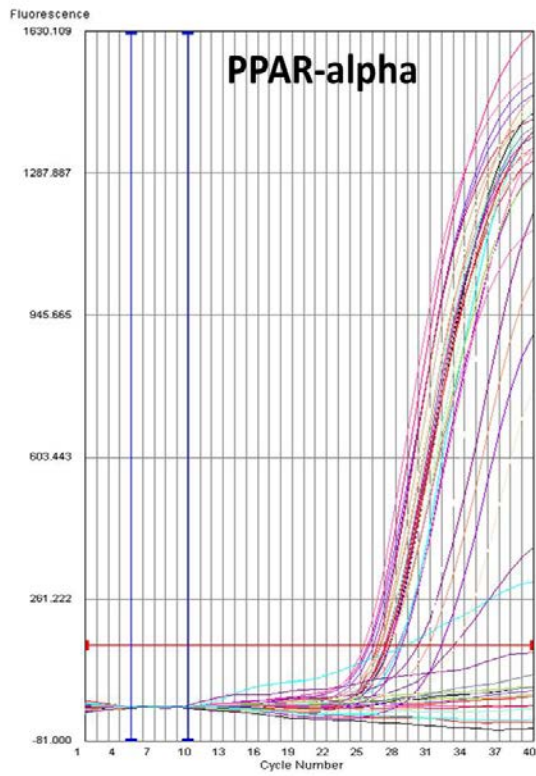
Baselined Amplification Curve for Assay Hs01115513_m1



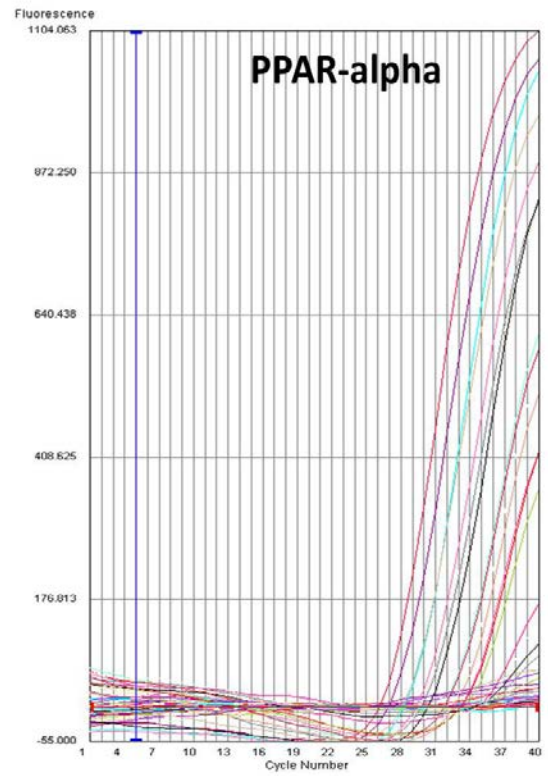
Baselined Amplification Curve for Assay Hs01115513_m1



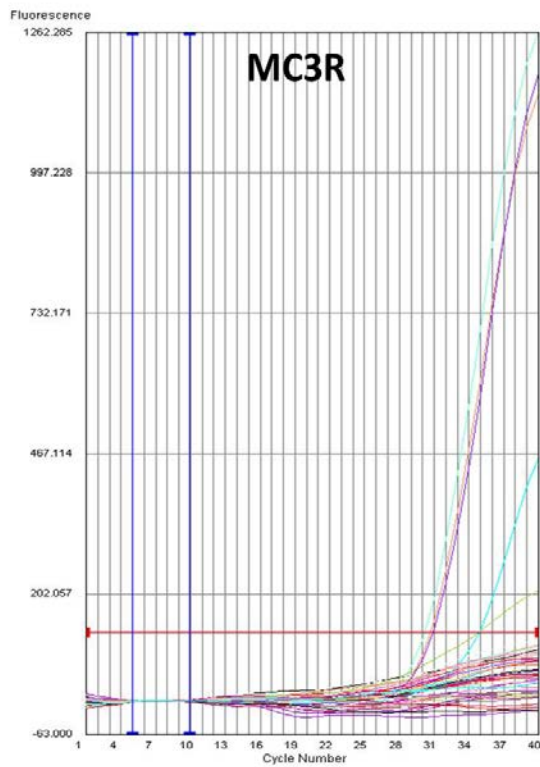
Baselined Amplification Curve for Assay Hs00947539_m1



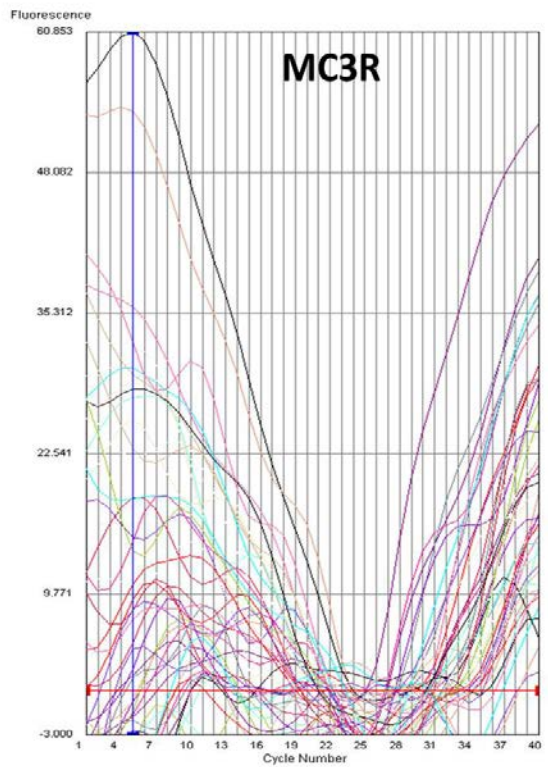
Baselined Amplification Curve for Assay Hs00947539_m1



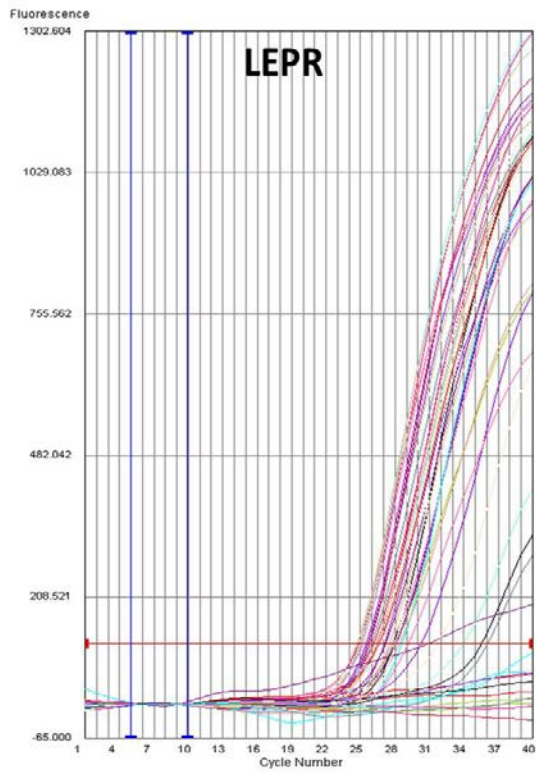
Baselined Amplification Curve for Assay Hs00252036_s1



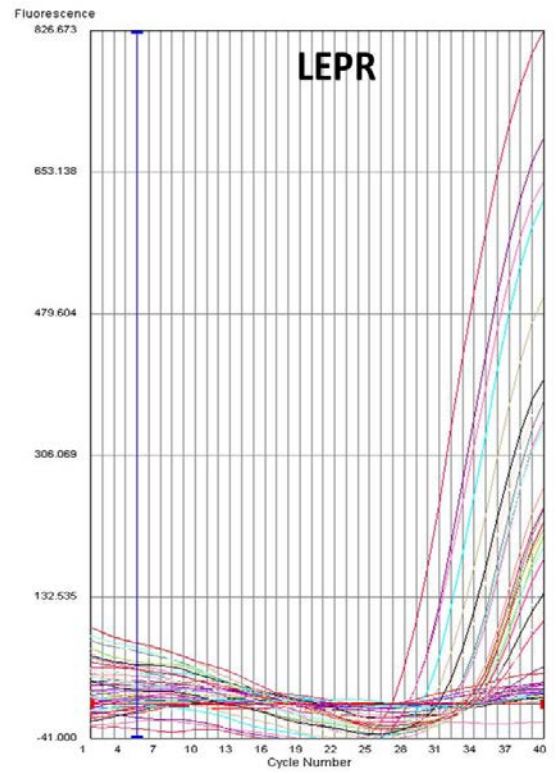
Baselined Amplification Curve for Assay Hs00252036_s1



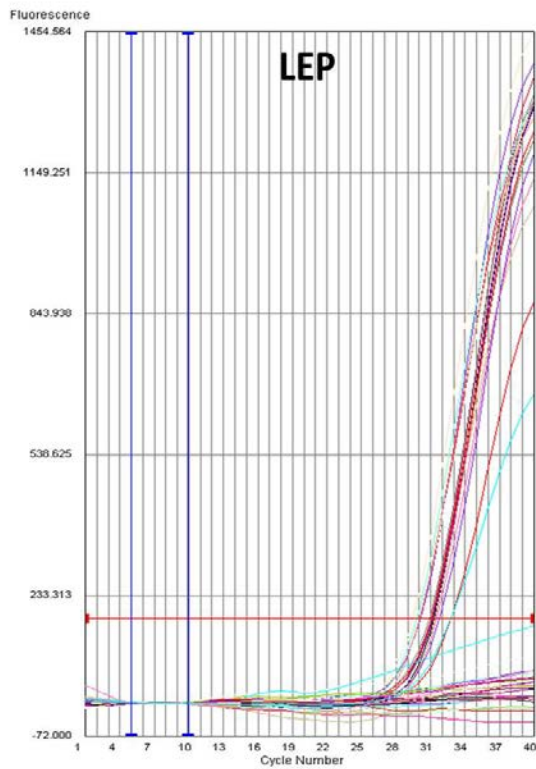
Baselined Amplification Curve for Assay Hs00174497_m1



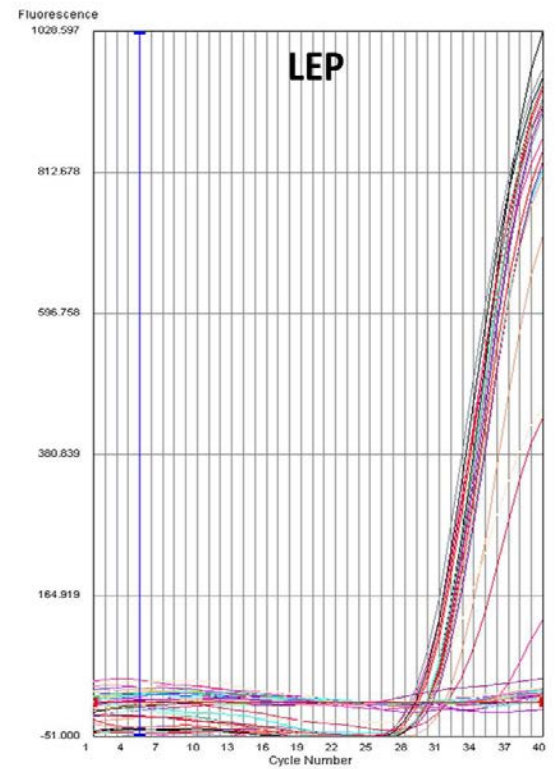
Baselined Amplification Curve for Assay Hs00174497_m1



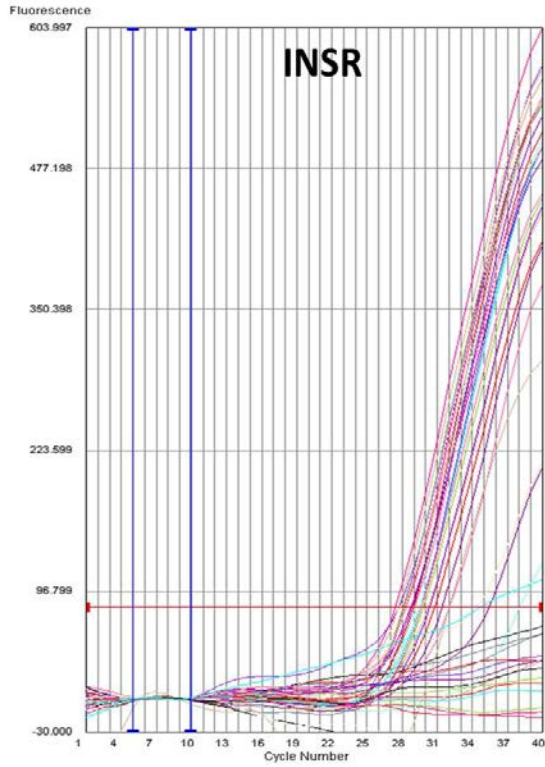
Baselined Amplification Curve for Assay Hs00174877_m1



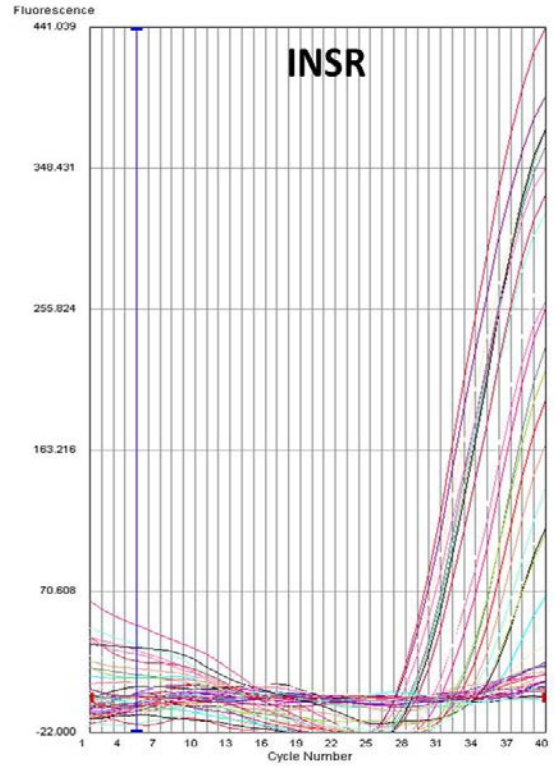
Baselined Amplification Curve for Assay Hs00174877_m1



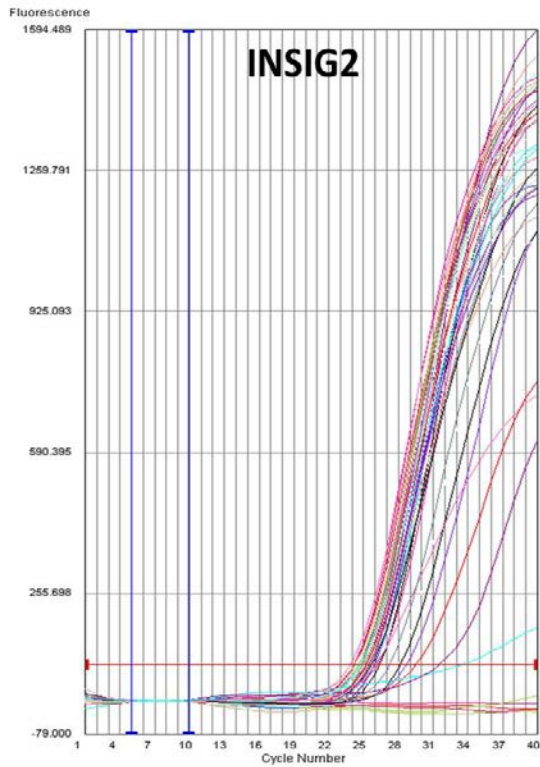
Baselined Amplification Curve for Assay Hs00961550_m1



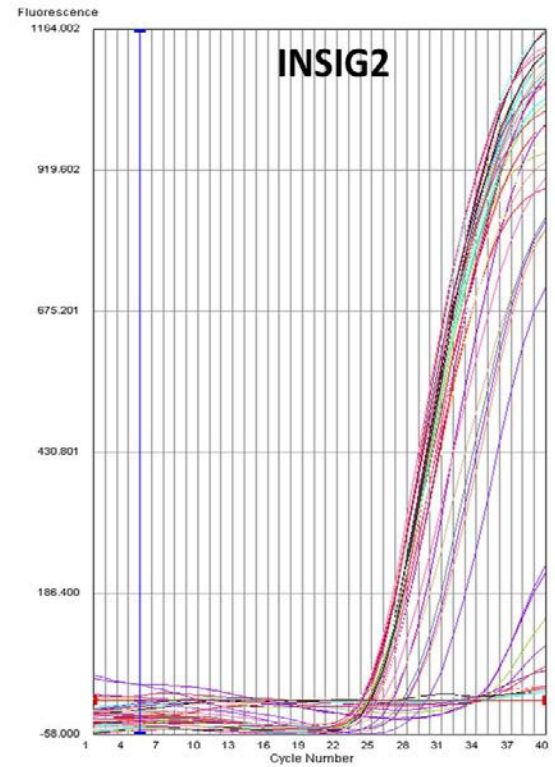
Baselined Amplification Curve for Assay Hs00961550_m1



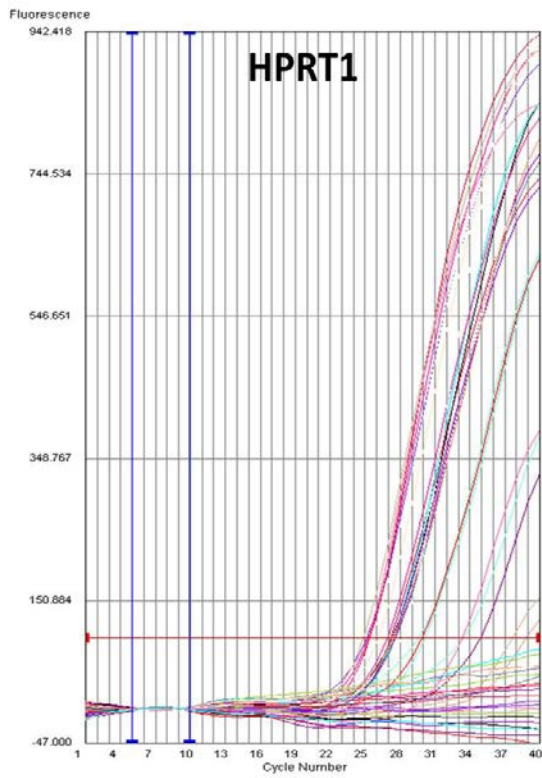
Baselined Amplification Curve for Assay Hs00379223_m1



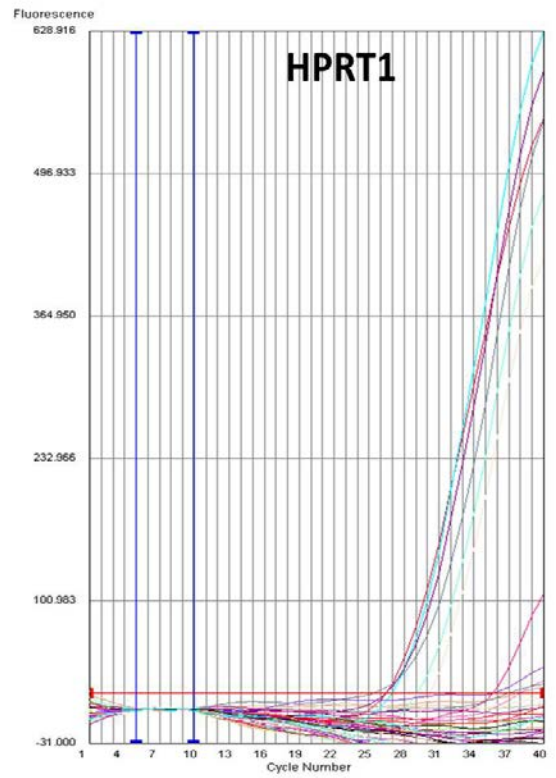
Baselined Amplification Curve for Assay Hs00379223_m1



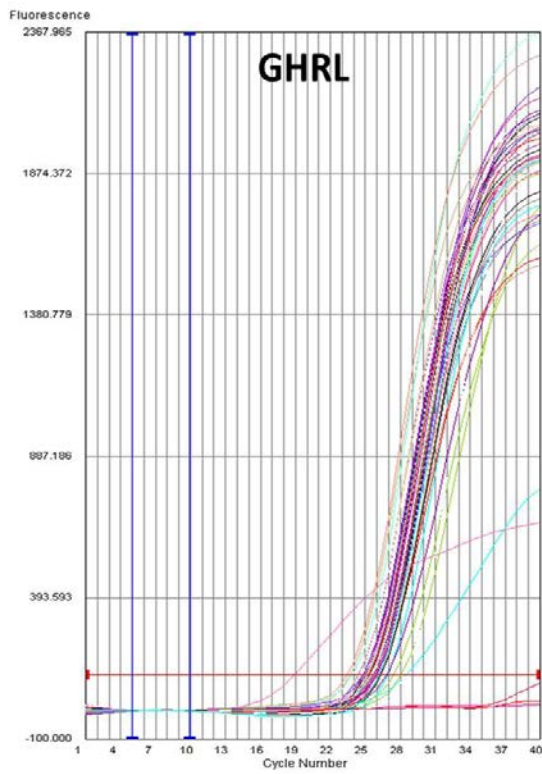
Baselined Amplification Curve for Assay Hs03929098_m1



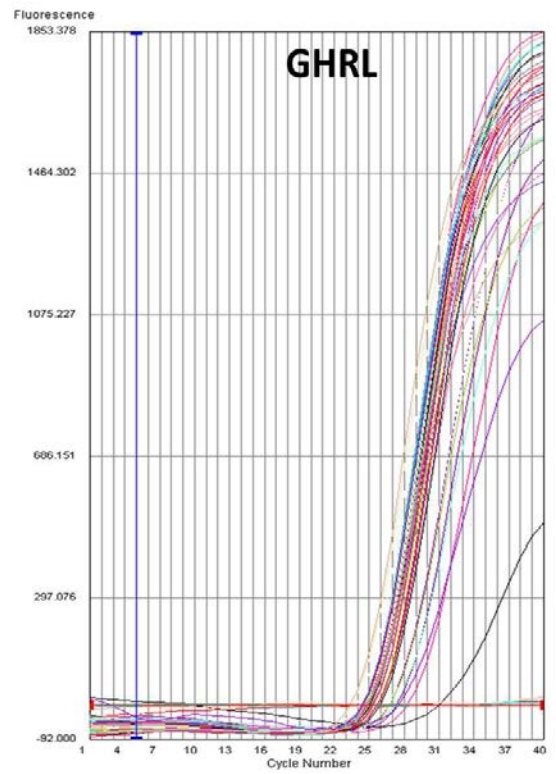
Baselined Amplification Curve for Assay Hs03929098_m1



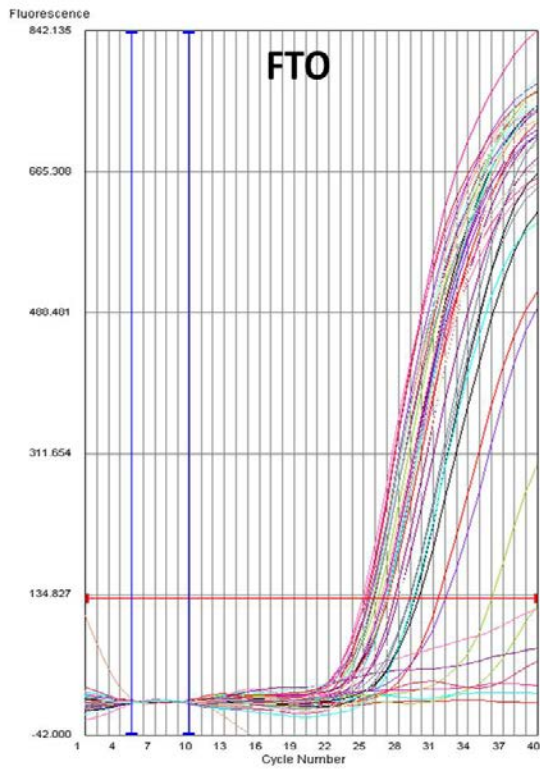
Baselined Amplification Curve for Assay Hs00175082_m1



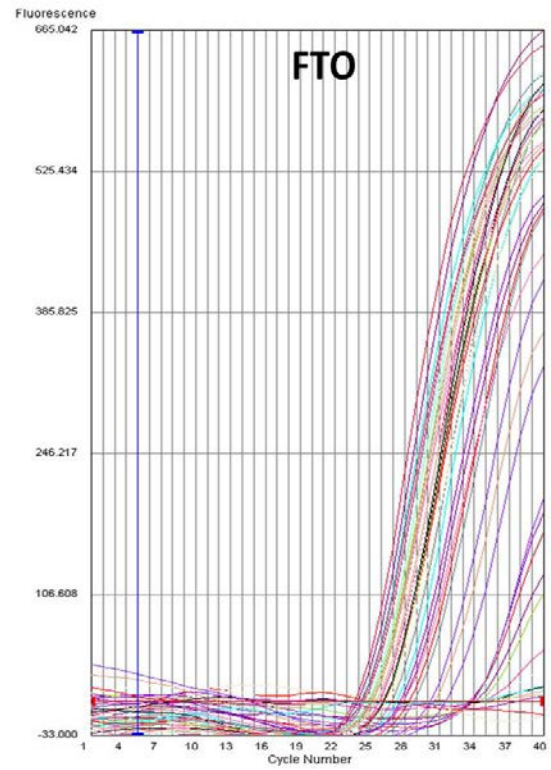
Baselined Amplification Curve for Assay Hs00175082_m1



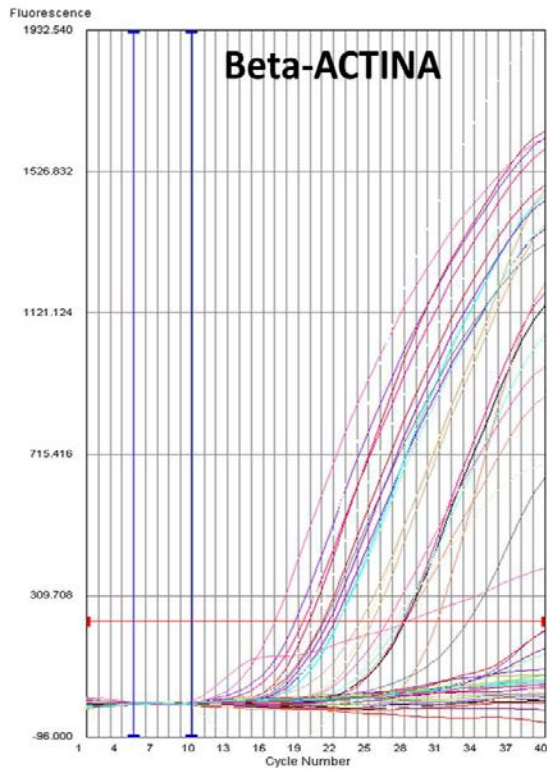
Baselined Amplification Curve for Assay Hs01057143_m1



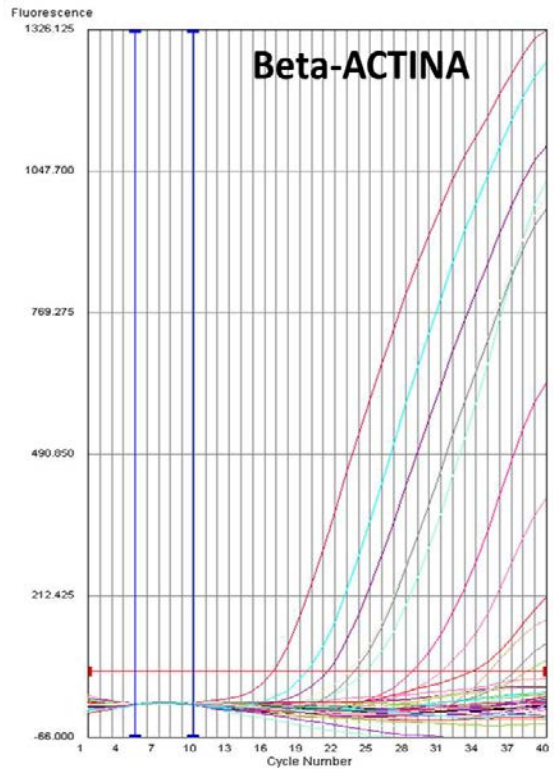
Baselined Amplification Curve for Assay Hs01057143_m1



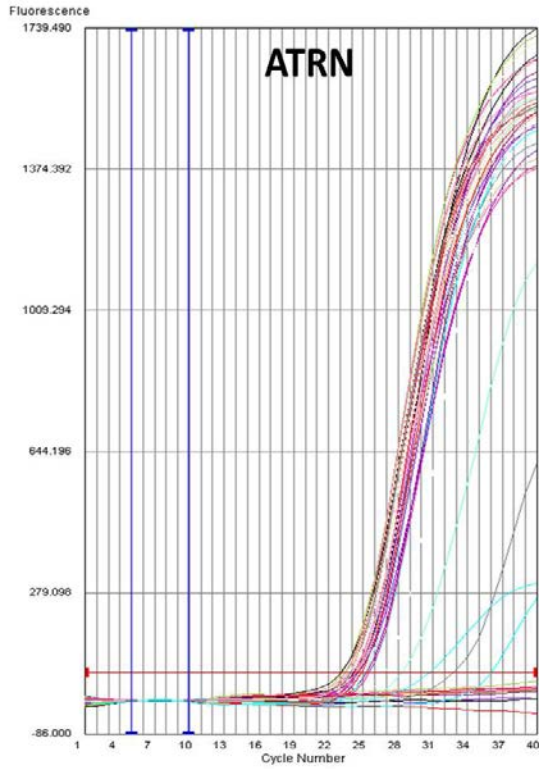
Baselined Amplification Curve for Assay Hs99999903_m1



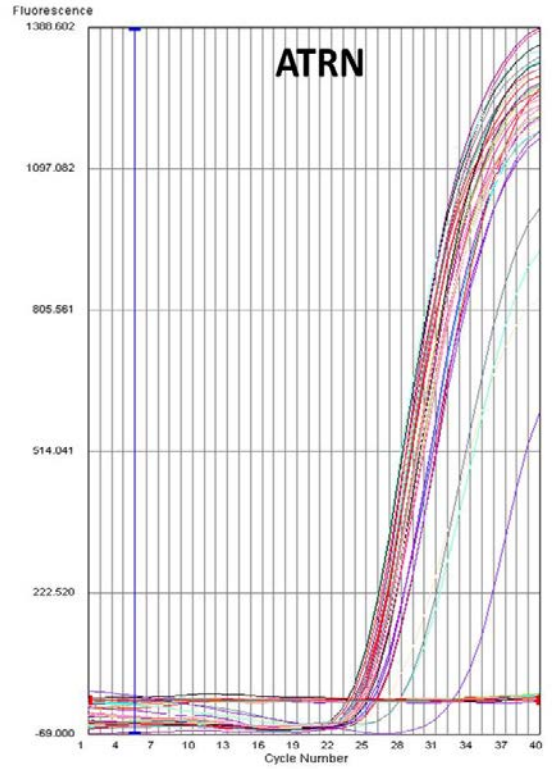
Baselined Amplification Curve for Assay Hs99999903_m1



Baselined Amplification Curve for Assay Hs00390610_m1



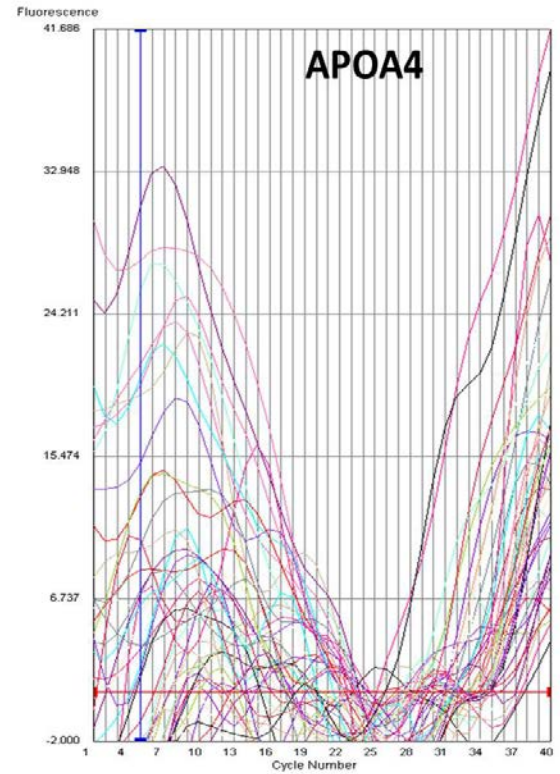
Baselined Amplification Curve for Assay Hs00390610_m1



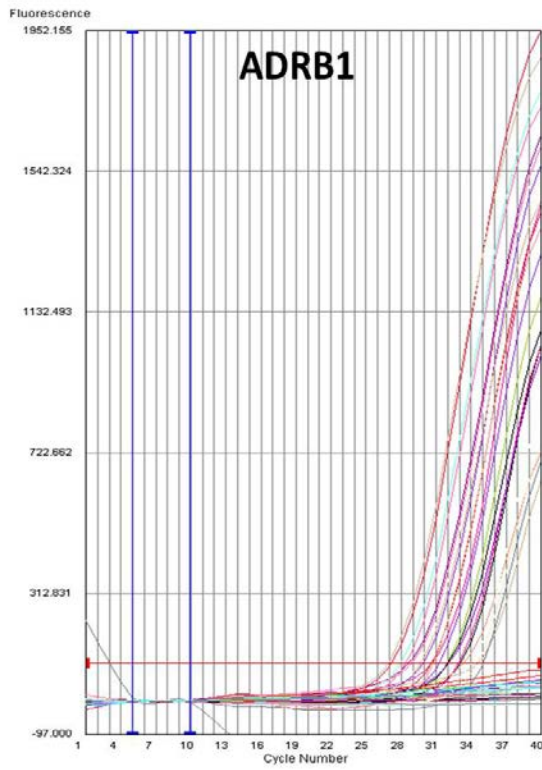
Baselined Amplification Curve for Assay Hs00166636_m1



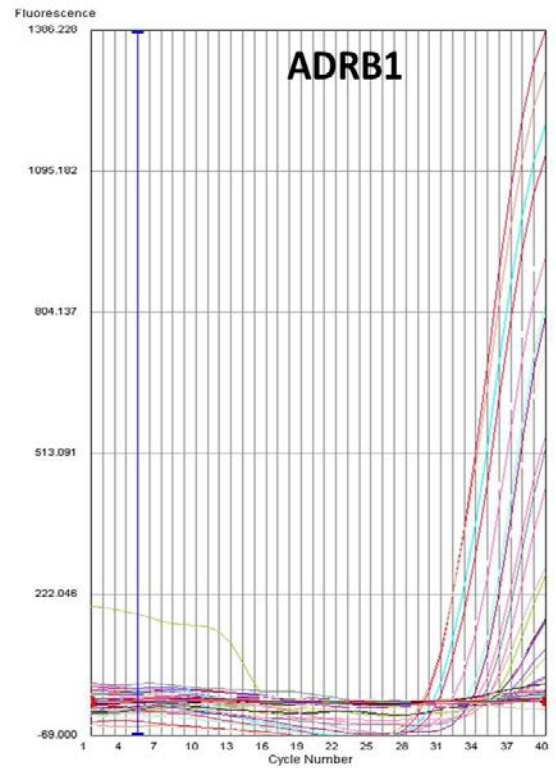
Baselined Amplification Curve for Assay Hs00166636_m1



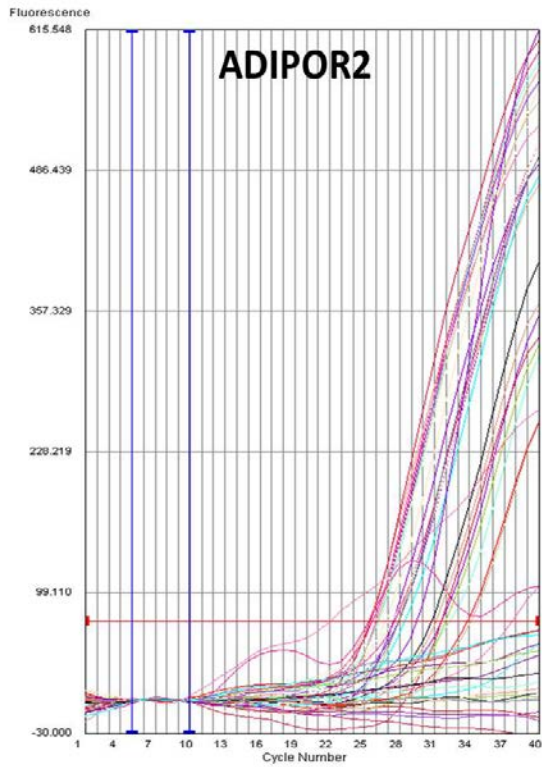
Baselined Amplification Curve for Assay Hs00265096_s1



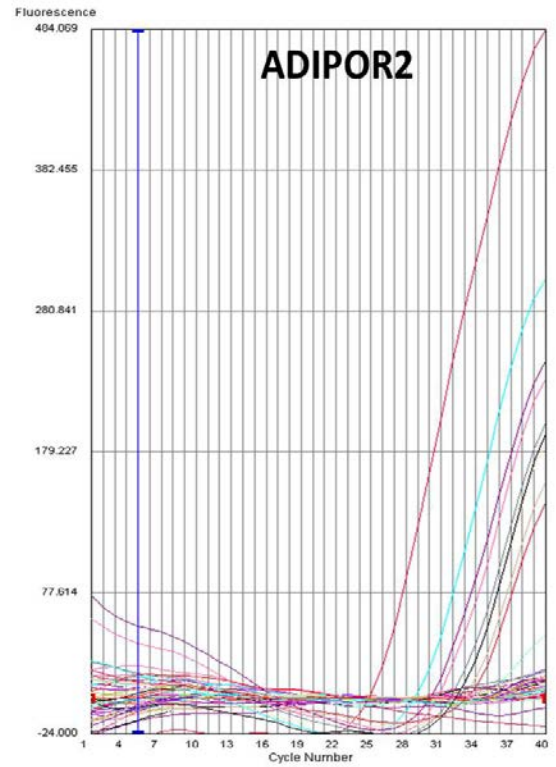
Baselined Amplification Curve for Assay Hs00265096_s1



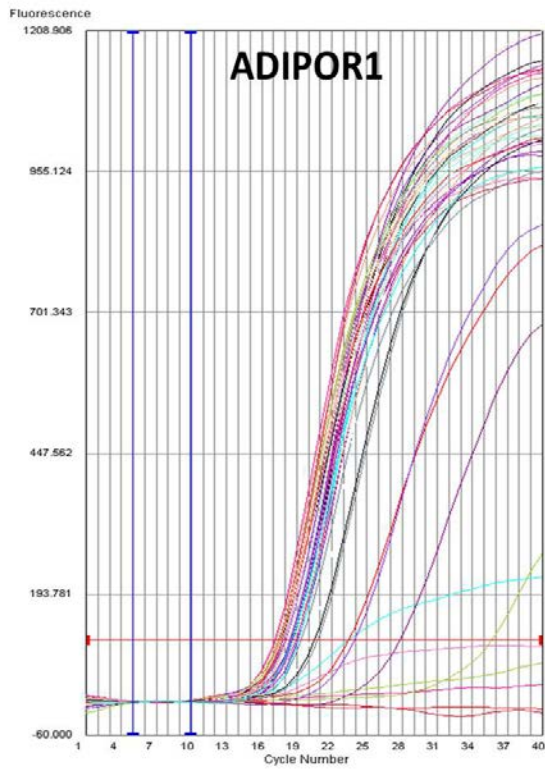
Baselined Amplification Curve for Assay Hs01047563_m1



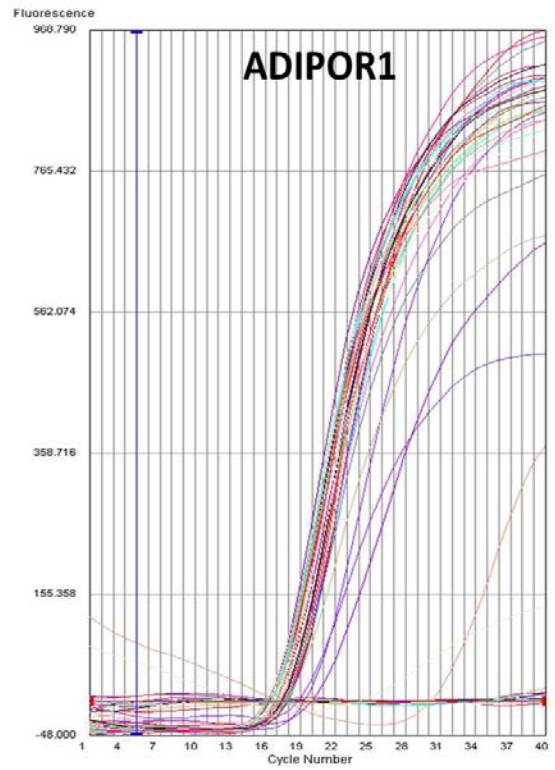
Baselined Amplification Curve for Assay Hs01047563_m1



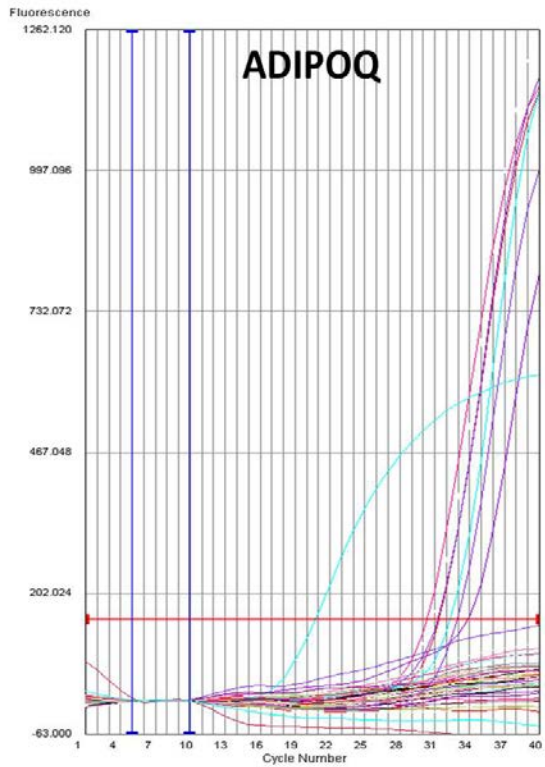
Baselined Amplification Curve for Assay Hs01114951_m1



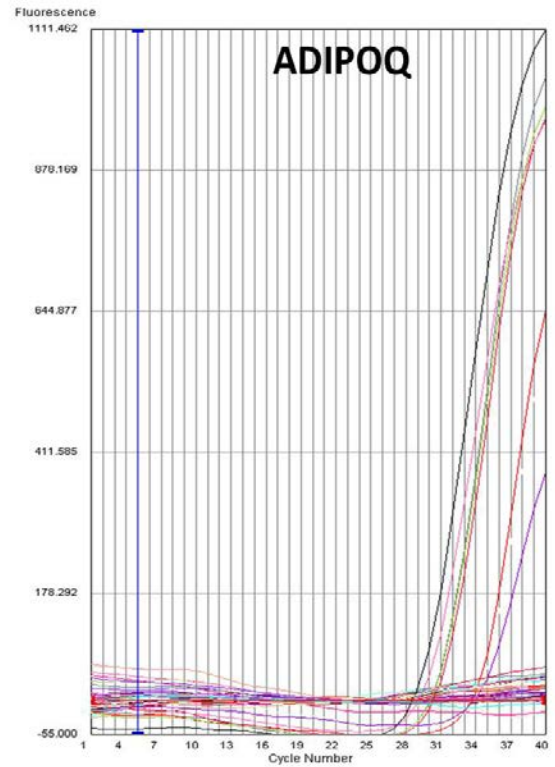
Baselined Amplification Curve for Assay Hs01114951_m1



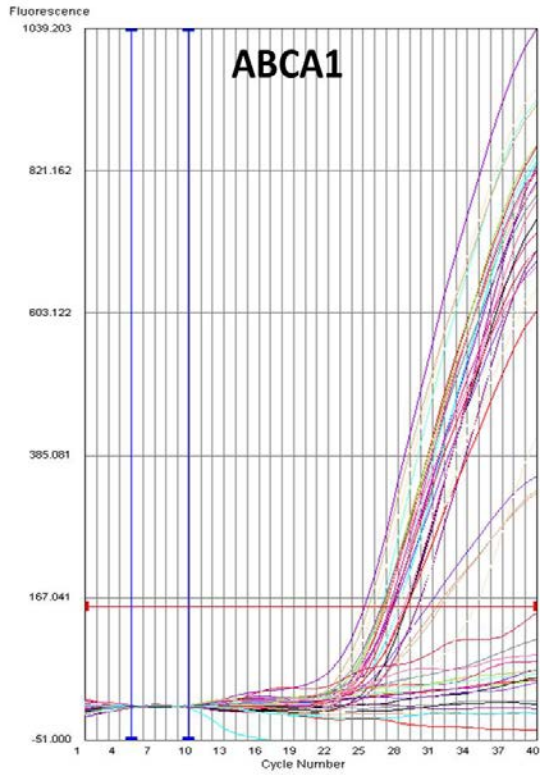
Baselined Amplification Curve for Assay Hs02564413_s1



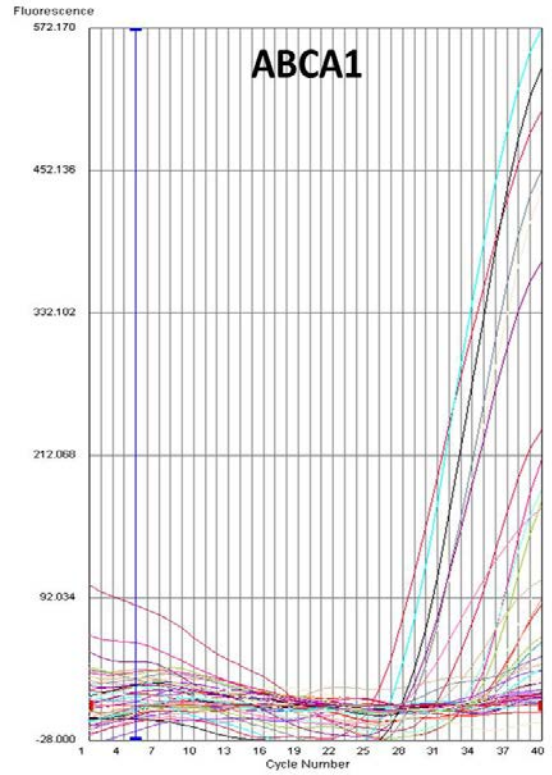
Baselined Amplification Curve for Assay Hs02564413_s1



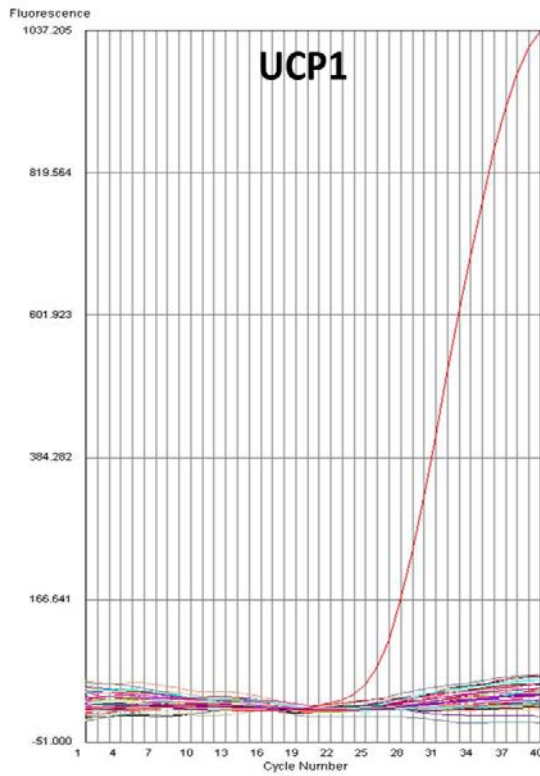
Baselined Amplification Curve for Assay Hs00194045_m1



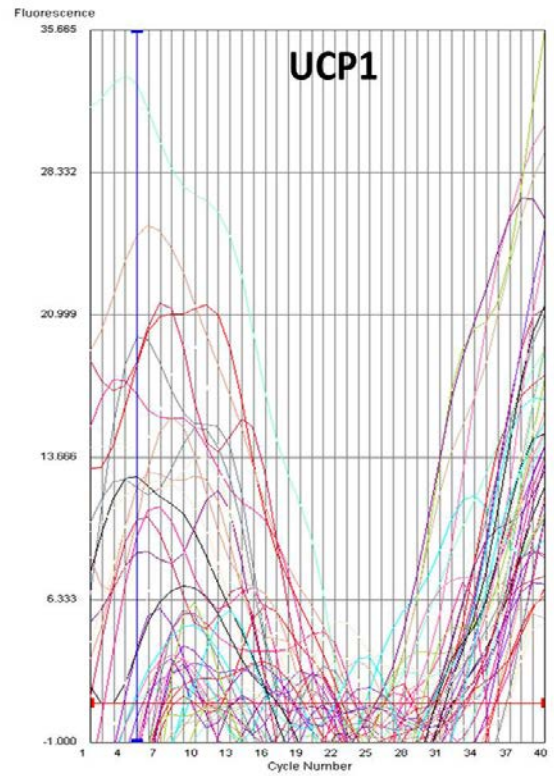
Baselined Amplification Curve for Assay Hs00194045_m1



Baselined Amplification Curve for Assays Hs00907094_m1 and Hs002224



Baselined Amplification Curve for Assay Hs00222453_m1



ANEXOS

Anexo 1. Artículo.



Expression of candidate genes associated to obesity in peripheral white blood cells of Mexican children.

Type:

Research paper

Running head:

Obesity and gene expression in Mexican children.

Abstract:

Introduction: Obesity is a chronic, complex, and multifactorial disease, characterized by excess of body fat. Diverse studies of the human genome, have led to the identification of susceptibility genes that contribute to obesity, however, relative few studies have addressed specifically the association between the level of expression of these genes and obesity.

Material and Methods: We studied 160 healthy and obese unrelated Mexican children aged 6 to 14 years. We measured the transcriptional expression of 20 genes associated to obesity, in addition to the biochemical parameters, in peripheral white blood cells. The detection of mRNA levels was made using Open Array Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

Results: Obese children exhibited higher values of fasting glucose ($p=0.034$), fasting insulin ($p=0.004$), LDL ($p=0.006$), triglycerides ($p<0.001$), SBP and DBP ($p<0.001$), and lower values of HDL ($p<0.001$) compared to lean children. Analysis of transcriptional expression data showed a difference for ADRB1 ($p=0.0297$), ADIPOR1 ($p=0.0317$), GHRL ($p=0.0060$) and FTO ($p=0.0348$) genes.

Conclusions: Our results suggest that changes in the expression level of the studied genes, are involved in biological processes implicated in the development of childhood obesity. Our study contributes with new perspectives for a better understanding of biological processes involved in obesity. The protocol was approved by the National Committee and Ethical Committee Board from the IMSS (IMSS FIS/IMSS/PRI0/10/011).

Keywords:

SNPs; triglycerides; obesity; Mexican children; gene expression.