



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL, SEDE SUR**

DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA

**“Análisis de adipocinas y el perfil epigenético en
los adolescentes mexicanos obesos”**

Tesis que presenta

M. en C. María del Carmen Ortiz Segura

Para obtener el Grado de

**Doctora en Ciencias en
Neurofarmacología y Terapéutica Experimental**

Directoras de Tesis
Dra. Guadalupe Bravo
Dra. Fengyang Huang

Ciudad de México

Mayo, 2018

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio 3 del Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav-IPN, Sede Sur) y en las instalaciones del laboratorio de Farmacología y Toxicología del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”, bajo la dirección de las Dras. Guadalupe Bravo y Fengyang Huang.

Durante la realización de este proyecto de tesis se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca de doctorado no. 336080/237544 (CVU/Becario) para estudios a nivel nacional.

Este trabajo estuvo parcialmente financiado por el proyecto ANR-CONACyT 2015-2016, No. registro: 273510 y los proyectos de Fondo Federal HIM/2012/002 SSA. 998 y HIM/2015/018 SSA.1161.

Agradecimientos

Gracias a Dios por permitirme llegar al día de hoy.

Gracias a la vida por todo lo bueno y por las lecciones que me ha tocado vivir, porque gracias a ello, he crecido como ser humano.

A mis tutoras, las Dras. Fengyang y Guadalupe Bravo por haberme apoyado durante todo este tiempo y por haber confiado en mí. Gracias infinitas.

A mi sínodo, los Dres. Enrique Hong, Leticia Gómez-Viquez, Dra. Laurence Marchat, por sus certeras y valiosas observaciones, en especial al Dr. Fausto Sánchez, porque además de ser mi sinodal, fue mi jefe, mi paño de lágrimas y una persona en quien confiar.

A Benjamín Rodríguez y Adriana Boiso, por su ayuda en todo lo del laboratorio, estaba perdida y ustedes me aclararon el panorama y me dieron confianza. Ustedes son parte importante de este proyecto. Muchas GRACIAS.

A mis compañeros de laboratorio del HIM, porque me hicieron llevadero el proceso. Los voy a extrañar. En especial gracias a ti Yolita, porque contigo reí, sufrí, me desahogué y hasta de enfermera la hiciste, muchas gracias.

A Martha Ballinas y Yaneli Juárez, gracias por su amistad, por esas tardes de charla y risas en Cardiología, además de trabajo, claro. Adrián gracias por tu apoyo, "Somos un equipo". A mi familia, a mi inmensa familia, mis tías Olivia, Rosa, Catalina, Guadalupe y Rosario, que de una u otra forma he sentido su apoyo y su presencia en mi vida, las quiero mucho. Quiero agradecer de manera muy especial a mi nueva familia, familia Islas Martínez, gracias por haberme hecho sentir como en casa, gracias por el apoyo, por el tiempo, por la comprensión, por la compañía. Gracias comadre Laura por confiarme a tu bebé y por esas platicas reparadoras. Gracias tía Mina por ayudarme tanto, Don Ángel, esas charlas en la mesa, en el carro o donde sea son entrañables. Reque y Manuel gracias.

Flaca (Vero Martínez) te agradezco el chisme, la compañía y las risas.

A mi primote Carlos Torres, a Trini, a Julia y a la tremenda Gaby. Gracias primo por recibirme en tu casa y por consentirme tanto. Los quiero mucho.

A mi prima Reyna gracias por preocuparte por mí. Gracias a mi defeño favorito, Luis Manuel Pinacho, aunque a veces me den ganas de ahorcarte, la mayoría me dan ganas de abrazarte, gracias por tu invaluable compañía y amistad, gracias por escucharme y aconsejarme. Jesús Leija gracias por el apoyo con la estadística.

Gracias a mis amigos, a la más antigua de mis amigas Emma, a Pepe, Lupita, Brenda, Paul, Alma, César, Jose Acosta, Ángeles Ortega, Lili Méndez, Amaranta Arellano.

Gracias señora María Botello, por recibirme en su casa y por brindarme su amistad, le tengo mucho cariño.

Gracias a todos aquellos que omití y siguen conmigo y gracias también a aquellos que decidieron no estar conmigo, porque su partida me enseñó que, a veces, cuando pierdes también ganas.

Dedicatoria

Dedico este logro a mis padres, por dejarme ser y por alentarme en todo lo que emprendo. A mis hermanos: Edith, Griselda, Juan, César y Víctor; los AMO INFINITAMENTE, ustedes son una parte de mi vida insustituible y única, son mis mejores amigos y aunque no se los diga, ustedes son mis grandes amores. A mis sobrinos Alex, Fátima, Camila, Valeria, Karen y Julia, ustedes me llenan el corazón de felicidad, me completan, me sorprenden, los amo.

Quiero dedicar mi trabajo a aquellos de mi familia que ya no me acompañan en esta vida, Tío Chuy, Juan Martín, mi abuela Sara, Tío Jorge, Nancita (te extraño tanto y aún me dueles) y Martha del Carmen (dejas un hueco que nadie llenará). Negri y Bartola, dejamos tantas cosas pendientes, pláticas y paseos, sé que si estuvieran aquí, éste mundo sería un mejor lugar, nunca me dejarán de hacer falta.

Al final y no por ello menos importante, quiero hacer una dedicatoria especial a David Escobedo Trujillo, aunque ya no estés, eres fuente de inspiración, me enseñaste a ver la vida de otra forma, a disfrutar de las cosas simples, como ir al cerro, caminar por la playa, a disfrutar de la sensación que brinda el aire en la cara, a oler lavanda. Gracias por mi langosta, por caminar conmigo bajo la lluvia, gracias por arroparme no sólo físicamente, sino por arroparme el corazón, contigo podía ser frágil y tú me fortalecías. Me enseñaste a querer a Bebé Willy, a tomarle el gusto al juego (me llevaste al casino), me escuchabas, me alentabas a continuar, a no rendirme. Gracias por esos amenos paseos, que, aunque hubiera tráfico los disfrutaba porque estaba contigo, a tu lado no existían los momentos malos. Gracias porque me ayudaste a soñar despierta nuevamente. Contigo el dolor era más llevadero y la vida más alegre. Tu partida me ha dejado con un hueco enorme en el corazón y muchos sueños inconclusos, pero me dejaste muchos recuerdos y enseñanzas. Te amo más allá de la muerte, porque sé que, aunque no estás conmigo físicamente, te llevo en el corazón y en mis recuerdos.

Índice

| | |
|---|------------|
| LISTA DE TABLAS | i |
| LISTA DE FIGURAS | iii |
| ABREVIATURAS | v |
| RESUMEN | ix |
| SUMMARY | x |
| I INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1. Obesidad | 1 |
| 1.1 Definición y clasificación | 1 |
| 1.2 Prevalencia de obesidad..... | 7 |
| 1.3 La obesidad y sus complicaciones..... | 10 |
| 1.3.1 Dislipidemias..... | 11 |
| 1.3.2 Resistencia a la insulina..... | 13 |
| 1.3.2.1 Generalidades de la insulina | 14 |
| 1.4 Tejido adiposo: clasificación y generalidades | 17 |
| 1.4.1 Anormalidades en las concentraciones de adipocinas | 21 |
| 1.4.1.1 Leptina | 22 |
| 1.4.1.2 Adiponectina | 24 |
| 1.4.1.3 Otras adipocinas | 25 |
| 1.4.2 Endotelio y disfunción endotelial | 28 |
| 1.4.2.1 Molécula soluble de adhesión intracelular-1 | 30 |
| 1.5 Interrelación de RI, adipocinas y disfunción endotelial | 31 |
| 1.5.1 Resistencia a la insulina y disfunción endotelial | 32 |
| 1.5.2 Leptina y disfunción endotelial | 34 |
| 1.5.3 Adiponectina y disfunción endotelial | 34 |
| 2. Obesidad: importancia de la genética y la epigenética en su desarrollo..... | 35 |
| 2.1 Genética y obesidad | 35 |
| 2.2 Epigenética | 37 |

| | |
|--|-----------|
| 2.2.1 Definición, clasificación e importancia | 38 |
| 2.2.2 Influencia de los factores ambientales sobre la epigenética | 39 |
| 2.2.2.1. Alimentos donantes de grupos metilo..... | 40 |
| 2.2.2.2. Ambiente intrauterino | 40 |
| 2.2.2.3 Ejercicio | 41 |
| 2.3 Modificación de las histonas en la obesidad | 41 |
| 2.4 miRNAs y obesidad | 42 |
| 2.5 Metilación del DNA | 43 |
| 2.5.1 Metilación en obesidad..... | 45 |
| II JUSTIFICACIÓN..... | 49 |
| III HIPÓTESIS..... | 50 |
| IV OBJETIVO GENERAL..... | 50 |
| V OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 50 |
| VI MATERIALES Y MÉTODOS..... | 51 |
| 6.1 Población de estudio..... | 51 |
| 6.2 Toma y almacenamiento de la muestra | 51 |
| 6.3 Criterios de inclusión y exclusión | 52 |
| 6.4 Cuantificación del perfil bioquímico | 52 |
| 6.5 Cuantificación de sICAM-1, insulina, leptina y adiponectina | 52 |
| 6.5.1 sICAM-1 | 53 |
| 6.5.2 Insulina | 53 |
| 6.5.3 Leptina | 54 |
| 6.5.4 Adiponectina | 54 |
| 6.6 MS-PCR y diseño de oligonucleótidos | 55 |
| 6.6.1 Consideraciones para el diseño de oligonucleótidos para MS-PCR | 56 |
| 6.6.2 Diseño de oligonucleótidos del gen de leptina..... | 56 |
| 6.6.3 Diseño de oligonucleótidos del gen de adiponectina..... | 59 |

| | |
|--|------------|
| 6.7 Extracción, purificación y cuantificación del DNA genómico | 62 |
| 6.8 Cuantificación del DNA y electroforesis | 63 |
| 6.9 Transformación del DNA con bisulfito de sodio..... | 64 |
| 6.10 PCR metilación específica (MS-PCR) | 67 |
| 6.10.1 MS-PCR del gen de leptina..... | 69 |
| 6.10.2 MS-PCR del gen de adiponectina | 71 |
| 6.11 Análisis estadístico | 72 |
| VII RESULTADOS..... | 73 |
| VIII DISCUSIÓN.... | 102 |
| IX CONCLUSIONES..... | 112 |
| X PERSPECTIVAS..... | 113 |
| XI BIBLIOGRAFÍA..... | 114 |

Lista de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Clasificación para el diagnóstico de sobrepeso y obesidad en población de acuerdo a la OMS..... | 2 |
| Tabla 2. Percentiles de estatura y peso en niños y adolescentes para edades comprendidas entre 2 y 20 años..... | 4 |
| Tabla 3. Percentiles de estatura y peso en niñas y adolescentes para edades comprendidas entre 2 y 20 años..... | 5 |
| Tabla 4. Límites establecidos para la CC de acuerdo a la FID..... | 7 |
| Tabla 5. Criterios establecidos para el diagnóstico de dislipidemias en niños y adolescentes de acuerdo a NCEP-ATP-III..... | 12 |
| Tabla 6. Genes involucrados de manera directa en el desarrollo de obesidad..... | 37 |
| Tabla 7. Secuencia de oligonucleótidos (M y U) empleados para la amplificación de la isla CpG analizada del gen de leptina..... | 59 |
| Tabla 8. Secuencia de oligonucleótidos (M y U) empleados para la amplificación de la isla CpG analizada del gen de adiponectina..... | 62 |
| Tabla 9. Preparación de mix de reacción MS-PCR..... | 65 |
| Tabla 10. Condiciones en termociclador para el proceso de transformación de DNA con bisulfito de sodio..... | 66 |
| Tabla 11. Cuantificación espectrofotométrica de muestras representativas de la transformación del DNA con bisulfito..... | 67 |
| Tabla 12. Concentraciones y volúmenes de trabajo empleados para realizar las MS-PCR..... | 69 |
| Tabla 13. Condiciones de ciclado y temperaturas empleadas para amplificar la isla CpG de leptina con los oligonucleótidos M..... | 70 |
| Tabla 14. Condiciones de ciclado y temperaturas empleadas para amplificar la isla CpG de leptina con los oligonucleótidos U..... | 70 |
| Tabla 15. Condiciones de ciclado y temperaturas empleadas para amplificar la isla CpG de adiponectina con los oligonucleótidos M..... | 71 |

| | |
|---|-----|
| Tabla 16. Condiciones de ciclado y temperaturas empleadas para amplificar la isla CpG de adiponectina con los oligonucleótidos U..... | 71 |
| Tabla 17. Características generales de la población de estudio..... | 74 |
| Tabla 18. Perfil bioquímico de la población de estudio. | 75 |
| Tabla 19. Correlaciones de Pearson para sICAM-1, leptina y adiponectina vs. variables antropométricas y bioquímicas..... | 79 |
| Tabla 20. Modelo de regresión lineal múltiple; variable dependiente: HOMA..... | 85 |
| Tabla 21. Modelo de regresión lineal múltiple; variable dependiente: sICAM-1..... | 87 |
| Tabla 22. Modelo de regresión lineal múltiple; variable dependiente: leptina..... | 89 |
| Tabla 23. Modelo de regresión lineal múltiple; variable dependiente: adiponectina..... | 91 |
| Tabla 24. Influencia de metilación de gen de leptina sobre leptina sérica..... | 100 |
| Tabla 25. Influencia de metilación de gen de adiponectina sobre adiponectina sérica..... | 101 |

Lista de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Prevalencias de sobrepeso y obesidad en adolescentes de 12-19 años de edad en ambos géneros..... | 8 |
| Figura 2. Prevalencias de sobrepeso y obesidad niños de 5-11 años de edad en ambos géneros..... | 9 |
| Figura 3. Síntesis de insulina..... | 15 |
| Figura 4. Mecanismo de acción de la leptina en peso normal y sobrepeso/obesidad..... | 24 |
| Figura 5. Mecanismo de acción de la adiponectina en peso normal y sobrepeso/obesidad | 25 |
| Figura 6. Participación de la obesidad, RI y adipocinas durante el proceso de disfunción endotelial..... | 32 |
| Figura 7. Mecanismos epigenéticos involucrados en la expresión génica..... | 39 |
| Figura 8. Metilación del DNA..... | 44 |
| Figura 9. Principales funciones de la metilación del DNA..... | 45 |
| Figura 10. Correlación de Spearman entre el lado fetal de la placenta... | 47 |
| Figura 11. Región reguladora de la expresión del gen de leptina..... | 57 |
| Figura 12. Ubicación de los oligonucleótidos y CpG's estudiados del gen de leptina..... | 58 |
| Figura 13. Región de estudio del gen de adiponectina..... | 60 |
| Figura 14. Ubicación de los oligonucleótidos y CpG's estudiados del gen de adiponectina..... | 61 |
| Figura 15. Gel representativo de electroforesis de extracción del DNA..... | 64 |
| Figura 16. Reacción de transformación con bisulfito de sodio. | 65 |
| Figura 17. Mecanismo de Hot Start Polimerasa de kit Epi Tect MSP de Qiagen..... | 68 |
| Figura 18. Concentración sérica de sICAM-1..... | 76 |
| Figura 19. Concentración sérica de leptina. | 77 |
| Figura 20. Concentración sérica de adiponectina..... | 78 |
| Figura 21. Correlación de Pearson para sICAM-1 vs. HOMA..... | 80 |

| | |
|---|----|
| Figura 22. Correlación de Pearson para leptina vs. HOMA. | 81 |
| Figura 23. Correlación de Pearson para adiponectina vs. HOMA..... | 82 |
| Figura 24. Correlación de Pearson para sICAM-1 vs. leptina..... | 83 |
| Figura 25. Correlación de Pearson para sICAM-1 vs. adiponectina.... | 84 |
| Figura 26. Gel representativo de la prueba de MS-PCR del gen de adiponectina usando oligonucleótidos M..... | 92 |
| Figura 27. Gel representativo de la prueba de MS-PCR del gen de adiponectina usando oligonucleótidos U..... | 93 |
| Figura 28. Gel representativo de la MS-PCR del gen de leptina para oligonucleótidos M..... | 94 |
| Figura 29. Gel representativo de la MS-PCR del gen de leptina para oligonucleótidos U..... | 94 |
| Figura 30. Gel representativo de la MS-PCR del gen de adiponectina para oligonucleótidos M..... | 95 |
| Figura 31.. Gel representativo de la MS-PCR del gen de adiponectina para oligonucleótidos U..... | 95 |
| Figura 32. Frecuencias de metilación del gen de leptina en los grupos de estudio..... | 97 |
| Figura 33. Frecuencias de metilación del gen de adiponectina en los grupos de estudio..... | 98 |

Abreviaturas

- α -MSH: Hormona Estimulante de Melanocitos
- AdipoR1: Adiponectin Receptor 1; Receptor de adiponectina 1
- AdipoR1: Receptor de adiponectina1
- AdipoR2 Adiponectin Receptor 2; Receptor de adiponectina 2
- AdipoR2: Receptor de adiponectina 2
- AGE's: Advanced glycation end products; Productos finales de glicación
- AGL: Ácidos grasos libres
- AgRP: Péptido Relacionado con el Gen Agouti
- Ang II: Angiotensin-II; Angiotensina II
- Apo B: Apolipoproteína B
- Bcl2: B cell lymphoma 2
- CART: Transcripto Regulado por Anfetaminas y Cocaína
- CC: Circunferencia de cintura
- CDC: Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Health Statistics
- CE: Células endoteliales
- CRH: Hormona Liberadora de Corticotropina
- CRP: C Reactive Protein; Proteína C Reactiva
- DE: Disfunción endotelial
- DM2: Diabetes mellitus tipo II
- DNA: Desoxirribonucleic Acid; Ácido desoxirribonucleico
- DPP-4: dipeptidyl peptidase-4; Dipeptil peptidasa 4
- ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay
- eNOS: endotelial-Nitric Oxide Synthase; Sintasa de óxido nítrico endotelial
- ENSANUT: Encuestas Nacionales de Salud
- ET-1: Endothelin-1; Endotelina 1
- FC: Frecuencia cardíaca
- FGF21: Fibroblast Growth Factor 21; Factor de crecimiento de fibroblastos- 21

FTO: Gen Fat Mass and Obesity-Associated

hASCs: Human Adipose-derived Stem Cells

HDL: High Density Lipoproteins; Lipoproteínas de alta densidad

HOMA: Homeostasis Model Assessment; Modelo de la evaluación de la homeostasis.

HUVEC: Human umbilical vein endothelial Cells; Células endoteliales de la vena umbilical humana

IDF: International Diabetes Federation; Federación Internacional de Diabetes

IL-1 Ra: Antagonista del receptor IL-1

IL-1 Ra: antagonista del receptor IL-1

IL-10: Interleucina 10

IL-13: Interleucina 13

IL-4: Interleucina 4

IMC: Índice de masa corporal

IOTF: The International Task Force

KO: Knock out

LDL: Low Density Lipoproteins; Lipoproteínas de baja densidad

LDLox: Oxidated Low Density Lipoproteins; Lipoproteínas de muy densidad

LepRb: Leptin receptor b: Receptor b de leptina

LPS: Lipopolisacárido

MC4R: Receptor de Proopiomelanocortina

miRNA: microRNA

MLL3/4: histona-lisina N-metil transferasa

MS-PCR: Methylation Specific PCR; PCR metilación específica

NCEP-ATP-III: Panel de Expertos en Detección, Evaluación y Tratamiento de la Hipercolesterolemia

NO: Nitric Oxide; Óxido nítrico

NO: Óxido nítrico

NPY: Neuropeptido Y

nt: Nucleótidos

Ob no RI: Obesos sin Resistencia a la insulina

Ob-RI: Obesos con resistencia la insulina

OCDE: Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico

OMS: Organización mundial de la Salud

PAD: Presión arterial diastólica

PAI-1: Plasminogen Activador Inhibidor-1; Inhibidor del activador del plasminógeno 1

PAS: Presión arterial sistólica

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PGC1: Receptor-gamma activado por PPAR- γ

PGI2: Prostaglandines; prostaglandinas

POMC: Propiomelanocortina

PPAR: Peroxisome proliferator-activated receptor, Receptor de proliferador activado por peroxisomas

PTIP: Proteína de interacción con el dominio de transactivación PAX

RI: Resistencia a la insulina

RNA: Ribonucleic acid, Ácido ribonucleico

ROS: Reactive Oxygen species; especies reactivas de oxígeno

RPB-4: Retinol Protein Binding-4; Proteína de unión al retinol

sICAM-1 Soluble Intercellular Adhesion Molecule-1; Molécula soluble de adhesión intercelular

SNC: Sistema Nervioso Central

SNP: Single Nucleotide Polymorphis; Polimorfismo de un solo nucleótido

SREBP: Proteína reguladora de unión a elementos esteroides

TA: Tejido adiposo

TAA: Tejido adiposo abdominal

TAB: Tejido adiposo blanco

TABe: Tejido adiposo beige

TAM: Tejido adiposo marrón

TAS: Tejido adiposo subcutáneo

TAV: Tejido adiposo visceral

TGFBR2: TGF- β Receptor type 2, Receptor tipo 2 de TGF- β

TGF- β : Transforming Growth Factor- β ; Factor transformante de crecimiento β

TGs: Triglicéridos

TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α ; Factor de necrosis tumoral α

UCP-1: Uncoupling Protein-1; Proteína Desacoplante-1

VCAM: Vascular Cell Adhesion Molecule; Molécula de adhesión celular vascular

VLDL: Very Low-Density Lipoproteins; Lipoproteínas de muy baja densidad

WT: Wild type; silvestres

Resumen

La obesidad es un problema de salud a nivel mundial y está asociada a un alto riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular. Anormalidades en las concentraciones de adipocinas, la Resistencia a la insulina (RI) y la disfunción endotelial son tres condiciones patológicas que pueden co-existir en la población infantil y adolescente, sin embargo, su relación no es del todo clara. Recientemente, se ha sugerido que las alteraciones epigenéticas se asocian con obesidad y desórdenes metabólicos. El estudio de la epigenética abre una nueva visión para el entendimiento de la etiología del desarrollo de obesidad. El primer objetivo de este estudio fue investigar la posible relación entre RI, disfunción endotelial y alteraciones en las concentraciones de adipocinas (leptina y adiponectina) en niños y adolescentes mexicanos obesos. Además, evaluamos si existe correlación entre la frecuencia de metilación de los promotores de los genes de leptina (*LEP*) y adiponectina (*ADIPOQ*) con las variables antropométricas, perfil bioquímico y RI. 227 niños y adolescentes se clasificaron de acuerdo con su percentil índice de masa corporal (IMC) (eutróficos: n=104; obesos: n=123) y al modelo de homeostasis metabólica (HOMA) (Ob-RI: n=65). Las concentraciones circulantes de la molécula soluble de adhesión intercelular (sICAM-1), leptina, adiponectina e insulina se determinaron por ELISA. La frecuencia de metilación de los promotores de *LEP* y *ADIPOQ* se evaluó por PCR metilación específica (MS-PCR) en el DNA obtenido de las muestras de sangre periférica. El grupo Ob-RI presentó concentraciones mayores de sICAM-1 en comparación con el grupo obesos sin RI (Ob no RI). Los niños y adolescentes obesos presentaron concentraciones mayores de leptina respecto a los eutróficos. Las concentraciones más bajas de adiponectina se observaron en el grupo Ob-RI. En los modelos de regresión lineal múltiple, el sICAM-1, los TGs (triglicéridos), glucosa y HOMA se asociaron fuertemente con la circunferencia de cintura (CC) ($R^2=0.457$, $P=0.008$). De igual manera, después de ajustar por edad Zscore del IMC, lípidos y adipocinas, el HOMA permaneció asociado con el sICAM-1 ($R^2=0.372$, $P=0.008$). El Zscore del IMC presentó una asociación leve con leptina ($R^2=0.176$, $P=0.002$) y la CC fue un predictor independiente de las concentraciones de adiponectina ($R^2=0.136$, $P=0.007$). Los adolescentes obesos con RI presentaron hipometilación (74.2%) del gen *LEP* comparados con los eutróficos (94.4%). En los modelos de regresión lineal, el incremento del IMC y la hipometilación de *LEP* contribuyen al 34.2% de los cambios circulantes de leptina. No se encontró diferencia en la metilación de *ADIPOQ*. Nuestros hallazgos demostraron que los adolescentes obesos, particularmente los que presentan RI, mostraron anomalía de adipocinas y disfunción endotelial. Nuestras observaciones en la frecuencia de metilación sustentan la hipótesis de que las modificaciones epigenéticas podrían contribuir al desarrollo de obesidad y los desórdenes metabólicos relacionados.

Summary

Obesity is a healthy problem in the world and is associated with a high risk of cardiovascular disease. Abnormality of adipokines, insulin resistance (IR), and endothelial dysfunction are three pathological conditions that can co-exist in children and adolescents, however their relationship is not yet clarified. Recently, epigenetic alterations have been suggested to be associated with obesity and related metabolic disorders. The epigenetic study opens the new view to understand the etiology in the development of obesity. The first aim of this study was to investigate the possible relationship among IR, endothelial dysfunction, and alteration of adipokines (leptin and adiponectin) in Mexican obese children and adolescents. Secondly, we also evaluated the correlation of methylation frequency of *LEP* and *ADIPOQ* promoters with anthropometric variables, biochemical profile, and IR in obese adolescents. Two hundred and twenty-seven children and adolescents were classified according to the percentile of body mass index (BMI) (eutrophic: n=104; obese: n=123) and homeostasis model of the assessment-insulin resistance index (HOMA) (obese with IR: n=65; Ob_IR). The circulating concentrations of soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1), leptin, adiponectin, and insulin were determined by ELISA. The methylation frequency of *LEP* (leptin) and *ADIPOQ* (adiponectin) promoters was determined by methylation-specific PCR (MS-PCR) in DNA obtained from peripheral blood samples. The obese adolescents with IR presented increased higher circulating concentrations in sICAM-1 in comparison with the obese subjects without IR (Ob no IR). Obese children and adolescents showed higher concentrations of leptin than eutrophics. The lowest concentrations of adiponectin were observed in the obese with IR. In multivariate linear regression models, sICAM-1 along with triglycerides, cholesterol, waist circumference (WC) and glucose and HOMA was strongly associated with WC ($R^2=0.457$, $P=0.008$). Similarly, after adjustment for age, BMI-SDS, lipids, and adipokines, HOMA remained associated with sICAM-1 ($R^2=0.372$, $P=0.008$). BMI-SDS was mildly associated with leptin ($R^2=0.176$, $P=0.002$) and the WC was mild and independent determinant of adiponectin ($R^2=0.136$, $P=0.007$). Moreover, the obese adolescents with IR exhibited hypomethylation (74.2%) of *LEP* compared with the eutrophics subjects (94.4%). In multivariate linear regression models, the increment of BMI and hypomethylation of *LEP* contributed 34.2% of changes in circulating leptin. No difference was observed in methylation frequency of *ADIPOQ* promoters. Our findings demonstrated that the obese adolescents, particularly the obese subjects with IR exhibited increased abnormality of adipokines and endothelial dysfunction. Our observations in methylation frequency sustain the hypothesis that epigenetic modifications might underpin the development of obesity and related metabolic disorders.

I. Introducción

1. Obesidad

1.1. Definición y clasificación

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la obesidad se define como la acumulación anormal o excesiva de grasa corporal que puede ser perjudicial para la salud (OMS, 2015). La obesidad es el resultado del balance energético positivo, es decir, la ingesta alimenticia supera al gasto energético (Pan American Health Organization, 2003) y se ha asociado con un mayor riesgo para el desarrollo de enfermedades no transmisibles como son apnea del sueño, hígado graso no alcohólico y artritis, así como aquellas que actualmente ocupan los primeros lugares de causa de muerte en México como diabetes tipo II (DM2), enfermedades cardiovasculares (ECV) y cáncer (Kopelman, 2000).

La obesidad es una patología de origen multifactorial, en donde se ven involucrados factores ambientales y genéticos. Los componentes ambientales involucrados en el desarrollo de obesidad son muy variados e involucran el tipo de dieta y la actividad física (Papas y cols., 2007). Se ha hecho especial énfasis en el papel que estos tienen en el aumento del consumo alimenticio y en la disminución del gasto energético que culminan con la aparición de obesidad.

Otro de los factores más destacados para el desarrollo de obesidad es la inactividad física, que se ha considerado una estrategia primaria en la prevención de por lo menos 35 padecimientos crónicos como: la obesidad, el síndrome metabólico, el hígado graso no alcohólico, la resistencia a la insulina (RI), etc. (Booth y cols. 2012). El llevar a cabo una actividad física o ejercicio puede reducir la inflamación asociada a una mayor adiposidad corporal. La práctica de actividad física reduce el riesgo de padecer ciertas enfermedades y la mortalidad.

Existen diversos métodos para medir el porcentaje de grasa corporal (que, en condiciones normales, debe ser <20% del peso corporal), entre los cuales podemos mencionar: la densitometría, la impedancia eléctrica y la resonancia magnética. Sin embargo, en la clínica se emplean otros como: el Índice de masa corporal (IMC), la circunferencia de cintura (CC), y la plicometría. Existen diversos criterios para el diagnóstico de obesidad, el más usado es el cálculo del IMC el cual muestra la asociación existente entre el peso (kg) y la talla (m²). En la tabla 1 se muestra la clasificación para sobrepeso y obesidad de acuerdo con la OMS.

Tabla 1. Clasificación para el diagnóstico de sobrepeso y obesidad en población de acuerdo con la OMS.

| IMC (kg/m ²) | CLASIFICACIÓN |
|--------------------------|--------------------|
| 18.5-24.9 | Peso normal |
| ≥25-29.9 | Sobrepeso |
| 30-34.9 | Obesidad grado I |
| 35-39.9 | Obesidad grado II |
| ≥40 | Obesidad grado III |

El uso del IMC para la clasificación de la obesidad presenta ciertas ventajas sobre otras técnicas de diagnóstico, entre ellas podemos mencionar que existe una buena correlación poblacional (0.7-0.8) con la grasa corporal y se ha demostrado que existe una correlación directa con el riesgo de mortalidad, independientemente del género. Esta correlación se ha usado para establecer los puntos de corte, sin embargo, se ha observado que el riesgo varía dependiendo de la población, por ejemplo, en los asiáticos, se ha propuesto un punto de corte para sobrepeso de 25 kg/m² ya que un gran número de personas de esta etnia desarrollan alteraciones metabólicas como Diabetes mellitus tipo II (DM2) y enfermedades cardiovasculares a valores de IMC menores respecto a los occidentales (Moreno, 2012).

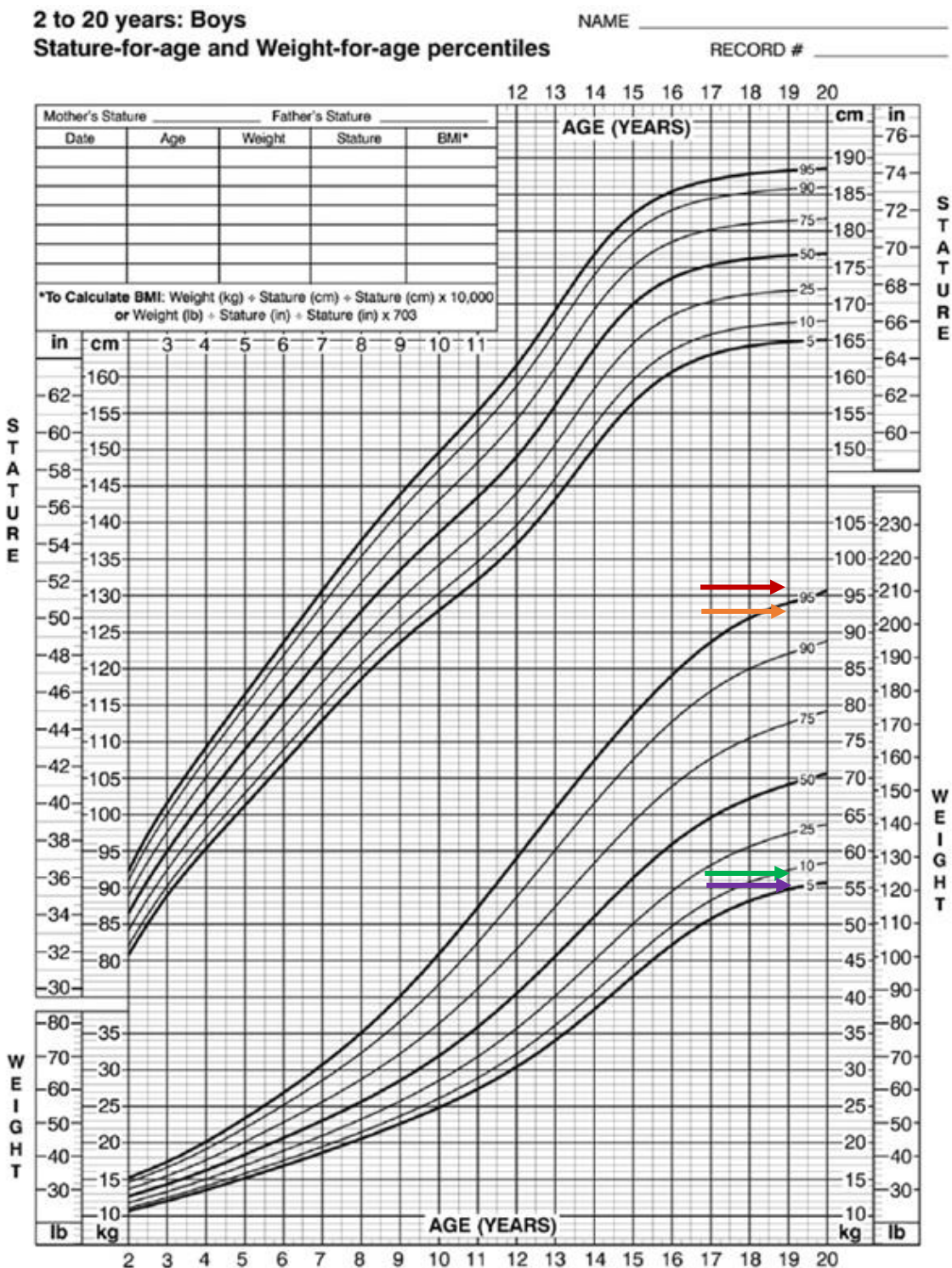
A pesar de que este índice es la medida más empleada para el diagnóstico de sobrepeso y obesidad, presenta varias limitaciones para el correcto establecimiento de los puntos de corte, entre ellos que no es un buen indicador de la composición corporal, ya que no distingue de manera específica la contribución de la masa magra y de la masa grasa en el peso, además, no mide los cambios que se producen en la grasa corporal con los cambios de edad, entrenamiento físico y entre grupos étnicos con distinta proporción corporal en cuanto a longitud de extremidades y estatura en posición sentada (Moreno, 2012).

El IMC no puede ser empleado en niños y adolescentes. Para esta población, no existe un consenso para determinar de manera uniforme un punto de corte que sea aceptado a nivel mundial. Existen varias propuestas para establecer los puntos de corte para el diagnóstico de obesidad en población infantil, entre ellos, un estudio realizado donde participaron 3320 niños con edades comprendidas entre los 5-18 años, se clasificó a los participantes como obesos si su porcentaje de grasa corporal era del 25% en el género masculino y del 30% en el género femenino (Williams y cols., 1992), por otro lado, un estudio realizado en la India, catalogó con sobrepeso a los sujetos entre el percentil ≥ 85 y < 95 y con obesidad aquellos con percentil ≥ 95 (Ghosh, 2014).

A nivel mundial, las tablas de percentiles son la de mayor uso para el diagnóstico de sobrepeso y obesidad en niños y adolescentes dado que consideran la edad, la talla y el género, en donde, un percentil por debajo de 5 se clasifica como desnutrición, mayor o igual a 5 hasta 84.9 como peso normal, mayor o igual a 85 pero menor a 95 como sobrepeso y mayor o igual a 95 como obesidad. El rango de edad que consideran es de 2-20 años. Estas tablas fueron propuestas por el CDC (Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Health Statistics).

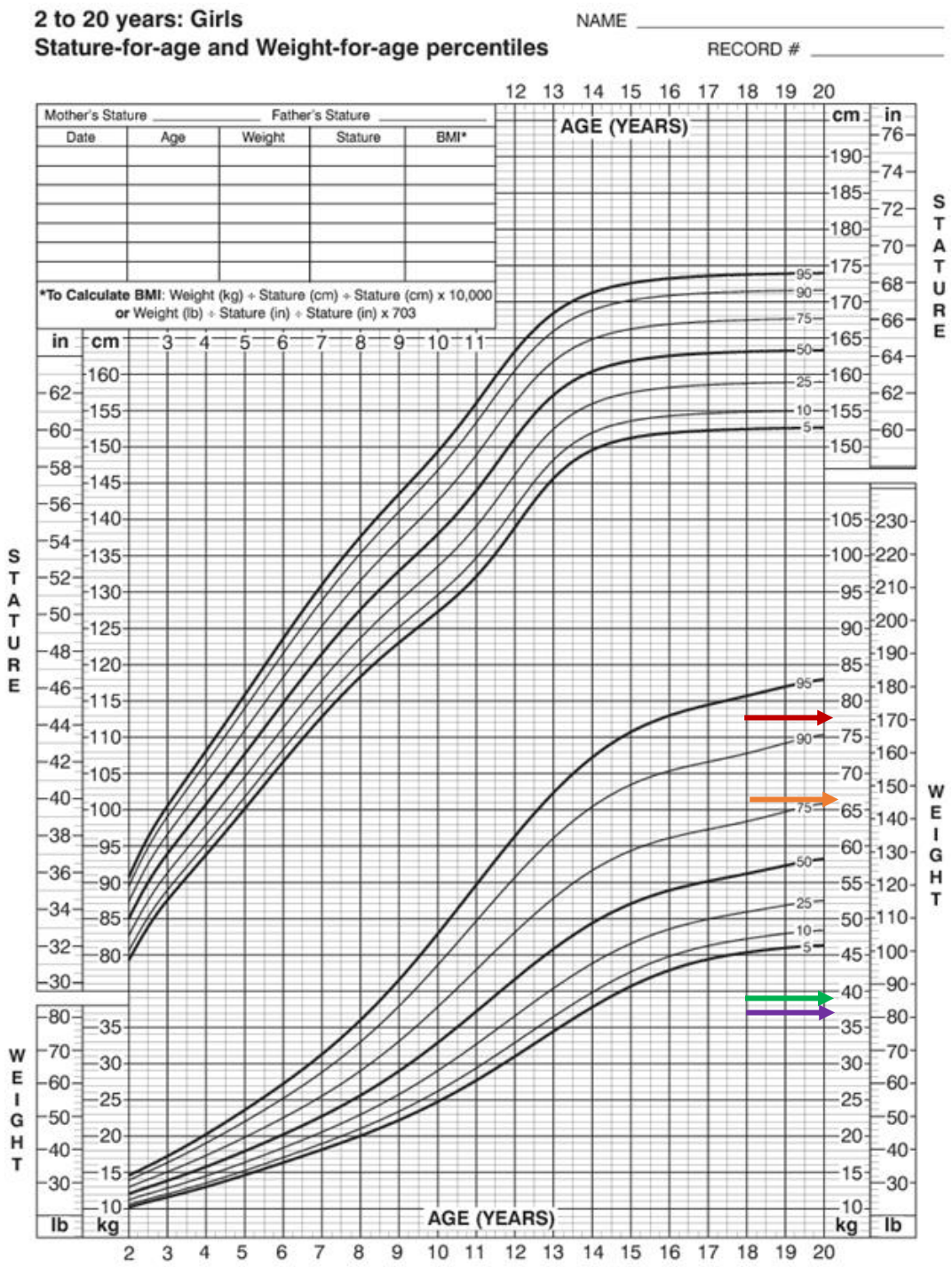
A continuación, se muestran las tablas propuestas por la CDC (2 y 3) para el diagnóstico de sobrepeso y obesidad en el género masculino y femenino respectivamente. Disponibles en: <http://www.cdc.gov>.

Tabla 2. Percentiles de estatura y peso en niños y adolescentes para edades comprendidas entre 2 y 20 años.



Se indica con flechas rojas los puntos de corte para el diagnóstico de obesidad, en naranja para sobrepeso, verde en peso normal y morado para bajo peso. Para poder obtener el percentil de los pacientes, es necesario contar con el peso, el género y la edad.

Tabla 3. Percentiles de estatura y peso en niñas y adolescentes para edades comprendidas entre 2 y 20 años.



Se indica con flechas rojas los puntos de corte para el diagnóstico de obesidad, en naranja para sobrepeso, verde en peso normal y morado para bajo peso. Para poder obtener el percentil de los pacientes, es necesario contar con el peso, el género y la edad.

Para el diagnóstico de sobrepeso y obesidad, es necesario contar con el peso del paciente y la edad, así, un paciente de 13 años de género masculino que pese 50 kg estará dentro de la categoría de peso normal.

El exceso de TA puede distribuirse por todo el cuerpo o puede concentrarse en determinadas regiones, cuando se acumula preferentemente en la cavidad abdominal, se le llama obesidad abdominal o central.

La OMS fue la primera en dar una definición sobre obesidad abdominal, basándose en el cociente cintura/cadera; así, se estableció la presencia de obesidad abdominal cuando el cociente era ≥ 1 en el género masculino y $\geq 0,9$ en el femenino (OMS, 1988). El Panel de Expertos en Detección, Evaluación y Tratamiento de la Hipercolesterolemia (NCEP-ATP-III), propusieron una segunda definición que se basa sólo en la CC, donde, una CC > 102 cm en el varón y > 88 cm en la mujer indican obesidad abdominal (NCEP, 1991).

En abril del 2005, la Federación Internacional de Diabetes (IDF, por sus siglas en inglés) introduce dos cambios importantes, por un lado, disminuye los puntos de corte para el diagnóstico de obesidad abdominal y propone distintos puntos de corte en función de la etnia de los sujetos (Alberti, Zimmet, y Shaw, 2005). Estos cambios se justificaron mediante dos hechos: por una parte, distintos estudios demostraron que el punto de corte para la CC que mejor se correlacionaba con la RI era más bajo que lo que estaba establecido según la definición del NCEP-ATP-III (H=102 cm y M=88 cm), y que la asociación de los factores de riesgo vascular con la CC determinaba unos puntos de corte diferentes según la población estudiada. En la tabla 4 se muestran los puntos de corte establecidos.

Tabla 4. Límites establecidos para la CC de acuerdo con la IDF.

| Grupo étnico /Nacionalidad | CC (cm) | |
|----------------------------|---------|---------|
| | Hombres | Mujeres |
| Europeos | ≥ 94 | ≥80 |
| Chinos | ≥90 | ≥80 |
| Asiáticos del Sur | ≥90 | ≥80 |
| Japonés | ≥90 | ≥80 |
| Estados Unidos | ≥102 | ≥88 |
| Sudamérica | ≥90 | ≥80 |
| Centroamérica | ≥90 | ≥80 |

CC: circunferencia de cintura.

Para la población mexicana, los límites que se emplean son los mismos que los de la población asiática del sur.

1.2. Prevalencia de obesidad

La incidencia y prevalencia de la obesidad a nivel mundial se ha incrementado de manera alarmante. En el período comprendido entre 1990 al 2013, el número de infantes con sobrepeso y obesidad se incrementó de 32 a 42 millones, incluso en África se observó esta tendencia y los niños con sobrepeso y obesos pasaron de 4 a 9 millones en el mismo período de tiempo (OMS, 2015).

De acuerdo con lo reportado por la ENSANUT 2016, la población adulta presentó una prevalencia de sobrepeso y obesidad del 72.5%. En los adolescentes de 12-19 años de edad, la prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad fue de 36.3%, es decir, 1.4 puntos porcentuales superior a la prevalencia encontrada en 2012 (34.9%). En la figura 1 se muestran las prevalencias de sobrepeso y obesidad para adolescentes de 12-19 años de edad reportadas en los años 2012 y 2016 (ENSANUT, 2016).

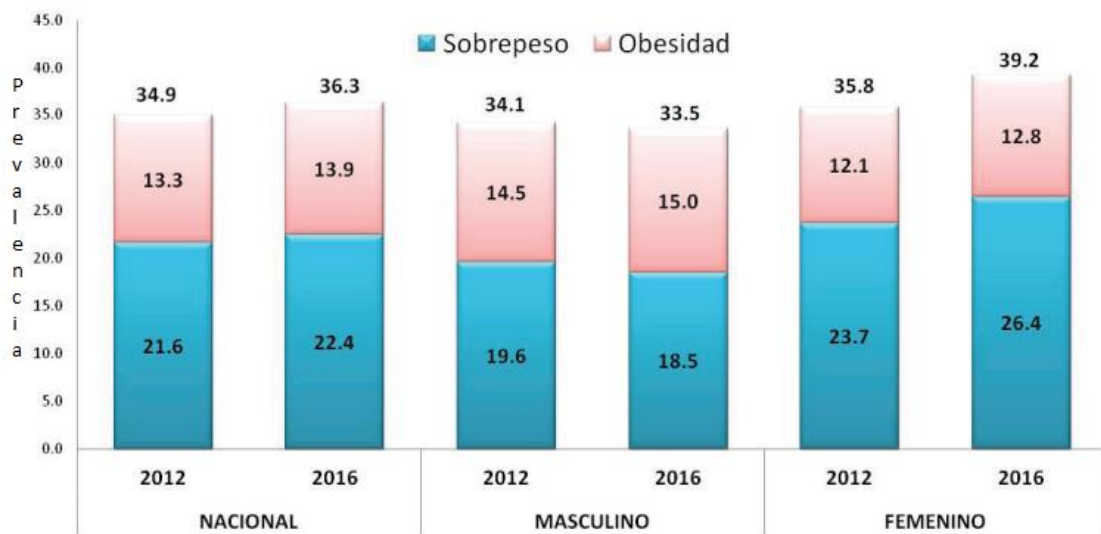


Figura 1. Prevalencias de sobrepeso y obesidad en adolescentes de 12-19 años de edad en ambos géneros. Los números que están fuera de las barras indican la suma de las prevalencias de sobrepeso y obesidad por género. Disponible en: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/209093/ENSANUT.pdf>

A pesar de la tendencia, no es posible concluir que hubo aumento en la prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad en este periodo de tiempo. La prevalencia de sobrepeso fue de 22.4% y de obesidad de 13.9%. La prevalencia de sobrepeso (26.4%) en adolescentes del género femenino en 2016 es 2.7 puntos porcentuales superior a la observada en 2012 (23.7%). Esta diferencia es estadísticamente significativa ($p > 0.05$), con lo cual se puede afirmar que hubo un incremento en la prevalencia de sobrepeso. La prevalencia de obesidad (12.8%) en 2016 es similar a la observada en 2012 (12.1%). Respecto al género masculino, las prevalencias de sobrepeso (18.5%) y obesidad (15.0%) en 2016 son muy similares a las observadas en 2012 (sobrepeso 19.6%; obesidad 14.5%). En el 2016, el sobrepeso en el género femenino fue mayor (26.4%) al observado en el género masculino (18.5%) en cuanto a la prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad, ésta fue de 39.2% y 33.5% respectivamente. En 2012, estas cifras fueron 35.8%(femenino) y 34.1% (masculino).

Como se puede observar, la incidencia de sobrepeso y obesidad es mayor en el género femenino que en el masculino.

Se ha establecido que existe una relación entre la obesidad infantil y el desarrollo de obesidad en la vida adulta. Un niño que es obeso tiene el doble de riesgo de desarrollar obesidad en la vida adulta respecto a uno con peso normal, además, se ha estimado que, si se padece obesidad durante la edad escolar, del 42 al 63% desarrollarán obesidad durante la vida adulta (Anderson, 2016; OMS, 2003; Serdula y cols., 1993).

En el año 1999, la prevalencia de sobrepeso y obesidad en niños de 5-11 años de edad usando los criterios propuestos por la IOTF (The International Task Force) fue de 19.5% (Hernández y cols., 2003), en lo que respecta a los niños menores de 5 años, la IOTF estimó que, a nivel mundial, en el año 2004, 22 millones presentaban sobrepeso u obesidad (Lobstein y cols., 2004). La prevalencia de obesidad infantil en México es una de las más altas a nivel mundial. En la figura 2 se presentan las prevalencias de sobrepeso y obesidad obtenidos durante la ENSANUT 2012 y la 2016 (ENSANUT, 2016).

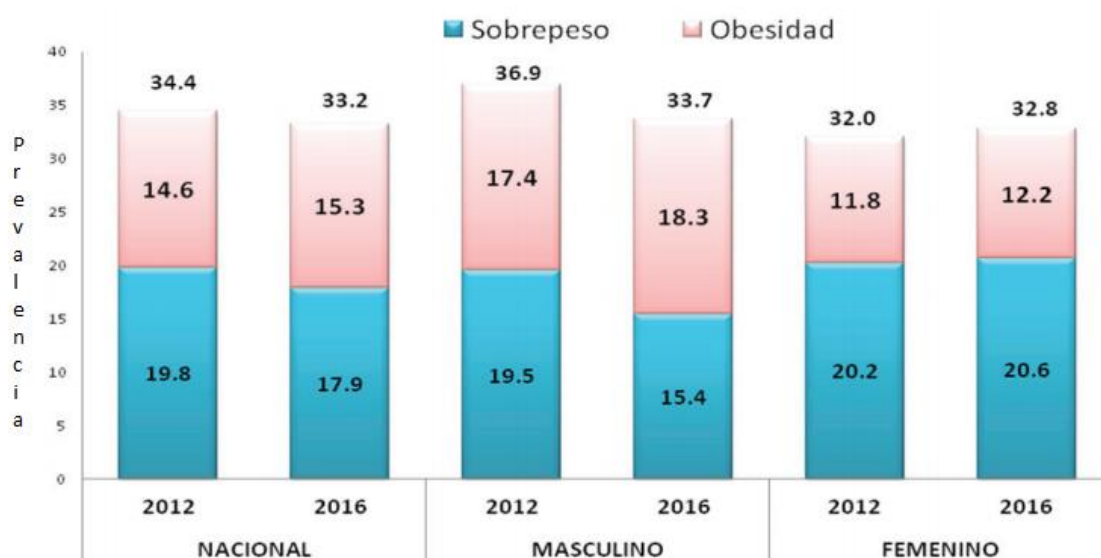


Figura 2. Prevalencias de sobrepeso y obesidad niños de 5-11 años de edad en ambos géneros. Los números que están fuera de las barras indican la suma de las prevalencias de sobrepeso y obesidad por género. Disponible en:

<https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/209093/ENSANUT.pdf>

De acuerdo con la ENSANUT, la prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad en la población en edad escolar en 2016 fue 33.2% y en 2012 fue 34.4%, es decir, 1.2 puntos porcentuales mayor, sin embargo, a pesar de esta tendencia de disminución, los intervalos de confianza de la prevalencia de 2016 son relativamente amplios, por lo que no es posible concluir que la prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad disminuyó. La prevalencia de sobrepeso fue de 17.9% y de obesidad de 15.3% en 2016, 1.9 puntos porcentuales menor que la observada en la ENSANUT 2012 (19.8%) mientras que la de obesidad fue 0.7 puntos porcentuales mayor (14.6%) pero no hubo cambios significativos. Las prevalencias de sobrepeso (20.6%) y obesidad (12.2%) en el género femenino en 2016 son muy similares a las observadas en 2012 (sobrepeso 20.2%; obesidad 11.8%). En cuanto al género masculino, las prevalencias de sobrepeso (15.4%) en 2016 son 4.1 puntos porcentuales menores que las observadas en 2012 (19.5%), esta diferencia es estadísticamente significativa ($p < 0.05$), con lo cual, podemos afirmar que la prevalencia de sobrepeso en niños de 5-11 años aumentó. En cambio, las prevalencias de obesidad (18.6%) son muy similares a las observadas en 2012 (17.4%). En 2016, se observó una prevalencia mayor de obesidad en el género masculino en comparación con el género femenino, siendo del 18.3% y del 12.2% respectivamente.

Además del riesgo de ser un adulto obeso, la obesidad en la niñez tiene consecuencias negativas de manera inmediata sobre la salud, entre ellas la dislipidemia, la hipertensión, la intolerancia a la glucosa, así como también desórdenes hepáticos (hígado graso no alcohólico) y endócrinos (Síndrome de ovario poliquístico). El elevado costo de la presencia de obesidad durante la niñez es considerable, lo que se reflejará en problemas de salud cuando se conviertan en adultos (Hernández-Cordero y cols., 2017).

1.3. La obesidad y sus complicaciones

La obesidad es una condición pro-inflamatoria en la cual los adipocitos hipertróficos y las células residentes del TAB contribuyen al aumento de los niveles circulantes de citocinas pro-inflamatorias. La obesidad está asociada a un estado de inflamación sistémica de bajo grado llamado "inflamación

metabólica”, la cual es considerada el detonante de la RI en humanos y roedores (Gregor y Hotamisligil, 2011; Ouchi y cols., 2011; Hotamisligil, 2006; Shoelson y cols., 2006). Entre las principales manifestaciones del estado pro-inflamatorio podemos mencionar a la RI, la disfunción endotelial (DE) y la alteración en la síntesis y secreción de adipocinas por parte del TA, las cuales, pueden dar origen a enfermedades tales como síndrome metabólico, ECV, cáncer, dislipidemia etc. (Segula, 2014). La importancia del estudio de la obesidad en la infancia radica en la asociación encontrada con factores de riesgo cardiometabólicos como hipertensión, dislipidemia e hiperinsulinemia que se ven reflejados en la vida adulta en la aparición de ECV. Además, padecer obesidad durante la infancia es un factor de riesgo asociado con la mortalidad por ECV en la vida adulta independientemente de la presencia de obesidad (Kelishadi y cols., 2015).

Se ha reportado que individuos con obesidad son más susceptibles de presentar factores de riesgo cardio-metabólicos. La gran mayoría de los estudios reportados se centran en adultos. El Bogalusa Heart Study mostró que la presencia de obesidad central, la cual fue determinada por la CC en individuos con edades comprendidas entre 5-17 años de edad está asociada con concentraciones anormales de triglicéridos (TGs), lipoproteínas de baja densidad (LDL del inglés, *Low Density Lipoproteins*), lipoproteínas de alta densidad (HDL, del inglés *High Density Lipoproteins*) e insulina (Freedman y cols., 2007), la obesidad abdominal está más estrechamente relacionada a factores de riesgo cardiovascular que la obesidad generalizada. Las dislipidemias son un grupo de alteraciones que se manifiestan en el perfil de lípidos y se ha asociado con obesidad abdominal.

1.3.1. Dislipidemias

Se ha observado de manera general, que los pacientes obesos presentan anomalías en el perfil de lípidos, donde los TGs, lipoproteínas de muy bajas densidad (VLDL, del inglés *Very Low Density Lipoproteins*) apolipoproteína B (Apo B) y el colesterol se encuentran elevados, mientras que el HDL se encuentra disminuido. De manera general, los niveles de las LDL, se encuentran en el rango normal, pero se presenta un incremento en las partículas pequeñas

de LDL, las cuales, se considera son más pro aterogénicas que las LDL debido a que tienen una afinidad menor al receptor de LDL, lo cual resulta en el aumento del tiempo de permanencia en circulación, además, logran atravesar la pared arterial más fácilmente que las partículas LDL y pueden unirse a los proteoglicanos intra-arteriales quedando atrapadas y, finalmente, estas moléculas son muy susceptibles de oxidación y se aumenta la captura por medio de los macrófagos. Los niveles post prandiales de TGs también están aumentados y los quilomicrones remanentes también son pro aterogénicos. Aproximadamente, el 60-70% de los pacientes obesos presentan anormalidades en el perfil de lípidos y los pacientes con sobrepeso entre un 50-60%. El aumento del riesgo para desarrollar ECV en pacientes obesos se debe parcialmente a la dislipidemia, así como a la RI (Bays y cols., 2013; Poirier y cols., 2006). Al igual que para el diagnóstico de obesidad, los criterios para establecer la presencia de dislipidemia en población infantil y adolescente son diferentes a los empleados en adultos, en la tabla 5 se muestran los valores propuestos por el NCEP-ATP-III para el diagnóstico de dislipidemias en niños y adolescentes.

Tabla 5. Criterios establecidos para el diagnóstico de dislipidemias en niños y adolescentes de acuerdo con NCEP-ATP-III.

| Categoría | Diagnóstico de dislipidemias | | |
|------------|------------------------------|---------|------|
| | Aceptable | Límite | Alto |
| Colesterol | <170 | 170-199 | ≥200 |
| LDL | <110 | 110-129 | ≥130 |
| TGs | | | |
| 0-9 años | <75 | 75-99 | ≥100 |
| 10-19 años | <90 | 90-129 | ≥130 |
| Categoría | Aceptable | Límite | Bajo |
| HDL | >45 | 40-45 | <40 |

LDL lipoproteínas de baja densidad; HDL lipoproteínas de alta densidad, TGs triglicéridos. Los puntos de corte se establecieron a partir de los percentiles 75 y 95 respectivamente. Los puntos de corte para HDL representan aproximadamente el percentil 10. Modificado de: Expert Panel on Integrated guidelines for Cardiovascular Health and Risk Reduction in Children and Adolescents (National Heart, 2011).

Además de las dislipidemias, existen otras comorbilidades de la obesidad, entre ellas, la RI.

1.3.2. Resistencia a la insulina

La RI es una de las principales complicaciones de la obesidad, la cual se define clínicamente como la incapacidad de una cantidad conocida de insulina exógena o endógena para aumentar la captación y utilización de glucosa en un individuo sano (Makkiy cols., 2013).

El término "RI" hace referencia a la resistencia que ejerce la insulina para llevar a cabo sus funciones fisiológicas sobre la captación, metabolismo o almacenamiento de glucosa. En el músculo esquelético, la RI se manifiesta por una disminución en la captación de glucosa dando por resultado alteraciones en la vía de señalización de ésta y defectos intracelulares post-receptor entre los que podemos mencionar, disminución del transporte de glucosa, fosforilación y oxidación, así como en la síntesis de glucógeno (Abdul-Ghani y Defronzo, 2010).

El mecanismo por el cual la obesidad causa RI en músculo esquelético está relacionado con la acumulación de grasa en los miocitos. Diversos estudios en biopsia de músculo han demostrado que existe un aumento de TGs en el músculo esquelético de sujetos sin tolerancia a la glucosa comparados con sujetos delgados y se demostró una relación inversa entre la sensibilidad a la insulina muscular y el contenido intramuscular de estos (Pan y cols., 1997; Phillips y cols., 1996). En estudios posteriores analizaron la contribución de grasa muscular dentro de la fibra muscular (intramiocelar) o fuera de ella extracelular (extramiocelar) y encontraron que la grasa intramiocelar contribuye sólo con el 1% de la grasa total presente en el músculo, sin embargo, correlaciona de manera importante con la RI de manera independiente de la cantidad corporal de grasa, mientras que la grasa extramiocelar no presenta correlación con la RI (Krssak y cols., 1999; Perseghin y cols., 1999).

La relación existente entre TA y RI se ha observado en diferentes grupos étnicos y en diferentes rangos de peso corporal. Diversos estudios han demostrado que el riesgo de desarrollar RI y posteriormente diabetes se asocia con el contenido de grasa corporal, usando como marcador de adiposidad el IMC. Sin embargo, la disposición de los depósitos de TA en el cuerpo presentan un papel importante

en la aparición de estas patologías, se ha descrito que la obesidad central está asociada de manera más fuerte a la RI, la diabetes y la ECV que los depósitos de grasa periféricos, por ejemplo en glúteos o subcutáneo (Kissebah y Krakover, 1994).

El mecanismo mediante el cual se genera la RI se ha estudiado ampliamente y se ha observado que la RI se presenta con mayor frecuencia en los sujetos que presentan obesidad abdominal respecto a aquellos que tienen obesidad periférica. La explicación que se ha dado acerca de este fenómeno es que el tejido adiposo abdominal (TAA) expresa un mayor número de genes que codifican para proteínas responsables de la producción de energía, por ejemplo, la producción de adiponectina es mayor en los adipocitos del TAA que en el tejido adiposo subcutáneo (TAS), además, el TAA es más lipolítico que el TAS y es menos sensible al efecto antilipolítico de la insulina (Krssak y cols., 1999). Para entender un poco acerca de la importancia de la RI, se dará una breve reseña de la insulina, así como su mecanismo de acción.

1.3.2.1. Generalidades de la insulina

La insulina es una hormona descrita por primera vez en 1921 por Banting y Best (Rosenfeld, 2002), está formada por dos cadenas polipeptídicas, la A cuenta con 21 aminoácidos y la B con 30, ambas cadenas están unidas entre sí por puentes disulfuro, además, la cadena A posee enlaces disulfuro de manera intracatenaria. La síntesis de insulina se lleva a cabo en las células β pancreáticas en forma de pre-proinsulina, poco tiempo después de la síntesis esta molécula es liberada al retículo endoplásmico donde por medio de enzimas proteolíticas se convierte en proinsulina. La proinsulina posee una cadena C que es la que une las cadenas A y B, es transportada hacia el aparato de Golgi en microvesículas. Finalmente, la conversión de proinsulina a insulina esta mediada por la acción de las enzimas convertasa 2 y 3 y por la carboxipeptidasa. Posteriormente, los gránulos maduros son translocados con ayuda de los microtúbulos y los microfilamentos (Joshi y cols., 2007). En la figura 3 se muestra de manera detallada la síntesis de insulina

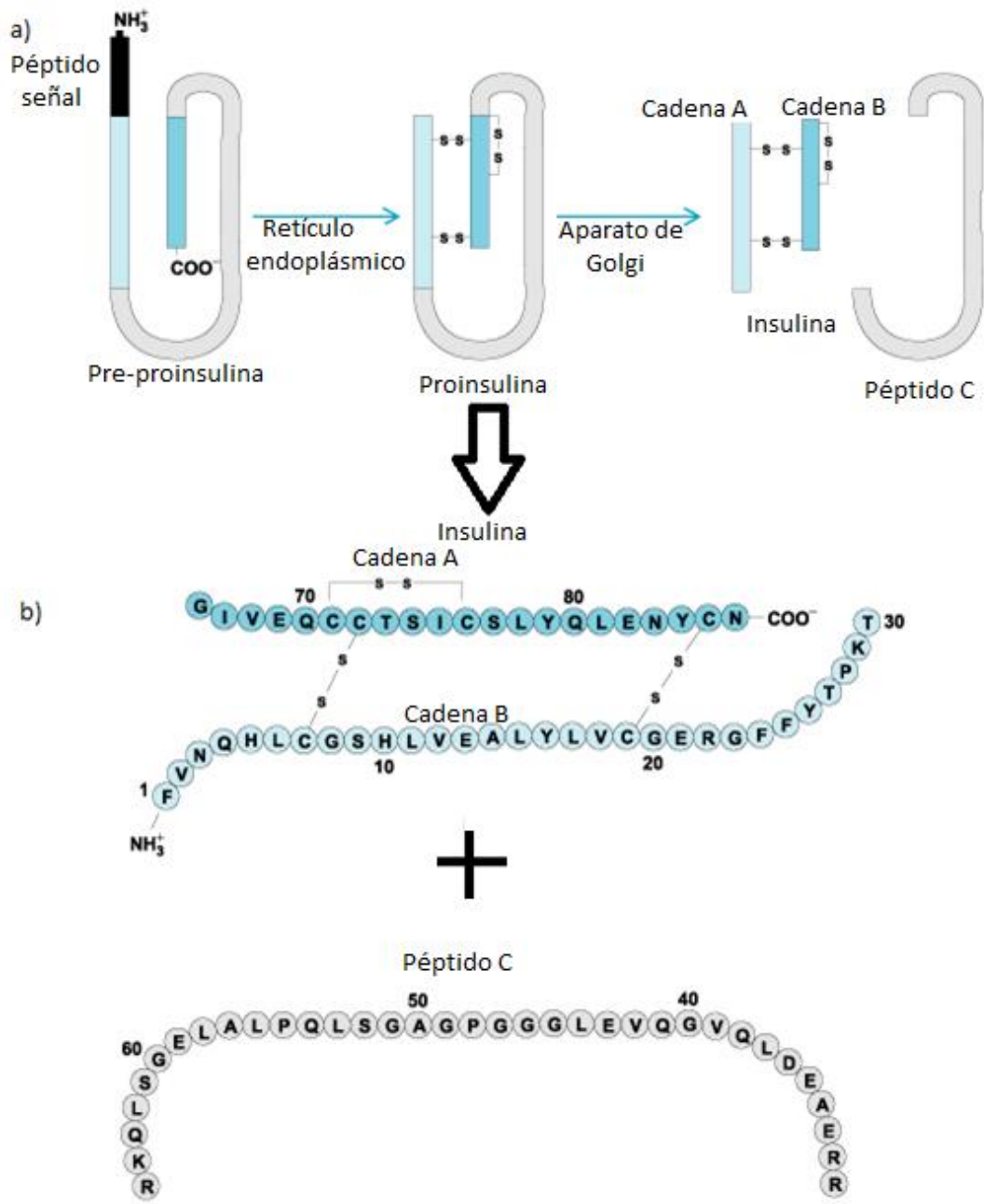


Figura 3. Síntesis de insulina. a) Síntesis de insulina en células β pancreáticas a partir de pre-proinsulina. b) Se muestran de manera detallada los aminoácidos que comprenden los productos de la acción de las convertasas 2 y 3, insulina y Péptido C. Modificada de: https://www.google.com.mx/search?q=insulin+synthesis&tbm=isch&source=lnms&sa=X&ved=0ahUKEwiln7LU4YrZAhUJDKwKHetRBNgQ_AUICigBy&biw=1280y&bih=918y&dpr=1#imgrc=4RzoMR-PMtQldM

La insulina es secretada por las células β en respuesta a varios estímulos, entre ellos la glucosa, la arginina, las sulfonilureas y algunos agentes farmacológicos y endócrinos (Joshi y cols., 2007) y posee diversos efectos metabólicos que son mediados por una amplia gama de acciones tejido específico que involucran

cambios en la fosforilación de las proteínas, en su función, así como cambios en la expresión génica. La importancia biológica de las acciones de la insulina se evidencia por el hecho de que las vías de señalización de la insulina que inician estos eventos están altamente conservadas en las especies a través de la evolución, desde *C. elegans* hasta el humano (Paradis y Ruvkun, 1998).

La insulina presenta un papel crítico dentro de la regulación de la biología de los adipocitos, siendo éstos uno de los tipos celulares que presentan mayor respuesta a las acciones de la insulina. La insulina promueve el almacenamiento de TGs en el adipocito a través de diversos mecanismos entre los que se incluyen, la diferenciación de preadipocitos a adipocitos; en los adipocitos maduros estimula el transporte de glucosa y la síntesis de TGs (lipogénesis), inhibe la lipólisis, aumenta la captación de ácidos grasos derivados de las lipoproteínas circulantes producidos por la activación de la lipasa en el TA (Paradis y Ruvkun, 1998).

El transporte de la glucosa es un paso importante en el metabolismo celular ya que controla la tasa de utilización de ésta. En músculo esquelético y TA se expresan tres isoformas del transportador de glucosa: GLUT 1, GLUT3 y GLUT4, mientras que en páncreas, células renales e intestino es el GLUT2 el que participa en el transporte de glucosa (Leturque y cols., 2005). La insulina aumenta la tasa de captación de glucosa principalmente por la translocación de la isoforma GLUT4 hacia la membrana celular. La insulina incrementa la glucólisis mediante el aumento del transporte de glucosa y de la actividad de las enzimas hexocinasa y 6-fosfofructocinasa (Dimitriadis y cols., 2011).

La insulina participa de manera activa en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. A continuación, se mencionan las principales acciones biológicas de la insulina. Metabolismo de carbohidratos: aumenta la tasa de transporte de glucosa a través de la membrana celular en músculo y TA; incrementa la glucólisis mediante la activación de la hexocinasa y la 6-fosfofructoquinasa; aumenta la síntesis de glucógeno en hígado, TA y músculo, por mencionar algunos; en el hígado inhibe la glucogenólisis y la gluconeogénesis. La acción hipoglucemiante de la insulina es el resultado de la

supresión de la producción de glucosa a nivel hepático e incremento de la captación de glucosa en el músculo y el TA. El metabolismo lipídico disminuye la lipólisis en TA, reduciendo las concentraciones plasmáticas de lípidos; aumenta la síntesis de AGL y TGs; favorece la formación de VLDL en hígado; disminuye la oxidación de ácidos grasos en hígado y músculo y aumenta la síntesis de colesterol hepático. Respecto al metabolismo de proteínas, aumenta el transporte de aminoácidos hacia los tejidos, la síntesis de proteínas en músculo, TA, hígado y otros tejidos y disminuye la degradación proteica en el músculo y la formación de urea. Por las acciones que lleva a cabo la insulina, es catalogada como una hormona anabólica (Dimitriadis y cols., 2011). Durante la obesidad, además de la alteración en la concentración y acción de la insulina se manifiesta un desequilibrio en la concentración sérica de otras moléculas implicadas en el proceso de regulación del peso corporal y homeostasis energética y metabólica.

Gran parte de estas moléculas son sintetizadas por el TA, que anteriormente era considerado únicamente un reservorio de energía, y actualmente se sabe que es el órgano endocrino más grande y que es capaz de liberar proteínas mediadoras y de señalización que funcionan como puente de comunicación entre éste y otros tejidos (Lehr y cols., 2012).

1.4. Tejido adiposo clasificación y generalidades

De acuerdo con sus diferencias morfológicas, de distribución corporal, de expresión de genes y de función, el TA se puede dividir en TA marrón o pardo (TAM), tejido adiposo beige (TABe) y TA blanco (TAB). El TAM era considerado un tejido característico de los animales hibernantes, actualmente se sabe que está presente en roedores y en pequeños mamíferos, incrementándose en aquellos adaptados al frío y en neonatos. En la mayoría de los mamíferos, es responsable del calor que da origen a la fiebre, además, en el estado de hibernación y durante la exposición al frío induce la termogénesis.

Chartoumpekis y cols. (2011) demostraron, mediante un estudio realizado en ratones de la cepa C57BL/6J que la exposición al frío, así como la estimulación β -adrenérgica causa un incremento en los niveles de mRNA de FGF21 (del inglés, *Fibroblast Growth Factor-21*, Factor de crecimiento de fibroblastos 21), una proteína pleiotrópica involucrada en el metabolismo de lípidos y la homeostasis energética, pero no se observó un incremento significativo de ésta en plasma. Posteriormente, se demostró que en humanos actúa como facilitador de la termogénesis inducida por frío, reportan, además, un incremento de 10-15 veces más del consumo de glucosa en esta condición que a temperatura ambiente (Hanssen y cols., 2015), se ha observado que otros compuestos como la irisina (originada en músculo esquelético) también presenta efecto sobre el TAM modulando la actividad simpática (Cereijo y cols., 2015).

Por otro lado, el TAM es rico en Proteína Desacoplante-1, (UCP-1, por sus siglas en inglés *Uncoupling Protein-1*) (Cannon y Nedergaard, 2004; Ricquier y cols., 1982) o termogenina, la cual es una proteína mitocondrial intramembranal que se encuentra de manera exclusiva en los adipocitos marrones. Cuando la noradrenalina se libera en respuesta al frío, se une a receptores β -adrenérgicos en la superficie de adipocitos marrones y se desencadena la activación de la enzima adenilato ciclasa, la producción de cAMP (AMP cíclico) y la activación simultánea de la cinasa dependiente de cAMP (PKA), dando origen a la fosforilación y activación de la lipasa sensible a hormonas. Los ácidos grasos liberados por acción de esta lipasa se unen a la termogenina iniciando un desacoplamiento del gradiente de H^+ y la liberación de la energía del gradiente en forma de calor. (Palou y cols. 1998).

Respecto a la morfología, los adipocitos del TAM tienen en promedio, un diámetro más pequeño que los del TAB, tienen vesículas lipídicas de diferentes tamaños, presentan abundante citoplasma, un núcleo esférico y excéntrico y un gran número de mitocondrias (Bernlohr y cols., 2011; Saely y cols. 2011). El color del TAM se deriva de la extensa vascularización y de la presencia de las mitocondrias densamente empaquetadas. El TAM posee una mayor vascularización que el TAB, lo que se traduce en una respuesta más rápida a la estimulación de sistema nervioso simpático provocando la producción de calor y

la síntesis de UCP-1 (Caruso y cols., 2010), además, los vasos sanguíneos participan en la liberación de combustible para almacenamiento y oxigenación y en la disipación del calor generada por las mitocondrias a otras partes del cuerpo (Kiess y cols., 2008). En los seres humanos, es difícil encontrar TAM postnatalmente, sin embargo, empleando tomografía por emisión de positrones se han observado depósitos de TAM activos en las regiones paraventral, supraclavicular, cervical y axilar en población adulta (Caruso y cols., 2010).

Tanto en roedores como en humanos, los depósitos de TAM y TAB se encuentran localizados en diferentes regiones anatómicas. Sin embargo, hace aproximadamente 30 años se reportó la presencia de algunas células multiloculares (características del TAM), que presentan grandes cantidades de UCP-1 en el TAB de ratones, ratas y gatos. Además, estas células cobraron relevancia al comprobarse que pueden ser estimuladas por el frío y de igual forma en roedores tratados con agonistas de los receptores β -adrenérgicos que elevan las concentraciones intracelulares de cAMP (Adenosín monofosfato cíclico), como CL316 y CL243 (Wu y cols., 2013). A este tejido adiposo se le ha denominado tejido adiposo beige.

Estos adipocitos se presentan en el TAB derivados de precursores celulares diferentes a los del TAM y son más cercanos al linaje celular del TAB. Por otro lado, se ha reportado la expresión de genes diferentes entre el TAM y TABe que nos permite diferenciar ambos tipos celulares. Estos genes están involucrados en distintas funciones: actúan como factores de transcripción (Zic1 y Tbx15), proteínas asociadas al metabolismo (Slc27a 1) o a vías inflamatorias (CD 40 y CD 137) (Giralt y Villarroya, 2013).

Sin embargo, las células del TAM y del TABe poseen ciertas características y por lo tanto, deberían ser consideradas diferentes tipos celulares, en primer lugar, las células del TABe, al menos en los depósitos de TAS en el ratón, no derivan de los mismos precursores embrionarios que dan lugar a los adipocitos del TAM; segundo, un número importante de loci están asociados con el desarrollo inducido de adipocitos del TABe pero no de adipocitos del TAM; tercero, el TABe y TAM expresan algunos genes diferentes; cuarto, existe una

notable diferencia en ambos tipos celulares, ya que los adipocitos del TAM expresan altos niveles de UCP-1 y otros genes termogénicos en condiciones basales, mientras que en los adipocitos del TABe se expresan sólo bajo condiciones de estimulación tales como el tratamiento con agonistas β -adrenérgicos o PPAR- γ . El TABe se está estudiando como un posible blanco terapéutico para la pérdida de peso (Harms y Seale, 2013).

Los adipocitos presentan la habilidad de reprogramar su fenotipo de manera reversible en función de las necesidades corporales, así, la exposición de manera crónica al frío favorece la transdiferenciación de adipocitos marrones a blancos o si es necesario aumentar el almacenamiento de energía se presenta la transdiferenciación de adipocitos marrones a blancos (Giralt y Villarroya, 2013). Incluso, durante la gestación, algunos adipocitos blancos (los autores proponen que sean llamados “rosas”) presentes en los depósitos subcutáneos de ratones hembra preñadas se diferencian de manera progresiva hacia la producción y secreción de leche (Giordano y cols., 2016).

En lo referente al TAB, es el principal reservorio de energía en forma de ácidos grasos libres (AGL), se ha reportado que, en población adulta en condiciones de peso normal, constituye como máximo el 20% del peso corporal (Park y cols., 2014). Múltiples evidencias demuestran que secreta más de 600 proteínas (Lehr y cols., 2012) entre ellas hormonas y moléculas de señalización, llamadas en general adipocinas, las cuales, pueden ejercer sus funciones biológicas de manera autocrina, paracrina o sistémica y tienen influencia sobre diversas vías como la homeostasis de la glucosa y la inmunidad. Las adipocinas provenientes del TAB pueden presentar propiedades anti-inflamatorias o pro-inflamatorias (Waki y Tontonoz, 2007).

El TAB de los sujetos delgados secreta preponderantemente adipocinas anti-inflamatorias como la adiponectina, apelina, factor de crecimiento transformante β (TGF- β , del inglés *Transforming Growth Factor- β*), interleucinas (IL) IL-4, IL-10, IL-13 y antagonista del receptor IL-1 (IL-1 Ra), entre otras. En los sujetos obesos, el TAB libera principalmente citocinas pro-inflamatorias como leptina, IL-6, Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF- α del inglés, *Tumor Necrosis Factor- α*),

visfatina, resistina, angiotensina II e inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1, del inglés *Plasminogen Activador Inhibidor-1*) (Ouchi y cols., 2011). En los sujetos delgados, las adipocinas anti-inflamatorias intervienen en funciones fisiológicas, pero en enfermedades metabólicas las que actúan son las adipocinas pro-inflamatorias dando origen a la RI ya sea afectando de manera directa la vía de señalización de la insulina o mediante la estimulación de vías de señalización pro-inflamatorias (Tilg y Moschen, 2008). La inflamación asociada a obesidad ocurre en estadios que se caracterizan por una remodelación del TAB, manifestándose un incremento en el número de adipocitos (hiperplasia) y un incremento del tamaño de estos (hipertrofia), infiltración de macrófagos y fibrosis. La hipertrofia es causada por dos factores: a) aumento de grasa en forma de adipocitos diferenciados y b) aumento de la expresión de mediadores pro-inflamatorios. Por otro lado, los adipocitos hipertrofos modifican el balance de citocinas creando en el tejido un ambiente responsable de la modificación del TAB en donde un grupo de macrófagos tipo 2 (M2), favorecen la expresión de mediadores pro-inflamatorios. En el TAB de sujetos obesos, existen estructuras conocidas como “estructuras en forma de corona” las cuales se conforman por adipocitos necróticos y fragmentos celulares adipocitarios, con lo cual, la infiltración de macrófagos M2 se aumenta, se ha descrito que algunas citocinas, así como sus receptores y moléculas de adhesión están involucradas en este proceso (Caruso y cols., 2010). El TAB se encuentra distribuido en diferentes sitios anatómicos. Se encuentra mayormente en la región intra abdominal (intestinos y áreas peri renales) y subcutánea (nalgas, muslos y abdomen). (Gesta y cols., 2007). El exceso de tejido adiposo da origen a la obesidad y conlleva el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas que disminuyen considerablemente la calidad de vida de los pacientes.

1.4.1. Anormalidades en las concentraciones de adipocinas

Desde el descubrimiento de la leptina en 1994, el TA ha sido objeto de un amplio trabajo de investigación, a través del cual se conoce la capacidad de los adipocitos de sintetizar y secretar sustancias biológicamente activas llamadas “adipocinas”. Dentro de este grupo de adipocinas se encuentran una vasta gama de citocinas, hormonas y enzimas que desempeñan un papel importante en una

extensa variedad de funciones biológicas, por ejemplo, la regulación del apetito, la homeostasis energética, la homeostasis vascular, la presión sanguínea y los procesos inmunes e inflamatorios, así como en el metabolismo de grasas y carbohidratos. Estos cambios pueden predisponer al desarrollo de RI, hipertensión e inflamación (Korek y Krauss, 2015). Se sabe que las adipocinas actúan a nivel local y sistémico y que expresan una gran variedad de receptores que les permiten responder a señales de otros sistemas hormonales y también del sistema nervioso central (SNC). Con la capacidad de responder a señales aferentes y eferentes el TA forma parte de una gran vía de comunicación entre un gran número de órganos. Este sistema global de respuesta resulta en la diversidad fisiológica de las adipocinas (Khan y Joseph, 2014). En las personas obesas, la secreción de adipocinas presenta anomalías, resultado del exceso de TA. Entre las más estudiadas en el contexto de obesidad han sido la leptina y la adiponectina, las cuales desarrollan un papel importante en la regulación del peso corporal y en la saciedad, y son marcadores confiables de adiposidad en humanos (Zhang y cols., 2017; Guenther y cols., 2014; Jéquier, 2002). Matsubara y cols. (2002) demostraron que en mujeres con peso normal no diabéticas la adiponectina se encuentra alta y la leptina baja y que esta relación se invierte cuando se evalúa en condiciones de obesidad y diabetes.

1.4.1.1. Leptina

La palabra leptina viene del griego *leptos* que significa “delgado”, esta hormona es producto del gen *Ob*, el cual está localizado en el cromosoma 7 y está formado por tres exones y dos intrones (Wasim, 2015). Esta hormona es secretada principalmente por el TAB y en menor grado en el hipotálamo, el epitelio gástrico, la placenta y en las gónadas; en los humanos se encuentra aumentada durante la obesidad y correlaciona de manera directa con la adiposidad, disminuyendo cuando se presenta pérdida de peso (Makki y cols., 2013). La leptina ha cobrado relevancia debido a que presenta efectos pleiotrópicos entre los que se incluyen la sensación de saciedad, el gasto energético y la función neuroendocrina (Friedman, 2000). Esta adipocina podría tener un papel preponderante en el desarrollo de ECV (González y cols., 2013). Existe evidencia que la involucra en la patogénesis de enfermedades inflamatorias y autoinmunes ya que es capaz

de activar al sistema inmune y por ende sus mediadores inflamatorios (Cojocarú y cols., 2013). En pacientes con enfermedad renal terminal la concentración sérica de leptina se encuentra elevada (Merabet y cols., 1997) y se reportó una correlación positiva con RI (Osegbe y cols., 2016; Wang y cols., 2013). La leptina actúa sobre dos tipos neuronales presentes en el núcleo arcuato a nivel hipotalámico. Estos circuitos neuronales se activan a través de la unión de la leptina a sus receptores LepRb (del inglés, *Leptin receptor b*). Una vez que la leptina se une a su receptor (LepRb), inhibe la acción de NPY (Neuropéptido Y) y AgRP (Péptido Relacionado con el Gen Agouti); se activa a la POMC (Proopiomelanocortina) y CART (Transcripto Regulado por Anfetaminas y Cocaína); estos cuatro factores tienen efecto sobre α -MSH (Hormona Estimulante de Melanocitos) y orexina en el hipotálamo lateral y sobre CRH (Hormona Liberadora de Corticotropina) en el núcleo paraventricular. La perfecta homeostasis entre estos sistemas produce: disminución en los niveles de glucosa, insulina y lípidos; aumento de hormonas tiroideas y reproductivas; produce sensación de saciedad y estimula la termogénesis (Almanza-Pérez y cols., 2008). En la figura 4 se muestra el mecanismo de acción de la leptina y sus efectos en peso normal y sobrepeso.

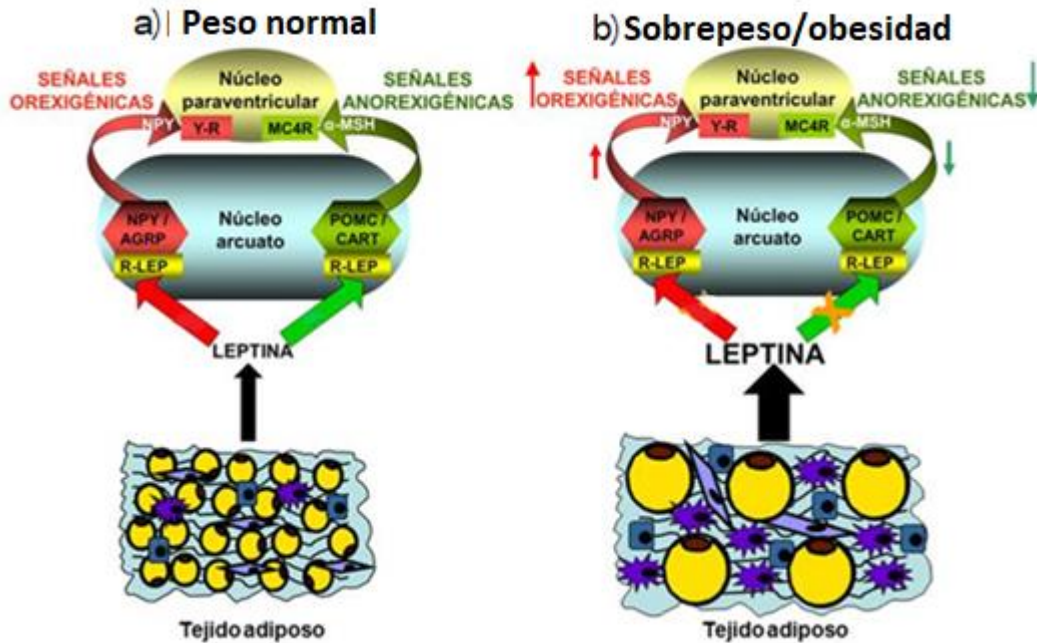


Figura 4. Mecanismo de acción de la leptina en individuos con: a) Peso normal; B) Sobrepeso u obesidad. R-LEP: Receptor de leptina; AGRP: Péptido Relacionado al Gen Agouti; NPY: Neuropeptido Y; CART: Transcrito Regulado por Anfetaminas y Cocaína; POMC: Proopiomelanocortina; Y-R: Receptores de NPY y AGRP; α -MSH: Hormona Estimulante de Melanocitos- α ; MC4R: Receptor 4 de Melanocortina.

1.4.1.2. Adiponectina

La adiponectina fue descrita casi de manera simultánea por 4 grupos de investigación (Breitfeld y cols., 2012). Es producto del gen *AdipoQ* que se localiza en el cromosoma 3q27, el cual está conformado por tres exones (Disponible en: <http://www.ensembl.org/index.html>; ENSG00000181092). La adiponectina, también conocida como GBP-28, Acrp-30, aPm1 o AdipoQ, circula en concentraciones altas en humanos y en ratones; representa cerca del 0.01% del total de las proteínas plasmáticas. El rango de concentración de la adiponectina en humanos es de 2-30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y es generalmente mayor en las mujeres que en los hombres. La adiponectina es secretada por el TAB, sin embargo, se ha demostrado su presencia en fluido cerebroespinal de roedores y humanos (Dridi y Taouis, 2009), además, es la única adipocina que se regula de manera negativa respecto a la obesidad, se han observado bajos niveles de esta hormona en obesidad y RI. Esta adipocina posee diversas funciones que son llevadas a cabo mediante la unión a sus receptores AdipoR1 (del inglés,

Adiponectin Receptor 1) y *AdipoR2* (del inglés, *Adiponectin Receptor 2*) (Lehr y cols., 2012), entre ellas podemos mencionar: aumento en la captación de glucosa en músculo, en la actividad de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS del inglés, *endothelial-Nitric Oxide Synthase*), en la β -oxidación, en la proliferación de macrófagos M2; disminución de: lipogénesis, producción de especies reactivas de oxígeno y mejoría en la RI (Ruan y Dong, 2016; Dridi y Taouis, 2009). La adiponectina ejerce un papel regulatorio sobre la sensibilidad a la insulina, así como una influencia directa sobre la secreción de ésta (Nagaraju y cols., 2016). En la figura 5 se muestra el mecanismo de acción y los efectos de la adiponectina en peso normal y sobrepeso u obesidad.

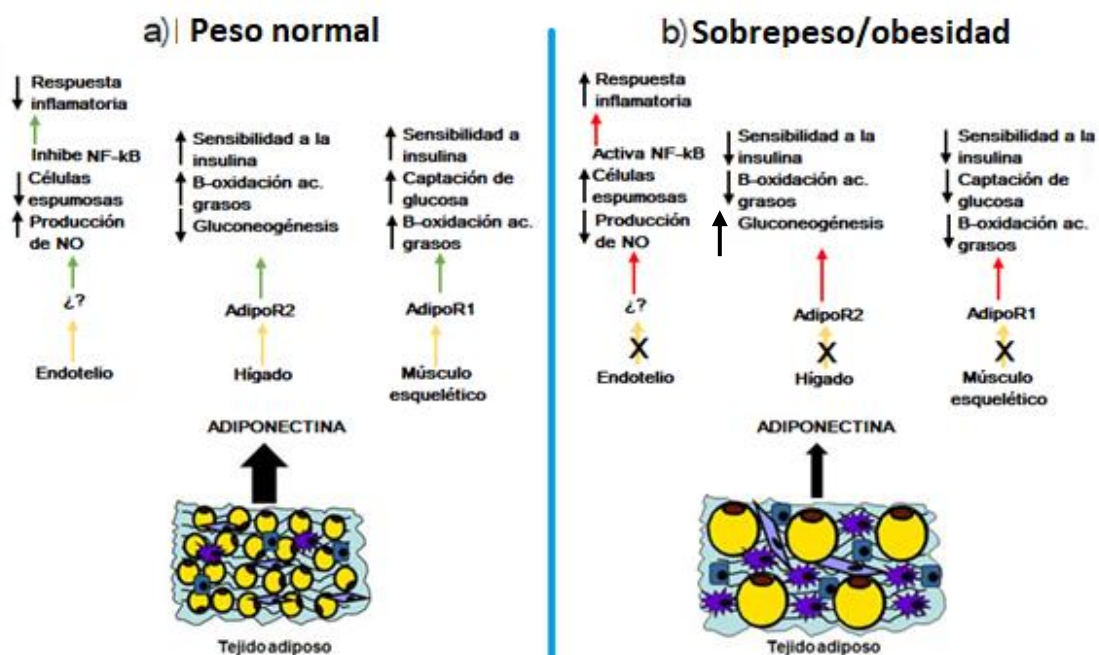


Figura 5. Mecanismo de acción de la adiponectina en a) Peso normal; B) Sobrepeso u obesidad. AdipoR1: Receptor 1 de adiponectina; AdipoR2: Receptor 2 de adiponectina; NF-kB: vía de señalización pro-inflamatoria.

1.4.1.3. Otras adipocinas

La familia de adipocinas está creciendo debido al descubrimiento de nuevos péptidos. Entre las nuevas moléculas que comienzan a cobrar importancia están la proteína de unión al retinol (RBP-4 del inglés, *Retinol Protein Binding-4*), el factor de crecimiento de fibroblastos-21 (FGF21 del inglés, *Fibroblast Growth Factor 21*) y la dipeptil peptidasa 4 (DPP-4 del inglés, *dipeptidyl peptidase-4*) por

su participación en la patogénesis de desórdenes metabólicos asociados a la obesidad, así para su tratamiento (Korek y Krauss, 2015).

Las adipocinas pueden a su vez dividirse en pro-inflamatorias y anti-inflamatorias. Entre las adipocinas pro-inflamatorias más estudiadas podemos mencionar a la interleucina 6 (IL-6), la cual se expresa de manera importante el TAB y correlaciona de manera positiva con la obesidad. La administración periférica de IL-6 interrumpe la vía de señalización de la insulina debido a un aumento en la expresión de SOCS3 (Supresor de la señalización de citosinas) en los hepatocitos, lo cual sugiere que la obesidad induce la expresión de IL-6 mediante el estado de RI. Por otro lado, los ratones deficientes de IL-6 presentan obesidad e inflamación hepática que se revierte mediante la administración de esta citocina y mejora la sensibilidad a la insulina (Kwon y Pessin, 2013).

El TNF- α fue descrito originalmente como una endotoxina capaz de mediar la necrosis tumoral y el cáncer. Es expresado principalmente por monocitos y macrófagos. Su concentración sérica se encuentra aumentada en los humanos durante la obesidad con lo cual se sugiere que presenta un papel importante en la RI. El tratamiento de líneas celulares y roedores con esta adipocina induce la RI. En pacientes obesos a los cuales se les ha administrado agentes bloqueadores de TNF- α por un período de tiempo corto, se ha observado disminución de la inflamación, pero no mejoría en la sensibilidad a la insulina, en contraste, el tratamiento durante un tiempo prolongado en pacientes obesos con enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide, mejora la sensibilidad a la insulina (Stanley y cols., 2011).

La proteína RPB-4 se expresa en hígado, adipocitos y se encuentra aumentada de manera significativa en roedores y en humanos obesos y diabéticos. Su expresión correlaciona de manera inversa con los receptores GLUT-4 en los adipocitos y la administración de esta adipocina recombinante en ratones normales, es capaz de inducir RI (Yang y cols., 2005). Además, estimula a las células endoteliales para favorecer la producción de moléculas pro-inflamatorias como la Molécula de adhesión vascular (VCAM-1, del inglés *Vascular Cell Adhesion Molecule*) e IL-6 lo que resultan en DE (Farjo y cols., 2012).

La Resistina es una proteína que se ha establecido como un factor inductor de la inflamación pulmonar y de la RI, los monocitos y los macrófagos son su mayor fuente productora en los humanos, sin embargo, en los murinos la expresión se limita a los adipocitos (Benomar y cols., 2013). En ratones Lep/Ob deficientes de resistina muestran una mejoría en la sensibilidad a la insulina y en la tolerancia a la glucosa. Ciertas moléculas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-6, TNF- α y LPS (Lipopolisacárido) inducen la expresión de resistina en macrófagos humanos y esta a su vez, es capaz de estimular las células mononucleares periféricas para producir IL-6 y TNF- α (Qi y cols., 2006).

La mayoría de las adipocinas presentan una actividad pro-inflamatoria a excepción de unas cuantas, como la adiponectina, la Vaspina, la Omentina y la Apelina. De manera general, las proteínas pro-inflamatorias se encuentran aumentadas mientras que las anti-inflamatorias disminuidas en roedores y humanos obesos y esta condición se asocia con la RI (Kwon y Pessin, 2013).

La vaspina se expresa en altas concentraciones en adipocitos de rata y mejora la sensibilidad a la insulina debido a que disminuye la expresión de resistina, leptina y TNF- α , al suprimir la expresión de TNF- α se disminuye la producción de especies reactivas de oxígeno y la adhesión de monocitos (Hida y cols., 2005), sin embargo, en humanos aún no queda claro su papel.

La Omentina-1, es secretada por el TA omental y se expresa mayormente por la fracción celular vascular del estroma omental. Los niveles circulantes de omentina-1 están inversamente correlacionados con obesidad y pueden ser suprimidos por la insulina y la glucosa. En los humanos aumenta la captación de glucosa mediada por insulina; en los adipocitos de tejido subcutáneo y visceral, atenúa la activación de TNF- α y Proteína C reactiva (CRP del inglés, *C-Reactive Protein*) en células endoteliales (Kwon y Pessin, 2013).

La apelina es una proteína que puede ser expresada por diferentes tipos celulares como pulmón, glándula mamaria y testículos, se ha identificado como un ligando endógeno de un receptor huérfano acoplado a proteína G conocido como APJ. La apelina tiene diversas funciones fisiológicas para regular la homeostasis y la frecuencia cardíaca (FC); secretada por los adipocitos y se

encuentra elevada en humanos y roedores que presentan obesidad. En ratones deficientes de esta adipocina y que han sido alimentados con una dieta alta en grasa se ha observado RI, lo cual sugiere que esta proteína mejora la homeostasis de la glucosa y la sensibilidad a la insulina, así mismo, se ha descrito que está involucrada en la respuesta inflamatoria en los sujetos obesos. La concentración de apelina correlaciona de manera positiva con TNF- α y el tratamiento con éste induce la expresión de apelina en TA (Kwon y Pessin, 2013).

Concentraciones elevadas de leptina y disminuidas de adiponectina, reportadas en pacientes con sobrepeso y obesos, se han relacionado con la presencia de alteraciones tales como la hipertensión y el riesgo de desarrollar ECV, patología en la cual tiene un papel preponderante la DE, la cual, es una de sus primeras manifestaciones.

1.4.2. Endotelio y disfunción endotelial (DE)

El endotelio es una capa de células que recubre la superficie luminal de los vasos sanguíneos, a principios de los 80's el enfoque de los investigadores hacia el endotelio cambió de manera radical, ya que era considerado únicamente como el "papel celofán" del árbol vascular, sin otras funciones específicas fuera de controlar la permeabilidad de agua y electrolitos (Rajendral y cols., 2013) a partir de esa década, se lograron grandes avances que permitieron el entendimiento de las funciones tan complejas que desarrolla este órgano endócrino. Las células del endotelio vascular presentan funciones únicas y distintas, entre las que podemos mencionar; la filtración de fluidos, como en el glomérulo renal; mantenimiento del tono de los vasos sanguíneos; homeostasis, reclutamiento de neutrófilos y transporte de hormonas (Durand y Gutterman, 2013).

Las principales funciones del endotelio son: control de los procesos de trombosis y fibrinólisis, interacción de leucocitos y plaquetas con la pared vascular, regulación del tono vascular y de la angiogénesis (Verhamme y Hoylaerts, 2006) y son llevadas a cabo mediante dos vías, una es a través de receptores de membrana afines a diversas moléculas entre las cuales podemos mencionar a

las proteínas, a las partículas transportadoras de lípidos, metabolitos y hormonas y también con ayuda de proteínas específicas de unión y receptores que controlan la interacción intercelular y las interacciones células-matriz celular (Cines y cols., 1998).

En 1980, se describió la existencia de un factor derivado del endotelio que presenta actividad vaso relajante, posteriormente se identificó como Óxido nítrico (NO, del inglés Nitric Oxide). Esta sustancia se sintetiza a partir de la conversión metabólica de L-arginina en L-citrulina, reacción catalizada por la enzima NOS (del inglés, Nitric Oxide Sintasa). Existen tres isoformas de esta enzima, la eNOS (Endothelial Oxide Nitric Sintasa), nNOS (Neuronal Oxide Nitric Sintasa) y la iNOS (Inducible Oxide Nitric Sintasa) (Cruz y cols., 2012).

La eNOS y la nNOS poseen mecanismos de activación constitutivos, la iNOS se expresa en procesos celulares anormales como la insuficiencia cardíaca. La eNOS, que se encuentra principalmente en las células endoteliales en compartimientos llamados caveolas, participa de manera importante en el mantenimiento del tono vascular (Días y cols., 2011).

Otras sustancias vasodilatadoras producidas por el endotelio y que participan de manera importante en el buen funcionamiento de éste, son las prostaglandinas (PG), las cuales, son lípidos autacoides derivados del ácido araquidónico mediante la acción de la isoenzima ciclooxigenasa (COX) y su síntesis es inhibida por fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (AINES), incluyendo el bloqueo específico de COX-2. Se han descrito 4 prostaglandinas bioactivas generadas in vivo: E2 (PGE2), la prostaglandina más abundante y con un gran número de funciones, lleva a cabo efectos pro-inflamatorios o anti-inflamatorios dependiendo del subtipo de receptor, población celular y el contexto de la activación, actúa sobre el músculo liso vascular; prostaglandina D2 (PGD2), producida principalmente por las células cebadas encargadas de iniciar la respuesta aguda alérgica, además, puede estar involucrada en procesos patológicos como el asma; prostaglandina F2 α (PGF2 α), producida por el endometrio durante el ciclo menstrual, cambios en la producción de esta molécula se han asociado a un flujo menstrual anormal y prostaciclina (PGI2),

esta molécula es sintetizada por el endotelio vascular e inhibe la proliferación, diferenciación y migración de células musculares lisas vasculares, inhibe la agregación plaquetaria, presenta un efecto cardioprotector durante el daño por reperfusión e isquemia y es un mediador relevante durante la inflamación aguda y en la transmisión del dolor inflamatorio (Ricciotti y FitzGerald., 2011; Mubarak, 2010).

La DE se define como un desequilibrio en la biodisponibilidad de sustancias bioactivas derivadas del endotelio que predispone a la inflamación, vasoconstricción y al incremento de la permeabilidad vascular y por ende favorece el desarrollo de arterosclerosis, agregación plaquetaria y trombosis (Badimon y Martinez, 2006), debido a lo anterior, la DE es considerada una etapa temprana del proceso aterogénico (McSorley y cols., 2004). Existen varias técnicas para evaluar la DE a nivel pre clínico, entre las más empleadas se encuentra la cuantificación de algunos marcadores séricos, los cuales son moléculas de adhesión que se expresan en la superficie de células endoteliales dañadas, estas moléculas se liberan a la circulación y sus niveles aumentados se asocian a riesgo vascular y arterosclerosis (Jezovnik, 2011), entre estas moléculas se encuentra el sICAM-1 (del inglés *Soluble Intercellular Adhesion Molecule-1*).

1.4.2.1. Molécula soluble de adhesión intercelular-1 (sICAM-1)

La obesidad y la RI están asociadas a niveles elevados de molécula sICAM-1, la cual pertenece a la súper familia de las inmunoglobulinas y es regulada por citocinas pro-inflamatorias. Esta molécula está presente en las placas ateroscleróticas (Sweeney, 2010); se expresa de manera constitutiva en la superficie celular de diversas líneas celulares (Whiteman y cols., 2003). Se ha reportado su presencia en diversos fluidos corporales como: cerebroespinal (Tsukada y cols.,1993), sinovial (Mason, Kapahi, y Haskard, 1993) de lavado bronco alveolar (Shijubo y cols.,1994) así como en orina (Teppo y cols., 2001) y suero (Rothlein y cols., 1991).

La liberación de sICAM-1 está mediada por algunas citocinas y factores, existen moléculas inductoras de la expresión de sICAM-1 como TNF- α , IL-6, IL-1, alcohol y ácidos grasos insaturados y otras fungen como inhibidoras como la IL-10, antioxidantes, insulina (Witkowska y Borawska, 2004) adiponectina (Zhu y cols., 2008; Goldstein y Scalia, 2004; Kubota y cols., 2002).

Ito y cols. (2002) reportaron que mujeres con obesidad, que se sometieron a una dieta equilibrada y a actividad física durante tres meses, además de la pérdida de peso se presentó una disminución en la concentración sérica de sICAM-1. En un estudio realizado por Sweeney (2010) se encontró que la RI se asocia de manera positiva a la concentración de sICAM-1, además, ajustando por edad y género, se observó que los niveles de TGs correlacionaron de manera positiva con el sICAM-1 y de manera negativa con el HDL.

Hoy en día es común el uso de moléculas tales como el sICAM-1 como biomarcadores para establecer DE y enfermedades derivadas de ésta. Recientemente, Dzikowska-Diduch y cols. (2017) reportaron que los sujetos con niveles elevados de sICAM-1 tienen un mayor riesgo de padecer trombosis venosa.

1.5. Interrelación de RI, adipocinas y disfunción endotelial

Se ha observado que aún en la niñez, la obesidad genera un ambiente inflamatorio, tanto en TA, como en la circulación (Sabin y cols., 2006; Sbarbati y cols., 2006; Winer y cols., 2006). La obesidad asociada a inflamación es una condición que se presenta tanto en RI como en el riesgo cardiovascular (Gustafson, 2010). Aunque la obesidad desempeña un papel importante en la fisiopatología de la RI y del riesgo cardiovascular, la RI es un factor de riesgo independiente para el establecimiento de las ECV (Quinones y cols., 2004) y las adipocinas como la leptina y la adiponectina también presentan efectos sobre el endotelio vascular y por ende, sobre el desarrollo de DE. La obesidad y la RI a la insulina pueden contribuir de manera importante al desarrollo de ECV. La obesidad favorece la DE a través del efecto directo de las adipocinas, principalmente el TNF- α , el cual es secretado por el TA debido al reclutamiento

de macrófagos M1 generando de manera indirecta inflamación y DE. Por otro lado, la RI asociada a una disminución de adiponectina y un aumento de IL-6, TNF- α , RBP-4 y AGL, genera estrés oxidativo y por ende DE. La acumulación de TA, la RI y la dislipidemia pueden originar el proceso aterosclerótico. En la figura 4 se muestra como la obesidad, la RI y las adipocinas participan en el proceso de DE (Van Gaal y cols., 2006).

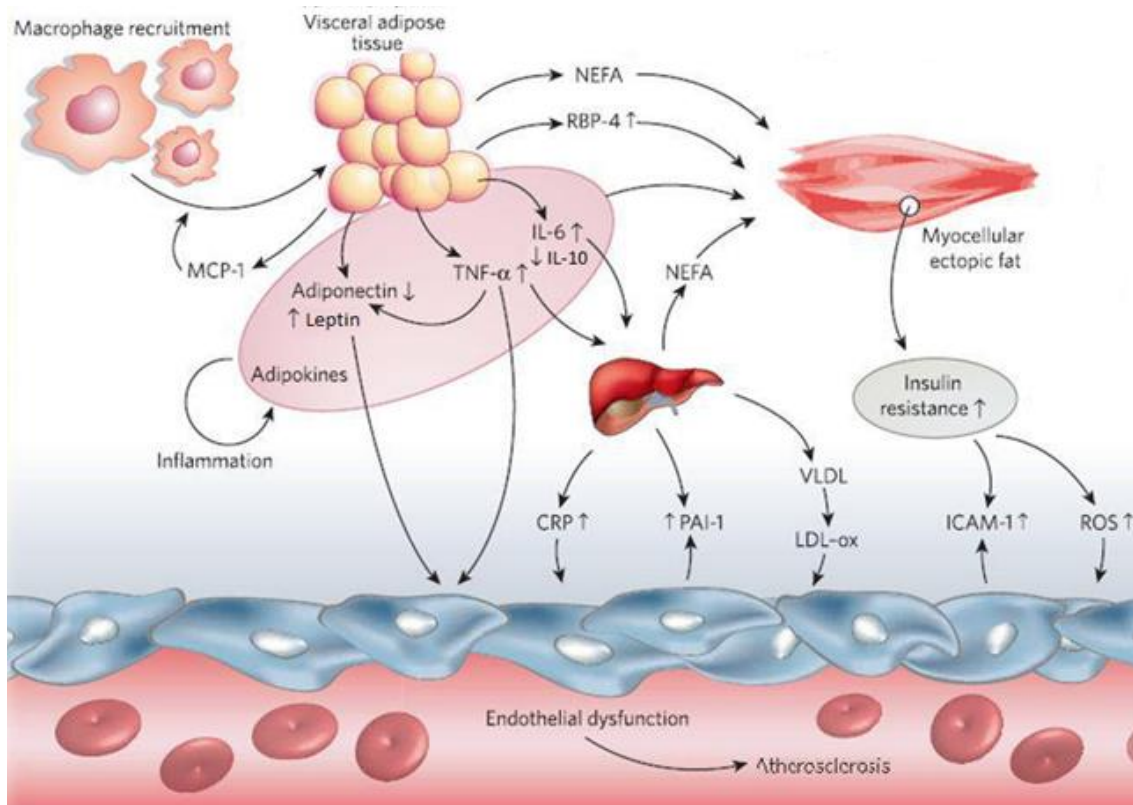


Figura 6. Participación de la obesidad, RI y adipocinas durante el proceso de disfunción endotelial. MCP-1: Monocyte Chemotactic Protein; TNF- α Tumoral Necrosis Factor- α ; IL-6: Interleukin 6; IL-10: Interleukin 10; NEFA: Non- Esterified Fatty Acids; CRP: C - reactive protein; PAI-1: Plasminogen Activator Inhibitor-1; VLDL: Very Low-Density Lipoproteins; LDL-ox: Oxidated-Low Density Lipoproteins; ICAM-1: Intercellular Adhesion Molecule; ROS: Reactive Oxygen Species. Tomado de: Van Gaal y cols. 2006.

1.5.1. Resistencia a la insulina y disfunción endotelial

Se sugiere que la RI es un factor de riesgo que predispone a la arterosclerosis temprana y al desarrollo de ECV, principalmente a través de su asociación con otros factores de riesgo como hipertensión, dislipidemia, hipercoagulabilidad, y DE. Así, la hiperinsulinemia originada por la RI al parecer promueve algunos

marcadores relacionados con la ECV, sin embargo, su papel en niños y adolescentes no es del todo claro (Steinberger y cols., 2009). Se sabe que la insulina ejerce efectos sobre el endotelio vascular y favorece el flujo sanguíneo en TA y músculo debido al aumento en la vasodilatación y el reclutamiento capilar.

El correcto funcionamiento endotelial se debe al balance en la secreción de mediadores vasodilatadores como el NO, las PGI₂ y vasoconstrictores como Angiotensina (Ang II, del inglés *Angiotensin-II*) y la Endotelina 1 (ET-1 del inglés *Endothelin-1*) (Davignon y Ganz, 2004). La insulina es capaz de actuar a través de diferentes vías metabólicas que tienen influencia sobre ambos tipos de mediadores. La activación de la vía PI3-K/Akt favorece la fosforilación de eNOS y la subsecuente conversión de L-arginina en L-citrulina y NO, el cual, es el más importante y potente vasodilatador endógeno, el cual desempeña un rol protector sobre el endotelio ya que disminuye la expresión de moléculas de adhesión celular como el sICAM-1, atenuando la agregación plaquetaria, la producción de citocinas pro-inflamatorias y la inhibición de la proliferación de células espumosas (Hartge y cols., 2007). Una disminución en biodisponibilidad de NO favorece el incremento de marcadores pro-inflamatorios y protrombóticos y de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés, *Reactive Oxygen species*), los cuales son factores asociados a la DE y están mediados a través de la activación de la vía MAPK/ERK. La exposición de células endoteliales a concentraciones elevadas de ácidos grasos no esterificados repercute sobre la función endotelial mediada por insulina, ya que se reduce la producción de NO y, por lo tanto, se presenta una disminución del flujo sanguíneo en los tejidos (Huang y cols., 2007).

Alteraciones en la concentración de adipocinas, RI y DE son tres condiciones patológicas que pueden coexistir y cuya relación causa-efecto no está del todo clara en la infancia.

1.5.2. Leptina y disfunción endotelial

Existe controversia sobre el papel que juega la leptina en la ECV (Hida y cols., 2005). Mediante el uso de modelos murinos de obesidad e hiperleptinemia, se demostró que los efectos de la leptina sobre la vasodilatación son concentración dependiente. Cuando la leptina se encuentra dentro de los parámetros normales (<15 ng/mL) estimula la vasodilatación a través de la liberación NO, pero en condiciones de hiperleptinemia se observa el efecto opuesto. Con ayuda de estudios llevados a cabo *in vivo* e *in vitro* en el contexto de obesidad, se demostró que la leptina previene la vasodilatación inducida por acetilcolina, la cual está mediada por NO. Estudios realizados en ratones Knock out para leptina han generado hallazgos controversiales respecto a si la leptina tiene un efecto protector o dañino para el endotelio vascular (Knudson y cols., 2005).

Al parecer, los efectos de la adiponectina y la leptina sobre la salud y el funcionamiento del endotelio vascular presentan acciones dicotómicas dependiendo del estado metabólico en general o de la patogénesis vascular de forma local. Los efectos de estas adipocinas pueden ser beneficiosas o perjudiciales (Stern y cols., 2016).

1.5.3. Adiponectina y disfunción endotelial

En modelos de roedores y en cultivos celulares de pacientes con ECV se ha evidenciado una disminución en la concentración sérica de adiponectina (Baker y cols., 2006). La adiponectina estimula la angiogénesis *in vivo* e *in vitro* a través de la activación de las vías de AMPK y AKT y de esta manera promueve la síntesis de NO en la célula endotelial (Ouchi y cols., 2004), además, también es capaz de activar la eNOS (Achari y Jain, 2017).

Komura y cols. (2013) realizaron un estudio en ratones deficientes (KO, del inglés *Knock out*) del gen de adiponectina y evaluaron la respuesta vascular inflamatoria inducida por LPS 4 horas después de la administración; los niveles de mRNA de VCAM e ICAM se midieron en la capa íntima de la aorta también en ratones silvestres (WT, del inglés *Wild type*) y encontraron que la adiponectina

se expresa en las células endoteliales de la aorta y que la deficiencia de ésta, causa un incremento significativo de las moléculas de adhesión vascular (VCAM e ICAM) si se administra LPS, el cual, induce el reclutamiento de monocitos al endotelio de manera paralela a la elevación de moléculas de adhesión. En este estudio se observa que la adiponectina presenta un efecto protector sobre la vasculatura durante la iniciación del proceso aterosclerótico.

Por otro lado, se ha descrito la existencia de una correlación inversa en la concentración sérica de adiponectina y la presencia N (epsilon)-(carboximethyl) lisine, molécula perteneciente al grupo de Productos de glicación terminales (AGE's del inglés, *advanced glycation end products*), los cuales son capaces de inducir complicaciones vasculares y se les ha ligado a la diabetes y a un aumento de la aterogenicidad y la inflamación (Del Turco y cols., 2011). Se ha reportado que la adiponectina protege contra la DE producida por las LDLox, efecto debido probablemente al mantenimiento intracelular de los niveles de GSH (glutati6n) (Plant y cols., 2008), el cual posee la acci3n anti oxidante.

2. Obesidad: importancia de la genética y la epigenética en su desarrollo

2.1. Genética y obesidad

La genética tiene un papel importante en el desarrollo de obesidad. Para su estudio a nivel genético, la obesidad se clasifica en obesidad monogénica, debida a la presencia de un solo gen disfuncional, es severa y poco frecuente, y la obesidad poligénica, la cual es causada por alteraciones en varios genes y nos permite estudiar las relaciones entre hormonas y proteínas, es la forma más frecuente de la enfermedad.

Hasta el año 2012, se contaba con la identificaci3n de 7 genes causantes de obesidad monogénica (*LEP, LEPR, POMC, MC4R, PC1, NPY* y *SIM1*) y 6 genes que producen obesidad poligénica (*ADRB1, ADRB2, ADRB3, UCP1, UCP 2, UCP 3*) (Shawky y Sadik, 2012). Algunas formas de obesidad monogénica est3n asociadas a mutaciones en el gen del receptor de Propiomelanocortina (*MC4R* del inglés, Melanocortin 4 Receptor), pero esto s3lo se ha observado en un

porcentaje bajo de pacientes con obesidad mórbida (3-5%) y no todos los individuos con una mutación en este gen presentan obesidad (Munsch y Beglinger, 2005), lo cual sugiere que el desarrollo de obesidad depende de un gran número de genes involucrados en procesos que afectan el almacenamiento de grasa, el gasto energético, la ingesta calórica etc.

Por otro lado, se ha reportado que las mutaciones: R105W, N103K y L72S en el gen *LEP*, se asocian con un fenotipo de obesidad mórbida de origen monogénico en diferentes poblaciones alrededor del mundo. Recientemente, se ha descrito que la mutación denominada H118L se encuentra presente en pacientes chinos con obesidad, no así en los controles (Zhao y cols., 2014).

En lo que respecta a la obesidad poligénica, se ha establecido la participación del receptor adrenérgico β -1 (ADRB1), el cual, está involucrado en la actividad de la enzima adenilato ciclasa. La presencia de la variante génica Gly389Arg ADRB1, genera un aumento en la actividad de la adenilato ciclasa en comparación con la forma 389Arg (Wild type) del gen. El mecanismo de acción de ADRB1 no está del todo claro, sin embargo, se tiene conocimiento de su participación en la lipólisis, el almacenamiento de grasas y en general del balance energético *in vivo* (Dionne y cols., 2002).

Otro tópico importante en el estudio del desarrollo de obesidad, son los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs del inglés, *Single Nucleotide Polymorphism*).

En la tabla 6 se muestra una compilación de genes involucrados en el desarrollo de obesidad a través de polimorfismos (Walley y cols., 2006).

Tabla 6. Genes involucrados de manera directa en el desarrollo de obesidad

| Gen | Nombre proteína/molécula | Localización cromosómica |
|--------|--------------------------------------|--------------------------|
| ADIPOQ | Adiponectina | 3q27 |
| ADRB2 | Receptor β -2 adrenérgico | 5q31-q32 |
| ADRB3 | Receptor β -3 adrenérgico | 8p12-p11.2 |
| DRD2 | Receptor de dopamina | 11q23.2 |
| GNB3 | Prot. De unión al nucleótido guanina | 12p13.31 |
| HTR2C | Serotonina | Xq24 |
| IL6 | Interleucina 6 | 7p21 |
| ACE | Enzima convertidora de angiotensina | 17q24.1 |

Uno de los genes más estudiados en este rubro, es el FTO (del inglés, *Fat Mass and Obesity-Associated*), el cual, brinda evidencia de la importancia en la asociación de algunos polimorfismos existentes de este gen y el desarrollo de obesidad. En un estudio llevado a cabo en Reino Unido en población infantil y adolescente, se encontró que los participantes que tenían el genotipo AA del SNP rs9939609 en este gen, presentaban un riesgo mayor de desarrollar obesidad al mostrar una respuesta menor a la sensación de saciedad (Wardle y cols., 2008), por otro lado, Jacobsson y cols. (2008) reportaron que este SNP sólo se asocia con el aumento de peso e IMC en niñas, no así en niños.

Como se puede observar, el desarrollo de la obesidad presenta una significativa variabilidad genética y ello dificulta enormemente su estudio, debido a que es una enfermedad poligénica e influenciada por el ambiente.

Recientemente, se ha descrito la importancia de la epigenética en el desarrollo de la obesidad y nos ayuda a entender la fisiopatología de la obesidad desde otro punto de vista.

2.2. Epigenética

2.2.1. Definición, clasificación e importancia

La epigenética es el estudio de cambios somáticamente heredables en la expresión génica no relacionados a cambios en la secuencia del DNA (del inglés, *Desoxirribonucleic Acid*). Es un campo de investigación que se está ampliando rápidamente debido al rol determinante que juega en el desarrollo de múltiples enfermedades (Kristensen y cols., 2013). Los cambios epigenéticos son causados por reguladores de la expresión génica que pueden ser transferidos de manera transgeneracional o a través de la división celular, son procesos dinámicos inmersos en una compleja interacción entre el organismo y el medio ambiente (Moosavi y Ardekani, 2016) que se ven reflejados en la diferenciación celular, morfogénesis, variabilidad y adaptabilidad de un organismo los cuales pueden ser modificados por factores genéticos y ambientales (Haluskova, 2010) como: la malnutrición, la obesidad, la actividad física, el estrés y las toxinas. Los cambios epigenéticos temporales a lo largo del genoma pueden influenciar los parámetros metabólicos y pueden ser o no heredables.

Estas modificaciones afectan la expresión génica de forma específica, dependiendo del tipo celular. De manera general, las modificaciones epigenéticas se han clasificado en tres grandes grupos: 1) la modificación postraduccional de las histonas que puede ser por metilación, acetilación, ubiquitinación, sumoilación etc. 2) cambios en la expresión de los ácidos ribonucleicos (RNA, del inglés *Ribonucleic Acid*) pequeños no codificantes y 3) modificación de nucleótidos mediante reacciones de metilación o hidroximetilación. Los RNA pequeños no codificantes, como los microRNAs (miRNAs), regulan la expresión génica ya que pueden favorecer la degradación del mRNA (RNA mensajero) o modular la traducción proteica. Las modificaciones a nivel de las histonas y los nucleótidos regulan la transcripción a través de la conformación de la cromatina, así como el acceso de los factores de transcripción al DNA (Barrés y Zierath, 2016). En la figura 7, se resumen brevemente los mecanismos epigenéticos.

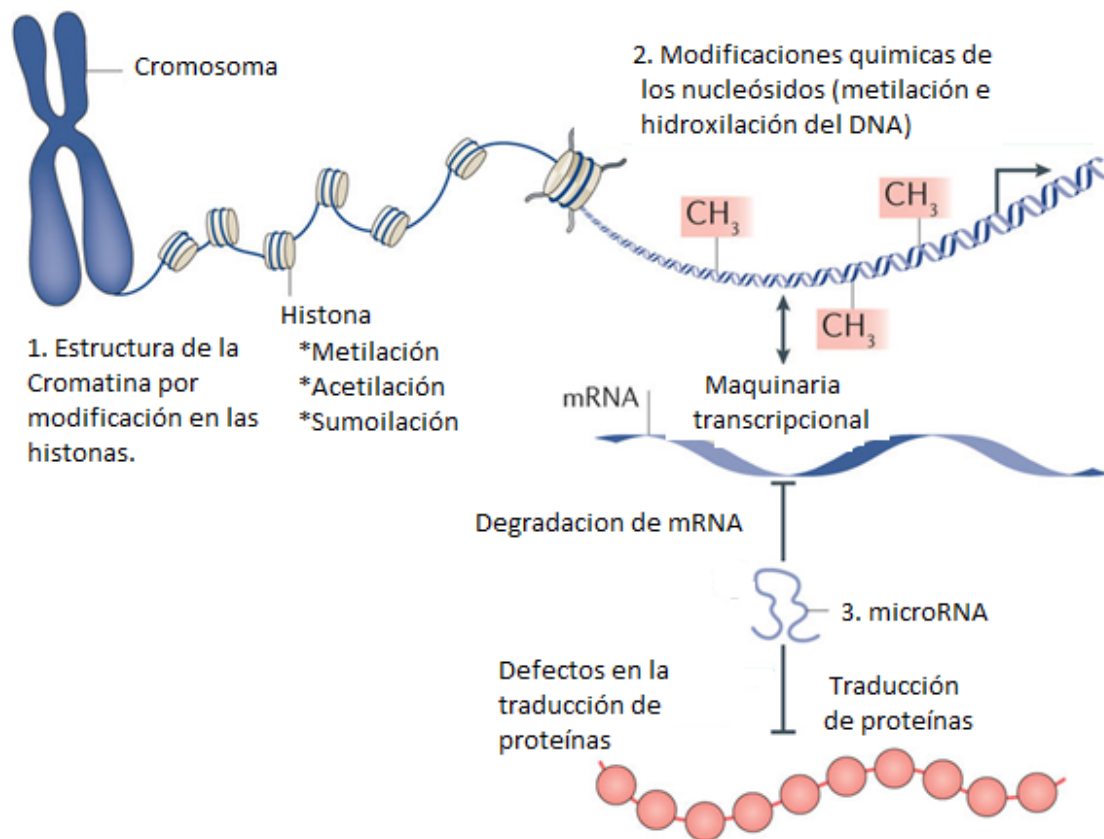


Figura 7. Mecanismos epigenéticos involucrados en la expresión génica. mRNA: RNA mensajero; CH₃: grupo metilo. Modificada de Barrés y Zierath, 2016.

2.2.2. Influencia de los factores ambientales sobre la epigenética

La epigenética está modulada por diversos factores, entre ellos, la exposición a agentes tóxicos como el arsénico (Marsit, 2015), el grupo étnico, la ingesta de alcohol, el tabaquismo, la actividad física, la edad, la nutrición (Bishop y Ferguson, 2015) así como las condiciones prenatales a las que se expone el feto por el estilo de vida de la madre (Perera y Herbstman, 2011). Entre los factores más estudiados se encuentra la alimentación, debido al consumo de ciertos grupos químicos capaces de modificar el epigenoma. Diversos grupos de investigación han resaltado la importancia de estos alimentos en el tratamiento de ciertos tipos de cáncer.

2.2.2.1. Alimentos donantes de grupos metilo

Los lipótropos, son un grupo de nutrientes entre los cuales se encuentran: la metionina, la colina, el folato y la vitamina B12 que poseen la característica de ser donadores de grupos metilo y pueden modificar el perfil de metilación del DNA. En un estudio llevado a cabo en líneas celulares T47D y MCF-7 (cáncer de mama) y se les administró como tratamiento lipótropos, se reportó que el crecimiento celular se inhibió en un 44% y 34% respectivamente y disminuyó casi un 25% la expresión de Bcl2 (del inglés, *B cell lymphoma 2*), la cual es una proteína anti apoptótica, los resultados anteriores sugieren que el tratamiento con lipótropos puede inducir la muerte celular en el caso de cáncer de mama (Park y cols., 2008).

2.2.2.2. Ambiente Intrauterino

Cuando el estado epigenético del DNA y sus asociaciones al fenotipo pueden heredarse, se le conoce como herencia epigenética transgeneracional. Este proceso puede explicarse debido a que las modificaciones epigenéticas generadas no se borran por completo durante la gametogénesis y la embriogénesis, resultado la generación de una memoria del estado epigenético que puede persistir y ser heredado a la siguiente generación. La presencia de un ambiente adverso durante la gestación o la lactancia podría influenciar en el desarrollo de obesidad, lo cual sugiere que la alimentación materna o la nutrición perinatal podrían afectar la programación de desarrollo en los fetos y neonatos (Camió y cols., 2009).

Se ha estudiado la importancia de la metilación en genes que están asociados a la obesidad (leptina y adiponectina). Bouchard y cols. (2010) reportaron que, en mujeres embarazadas, la intolerancia a la glucosa correlaciona de manera positiva con el nivel de metilación del gen de leptina (en el lado materno y la correlación es inversa en el lado fetal, al evaluarse durante el tercer trimestre. Referente al gen de adiponectina, un estudio realizado en mujeres embarazadas demostró que la hiperadiponectinemia en cordón umbilical se asocia con un alto peso al nacer (Bouchard y cols., 2012).

2.2.2.3.Ejercicio

La práctica constante de ejercicio físico ofrece beneficios especialmente en la salud, particularmente en niños y adolescentes. Recientemente, se ha postulado que el ejercicio podría modificar positivamente el epigenoma de los humanos, de manera específica el patrón de metilación. Se ha observado que el ejercicio y la alimentación actúan de manera sinérgica favoreciendo la liberación de miRNAs de los exosomas (Archer, 2015). Diversos estudios han comprobado los beneficios de practicar ejercicio de manera regular sobre la sensibilidad a la insulina (Balkau y cols., 2008), sin embargo, este mecanismo no está del todo elucidado. Existen evidencias que sugieren que la sensibilidad a la insulina podría verse mejorada debido a un aumento en la expresión de *PGC1* (Receptor-gamma activado por PPAR- γ) inducida por ejercicio. Se ha postulado además que el ejercicio atenúa las modificaciones epigenéticas inducidas por dietas altamente energéticas y una actividad física baja, lo cual nos conduce a una disminución o desaparición del riesgo de desarrollar DM2 (Santos y cols., 2014). Se ha documentado la participación de la metilación en la aparición de múltiples enfermedades como son cáncer, enfermedades autoinmunes, trastornos neurológicos (Portela y Esteller, 2010) y desórdenes metabólicos (Barrés y Zierath, 2011).

2.3. Modificación de las histonas en obesidad

El acceso al DNA en las células eucariotas está determinado por su acomodo en un complejo DNA-proteína conocido como cromatina. La estructura de la cromatina es regulada mediante modificaciones dinámicas de las proteínas constituyentes, principalmente las histonas. La unidad fundamental de la cromatina en el nucleosoma está formada por 146 pb de DNA envuelta en un octámero de histonas, con dos copias de cada histona, dando por resultado, 4 histonas diferentes H2A, H2B, H3 y H4. La porción N-terminal de las histonas es susceptible a diversas modificaciones post-transcripcionales entre las que se incluyen, metilación, acetilación, fosforilación y ubiquitinación. Múltiples evidencias han demostrado que existe un claro vínculo entre el patrón de

modificación de las histonas y la tasa de transcripción de los genes localizados en un locus de manera particular. De esta manera, la activación de la transcripción génica correlaciona con la hiperacetilación de las histonas H3 y H4, mientras que la hipoacetilación correlaciona con la cromatina inactiva (Martin y Zhang; 2005 Fischle y cols., 2003). La metilación de histonas en los residuos de lisina y arginina presentan un papel importante en algunos procesos biológicos, entre los que podemos mencionar a la regulación transcripcional, la formación de heterocromatina y la impronta genómica (Bedford y Richard, 2005; Martin y Zhang, 2005).

La metilación de la histona H3K4 afecta la activación transcripcional. Se ha reportado que algunas proteínas nucleares incluyendo factores de transcripción y enzimas modificadoras de la cromatina como: MLL3/4 (histona-lisina N-metil transferasa), Proteína de interacción con el dominio de transactivación PAX (PTIP, del inglés *Pax transactivation domain-interacting protein*), Wnt/catenina (vía de señalización implicada en desarrollo embrionario y cáncer) están asociadas con un estado de metilación alterado en los promotores de genes adipogénicos como PPAR (Peroxisome proliferator-activated receptor), C/EBP (CCAAT-enhancer-binding proteins) entre otros (Bedford y Richard, 2005; Martin y Zhang, 2005; Fischle y cols., 2003).

2.4. miRNAs y obesidad

Los miRNAs maduros son RNA pequeños (21 nt aprox.), monocatenarios que regulan de manera negativa la expresión del gen blanco. El primer miRNA descrito fue el de *C. elegans* en 1993 (Wightman y cols., 1993). Los miRNAs tienen un papel importante en el desarrollo y avance de algunas enfermedades como el cáncer y la obesidad (Deiuliis, 2016). Se ha documentado la participación de los miRNAs en procesos que tienen asociación con el desarrollo de obesidad, tal es el caso del miR-143, que aumenta la diferenciación adipocitaria a través de la activación de su gen blanco, el ERK5 en preadipocitos humanos (Esau y cols., 2004). Uno de los miRNAs más estudiados es el miR-21, que se encuentra elevado en el glioblastoma (tumor cerebral) y se propuso que podría actuar como un agente antiapoptótico (Chan y cols., 2005). En el

contexto de la obesidad, al evaluar la expresión de miR-21 en células mesenquimales derivadas del TA (hASCs, del inglés *Human Adipose-derived Stem Cells*), se observó que ésta cambiaba de manera transitoria durante la diferenciación adipocitaria y, además, es capaz de bloquear la acción inhibitoria de adipogénesis que posee el TGF- β mediante la disminución de la expresión del receptor 2 del TGF- β (TGFBR2, del inglés *TGF- β Receptor type 2*) (Kim y cols., 2009). Se ha estudiado la participación de los miRNAs en el desarrollo de RI, y se ha establecido que actúan a diferentes niveles; sobre la regeneración pancreática (miR-15^a, miR-15b, miR-16 y miR-195); en la regulación de la expresión de insulina (miR-30d, miR-375, miR-124^{a2}); de la secreción de insulina (miR-375, miR-9, miR-124^{a2}); de la secreción de insulina por glucosa (miR-369-5p, miR-130^a, miR-27^a, miR-410, miR-200^a, miR-337, miR-532, etc.); en la diferenciación adipocitaria (miR-143, miR-27b, miR130, miR519d) y la sensibilidad a la insulina (miR-103, miR-107, miR-29, miR-320, mmu-miR-183-96-182) (Williams y Mitchell, 2012). Como se puede observar, el papel de los miRNAs en el desarrollo de la obesidad presenta una relevancia significativa.

2.5. Metilación del DNA

Una de las modificaciones epigenéticas más estudiadas es la metilación del DNA, la cual en los mamíferos ocurre de manera exclusiva en los dinucleótidos CpG, es decir, una citosina unida a una guanina por un grupo fosfato (Portela y Esteller, 2010). La metilación en la posición 5' de los residuos de citosina es una modificación reversible y covalente del DNA que resulta en la producción de 5-metil citosina y se ha calculado que aproximadamente el 3% de las citosinas en humanos están metiladas. La enzima encargada de cumplir con la función de metilación es la D N-metil transferasa (DNMT, del inglés *D N-Methyl Transferase*). Estos grupos metilos modifican las características biofísicas del DNA (Gibney y Nolan, 2010). En la figura 8 se muestra el proceso mediante el cual se lleva a cabo la metilación del DNA.

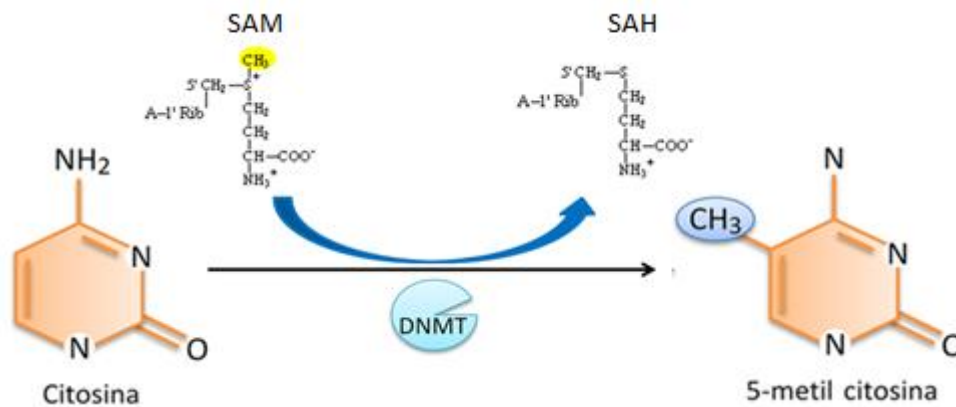


Figura 8. Metilación del DNA. El grupo metilo es donado a la posición 5 de la citosina por el SAM, la reacción es catalizada por la DNMT. El producto es 5-metil citosina y SAH. SAM: S-Adenosil metionina; SAH: S-Adenosil homocisteína; DNMT; D N-Methyl Transferasa.

Los dinucleótidos CpG están agrupados en regiones conocidas como islas CpG, que se definen como regiones de más de 200 pb (pares de bases), de las cuales, por lo menos el 50% deben ser CpG.

Aproximadamente el 60% de los promotores de los genes en humanos están asociados a islas CpG que generalmente están no metilados, sin embargo, cerca del 6% se metilan de manera tejido específico durante el desarrollo temprano y la diferenciación de tejidos (Portela y Esteller, 2010). Como se mencionó anteriormente, la metilación es un mecanismo de regulación de la expresión génica. Se han descrito varios mecanismos mediante los cuales la metilación regula la expresión génica: el DNA metilado promueve el reclutamiento de proteínas del dominio de unión a metil-CpG (MBD) y con ello se remodelan los complejos de cromatina (Esteller, 2007), por otro lado, algunos miembros de la familia MBD son capaces de unirse a sus sitios blanco en el DNA (Kuroda y cols., 2009). Las islas CpG no metiladas, generan una estructura de la cromatina que favorece la expresión génica a través del reclutamiento de Cfp1, el cual se asocia con Setd1 (histona metil transferasa) creando dominios ricos en la marca H3K4 en las histonas (Thomson y cols., 2010). Sin embargo, la inhibición de la transcripción no es la única función de la metilación de DNA, pero sí la más importante en mamíferos. En la figura 9 se describen las diferentes acciones de la metilación del DNA.

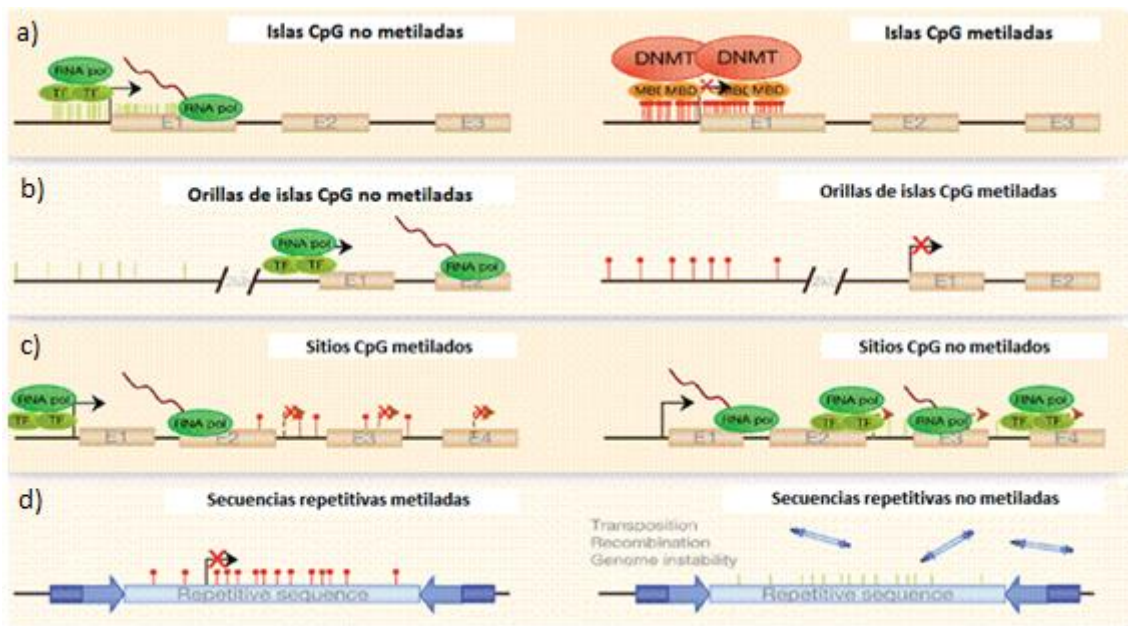


Figura 9. Principales funciones de la metilación del DNA. En a y b) Represión de la transcripción en islas CpG y en regiones conocidas como orillas de islas CpG. c) Transcripción aberrante debido a la desmetilación de regiones comúnmente metiladas. d) La metilación de DNA brinda estabilidad genómica. Modificado de Portella y Esteller, 2010.

En el campo de estudio de la obesidad y genes involucrados en la homeostasis energética, la metilación del DNA es objeto de un exhaustivo trabajo de investigación.

2.5.1. Metilación en obesidad

Es en el área de oncología donde se ha explotado más el estudio de la epigenética, sin embargo, en la homeostasis metabólica también se han dado grandes avances, sobre todo en la metilación del DNA. La metilación del DNA desempeña un papel importante en la regulación de la expresión de algunos genes involucrados en la homeostasis de la glucosa. El promotor del gen de la insulina se encuentra desmetilado en las células β pancreáticas durante la producción de insulina, así como en las células madre embrionarias de ratón que se diferenciarán a células productoras de insulina, el promotor del gen del transportador de glucosa GLUT 4 está altamente desmetilado durante la diferenciación adipocitaria, así como, la metilación en sitios CpG específicos, puede inhibir la unión de los factores de transcripción (Barres y Zierath, 2011).

En lo referente a población infantil y adolescente con obesidad con y sin RI, García-Cardona y cols. (2014) reportan diferencias de metilación de manera específica en los sitios CpG -31 y -51 del promotor del gen de leptina en los sujetos que presentaron resistencia a la insulina, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en las concentraciones séricas de leptina en los diferentes grupos de estudio. De manera general, ambos sitios presentaron la misma tendencia de metilación, existiendo un mayor número de pacientes metilados en el grupo control (peso normal) en los grupos de obesidad y obesidad mórbida, se observó una disminución de la frecuencia de metilación, además, en los pacientes con RI también se observó esta tendencia en ambos sitios. En lo que respecta a la adiponectina se evaluaron de igual manera dos sitios CpG, el -74 y el -283, para el sitio -283 la frecuencia de metilación disminuyó de manera considerable en los sujetos con sobrepeso, sin embargo, aumentó en los grupos de obesidad y obesidad mórbida. Al comparar entre los que presentaron RI y los que no, se observó que aquellos con RI mostraron una menor metilación en este sitio. En todos los casos, los grupos fueron diferentes estadísticamente respecto al control. En lo referente al sitio -74, al comparar la frecuencia de metilación con base en el IMC, no se observó diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control y los que presentaron sobrepeso, sin embargo, los grupos de obesidad y obesidad mórbida si reportan diferencia. Cuando se comparó basándose en el IMC y la RI, no se observó diferencia entre los obesos y obesos mórbidos con y sin RI.

Por otro lado, en un estudio realizado en Canadá, en el que se incluyó a mujeres embarazadas, se exploró la influencia de la tolerancia a la glucosa materna sobre el perfil de metilación del gen de adiponectina en el feto y en la madre y su asociación con RI y expresión materna de la proteína.

El análisis de metilación abarcó 17 sitios CpG, ubicados en 3 diferentes islas CpG: la A3 está localizada a 20 Kb del primer exón y evaluaron 9 sitios CpG, la (C1) se encuentra en la región promotora proximal, aproximadamente 4 Kb río arriba del primer exón y contaba con 4 sitios CpG, finalmente, la isla E2, que está localizada entre el primer y el segundo exón (intrón 1) fue la que mostró mayores niveles de metilación, analizando 4 sitios obteniéndose las medias de metilación por pares. La isla E2 fue la que presentó mayor porcentaje de metilación y se decidió evaluarla como E2 media1 y E2 media 2 con niveles de metilación del

85% y del 65% respectivamente, en ambos lados de la placenta (fetal y materno). La metilación de la isla E2 medida del lado fetal, presentó una correlación negativa y estadísticamente significativa con las concentraciones de adiponectina. En la figura 10, se muestra el resultado de la correlación de Spearman para la metilación del gen de adiponectina del lado fetal y la concentración sérica de adiponectina (Bouchard y cols., 2012).

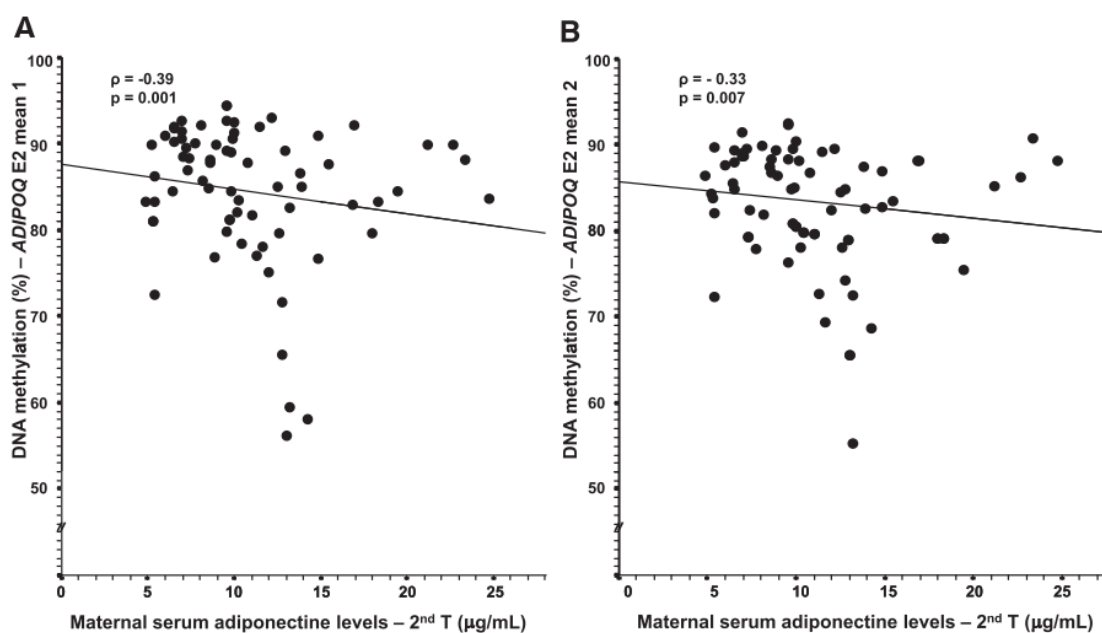


Figura 10. Correlación de Spearman entre el lado fetal de la placenta de la isla E2: A) media 1 y B) media 2 y los niveles séricos de adiponectina de la madre. Los valores se ajustaron para el IMC materno del primer trimestre del embarazo y para los valores de HOMA-IR del segundo trimestre. Los resultados permanecieron sin cambios después de eliminar un dato fuera de rango. Tomado de: Bouchard y cols., 2012.

Sayed y cols. (2018) evaluaron la metilación del gen de leptina en una población de sujetos obesos menores a 18 años de edad. Se conformaron los siguientes grupos: control, obesos y obesos con dieta, ejercicio y ácido fólico. Al final del tiempo estipulado (3 meses), se observó que la metilación del gen de leptina era mayor en el grupo control ($71.28 \pm 7.86\%$), seguido por el grupo de obesos con dieta, ejercicio y ácido fólico ($55.41 \pm 11.26\%$) y por último el grupo de obesos ($34.6 \pm 16.7\%$). Además, mediante un análisis de correlación de Spearman se estableció que existe una correlación positiva y significativa ($r: 0.516$; $p= 0.001$) con la concentración de ácido fólico y negativa con: el percentil de peso

($r=-0.524$; $p<0.001$), el colesterol ($r= -0.442$; $p<0.001$), los triglicéridos ($r= -0.269$; $p =0.05$) y el LDL ($r= -0.425$; $p =0.002$).

II. Justificación

A nivel mundial, México ocupa los primeros lugares en obesidad, la cual se ha asociado a numerosas patologías, entre ellas la DM2, el cáncer y las ECV, patologías que ocupan los primeros lugares de causa de muerte en nuestro país y sus tratamientos empleados generan altos costos al sector salud. Una de las principales alteraciones asociadas a la obesidad, es la RI, que, a su vez, se relaciona con la ECV, siendo la DE una de sus manifestaciones tempranas, pero determinantes. Se sabe de la influencia de diversas moléculas sobre la homeostasis vascular, entre ellas, la insulina, la leptina y la adiponectina. La expresión de estas moléculas está regulada por diversos factores, siendo uno de los menos explorados, la regulación epigenética, que está tomando una importancia considerable al comprobarse que cambios a nivel epigenético se asocian de manera importante con diversas patologías, entre ellas, el cáncer. Es por ello, que es de suma importancia identificar marcas epigenéticas que pudieran ser usadas como marcadores de riesgo o pronóstico.

III. Hipótesis

En el estado de RI, las concentraciones séricas de sICAM-1 y leptina se encuentran elevadas y las de adiponectina disminuidas en pacientes adolescentes mexicanos obesos; esto se asocia con modificaciones en el perfil de metilación de los genes que codifican para adiponectina y leptina.

IV. Objetivo general

Analizar las adipocinas y el perfil de metilación de los genes que codifican para leptina y adiponectina en adolescentes mexicanos obesos con y sin RI.

V. Objetivos específicos

1. Comparar el perfil metabólico (glucosa y perfil de lípidos), insulina, sICAM-1 y adipocinas (leptina y adiponectina) en los adolescentes eutróficos y obesos con y sin RI.
2. Establecer si existe una asociación entre RI, sICAM-1 y adipocinas.
3. Determinar el estado de metilación de los genes que codifican para leptina y adiponectina en sangre periférica en la población de estudio.
4. Analizar si existe asociación entre el perfil de metilación de los genes que codifican para las adipocinas y su concentración sérica.

VI. Materiales y métodos

6.1 Población de estudio

El reclutamiento de pacientes se llevó a cabo con la colaboración del Departamento de Alergia e Inmunología Clínica del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”, en total fueron 227 niños y adolescentes, ambos géneros, con edades comprendidas entre 10-16 años. Durante la consulta médica se registraron las siguientes variables antropométricas: género, edad, talla, peso, CC (Circunferencia de cintura), FC (Frecuencia cardíaca), PAS (Presión arterial sistólica) y PAD (Presión arterial diastólica).

Se tomó una muestra de sangre periférica y posteriormente, se realizaron las pruebas de laboratorio, entre ellas la glucosa y la insulina para poder formar los grupos de estudio. Para el diagnóstico de obesidad se emplearon las tablas de percentiles de la CDC y para la RI se usó el índice HOMA= (glucosa (mmol/L) * insulina (UI/mL) /22.5 tomando como valor de referencia ≥ 3.4 (van der Aa y cols., 2014) para considerar la presencia de RI. En función de estos criterios, se hicieron los grupos de estudio: eutróficos (n= 104), obesos sin RI (Ob no RI; n= 58), obesos con RI (Ob-RI; n= 65). Posteriormente, para llevar a cabo los ensayos de metilación de DNA se tomó una muestra de sangre de manera aleatoria de cada uno de los grupos; la n total fue de 107: eutróficos (n= 36), obesos no RI (n= 40), obesos RI (n= 31).

6.2 Toma y almacenamiento de la muestra

Se citó a los pacientes en ayuno de 12 horas. De la vena cubital izquierda se extrajeron 5 mL de sangre en un tubo sin anticoagulante y otro con anticoagulante (EDTA).

La sangre del tubo sin anticoagulante se centrifugó a 4°C durante 15 min a 3500 rpm. El suero obtenido se dispensó en varios tubos eppendorf de 1.5 mL y se

congeló a -70°C para posterior análisis y determinación (Glucosa, insulina, sICAM-1, leptina, adiponectina, colesterol, TGs y HDL). La sangre con EDTA, se separó en diferentes tubos y se congeló a -30°C llevar a cabo la extracción de DNA y posteriormente los ensayos de metilación.

6.3 Criterios de inclusión y exclusión

Inclusión:

- Ambos géneros, edad 10-16 años.
- Aceptar participar en el estudio.
- Carta de consentimiento informado de los padres y carta de asentimiento por parte de los participantes.
- No estar bajo medicación.

Exclusión:

- Presencia de alguna enfermedad causante de obesidad como hipotiroidismo o alguna endocrinopatía.
- Retraso mental, autismo, enfermedades psiquiátricas.

Eliminación

- Que no se cuente con la muestra suficiente
- Muestra de mala calidad

6.4 Cuantificación del perfil bioquímico

Las concentraciones séricas de glucosa, colesterol, TGs, y HDL se midieron en el Laboratorio Central del Hospital Infantil de México mediante ensayos enzimático-colorimétricos automatizados usando el equipo Dimension-RXL (Dade, Behring, Germany).

6.5 Cuantificación de sICAM-1, insulina, leptina y adiponectina

Las concentraciones de sICAM-1, insulina, leptina y adiponectina se determinaron por la técnica de ELISA (del inglés, *Enzyme-linked immunosorbent assay*), se usaron kit de la marca comercial Millipore (Millipore, USA). En todos

los ensayos se emplearon dos controles, que se determinaron al momento de realizar el ensayo, las lecturas debían encontrarse en el rango establecido por el proveedor.

6.5.1 sICAM-1

La cuantificación de sICAM-1 se realizó con el kit ECM335 de la marca Millipore, el cual, permite la evaluación de esta molécula en sobrenadantes de cultivos celulares, suero, plasma y otros fluidos biológicos. El fundamento de la técnica es el siguiente: la placa de ELISA está recubierta con un anticuerpo monoclonal que se une a sICAM-1, después, se añade un anticuerpo monoclonal secundario conjugado con HRP que se une a las moléculas de sICAM-1 capturadas por el primer anticuerpo. El anticuerpo secundario que no se unió a sICAM-1, se elimina mediante lavados y se añade el sustrato de HRP, se incuba por lo menos 15 min. La intensidad de la coloración en las celdas de la placa es directamente proporcional a la concentración de sICAM-1 presente en las muestras. La reacción se da por terminada al agregar la solución de paro (Ácido fosfórico 1M), la placa se lee a una absorbancia de 450 nm. La curva de estándar se prepara a partir de 5 diluciones del estándar y con base en esta, se determina la concentración de la muestra.

6.5.2 Insulina

La determinación de insulina se realizó con un kit de la marca Millipore, con número de catálogo EZHI-14K, el cual es empleado para la cuantificación no radioactiva de insulina humana en suero, plasma y otros fluidos biológicos. Este kit no presenta reacción cruzada con proinsulina humana, el mayor intermediario existente en suero. El ensayo se basa en la técnica de ELISA conocida como sándwich, que se basa en: la captura de moléculas de insulina humana de las muestras que se colocan en los pocillos de la placa, previamente recubierta con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-insulina humana y la unión de un segundo anticuerpo monoclonal biotinilado que se une al complejo formado por el primer anticuerpo y la insulina. Mediante lavados se elimina la insulina que no se unió al primer anticuerpo y el anticuerpo biotinilado excedente. Se añade

peroxidasa de rábano, la cual se une a los anticuerpos biotinilados, se lava para eliminar los conjugados enzimáticos libres y se cuantifican los complejos inmovilizados en presencia de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina. Las muestras se leen a 450 nm. Dado que el aumento de la absorbancia es directamente proporcional a la cantidad de insulina capturada en la muestra problema, la última se deriva de una curva con estándares de referencia de concentraciones conocidas de insulina humana.

6.5.3 Leptina

La determinación de la concentración de leptina en las muestras se realizó con el kit EZHL-80SK de Millipore, que se puede emplear en suero, plasma y otros fluidos biológicos. Este kit se basa en la técnica de sándwich de ELISA, donde un anticuerpo policlonal de conejo anti leptina está inmóvil unido a los pozos de la placa, se añade la muestra y la leptina presente se une a este anticuerpo, se lava para eliminar las moléculas no unidas, posteriormente, se añade un anticuerpo monoclonal biotinilado que se une a la leptina capturada por el primer anticuerpo, se incuba y se lava, se adiciona la estreptavidina-peroxidasa de rábano con el sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina. La actividad enzimática se mide espectrofotométricamente a 450-590 nm después de la acidificación de los productos formados. El incremento en la absorbancia es directamente proporcional a la cantidad de leptina capturada en la muestra, la concentración se obtiene a partir de la interpolación de una curva generada con estándares de concentraciones conocidas de leptina humana.

6.5.4 Adiponectina

La adiponectina se evaluó con el kit EZHADP-61K (Millipore), que es usado para la cuantificación no radiactiva de adiponectina humana en muestras de suero, plasma, extractos de adipocitos o medios de cultivos celulares. Este kit es específico para adiponectina humana, no presenta reacción cruzada con adiponectina de ratón.

La placa esta recubierta con un anticuerpo monoclonal anti adiponectina humana, al que se une la adiponectina de las muestras, posteriormente, este complejo se une a un segundo anticuerpo monoclonal biotinilado, se lava la muestra para eliminar los contaminantes y se adiciona estreptavidina-peroxidasa de rábano con el sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, se lava para eliminar los conjugados de enzima libres y se mide la actividad enzimática de manera espectrofotométrica a 450-590 nm. El incremento en la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de adiponectina presente en la muestra, la concentración se obtiene por interpolación de una curva generada a partir de estándares de concentración conocida de adiponectina humana.

6.6 MS-PCR y diseño de los oligonucleótidos

Para el estudio de la metilación, existen diversas técnicas que brindan diferentes tipos de información. Dentro del análisis de metilación, las técnicas más empleadas son aquellas que se basan en la transformación de la muestra con sales de bisulfito para después, proceder a su análisis. Y la MS-PCR (del inglés *Methylation Specific PCR*), es una técnica cualitativa, se lleva a cabo en un termociclador de punto final y los resultados se observan en un gel de agarosa (electroforesis). Entre las ventajas que presenta esta técnica, está su alta sensibilidad; amplifica un alelo metilado, en una población de más de 1000 alelos no metilados. Para llevar a cabo esta técnica, se deben diseñar dos juegos de oligonucleótidos, uno para DNA metilado (M) y otro para DNA no metilado (U), es decir, un juego amplificará sólo los alelos metilados y el otro amplificará los alelos no metilados, dejando de lado la metilación parcial o en mosaico que puedan presentar algunos alelos.

El diseño de los oligonucleótidos es una parte esencial en esta técnica para obtener resultados confiables, es importante resaltar que el juego de oligonucleótidos debe ser diseñado para los mismos sitios CpG.

6.6.1 Consideraciones para el diseño de Oligonucleótidos para MS-PCR

En el diseño de los oligonucleótidos para MS-PCR se debe tener una serie de consideraciones entre las que destacan las siguientes: el área de interés no debe poseer SNPs ni DNA repetitivo, la temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos para DNA sentido y antisentido debe ser similar. La especificidad se logra mediante la inclusión de algunos sitios CpG en la secuencia del oligonucleótido, preferentemente, cerca o en el extremo 3'. Los oligonucleótidos pueden ser diseñados de manera manual o empleando el programa MethPrimer (<http://www.urogene.org/methprimer>) o mediante MS-PCR Primers (<http://www.mspprimer.org>). La secuencia de los genes de interés puede obtenerse en cualquier base de datos de genes como UCSC Genome Browser (<http://www.genome.ucsc.edu>) o Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org>), los cuales nos brindan información acerca de las posiciones de los SNPs y del DNA repetitivo.

6.6.2 Diseño de los oligonucleótidos del gen de leptina

La leptina es una proteína codificada por el gen *LEP*, el cual se encuentra localizado cromosómicamente en la región 7q32.1, consta de 3 exones y dos intrones. Este gen codifica para una proteína de 167 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 16 kDa (Disponible en: Ensembl Database, <http://www.ensembl.org/index.html>; ENSG00000174697). Se ha sugerido que el CEBP α , un factor de transcripción implicado en el desarrollo y la regulación metabólica de los adipocitos podría estar implicado en la expresión de este gen (Paracchini y cols., 2005).

De acuerdo con Ensembl (Navegador genómico), existe una región reguladora localizada en la posición 128241311-128241401 (Figura 11) relativo al sistema de coordenadas, es una región regulada por el factor de transcripción CCCTC (CTCF); el cual es una proteína de dedos de zinc altamente conservada. Este es un factor de transcripción que puede fungir como activador transcripcional, como represor o bien, como aislante bloqueando la comunicación entre “enhancers” y

promotores. CTCF también puede reclutar otros factores de transcripción mientras se une a los límites del dominio de cromatina. La región analizada para el gen de leptina se muestra en la figura 11.

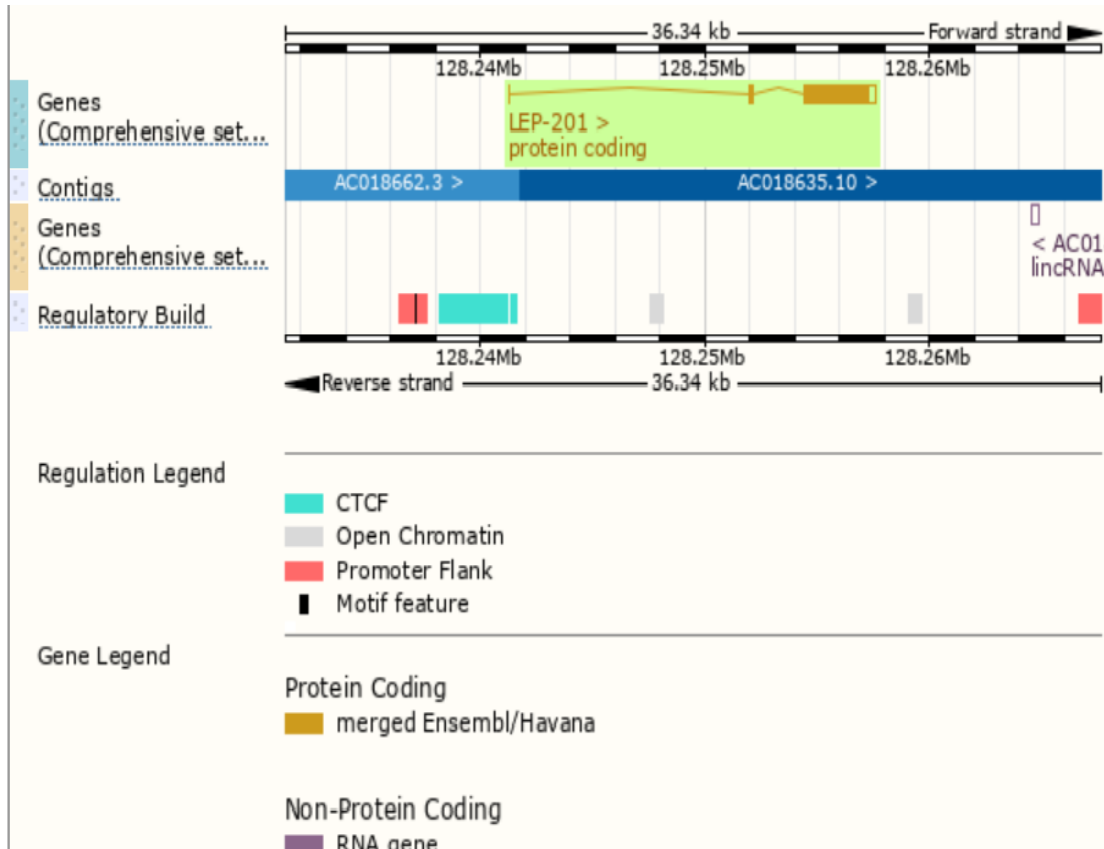


Figura 11. Región reguladora de la expresión del gen de leptina. Se puede observar en color verde la región CTCF, dentro de la cual se encuentra la que se analizó en el presente estudio. CTCF: región regulada por el factor de unión CCCTC.

La isla CpG que se analizó, se encuentra dentro de esta región reguladora y además, el amplicón posee algunas de las posiciones de sitios CpG reportadas con anterioridad (García-Cardona y cols., 2014).

La figura 12 muestra la región que se examinó en el presente proyecto, dentro de las posiciones 128451156-128241319 relativo al sistema de coordenadas. Se tomó una secuencia de 683 nt, se analizó con Methprimer para encontrar las islas CpG y se diseñaron los oligonucleótidos a utilizar. La imagen muestra la región que se amplificó, los oligonucleótidos para DNA no metilado (subrayados

Tabla 7. Secuencia de los oligonucleótidos (M y U) empleados para la amplificación de la isla CpG analizada del gen de leptina.

| Oligonucleótidos M | Secuencia |
|---------------------------|--------------------------|
| Forward | GTACGTCGTTATTTTGAGGGGC |
| Reverse | CCGAAACCTTACCTTACAACCG |
| Oligonucleótidos U | |
| Forward | GGTATGTTGTTATTTTGAGGGGTG |
| Reverse | CCAAAACCTTACCTTACAACCACT |

G: Guanina; T: Timina; A: Adenina y C: Citosina. Oligonucleótidos M: amplifican DNA metilado; oligonucleótidos U: amplifican DNA no metilado.

6.6.3 Diseño de los oligonucleótidos del gen de adiponectina

La adiponectina es producto del gen *ADIPOQ*, que se encuentra localizado en el cromosoma 3q27; consta de tres exones, de los cuales, 2 son codificantes, y dos intrones. Tiene un tamaño de 15.8 Kb y codifica para una proteína de 244 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 26 kDa (Ensembl Database, <http://www.ensembl.org/index.html>; ENSG00000181092).

La región promotora del gen de adiponectina incluye secuencias de la región 5'UTR (Región no codificante del inglés, *Untranslated region*) y una importante secuencia motif (secuencia de nucleótidos con relevancia biológica) en el intrón 1. Posee por lo menos dos sitios de unión a factores de transcripción, la proteína reguladora de unión a elementos esteroides (SREBP) y una región CEBP, en la región que abarca de -676 a 41, que parece ser suficiente para la actividad basal transcripcional del promotor (Breitfeld y cols., 2012).

De acuerdo con la fuente anterior, una parte de la región reguladora del gen de adiponectina se encuentra en el intrón 1, lo cual concuerda con lo reportado por

Bouchard y cols. (2012). Considerando los resultados obtenidos por este grupo de investigación, se decidió analizar una región cercana a lo descrito (Figura 13).

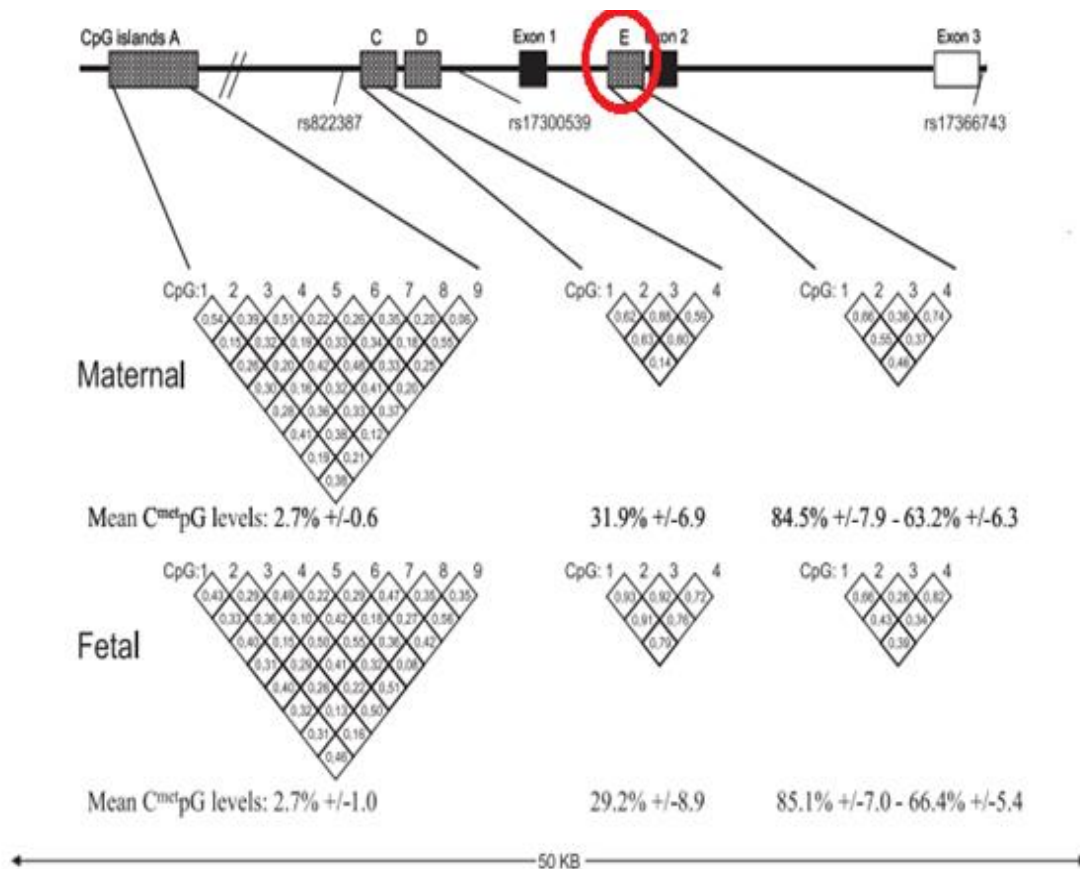


Figura 13. Región de estudio del gen de adiponectina. Los números en los diamantes reportan los coeficientes de correlación de Spearman entre los sitios CpG. En la parte superior, las letras A, C, D y E representan a las islas CpG analizadas. El círculo rojo indica la posición de la región analizada en el presente estudio. Tomado de Bouchard y cols. 2012.

La región que se amplificó corresponde al Intrón 1 (186844880-186845180) la numeración usada es la relativa al sistema internacional de coordenadas. Se analizó una región de 2807 nt, se introdujo a Methprimer y arrojó una nueva ventana donde se indica la isla CpG, así como los posibles juegos de oligonucleótidos que se pueden emplear. En la figura 14, se muestra la región que se amplificó, en azul se indica donde se alinean los oligonucleótidos para DNA no metilado y en morado para DNA metilado, las flechas rojas nos muestran las citosinas susceptibles de metilación (sitio CpG).

Tabla 8. Secuencia de los oligonucleótidos (M y U) empleados para la amplificación de la isla CpG analizada del gen de adiponectina.

| Oligonucleótidos M | Secuencia |
|---------------------------|---------------------------|
| Forward | GTGGATCGGTGGTTTTAGATATACG |
| Reverse | CACCTCCACCTATACACGCG |
| Oligonucleótidos U | |
| Forward | TGGGATCGGTGGTTTTAGATATACG |
| Reverse | ACACCTCCACCTATACACACACA |

G: Guanina; T: Timina; A: Adenina y C: Citosina. Oligonucleótidos M: amplifican DNA metilado; oligonucleótidos U: amplifican DNA no metilado.

6.7 Extracción, purificación y cuantificación del DNA genómico

Para la extracción de DNA se empleó el kit FlexiGene de Qiagen. En un tubo Eppendorf de 2 mL se colocaron 1250 µL de Buffer FG1 (agente lisante) que actúa degenerando las membranas celulares de núcleo y mitocondria, los eritrocitos y leucocitos y dejando libre el DNA genómico de los leucocitos+ 500 µL de sangre, se homogenizó y centrifugó (10,000 rpm)/ minuto, posteriormente se descartó el sobrenadante y el pellet, se secó y se añadieron 250 µL de buffer FG2 (contiene sales caotrópicas)+ la proteasa (2.5 µL), inmediatamente se incubó a 60 °C durante 5 minutos, para remover los contaminantes, por ejemplo, las proteínas. Transcurrido el tiempo de incubación (con el objetivo de precipitar el DNA), se adicionaron 250 µL de isopropanol (de preferencia frío), se homogenizó por inversión y se centrifugó (10,000 rpm/minuto), se descartó el sobrenadante; se dejó secar el pellet, se agregan 250 µL de etanol al 70%, se homogenizó y centrifugó (10,000 rpm/minuto), se secó sobre papel absorbente y se reconstituyó en agua grado PCR.

6.8 Cuantificación del DNA y electroforesis

Una vez realizada la extracción de DNA, se procedió a efectuar la cuantificación en un NanoDrop 1000, mediante el uso de técnicas de espectrofotometría. Se consideró que una muestra de DNA estaba libre de contaminantes si presentaba un cociente 1.7-1.9 para la relación de absorbancias 260/280 y superior a 1 para las absorbancias 260/230. Además, se observó la integridad del DNA mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% (5g agarosa en 50 mL de buffer TBE 1X), los geles se prepararon con bromuro de etidio a una concentración de 0.05 g/mL, se utilizó como buffer de corrida TBE 1X, a la par, se carga un marcador de peso molecular de 1kb (Marca Axygen). Los geles se observaron en un foto documentador con luz UV (Gel-Imager, Life Technologies). Una vez que se cuantificó la concentración y se evaluó la integridad del DNA extraído, se almacenó a -30 °C hasta su posterior transformación con bisulfito y PCR. En la figura 15 se muestra un gel representativo de las electroforesis de las muestras de DNA extraído de sangre total.

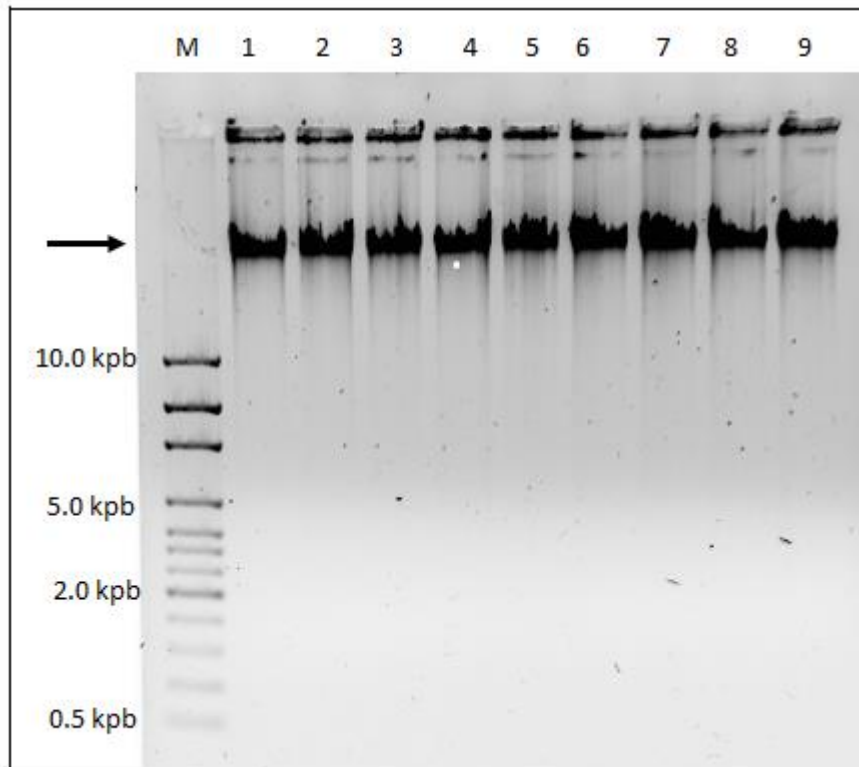


Figura 15. Gel representativo de electroforesis de extracción del DNA. Como indica la flecha, la presencia de una banda intensa y sin barrido revela que la concentración de DNA es alta y que no presenta degradación. M marcador de peso molecular de 1kb. 1-9 muestras que se cargaron en el gel para su análisis.

6.9 Transformación del DNA con bisulfito de sodio

Para el análisis de metilación por MS-PCR (Methylation Specific-PCR) es necesario someter a las muestras de DNA a un proceso con sales de bisulfito de sodio, en donde, las citosinas metiladas permanecen como citosinas y las no metiladas se transforman en uracilo, mediante una reacción de desaminación hidrolítica y posteriormente una desulfonación. En la figura 16 se detalla la reacción llevada a cabo durante la reacción de transformación de DNA con bisulfito de sodio.

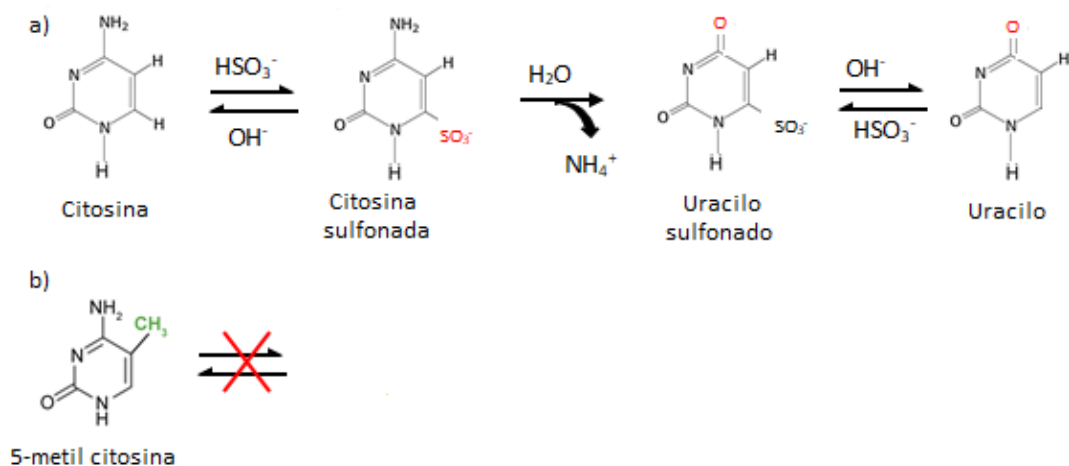


Figura 16. Reacción de transformación del DNA con bisulfito de sodio. a) citosina; b) 5-metil citosina (reacción no se lleva a cabo).

Para la transformación de DNA con bisulfito de sodio se empleó el kit EpiTect Fast Bisulfite Conversion (Qiagen). Para la correcta evaluación del patrón de metilación es necesario asegurar una conversión completa de las citosinas presentes en la muestra, para evitar negativos de metilación. La transformación se lleva a cabo por la incubación del DNA a altas concentraciones de sales de bisulfito de sodio y de temperatura y a un pH bajo. En la tabla 9 se muestran los reactivos y sus volúmenes para las reacciones de transformación de DNA con bisulfito de sodio.

Tabla 9. Preparación del mix de reacción de la MS-PCR

| Reactivo | Volumen |
|-------------------------|-----------------------------|
| Mix de bisulfito | 85 μL |
| Buffer protector de DNA | 35 μL |
| DNA | Variable (2 μg) |
| Agua | cbp 140 μL |
| Volumen total | 140 μL |

Volúmenes de reactivos para llevar a cabo las reacciones para transformar DNA con bisulfito de sodio. Cbp: Cuanto baste para.

Las condiciones empleadas en el termociclador a las que se realizaron las reacciones de transformación de DNA con bisulfito de sodio se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Condiciones en el termociclador para el proceso de transformación del DNA con bisulfito de sodio.

| Proceso | Tiempo (min) | Temperatura (°C) |
|-------------------|--------------|------------------|
| Desnaturalización | 5 | 95 |
| Incubación | 20 | 60 |
| Desnaturalización | 5 | 95 |
| Incubación | 20 | 60 |
| Mantenimiento | ∞ | 20 |

Las reacciones de transformación con bisulfito se llevaron a cabo en un termociclador punto final MyCycler™ Thermal Cycler 170-9701 de la marca Bio-Rad. Debido a que el DNA se somete a condiciones ásperas, se genera un alto grado de fragmentación y subsecuente pérdida, razón por la que se emplean aproximadamente 2 µg. El proceso de purificación es realizado en columnas de sílica que permite la elución del DNA transformado en 10 µL de buffer.

Al finalizar el proceso de purificación de DNA transformado con bisulfito, se procede a la cuantificación y homologación en una concentración final (50 ng/µL) en todas las muestras. Cabe mencionar que el coeficiente de absorbancias 260/280 aumentó por encima de 2.1, debido a la gran cantidad de uracilos presentes en la muestra, al cuantificarse, debe ser leída como RNA. En la tabla 11 se muestran valores representativos de la concentración obtenida después de la transformación con bisulfito.

Tabla 11. Cuantificación espectrofotométrica de muestras representativas de la transformación de DNA con bisulfito.

| Grupo | Muestra | Absorbancias (nm) | | Pureza | Concentración |
|-------|---------|-------------------|-------|---------|---------------|
| | | 260 | 280 | 260/280 | ng/μL |
| Ob | 1 | 0.065 | 0.023 | 2.827 | 65.3 |
| | | 0.061 | 0.021 | 2.966 | 61.1 |
| Ob | 2 | 0.064 | 0.023 | 2.803 | 64.2 |
| | | 0.058 | 0.019 | 2.969 | 57.6 |
| Ob_RI | 3 | 0.072 | 0.027 | 2.682 | 71.6 |
| | | 0.067 | 0.025 | 2.684 | 67.1 |
| Ob_RI | 4 | 0.105 | 0.038 | 2.742 | 105 |
| | | 0.101 | 0.037 | 2.716 | 101.3 |
| Eut | 5 | 0.108 | 0.041 | 2.615 | 108 |
| | | 0.101 | 0.039 | 2.616 | 100.7 |
| Eut | 6 | 0.07 | 0.025 | 2.818 | 69.6 |
| | | 0.067 | 0.025 | 2.7 | 66.7 |

Se consideraron 2 muestras de cada grupo y se cuantificaron por duplicado.

Las MS-PCR se realizaron de manera inmediata a la transformación, ya que se observó que una vez transformado con bisulfito de sodio tiende a degradarse aún almacenado a temperaturas de -70°C .

6.10 PCR metilación específica (MS-PCR)

La MS-PCR, es un método que permite evaluar de manera rápida el estatus de metilación de un grupo de sitios CpG presentes en una región determinada. Las reacciones de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) se llevaron a cabo empleando las diluciones a 50 ng/μL de las muestras obtenidas.

El kit empleado para realizar las PCR fue el EpiTect MSP de Qiagen. Este kit consta de los reactivos necesarios y de la mejor calidad para realizar este tipo de experimentos, ya que la enzima HotStar Taq d-Tect polimerasa es una forma

recombinante de 94 KDa de la *Taq* DNA polymerase de Qiagen, la modificación previene la elongación de bases no complementarias en el extremo 3' del oligonucleótido. Esto permite la discriminación por una sola base no complementaria durante el alineamiento y la extensión del amplicón. Al encontrarse la enzima inactiva a temperatura ambiente se previene la formación de productos inespecíficos y de dímeros de oligonucleótidos a bajas temperaturas. La figura 17 explica de manera detallada la acción de la HotStar Taq d-Tect polimerasa.

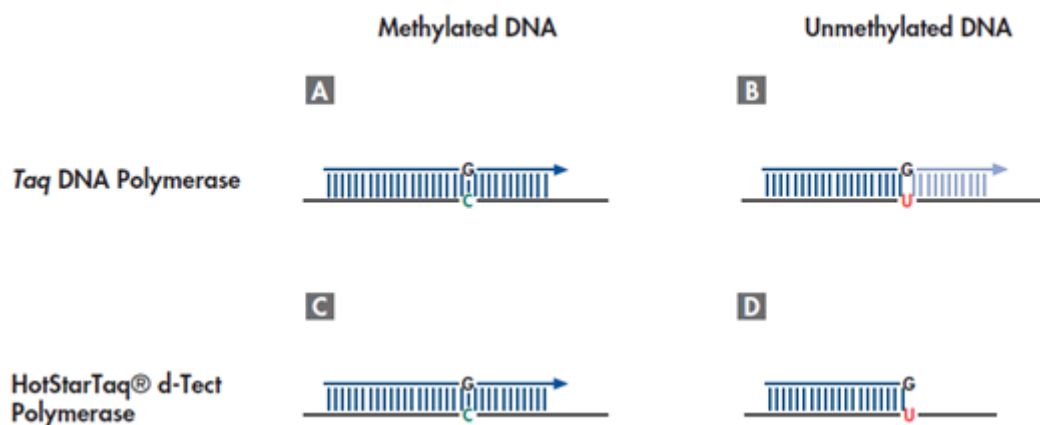


Figura 17. Mecanismo de Hot Start Polimerasa de kit Epi Tect MSP de Qiagen. Aumento de la discriminación de Hot Start Polimerasa de kit Epi Tect MSP de Qiagen. Durante la fase de alineamiento, los oligonucleótidos para metilación específica también pueden unirse a DNA no metilado transformado con bisulfito (B). La Taq DNA polimerasa puede de manera eficiente elongar con estos oligonucleótidos a pesar de la discordancia de apareamiento entre los nucleótidos (A y B). Debido a su capacidad de discriminación entre regiones no complementarias, la HotStartTaq-dTect polimerasa puede detectar una disparidad en el extremo 3' del oligonucleótido MSP y previene la elongación. (D) Así, la HotStartTaq-dTect polimerasa en reacciones de MSP incrementa la confiabilidad previniendo los falsos positivos en las reacciones de amplificación, facilitando el diseño del oligonucleótido. Modificado de: EpiTect® MSP Handbook–Qiagen

El buffer está basado en la fórmula original del buffer de PCR de Qiagen, esta nueva formulación permite una alta especificidad del oligonucleótido durante el proceso de alineamiento en cada ciclo de la PCR. Debido a su combinación perfectamente balanceada de KCl y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ el buffer provee condiciones rigurosas para el alineamiento específico de los oligonucleótidos en un amplio rango de temperaturas de alineamiento.

Una vez que se diseñaron los oligonucleótidos y se transformaron las muestras de DNA con bisulfito de sodio, se procedió a realizar las PCR's. Las reacciones de MS-PCR se prepararon en una campana de flujo laminar, se emplearon tubos Eppendorf de 200 μ L, estériles. La preparación de los mix de reacción se realizó de la misma manera, sólo empleando oligonucleótidos diferentes. La tabla 12 nos muestra las concentraciones finales de reactivo para cada PCR, independientemente del gen y del juego de oligonucleótidos a emplear; M o U.

Tabla 12. Concentraciones y volúmenes de trabajo empleados para realizar las reacciones de MS-PCR.

| | Stock | Trabajo | 1X (μ L) |
|-------------------|------------------|---------|---------------|
| Mix de reacción | 2X | 1X | 10 |
| Oligonucleótido F | 10 pmol/ μ l | 20 pmol | 2 |
| Oligonucleótido R | 10 pmol/ μ l | 20 pmol | 2 |
| H2O | | cbp | 2 |
| DNA | | 200ng | 4 |
| Vol. Rx'n | | | 20 |

Los volúmenes y las concentraciones finales fueron las mismas para los dos juegos de oligonucleótidos (M y U) de cada gen (leptina y adiponectina).
Cbp: Cuanto baste para: F: Forward; R: Reverse.

Las reacciones de MS-PCR de los genes de leptina y adiponectina se realizaron en un termociclador punto final MyCycler™ Thermal Cycler (Bio-Rad).

La amplificación específica de cada gen de interés presenta determinadas condiciones de reacción se resumirán las condiciones empleadas para cada gen analizado.

6.10.1 MS-PCR del gen de leptina

Es importante destacar que es necesario emplear dos juegos de oligonucleótidos para cada gen, uno para DNA metilado y otro para DNA no metilado. En las tablas 13 y 14 se muestran las condiciones empleadas para los oligonucleótidos de leptina M y U respectivamente.

Tabla 13. Condiciones de ciclado y temperaturas empleadas para amplificar la isla CpG de leptina con los oligonucleótidos M.

| Leptina: PCR juego de oligonucleótidos M | | | |
|--|-------------|--------|-------------|
| Paso | Temperatura | Tiempo | |
| Activación de la enzima | 95° C | 10 min | |
| | | | |
| Incubación | 94° C | 30 seg | |
| Alineamiento | 57° C | 30 seg | x 40 ciclos |
| Elongación | 72° C | 30 seg | |
| | | | |
| Elongación | 72° C | 10 min | |
| incubación | 4° C | ∞ | |

Tabla 14. Condiciones de ciclado y temperaturas empleadas para amplificar la isla CpG de leptina con los oligonucleótidos U.

| Leptina: PCR juego de oligonucleótidos U | | | |
|--|-------------|--------|-------------|
| Paso | Temperatura | Tiempo | |
| Activación de la enzima | 95° C | 10 min | |
| | | | |
| Incubación | 94° C | 30 seg | |
| Alineamiento | 55.1° C | 30 seg | x 40 ciclos |
| Elongación | 72° C | 30 seg | |
| | | | |
| Elongación | 72° C | 10 min | |
| incubación | 4° C | ∞ | |

6.10.2 MS-PCR del gen de adiponectina

A continuación, se muestran las condiciones para las reacciones de PCR usando los oligonucleótidos de adiponectina M (Tabla 15) y U (Tabla 16).

Tabla 15. Condiciones de ciclado y temperaturas y temperaturas empleadas para amplificar la isla CpG de adiponectina con los oligonucleótidos M.

| Adiponectina: PCR juego de oligonucleótidos M | | | |
|---|-------------|--------|-------------|
| Paso | Temperatura | Tiempo | |
| Activación de la enzima | 95° C | 10 min | |
| | | | |
| Incubación | 94° C | 30 seg | |
| Alineamiento | 56.7° C | 30 seg | x 40 ciclos |
| Elongación | 72° C | 30 seg | |
| | | | |
| Elongación | 72° C | 10 min | |
| Incubación | 4° C | ∞ | |

Tabla 16. Condiciones de ciclado y temperaturas empleadas para amplificar la isla CpG de adiponectina con los oligonucleótidos U.

| Adiponectina: PCR juego de oligonucleótidos U | | | |
|---|-------------|--------|-------------|
| Paso | Temperatura | Tiempo | |
| Activación de la enzima | 95° C | 10 min | |
| | | | |
| Incubación | 94° C | 30 seg | |
| Alineamiento | 55.8° C | 30 seg | x 40 ciclos |
| Elongación | 72° C | 30 seg | |
| | | | |
| Elongación | 72° C | 10 min | |
| incubación | 4° C | ∞ | |

6.11 Análisis estadístico

Para llevar a cabo el análisis estadístico, se empleó el paquete IBM SPSS Statistical versión 18. Los datos que se presentan en las tablas y en gráficas se expresan en medias \pm ES. Para las diferencias entre los diferentes grupos se usó Anova de una vía con *post hoc* de Bonferroni, se realizaron correlaciones de Pearson, pruebas de chi-cuadrada (metilación) y análisis de regresión lineal múltiple.

VII. Resultados

Perfil metabólico, insulina, sICAM-1 y adipocinas (leptina y adiponectina)

La población fue de 227 pacientes, de ambos géneros con edades entre los 10 y 16 años. Se registraron sus medidas antropométricas y se tomó una muestra de sangre para separar suero y cuantificar el perfil bioquímico. Los grupos se conformaron de acuerdo con su percentil de IMC (>95) y al HOMA (>3.4). Se formaron 2 grupos: Eutróficos y Obesos, a su vez, éste último se subdividió en obesos con RI (Ob-RI) y sin RI (Ob no RI). Con el fin de establecer si existen diferencias en las variables antropométricas y bioquímicas evaluadas, se realizó inicialmente una t de student para comparar los grupos: eutróficos y obesos. Se usó la prueba estadística de Anova de una vía para comparar los subgrupos de obesos (con y sin RI) y los eutróficos. Las pruebas de t de student y Anova de una vía son pruebas estadísticas empleadas para establecer si existe diferencia significativa entre las medias de las variables de los diferentes grupos de estudio.

Al comparar las características generales de la población de estudio, los grupos de eutróficos y obesos presentaron similitudes en los valores obtenidos para la edad y el desarrollo puberal, por lo tanto, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Los adolescentes obesos presentaron valores mayores para: CC, FC, PAS y PAD respecto al grupo de eutróficos. De acuerdo con su valor de HOMA, los adolescentes obesos se dividieron en: Ob no RI y Ob-RI. El 52.8% de los participantes obesos presentaron RI, los sujetos Ob-RI tuvieron valores mayores de FC y los Ob no RI mayores de PAD respecto a los eutróficos. Entre subgrupos de obesos, no se encontró diferencia estadísticamente significativa en ninguna de las variables descritas. En la tabla 17 se encuentran resumidas las características generales de la población estudiada.

Tabla 17. Características generales de la población de estudio.

| | Eutróficos | Obesos | Ob no RI | Ob-RI |
|-----------------|-------------|----------------|----------------|---------------|
| n=227 | 104 | 123 | 58 | 65 |
| n (H/M) | 57/47 | 69/54 | 32/26 | 37/28 |
| Edad (años) | 12.8 ± 1.5 | 12.6 ± 1.6 | 12.5 ± 1.5 | 12.7 ± 1.7 |
| Peso (kg) | 43.4 ± 8.1 | 69.9 ± 16.1** | 66.4 ± 14.8** | 73.1 ± 16.7** |
| Talla (m) | 151.6 ± 9.1 | 155.6 ± 9.4 | 153.7 ± 9.4 | 157.2 ± 9.0 |
| Percentil (IMC) | 50.5 ± 24.4 | 96.8 ± 3.0** | 96.6 ± 2.7** | 97 ± 3.2** |
| CC (cm) | 71.7 ± 6.9 | 96.8 ± 12.0** | 93.7 ± 10.7** | 97.8 ± 12.9** |
| FC (lat/min) | 72.4 ± 6.1 | 76.0 ± 7.6** | 75.6 ± 6.4* | 76.4 ± 8.6** |
| PAS (mm Hg) | 103.2 ± 9.8 | 108.7 ± 10.0** | 108.3 ± 10.4** | 109.1 ± 9.7** |
| PAD (mm Hg) | 67.2 ± 6.4 | 70.6 ± 7.7** | 71.1 ± 7.5** | 70.2 ± 7.8* |

H: Hombres; M: Mujeres; IMC: Índice de masa corporal; CC: Circunferencia de cintura; FC: Frecuencia cardíaca; lat: latidos; PAS: Presión arterial sistólica; PAD: Presión arterial diastólica. *p≤0.05, **p≤0.01 vs. eutróficos.

La tabla 18 muestra el perfil bioquímico de la población de estudio. Los obesos presentan valores mayores ($p \leq 0.05$) de glucosa, insulina, HOMA, colesterol, TGs y HDL comparados con el grupo de eutróficos. Los valores de insulina fueron estadísticamente mayores y los de HDL menores en los Ob no RI respecto al grupo de eutróficos. El grupo Ob-RI presenta valores mayores ($p \leq 0.001$) en todas las variables en relación con los eutróficos. Entre Ob no RI y Ob-RI se observaron diferencias significativas en todas las variables, a excepción del HDL, siendo mayores los valores en los Ob-RI.

Tabla 18. Perfil bioquímico de la población de estudio.

| | Eutróficos | Obesos | Ob no RI | Ob-RI |
|------------------|--------------|----------------|--------------|------------------|
| n=227 | 104 | 123 | 58 | 65 |
| n (H/M) | 57/47 | 69/54 | 32/26 | 37/28 |
| Glucosa (mg/dL) | 80.0 ± 11.0 | 86.3 ± 19.4** | 80.8 ± 10.4 | 91.2 ± 23.6**## |
| Insulina (UI/mL) | 7.1 ± 3.8 | 21.5 ± 15.2** | 11.15 ± 3.6* | 30.74 ± 15.6**## |
| HOMA | 1.39 ± 0.75 | 4.69 ± 3.71** | 2.23 ± 0.73 | 6.88 ± 3.93**## |
| Col. (mg/dL) | 146.0 ± 27.4 | 165.1 ± 57.8** | 149.6 ± 33.4 | 179.3 ± 70.8**## |
| TGs (mg/dL) | 96.6 ± 41.7 | 145.6 ± 84.5** | 117.4 ± 61.8 | 171.6 ± 94.3**## |
| HDL (mg/dL) | 47.4 ± 14.8 | 40.1 ± 10.6** | 40.5 ± 8.8** | 39.7 ± 12.0** |

H: Hombres; M: Mujeres, TGs: triglicéridos; Col: Colesterol; HDL: High Density Lipoproteins. *p≤0.05, **p≤0.01 vs. eutróficos; #p≤0.05, ##p≤0.01 vs. Obesos no RI.

Cuantificación sérica de sICAM-1, leptina y adiponectina

Se ha reportado que, en los adultos que presentan obesidad, ciertas moléculas como el sICAM-1 y la leptina se encuentran aumentadas y la adiponectina disminuida, estas condiciones, predisponen al desarrollo de enfermedades metabólicas y/o cardiovasculares, entre otras. En población infantil y adolescente, también se ha observado este fenómeno.

Para evaluar si existe diferencia en los niveles de sICAM-1, leptina y adiponectina de acuerdo con el IMC y al HOMA, los datos se analizaron mediante la prueba estadística Anova de una vía *post hoc* de Bonferroni.

Respecto al sICAM-1, se encontró una diferencia altamente significativa ($p \leq 0.001$) entre los diferentes grupos (Figura 18), siendo mayor la concentración en el grupo Ob-RI y menor en los eutróficos. Estos resultados concuerdan con lo esperado, ya que se ha establecido que la obesidad aunada a la RI favorece la disfunción endotelial, y el sICAM-1, es un marcador temprano de esta alteración.

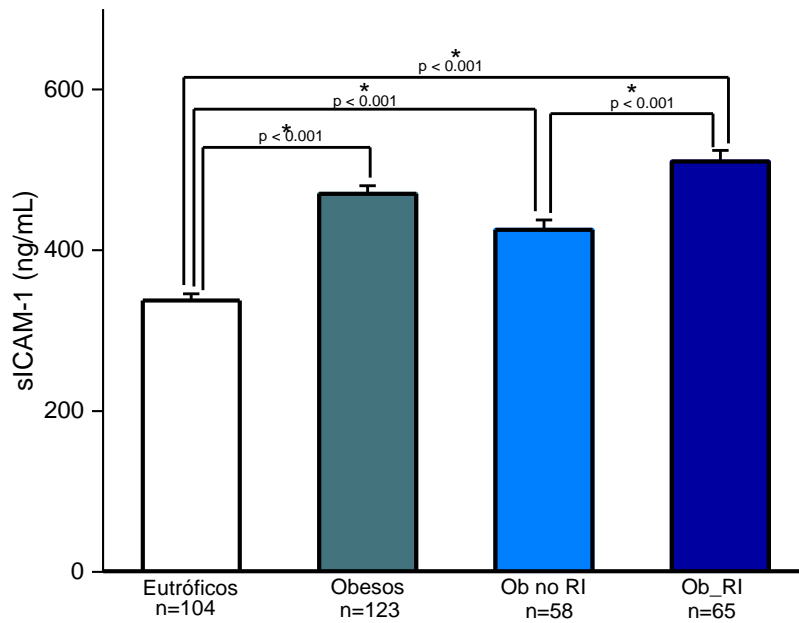


Figura 18. Concentración sérica de sICAM-1. Los datos se expresan como la media \pm ES. En el gráfico se muestra el valor de p, en caso de ser significativo.

La concentración de leptina aumentó significativamente ($p \leq 0.001$) en los sujetos que presentan obesidad en relación con los eutróficos, independientemente de la presencia de RI. Los grupos Ob no RI y Ob-RI, no mostraron diferencia estadística. Los resultados obtenidos se muestran la figura 19.

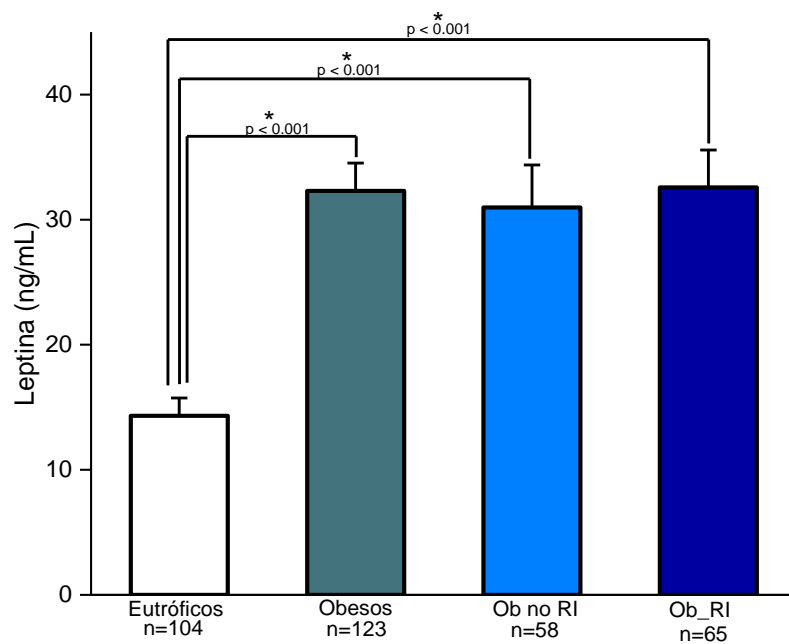


Figura 19. Concentración sérica de leptina. Los datos se expresan como la media \pm ES. En el gráfico se muestra el valor de p, en caso de ser significativo.

En las concentraciones de adiponectina, los obesos y Ob-RI, mostraron una disminución significativa de esta adipocina ($p \leq 0.001$) respecto a los eutróficos. Entre Ob no RI y Ob-RI no hubo diferencia. Los resultados se muestran en la figura 20.

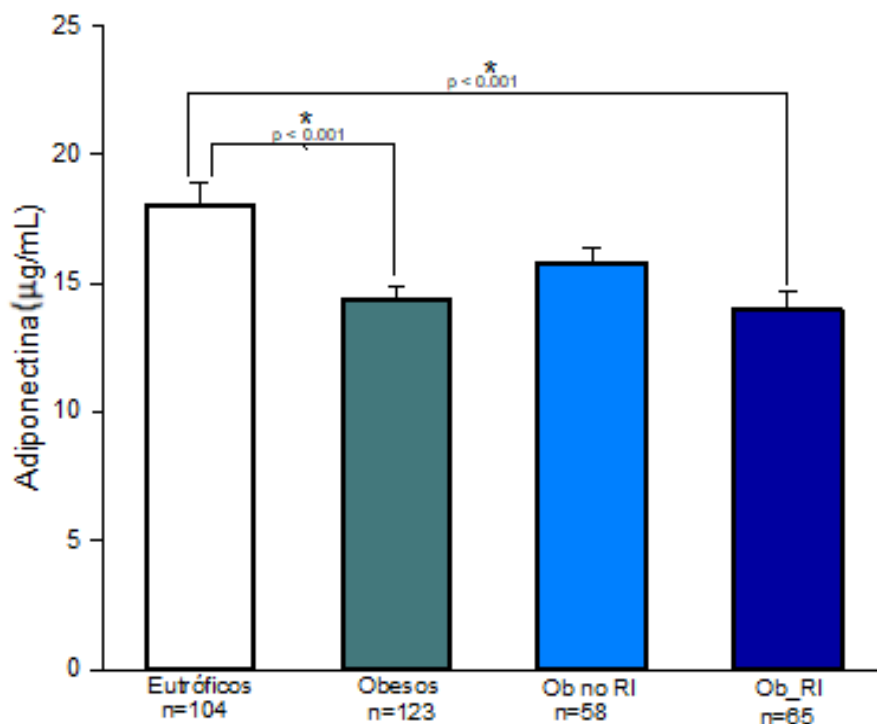


Figura 20. Concentración sérica de adiponectina. Los datos se expresan como la media \pm ES. En el gráfico se muestra el valor de p, en caso de ser significativo.

Asociación entre HOMA, sICAM-1 y adipocinas con variables antropométricas y bioquímicas.

Para valorar las posibles asociaciones entre las variables evaluadas, los datos se analizaron con el coeficiente de correlación de Pearson, el cual es una prueba que nos permite evaluar si existe relación lineal entre dos variables aleatorias cuantitativas. Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

El HOMA correlaciona de manera positiva y significativa con las siguientes variables: peso, talla, CC, FC, IMC; así como su percentil y Zscore, TGs, colesterol, glucosa e insulina y de manera negativa, con el HDL. En la tabla 19, se resumen las correlaciones de Pearson. El sICAM-1 presenta una correlación positiva con casi todas las variables, excepto con PAS, PAD y HDL que no mostraron ningún tipo de correlación. La leptina mostró una correlación positiva y significativa con el peso, con el IMC; su percentil y Zscore, la CC, la PAS, los

TGs y la insulina. Interesantemente, la adiponectina presenta una correlación negativa con las mismas variables que se asocian de manera positiva con la leptina.

Tabla 19. Correlaciones de Pearson para sICAM-1, leptina y adiponectina vs. variables antropométricas y bioquímicas.

| | HOMA | sICAM-1 | Leptina | Adiponectina |
|-------------------|-----------------|----------------|----------------|-----------------|
| | Valor de r | | | |
| Edad | -0.07 | -0.014 | -0.021 | 0 |
| Peso | 0.527** | 0.520** | 0.281** | -0.251** |
| Talla | 0.197** | 0.189** | 0.032 | -0.121 |
| IMC | 0.570** | 0.564** | 0.352** | -0.259** |
| Percentil del IMC | 0.423** | 0.466** | 0.380** | -0.239** |
| Zscore del IMC | 0.498** | 0.527** | 0.385** | -0.243** |
| CC | 0.498** | 0.534** | 0.288** | -0.002** |
| FC | 0.137* | 0.169* | 0.064 | -0.014 |
| PAS | 0.096 | 0.077 | 0.192** | -0.144* |
| PAD | 0.078 | 0.042 | 0.103 | -0.117 |
| TGs | 0.508** | 0.365** | 0.170* | -0.147* |
| Colesterol | 0.436** | 0.223** | 0.051 | -0.11 |
| HDL | -0.136** | -0.092 | -0.047 | 0.058 |
| Glucosa | 0.491** | 0.262** | -0.014 | -0.096 |
| Insulina | 0.931** | 0.459** | 0.261** | -0.192** |

IMC: Índice de masa corporal; CC: Circunferencia de cintura; FC: Frecuencia cardíaca; PAS: Presión arterial sistólica; PAD: Presión arterial diastólica; TGs: Triglicéridos. *p≤0.05, **p≤0.01. En negritas se muestran las asociaciones significativas.

sICAM-1 vs. HOMA

Las concentraciones séricas de sICAM-1 correlacionan de manera positiva y significativa con el HOMA ($r= 0.483$; $p < 0.001$). De acuerdo con los resultados, al incrementar el valor de HOMA, las concentraciones de sICAM-1; también

aumentan. Estos datos van de acuerdo con lo esperado, ya que el sICAM-1 es un marcador temprano de DE y de inflamación vascular. La correlación para sICAM-1 y HOMA, se muestra en la figura 21.

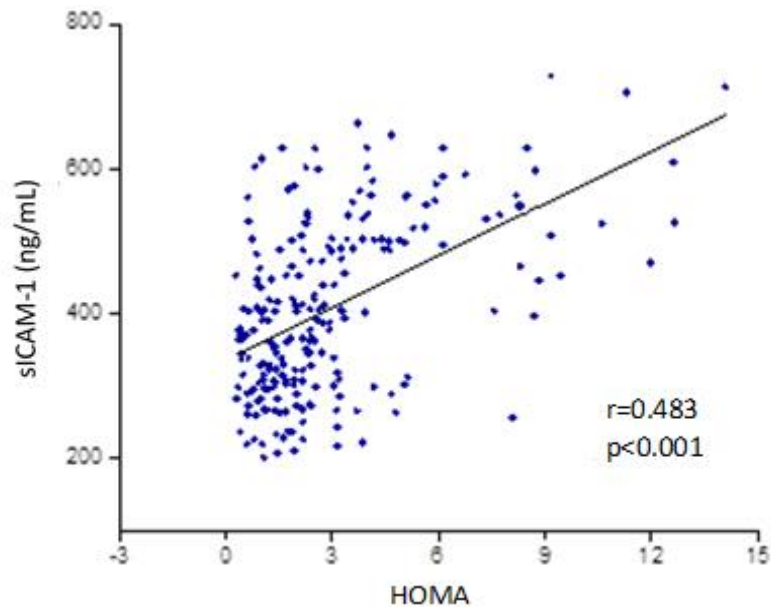


Figura 21. Correlación de Pearson para sICAM-1 vs. HOMA.
r: linealidad; p: significancia.

Leptina vs. HOMA

La leptina se encuentra incrementada en los pacientes que presentan sobrepeso y obesidad, de igual forma, en el estado de RI (HOMA >3.4). En la población de estudio, esta hormona presentó una correlación positiva y significativa con el HOMA ($r= 0.212$; $p= 0.001$). La correlación de Pearson para leptina vs. HOMA se muestran en la figura 22.

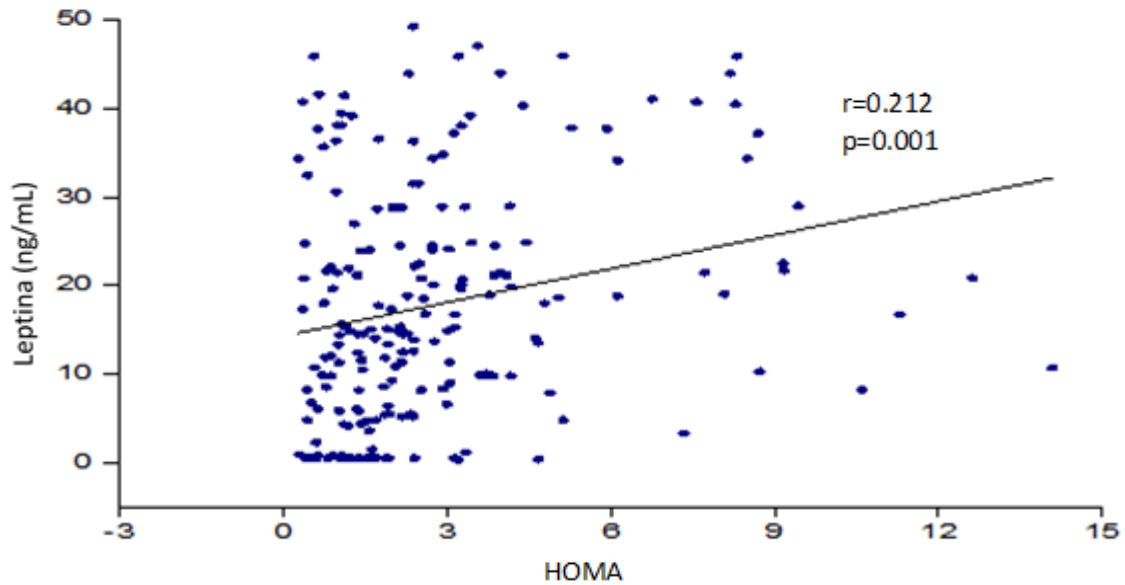


Figura 22. Correlación de Pearson para leptina vs. HOMA.
r: linealidad; p: significancia.

Adiponectina vs. HOMA

La adiponectina es una hormona que se disminuye en condiciones de obesidad y RI. Esta adipocina mostró una correlación negativa y significativa ($r= -0.184$; $p= 0.005$) con el HOMA. En la figura 23 se muestran los resultados obtenidos al realizar la prueba estadística de correlación de Pearson.

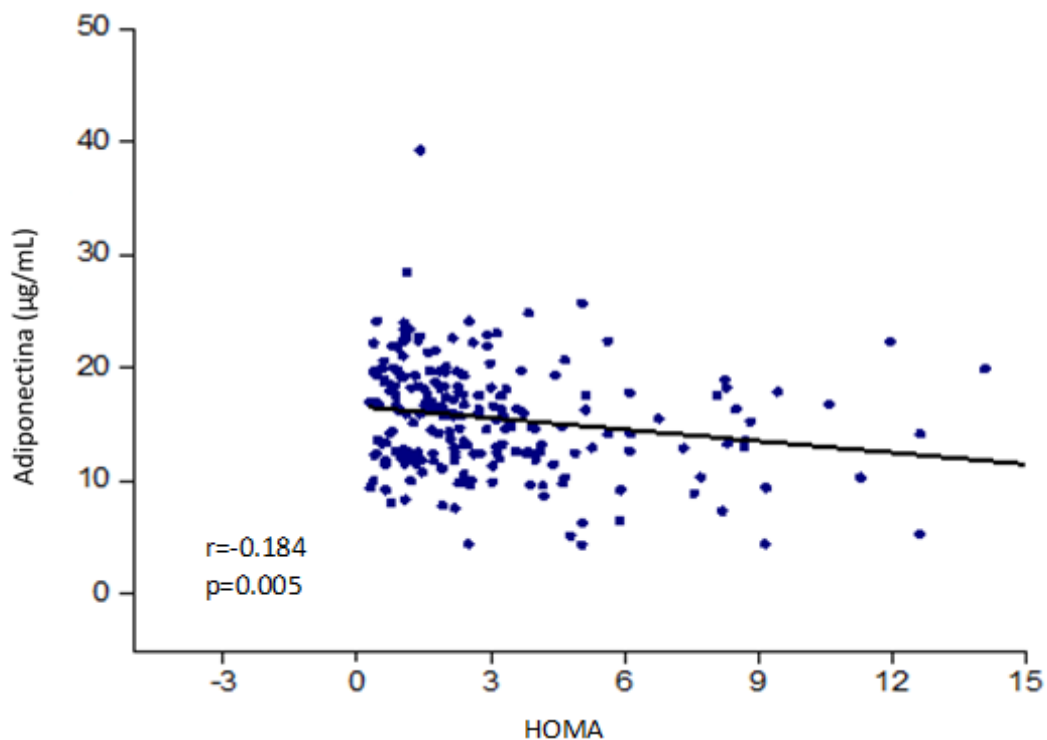


Figura 23. Correlación de Pearson para adiponectina vs. HOMA.
r: linealidad; p: significancia.

Diversos estudios han evidenciado la correlación existente entre los niveles séricos de adipocinas (leptina y adiponectina) con marcadores de riesgo cardiovascular en población adulta.

En el presente estudio, se analizó si existe correlación entre las concentraciones de sICAM-1 y leptina. La correlación encontrada fue positiva y estadísticamente significativa ($r= 0.245$; $p < 0.001$), lo cual indica que, a mayores concentraciones de leptina, habrá un aumento en las concentraciones de sICAM-1. En la figura 24 se muestra la correlación de Pearson para sICAM-1 y leptina.

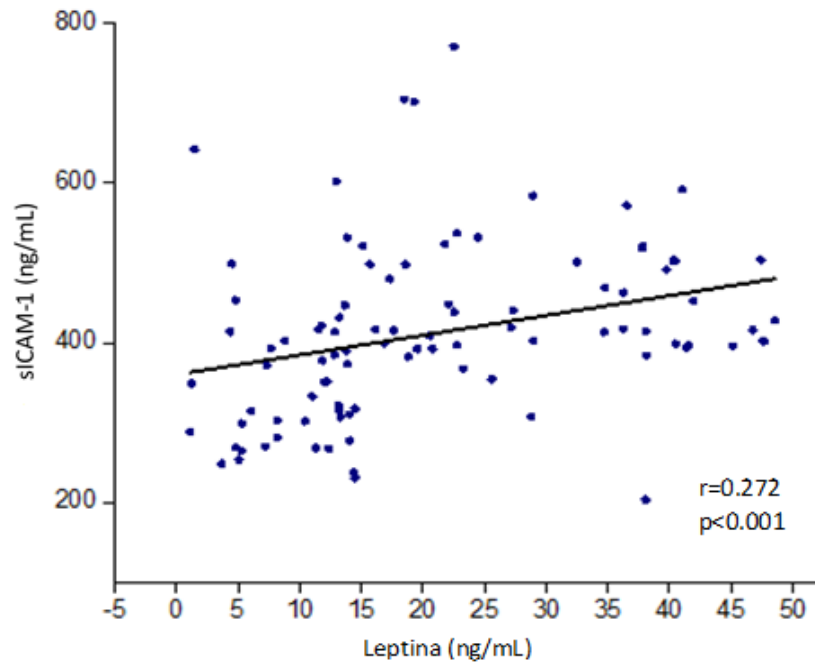


Figura 24. Correlación de Pearson para sICAM-1 vs. leptina.
r: linealidad; p: significancia.

De igual forma, se analizó si los niveles de sICAM-1 y adiponectina presentan correlación. La correlación que se presenta entre estas dos variables es negativa y estadísticamente significativa ($r= -0.162$, $p= 0.014$). En la figura 25 se pueden apreciar los resultados obtenidos, Por último, no se encontró correlación entre leptina y adiponectina (No se muestran los datos).

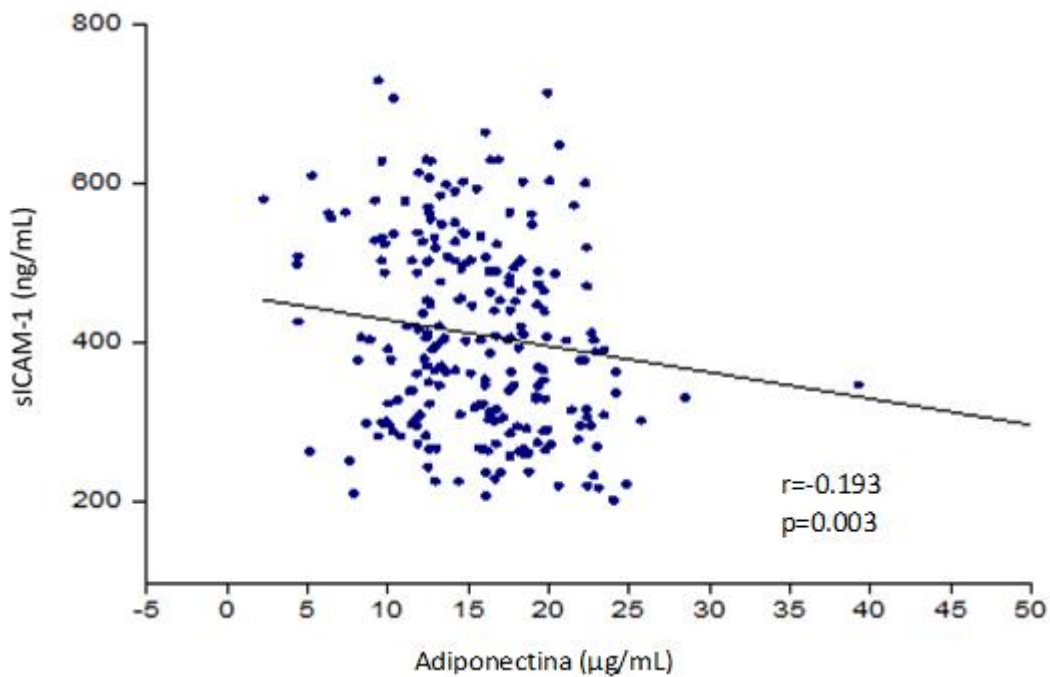


Figura 25. Correlación de Pearson para sICAM-1 vs. adiponectina.
r: linealidad; p: significancia.

Modelos de regresión lineal múltiple considerando: HOMA, sICAM-1 y adipocinas como variables dependientes.

El modelo de regresión lineal múltiple es una herramienta estadística que permite explorar la posible relación existente entre varias variables independientes (predictoras o explicativas) y una dependiente (criterio, explicada, respuesta).

De esta manera, con el objetivo de observar la interrelación entre HOMA, sICAM-1, leptina y adiponectina con los parámetros antropométricos y el perfil de lípidos, se realizaron modelos múltiples en la población de estudio. Para el análisis de cada una de las variables, se estimaron 5 (1-5) modelos que a continuación se describen.

El HOMA es una de las variables que se asocia de manera importante a alteraciones en las concentraciones de adipocinas y moléculas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias durante la obesidad.

Para el análisis de regresión múltiple, considerando HOMA como variable dependiente, se observó que, las variables que se ajustaron al modelo fueron: *Zscore* del IMC, la CC, TGs, el colesterol, la edad, la escala de Tanner (Valoración de la maduración sexual), la leptina, la adiponectina y el sICAM-1, presentando significancia estadística: la CC, TGs, el colesterol y sICAM-1. Este modelo es capaz de explicar hasta el 45.7% de las variabilidades de los valores de HOMA en la población de estudio.

En la tabla 20 se muestran los resultados obtenidos para el modelo 5, que fue el único que presentó asociaciones altamente significativas.

Tabla 20. Modelo de regresión lineal múltiple; variable dependiente: HOMA.

| Variable dependiente: HOMA | | | | |
|-----------------------------------|--------------------------|----------------|--------------|-------------------|
| Modelo | Variables independientes | R ² | β | Valor de <i>p</i> |
| 5 | <i>Zscore</i> del IMC | 0.457 | -0.025 | 0.84 |
| | CC | | 0.295 | 0.024 |
| | TGs | | 0.259 | <0.001 |
| | Colesterol | | 0.232 | 0.001 |
| | Edad | | -0.15 | 0.086 |
| | Tanner | | 0.066 | 0.436 |
| | Leptina | | -0.012 | 0.853 |
| | Adiponectina | | 0.03 | 0.648 |
| | sICAM-1 | | 0.185 | 0.008 |

IMC: Índice de masa corporal; CC: Circunferencia de cintura; TGs: Triglicéridos; sICAM-1: Molécula de adhesión intercelular. En negritas se muestran las variables que presentaron significancia.

La siguiente variable analizada fue el sICAM-1 (tabla 21). El modelo 1 consideró al HOMA como la única variable independiente que puede tener influencia sobre la concentración de sICAM-1; se observó que esta asociación es significativa. Ésta variable es capaz de explicar por sí sola, el 23.3% de los cambios presentados en la concentración de sICAM-1 en la población de estudio.

Para el modelo 2, se agregó como variable predictora el Zscore del IMC; ésta presentó significancia y la interacción observada se reforzó, el 34.2% de la concentración de sICAM-1 se explica por estas dos variables.

Se agregó la CC (modelo 3) y no presentó significancia estadística, sin embargo, los niveles de sICAM-1 son explicados en un 36.7% por este modelo.

En el modelo 4, se añadieron los TGs y el colesterol, ambas variables no presentaron significancia; se observó que el HOMA y el Zscore del IMC continúan siendo los predictores más importantes para la concentración de sICAM-1.

Para el modelo 5, se sumó un mayor número de variables: edad, estadios de Tanner y niveles de leptina y adiponectina; se encontró que este grupo de variables explican hasta el 37.2% de la variabilidad de los niveles de sICAM-1 en la población de estudio, el HOMA continuó como la variable con mayor influencia sobre esta molécula.

Tabla 21. Modelo de regresión lineal múltiple; variable dependiente: sICAM-1.

| Variable dependiente: sICAM-1 | | | | |
|--------------------------------------|--------------------------|----------------|--------------|------------------|
| Modelo | Variables independientes | R ² | β | Valor de p |
| 1 | HOMA | 0.233 | 0.483 | <0.001 |
| 2 | HOMA | 0.342 | 0.293 | <0.001 |
| | Zscore del IMC | | 0.381 | <0.001 |
| 3 | HOMA | 0.367 | 0.246 | <0.001 |
| | Zscore del IMC | | 0.332 | 0.004 |
| | CC | | 0.127 | 0.273 |
| 4 | HOMA | 0.365 | 0.220 | 0.005 |
| | Zscore del IMC | | 0.253 | 0.042 |
| | CC | | 0.180 | 0.144 |
| | TGs | | 0.091 | 0.249 |
| | Colesterol | | -0.013 | 0.861 |
| 5 | HOMA | 0.372 | 0.214 | 0.008 |
| | Zscore del IMC | | 0.244 | 0.075 |
| | CC | | 0.162 | 0.248 |
| | TGs | | 0.075 | 0.352 |
| | Colesterol | | -0.010 | 0.895 |
| | Edad | | -0.059 | 0.522 |
| | Tanner | | 0.076 | 0.387 |
| | Leptina | | 0.044 | 0.501 |
| | Adiponectina | | -0.064 | 0.323 |

HOMA: Modelo de homeostasis metabólica; IMC: Índice de masa corporal; CC: Circunferencia de cintura; TGs: Triglicéridos. En negritas se muestran las variables que presentaron significancia.

Para evaluar la influencia de las variables anteriormente empleadas sobre las concentraciones séricas de leptina se realizaron varios modelos de regresión lineal múltiple (Tabla 22).

En el modelo 1, se consideró únicamente el HOMA y de acuerdo con los resultados obtenidos, resultó ser un predictor de fuerza moderada para las concentraciones de leptina, explicando solamente el 4.5% de la variabilidad encontrada.

Al modelo 2, se añadió el *Zscore* del IMC, el cual, es la única variable que presenta influencia sobre los niveles de sICAM-1, el HOMA perdió su significancia, así, este modelo explica el 15.8% de las concentraciones de leptina.

Para el modelo 3, se agregó la CC, que como se recordará, es un marcador de obesidad abdominal. Esta última variable no presenta significancia estadística y el *Zscore* del IMC continúa como la única que presenta significancia, de esta manera, el modelo explica el 15.6% de las variaciones de esta hormona.

En el modelo 4, se sumaron los TGs y el colesterol; este modelo explica el 16.3% de la variabilidad de leptina, siendo el *Zscore* del IMC la única variable con significancia estadística.

Modelo 5, el ajuste realizado para los parámetros antropométricos (edad y Tanner), y adipocinas (leptina y adiponectina), encontramos que, el *Zscore* del IMC fue la determinante más importante para la concentración de leptina, explicando el 17.6% de su variabilidad.

De acuerdo con los diferentes modelos empleados para ver la influencia de diversas variables sobre la concentración de leptina, podemos concluir que la más importante es el *Zscore* del IMC.

Tabla 22. Modelo de regresión lineal múltiple; variable dependiente: leptina.

| Variable dependiente: Leptina | | | | |
|-------------------------------|--------------------------|----------------|--------------|------------------|
| Modelo | Variables independientes | R ² | β | Valor de p |
| 1 | HOMA | 0.045 | 0.212 | 0.001 |
| 2 | HOMA | 0.158 | 0.019 | 0.787 |
| | Zscore del IMC | | 0.387 | <0.001 |
| 3 | HOMA | 0.156 | 0.005 | 0.944 |
| | Zscore del IMC | | 0.503 | <0.001 |
| | CC | | -0.136 | 0.31 |
| 4 | HOMA | 0.163 | 0.031 | 0.729 |
| | Zscore del IMC | | 0.519 | <0.001 |
| | CC | | -0.171 | 0.227 |
| | TGs | | 0.076 | 0.403 |
| | Colesterol | | -0.117 | 0.173 |
| 5 | HOMA | 0.176 | -0.001 | 0.990 |
| | Zscore del IMC | | 0.480 | 0.002 |
| | CC | | -0.121 | 0.450 |
| | Triglicéridos | | 0.071 | 0.440 |
| | Colesterol | | -0.119 | 0.169 |
| | Edad | | -0.128 | 0.226 |
| | Tanner | | 0.110 | 0.277 |
| | Adiponectina | | 0.058 | 0.501 |

HOMA: Modelo de homeostasis metabólica; IMC: Índice de masa corporal; CC: Circunferencia de cintura; TGs: Triglicéridos. En negritas se muestran las variables que presentaron significancia.

La adiponectina es considerada una hormona anti-inflamatoria, anti aterogénica y por ende cardioprotectora. Sus niveles están disminuidos en personas que presentan obesidad. Mediante este modelo, se pretendió establecer cuales

variables presentaron un mayor grado de influencia sobre las concentraciones séricas de esta adipocina, de igual forma que con las variables dependientes anteriores, se evaluaron varios modelos (Tabla 23).

De igual manera que para las otras variables, inicialmente (modelo 1) se considera únicamente al HOMA como variable independiente y aunque la interacción resulta significativa ($p=0.005$), este modelo explica solamente el 3.4% de los cambios de la adiponectina en la población de estudio.

Posteriormente, se añadió el *Zscore* del IMC (Modelo 2) incrementando la explicación de las concentraciones del 3.4% al 7%, interesantemente, el *Zscore* del IMC la única variable que presentó significancia. Se adicionó la variable CC (Modelo 3) siendo la única variable que mostró significancia estadística, y de acuerdo con los resultados obtenidos, este modelo explica el 14.3% de las variaciones en las concentraciones de adiponectina encontradas.

Se evaluó la influencia de los TGs y el colesterol (Modelo 4) y de igual manera que el modelo anterior, la CC fue significativa, este modelo explica el 12.5% de los cambios encontrados en las concentraciones de adiponectina.

En el modelo 5, se hicieron ajustes para edad, Tanner, leptina; y la CC continuó como la única variable con significancia estadística. Este modelo explica el 13.6% de la variabilidad de las concentraciones de adiponectina.

La obesidad abdominal, que se diagnostica mediante la medición de la CC, fue la variable que presentó mayor influencia sobre los niveles de adiponectina. Se observa que la correlación es negativa, es decir, a mayor CC menores niveles de adiponectina.

Tabla 23. Modelo de regresión lineal múltiple; variable dependiente: adiponectina

| Variable dependiente: Adiponectina | | | | |
|---|--------------------------|----------------|---------------|--------------|
| Modelo | Variables independientes | R ² | β | Valor de p |
| 1 | HOMA-IR | 0.034 | -0.184 | 0.005 |
| 2 | HOMA-IR | 0.07 | 0.076 | 0.787 |
| | Zscore del IMC | | -0.219 | 0.004 |
| 3 | HOMA-IR | 0.143 | -0.053 | 0.503 |
| | Zscore del IMC | | 0.135 | 0.309 |
| | CC | | -0.46 | 0.001 |
| 4 | HOMA-IR | 0.125 | 0.035 | 0.7 |
| | Zscore del IMC | | 0.121 | 0.404 |
| | CC | | -0.423 | 0.004 |
| | TGs | | -0.091 | 0.323 |
| | Colesterol | | -0.031 | 0.721 |
| 5 | HOMA-IR | 0.136 | 0.053 | 0.579 |
| | Zscore del IMC | | 0.150 | 0.351 |
| | CC | | -0.437 | 0.007 |
| | TGs | | -0.100 | 0.288 |
| | Colesterol | | -0.021 | 0.812 |
| | Edad | | -0.011 | 0.919 |
| | Tanner | | 0.075 | 0.471 |
| | Leptina | | -0.088 | 0.323 |

Modelo de homeostasis metabólica; IMC: Índice de masa corporal; CC: Circunferencia de cintura; TGs: Triglicéridos. En negritas se muestran las variables que presentaron significancia.

Determinación del estado de metilación de los genes que codifican para leptina y adiponectina en la población de estudio.

Para llevar a cabo las MS-PCR de las muestras de los pacientes, previamente se corroboró la funcionalidad de los oligonucleótidos de la siguiente manera, se corrieron PCR's con los controles de DNA genómico (metilado y no metilado). Se realizaron PCR's de ambos genes para el juego de oligonucleótidos M con control de DNA metilado, control de DNA no metilado y DNA sin transformar, de igual manera con los oligonucleótidos U, se procesaron, además, muestras de DNA obtenido de donadores voluntarios. Se usó un marcador de peso molecular de 100 pb (Marca Axygen). Las condiciones empleadas para cada gen y juego de oligonucleótidos se mencionaron con anterioridad.

Los resultados correspondientes a la prueba realizada con los oligonucleótidos M y U del gen de adiponectina se muestran en la figura 26 y 27 respectivamente.

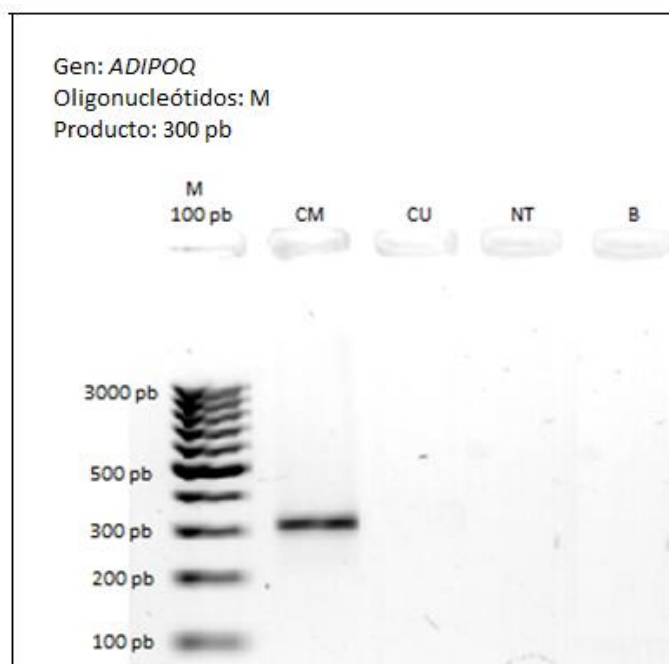


Figura 26. Gel representativo de la prueba de MS-PCR del gen de adiponectina usando oligonucleótidos Metilados (M). M: Marcador de peso molecular de 100 pb; CM: Control metilado; CU: Control no metilado; NT: DNA no transformado con bisulfito de sodio; B: Blanco.

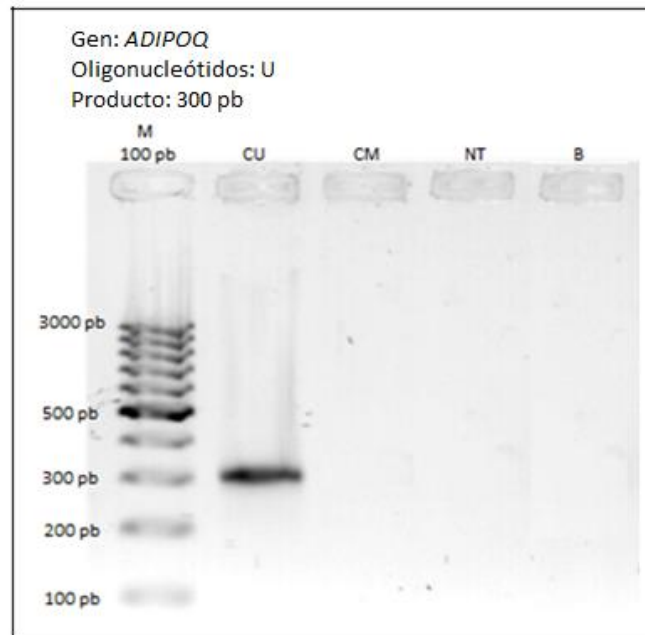


Figura 27. Gel representativo de la prueba de MS-PCR del gen de adiponectina usando oligonucleótidos no metilados (U). M: Marcador de peso molecular de 100 pb; CM: Control metilado; CU: Control no metilado; NT: DNA no transformado con bisulfito de sodio; B: Blanco.

El objetivo de esta prueba fue descartar que los oligonucleótidos amplificaran de manera cruzada, así como que lo hicieran con DNA sin transformar con bisulfito. Como se observa, el juego de oligonucleótidos M sólo amplificó con el control M y el juego de oligonucleótidos U sólo amplificó con el control no metilado. En ningún caso, el DNA sin transformar o el blanco amplificaron.

Respecto a las muestras, en cada gel se puede observar que se cargaron las reacciones para DNA metilado y no metilado del gen correspondiente y dependiendo del juego de oligonucleótidos empleado. Se puede apreciar el marcador de peso molecular de 100 pb (Marca Axygen), el control metilado (M) o el control no metilado (U) y el blanco. A continuación, se muestran geles representativos de las MS-PCR realizadas para el gen de leptina (oligonucleótidos M y U) y adiponectina (oligonucleótidos M y U) en las figuras 28-31 respectivamente.

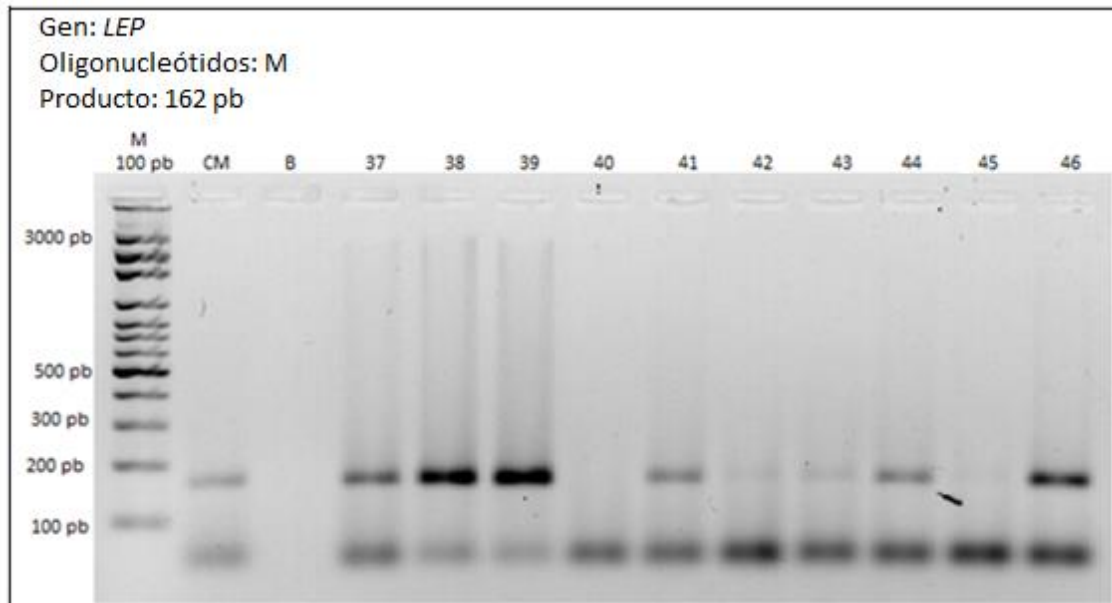


Figura 28. Gel representativo de la MS-PCR del gen de leptina empleando oligonucleótidos M. M: Marcador de peso molecular de 100 pb; CM: Control metilado; B: Blanco. Los números corresponden a los folios de cada paciente de las muestras analizadas.

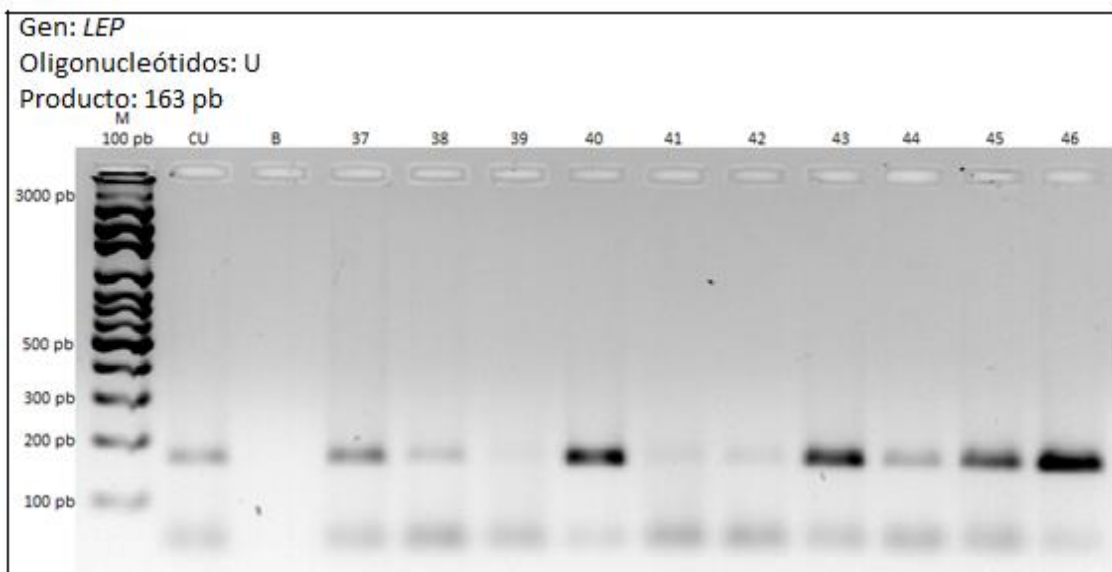


Figura 29. Gel representativo de la MS-PCR del gen de leptina empleando oligonucleótidos U. M: Marcador de peso molecular de 100 pb; CU: Control no metilado; B: Blanco. Los números corresponden a los folios de cada paciente de las muestras analizadas.

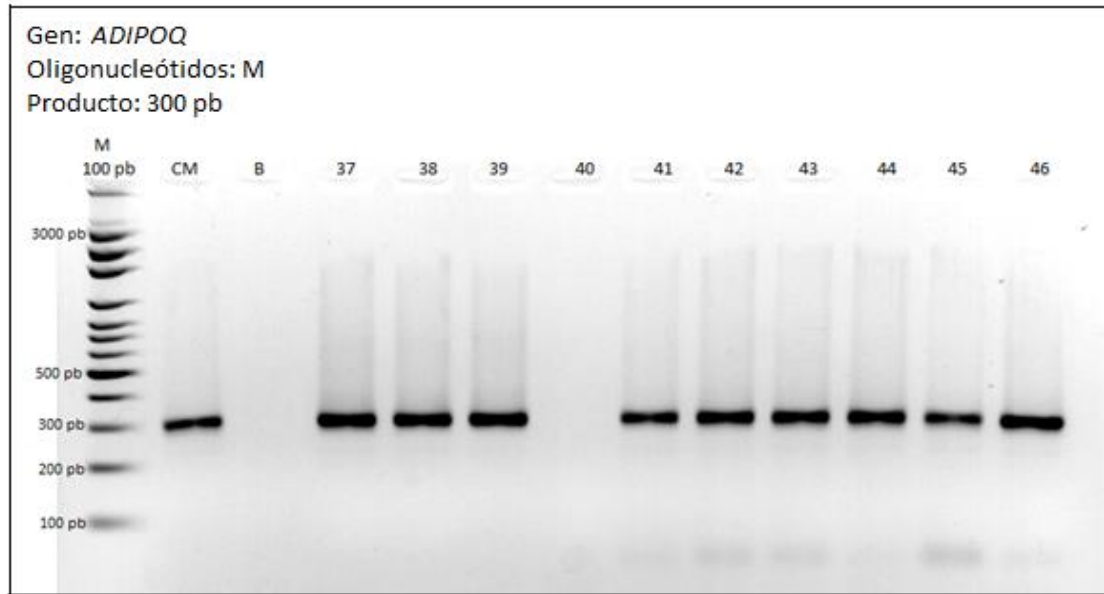


Figura 30. Gel representativo de la MS-PCR del gen de adiponectina empleando oligonucleótidos M. M: Marcador de peso molecular de 100 pb; CM: Control metilado; B: Blanco. Los números corresponden a los folios de cada paciente de las muestras analizadas.

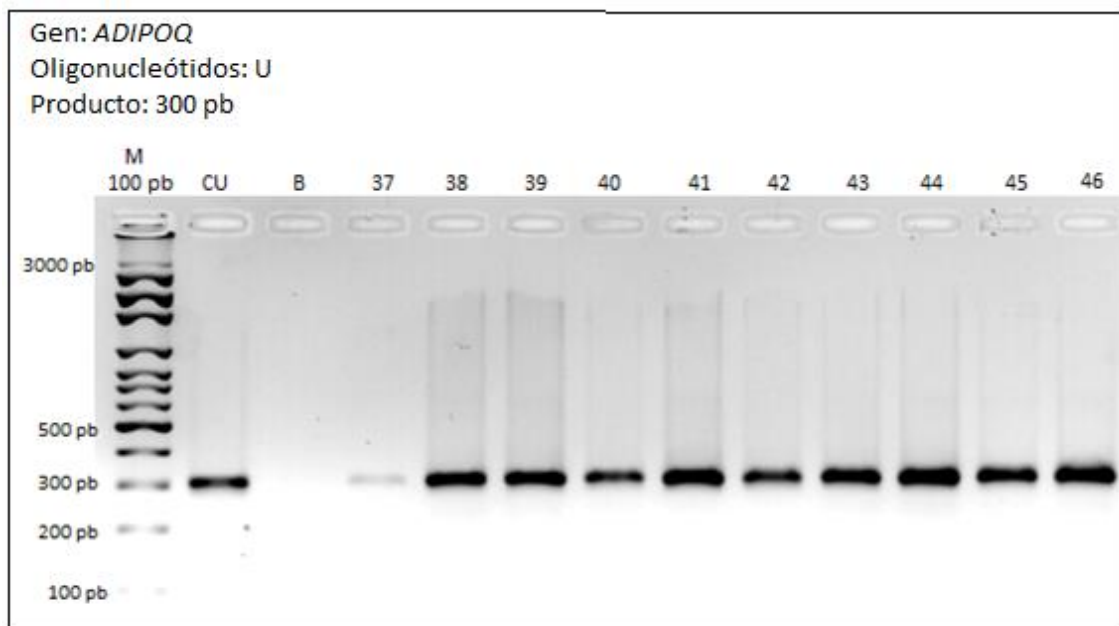


Figura 31. Gel representativo de la MS-PCR del gen de adiponectina empleando oligonucleótidos U. M: Marcador de peso molecular de 100 pb; CU: Control no metilado; B: Blanco. Los números corresponden a los folios de cada paciente de las muestras analizadas.

La ausencia de banda nos indica que el juego de oligonucleótidos M empleados para leptina o adiponectina no amplificó, lo que se significa que la isla CpG analizada está no metilada.

Respecto a los oligonucleótidos U de ambos genes, la ausencia de banda, indica que el DNA está metilado. En caso de haber banda tanto en la PCR de oligonucleótidos M y U, nos dice que existen alelos metilados y no metilados en la muestra que se analizó.

Como se observa en las diferentes figuras, las bandas del amplicón de las muestras, poseen una intensidad diferente. Es decir, una banda de mayor intensidad significa un mayor número de alelos metilados o no metilados dependiendo de los oligonucleótidos empleados para preparar el mix. En los casos donde amplificaron los dos juegos de oligonucleótidos (M y U), se consideró que el gen amplificó para M, con base en esto, se obtuvieron las frecuencias de metilación de las islas CpG estudiadas en cada gen.

Para evaluar si existen diferencias de metilación entre los diferentes grupos, se usó la prueba estadística de Chi-cuadrada, la cual, compara las frecuencias de metilación observadas en cada categoría.

En la figura 32 se representan las frecuencias de metilación del gen de leptina para los diferentes grupos.

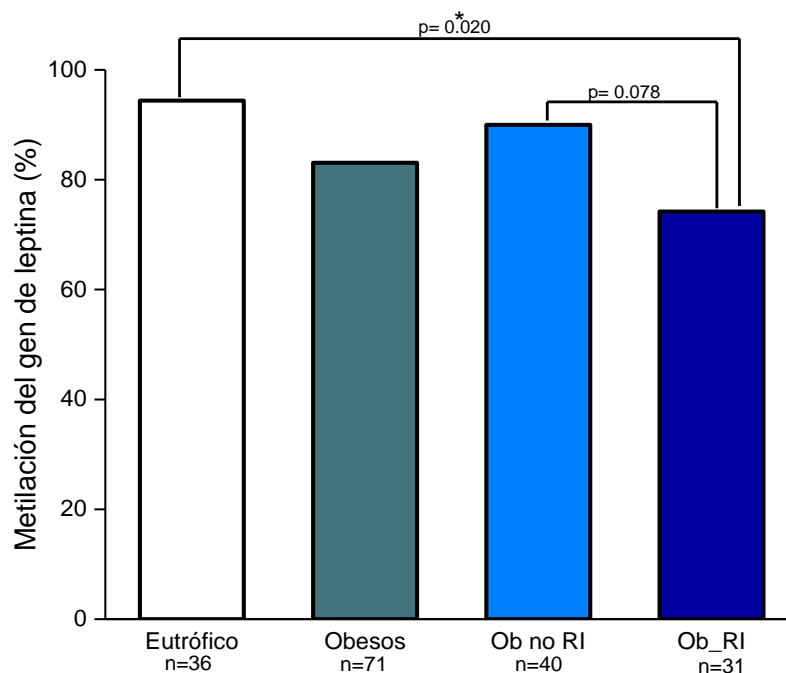


Figura 32. Frecuencias de metilación del gen de leptina en los grupos de estudio. El análisis estadístico se realizó con Chi-cuadrada.

Sólo el grupo Ob-RI (74.2%; n=23) presenta una disminución significativa ($p=0.020$) en la frecuencia de metilación respecto a los eutróficos (94.4%; n= 34). Referente al grupo de adolescentes Ob no RI vs. Ob-RI se observa que, aunque no hay diferencia estadística ($p=0.078$), se presenta una tendencia a la disminución en la metilación del gen de leptina en los Ob-RI, que podría ser explicada por la presencia de RI.

Los resultados obtenidos de frecuencia de metilación del gen de adiponectina se muestran en la figura 33.

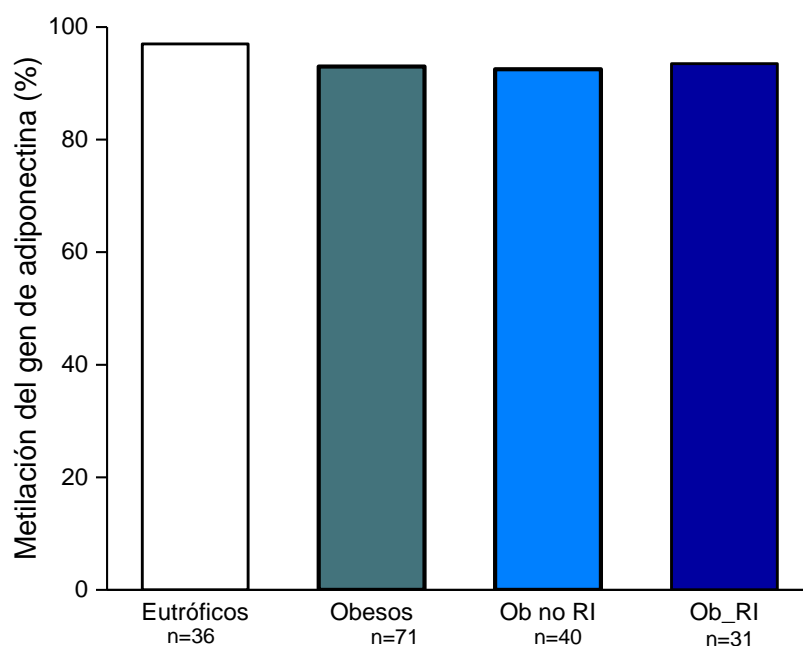


Figura 33. Frecuencias de metilación del gen de adiponectina en los grupos de estudio. El análisis estadístico se realizó con Chi-cuadrada.

Como se puede apreciar en la figura 33, la metilación del gen de adiponectina no presentó diferencia entre los diferentes grupos de estudio, las frecuencias de metilación fueron similares.

Asociación entre el perfil de metilación de los genes que codifican para las adipocinas y su concentración sérica.

Se realizó un modelo de regresión lineal múltiple, con el fin de observar la asociación de una variable de respuesta con diferentes variables independientes, se emplearon modelos (1-4) de estudio con el fin de evaluar si la metilación de los genes de leptina y adiponectina presentan influencia sobre los niveles séricos de las adipocinas. El análisis se muestra en las tablas 24 y 25 respectivamente.

En el análisis donde la leptina se consideró como variable dependiente o de respuesta, en el primer modelo, se evaluó únicamente la metilación del gen de leptina como variable independiente; no se observó una asociación significativa. Se añadió el IMC (Modelo 2); logrando significancia ambas variables: metilación del gen de leptina ($p=0.010$) e IMC ($p < 0.001$), siendo éste el de mayor influencia sobre los niveles séricos de leptina. La interacción de ambas variables explica el 28.1 % de la variabilidad de concentración de esta adipocina. Al considerar el HOMA (Modelo 3); esta variable no presenta significancia estadística y se conserva la tendencia observada en el modelo anterior. En el modelo 4, se agregó la concentración de TGs; variable que no presentó significancia, al igual que el modelo 2, se conservó la misma predisposición al incremento de leptina sérica, donde los parámetros que presentan influencia son metilación de leptina e IMC. El estadístico β nos brinda información sobre el tipo de asociación entre las variables (positiva o negativa), en este caso en particular, indica que una disminución en la metilación del gen de leptina y un aumento de IMC favorecen el incremento de los niveles de leptina, este fenómeno se observó en los modelos 2-4.

Tabla 24. Influencia de metilación de gen de leptina sobre leptina sérica.

| Variable dependiente: leptina sérica | | | | |
|---|---------------------------|----------------|---------------|-------------------|
| Modelo | Variables independientes | R ² | β | Valor de <i>p</i> |
| 1 | Metilación leptina | 0.004 | -0.061 | 0.533 |
| 2 | Metilación leptina | 0.281 | -0.231 | 0.010 |
| | IMC | | 0.553 | <0.001 |
| 3 | Metilación leptina | 0.282 | -0.23 | 0.010 |
| | IMC | | 0.531 | <0.001 |
| | HOMA | | 0.040 | 0.693 |
| 4 | Metilación leptina | 0.283 | -0.24 | 0.009 |
| | IMC | | 0.529 | <0.001 |
| | HOMA | | 0.023 | 0.829 |
| | TGs | | 0.045 | 0.634 |

IMC: Índice de masa corporal; HOMA: Modelo de homeostasis metabólica; TGs: Triglicéridos. Valor de significancia $p < 0.05$. En negritas se muestran las variables que presentaron significancia.

Se realizó este mismo análisis para evaluar la influencia de la metilación del gen de adiponectina sobre su concentración sérica y se consideraron las variables independientes empleadas para la leptina.

En el modelo 1, se evaluó solamente la metilación del gen de adiponectina; no presenta significancia, por lo tanto, tampoco relevancia biológica sobre la concentración sérica de adiponectina.

En el modelo 2, se consideró además el IMC; el cual, presentó significancia estadística ($p=0.016$), el valor de β es negativo, lo cual indica que la relación es inversa, al disminuir el IMC aumenta la adiponectina, sin embargo, sólo explica el 6% de los cambios de esta adipocina.

En los modelos 3 y 4, se sumaron el HOMA y los TGs respectivamente y ninguna presentó significancia, incluso, la significancia del IMC sobre la concentración de adiponectina se perdió en estos modelos. La tabla 25 resume los resultados obtenidos.

Tabla 25. Influencia de metilación de gen de adiponectina sobre adiponectina sérica.

| Variable dependiente: adiponectina sérica | | | | |
|--|--------------------------|----------------|---------------|--------------|
| Modelo | VARIABLES INDEPENDIENTES | R ² | β | Valor de p |
| 1 | Metilación adiponectina | 0.005 | 0.068 | 0.491 |
| 2 | Metilación adiponectina | 0.060 | 0.106 | 0.279 |
| | IMC | | -0.239 | 0.016 |
| 3 | Metilación adiponectina | 0.83 | 0.105 | 0.282 |
| | IMC | | -0.144 | 0.210 |
| | HOMA | | -0.179 | 0.116 |
| 4 | Metilación adiponectina | 0.109 | 0.108 | 0.264 |
| | IMC | | -0.116 | 0.314 |
| | HOMA | | -0.110 | 0.358 |
| | TG | | -0.182 | 0.095 |

IMC: Índice de masa corporal; HOMA: Modelo de homeostasis metabólica; TGs: Triglicéridos. Valor de significancia $p<0.05$. En negritas se muestran las variables que presentaron significancia.

VIII. Discusión

La obesidad es considerada actualmente un problema de salud a nivel mundial, debido a que se le ha asociado con un número considerable de enfermedades que se encuentran entre las primeras causas de muerte alrededor del mundo. Estudios realizados en diversas poblaciones étnicas y diferentes grupos de edad, han evidenciado la correlación existente entre la obesidad, la RI y la dislipidemia. El presente estudio confirma que la obesidad en adolescentes mexicanos está asociada a dislipidemia, RI, hiperleptinemia y disminución sérica de adiponectina. Esto representa un riesgo aumentado de desarrollar disfunción endotelial, que puede detectarse mediante la cuantificación de diversos parámetros séricos, entre ellos el sICAM-1. Interesantemente, el HOMA-IR y el sICAM-1 son predictores el uno del otro, el Zscore del IMC es una determinante independiente de la concentración de leptina. De igual manera, la CC lo es para las concentraciones séricas de adiponectina. Los resultados de este trabajo son consistentes con lo reportado por D'Adamo y cols. (2015) en donde señalan que los niños y adolescentes obesos presentan un perfil de lípidos alterado comparados con aquellos que presentan un peso normal. Debido a que la patofisiología que subyace el desarrollo de dislipidemia es de origen multifactorial, ésta no se ha podido elucidar de manera clara. Existe la hipótesis de que la RI presenta un papel protagónico en la relación obesidad-dislipidemia (Ahrens y cols., 2014; Burns y cols., 2009).

En un estudio llevado a cabo por De Giorgis y cols. (2014) en una cohorte de jóvenes obesos que presentaban RI, la relación TGs/HDL se asoció de manera significativa con esta alteración, además, se confirmó que esta relación de lípidos presenta asociación con signos tempranos de daño vascular en sujetos prepuberales.

Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que niveles altos de TGs y colesterol son predictores para el desarrollo de HOMA. Se ha postulado que la RI es una alteración fisiológica que se suma a diversos factores de riesgo para el desarrollo de ECV, pero los mecanismos mediante los cuales genera esta

patología no se han elucidado del todo. Durante la década pasada, se había considerado que la RI era consecuencia de la obesidad visceral y que no participaba en el desarrollo de complicaciones cardiovasculares. Actualmente, se ha postulado que la RI es un epifenómeno asociado a la obesidad y al síndrome metabólico (Kim, 2012).

Por otra parte, diversos estudios han demostrado que una disminución en la sensibilidad de la insulina en el endotelio conduce a la disfunción vascular, favorece la expresión de moléculas de adhesión vascular, y da origen a lesiones ateroscleróticas en ratones (Li y cols., 2013; Hasegawa y cols., 2012; Rask-Madsen y cols., 2011; Du y cols., 2006). La RI se ha atribuido a la inflamación derivada de los adipocitos en el TA con lo cual, se ha postulado la existencia de un “paradigma adipocéntrico” (Kim, 2012). Este concepto es apoyado por la suposición de que la supresión de la inflamación en el endotelio vascular previene la RI en otros órganos y es capaz de prolongar la esperanza de vida (Hasegawa y cols., 2012). Kubota y cols. (2011) realizaron un estudio en ratones obesos que demostró que la alteración genética del sustrato receptor de insulina 2 (ISR-2) en las células endoteliales reduce de manera considerable la captación de glucosa en el músculo esquelético. Estos hallazgos fortalecen la teoría del papel central que presenta el endotelio en la RI inducida por la obesidad. La DE es considerada un marcador temprano para el desarrollo de ECV. Existen diversos métodos para evaluar la disfunción endotelial, uno de los más empleados, porque no es invasivo, y brinda información relevante es la cuantificación de moléculas solubles de adhesión, que son usadas como un marcador de activación endotelial. Tzoulaki y cols. (2005) estudiaron a una población durante 12 años, reclutaron casi 1600 participantes con edades oscilantes entre los 55-74 años, se cuantificaron las concentraciones séricas de varios marcadores de disfunción endotelial, entre ellos el sICAM-1 y encontraron que resultó ser un predictor de la progresión de arterosclerosis que se midió a través de cambios en el índice tobillo/brazo.

Las concentraciones de sICAM-1 se han asociado con el riesgo de infarto al miocardio en población adulta en el género masculino, esto de acuerdo con los reportado por el Physician's Health Study (Ridker y cols.,1998; Hwang y

cols.,1997). Glowinska y cols. (2005), reportaron que los hombres que presentaron una angiografía coronaria positiva tenían concentraciones elevadas de sICAM-1 que aquellos cuya angiografía coronaria fue negativa, esto, independientemente de la presencia de otros factores de riesgo para ECV. Incluso, Lee y cols. (2008) reportaron que en población infantil las concentraciones de ICAM-1, E-Selectina e IL-6 en niños obesos fueron mayores respecto a aquellos que no presentaron obesidad, sin embargo, en adolescentes con síndrome metabólico esta relación desaparece cuando se ajusta para obesidad abdominal. Por otro lado, Garanty-Bogacka y cols. (2005) encontraron que, en los sujetos obesos con hipertensión, la concentración de ICAM-1 es mayor respecto a los normotensos. Los resultados obtenidos en el presente estudio son consistentes con lo reportado por otros autores (Byun y cols., 2014; Głowinska-Olszewska y cols., 2013; Huang y cols., 2011) y confirman la presencia de la activación endotelial en adolescentes obesos, lo cual, puede ser un factor de riesgo para desarrollar ECV.

En el presente estudio, al emplear una correlación lineal múltiple y ajustando para: edad, estadio puberal (Tanner), IMC, perfil de lípidos y adipocinas; el HOMA y sICAM-1 permanecen como fuertes predictores de concentración uno del otro. Estos datos muestran una clara interacción entre RI y la DE temprana, lo cual, puede dar origen a nuevas alternativas terapéuticas con el fin de prevenir o revertir la RI sistémica y, por ende, disminuir el riesgo de desarrollar DE y posteriormente ECV en los pacientes obesos.

Además de la RI, existen diversas adipocinas asociadas a la obesidad, entre ellas se encuentran la leptina y la adiponectina, que presentan un papel importante en las alteraciones metabólicas y cardiovasculares. Los datos obtenidos durante este estudio son consistentes con otros reportados previamente en niños y adolescentes: el aumento en las concentraciones de adipocinas pro-inflamatorias como la leptina y la reducción de la adiponectina, la cual es un mediador anti-inflamatorio derivado del TA (Ley y cols., 2008; Wang y cols., 2008; Valle y cols., 2005).

En este estudio, las concentraciones de sICAM-1 correlacionan de manera positiva con la leptina. Korda y cols. (2008) realizaron un estudio en células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) y en endotelio aórtico de ratas tratadas con diferentes tipos de dieta. Los animales sometidos a una dieta hipercalórica se dividieron en 3 subgrupos y se dio a un grupo agua simple, a otro, agua + L-arginina y por último L-arginina + sepiapterina. Al sacrificar a los animales, se tomó tejido aórtico y se trató con diferentes concentraciones de leptina de la misma manera que los cultivos de HUVEC. De acuerdo con sus resultados, la leptina incrementa la expresión de eNOS, pero la disponibilidad de NO se encuentra reducida mientras que las concentraciones de O_2 y $ONOO^-$ están incrementados durante la obesidad. El desbalance entre la expresión de eNOS y el nivel intracelular de L-arginina y/o tetrahidrobiopterina intracelular se ha postulado como un posible mecanismo de acción de la leptina para favorecer la DE. Por otro lado, se ha observado que la hiperleptinemia regula negativamente la expresión de los receptores de leptina, así como la densidad de los receptores de leptina en tejido renal de ratas y perros (Beltowski, 2012).

Un gran número de evidencias sugieren la importancia de evaluar la obesidad abdominal con el fin de valorar los riesgos de salud en niños y adolescentes (Maffeis y cols., 2008). La CC es un marcador de obesidad central, está asociado con el TA visceral, la RI, biomarcadores de inflamación y adiponectina en niños y adolescentes (Huang y cols., 2011; Lee y cols., 2008; Ogawa y cols., 2005; Huang y cols., 2003).

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que la CC es la única variable determinante para las concentraciones de adiponectina. Esto confirma que el TA es la principal contribuyente a las bajas concentraciones de adiponectina. Además, el *Zscore* del IMC es una determinante moderada e independiente para el desarrollo de hiperleptinemia.

Una herramienta que se ha explotado de manera importante es la evaluación de la metilación del DNA, ya que se ha descrito que alteraciones en los patrones de metilación de determinados genes se asocia con el desarrollo de enfermedades como el cáncer, enfermedades neurológicas y obesidad. El análisis de metilación

del DNA podría ser empleado como un instrumento de diagnóstico y/o de pronóstico durante el curso de algunas enfermedades.

La técnica empleada para evaluar el perfil de metilación de los genes de interés fue la de MS-PCR, la cual, brinda un análisis rápido del estatus de metilación de las islas CpG. Es una técnica que provee ciertas ventajas sobre otras, por ejemplo, es altamente sensible, por lo tanto, es capaz de detectar un número bajo de alelos metilados y permite el análisis de DNA en muestras pequeñas. La simultánea amplificación de productos metilados y no metilados en una muestra brinda información acerca de la densidad de metilación de los alelos. Una de las ventajas del MS-PCR vs. la secuenciación es que la primera lleva menos tiempo, ya que se evitan los pasos que implica la clonación, lo cual, agiliza el proceso, con esta técnica disminuimos el uso de reactivos empleados en la secuenciación, que son caros y existe la exposición a radioactividad.

Al analizar los resultados del perfil de metilación de los genes de leptina y adiponectina, sólo se encontraron diferencias importantes en la metilación del gen de leptina. Los resultados obtenidos en el presente estudio coinciden con lo reportado por García-Cardona y cols. (2014), Sayed y cols. (2018) y Houde y cols. (2014), en donde, los pacientes con obesidad presentan una disminución de la metilación en el gen de leptina respecto a los sujetos no obesos y, además, concentraciones elevadas de esta adipocina. Por otro lado, se ha demostrado una correlación inversa entre expresión de leptina y la metilación del gen *LEP* evaluada en TAB (Marchi y cols., 2011; Stöger y cols., 2006).

Houde y cols. (2015) evaluaron la metilación de los genes de leptina y adiponectina en TA (subcutáneo y visceral) y en sangre, encontrándose asociación de la metilación de estos genes con complicaciones relacionadas a la obesidad, incluyendo dislipidemia, hiperglicemia e hipertensión. La concentración sérica de LDL correlacionó de manera positiva con la metilación del gen de leptina en el TA abdominal (TAA) y con adiponectina en TA subcutáneo (TAS) y TAA. Así mismo provee evidencia de que los niveles de metilación del gen de leptina medidos en sangre correlacionan de manera negativa con el IMC. Estos hallazgos concuerdan con lo obtenido en este trabajo.

Con respecto a la metilación de adiponectina, este grupo encontró una correlación positiva con el IMC cuando se midió en TA subcutáneo, no así en sangre periférica. Esta asociación tampoco se encontró en el presente estudio.

Múltiples grupos de investigación han evidenciado la asociación de la metilación del DNA con la obesidad. Plagemman y cols. (2009) reportaron un aumento en la metilación en el gen de POMC y, además, el Neuropeptido Y presentó un nivel bajo de metilación en el tejido hipotalámico de ratas neonatas a las cuales se les indujo una sobrenutrición mediante la disminución del tamaño de la camada para cada madre. El grupo sobrealimentado presentó además importantes alteraciones metabólicas presentes en la obesidad. En un estudio realizado por Agha y cols. (2015) en población adulta, se tomó a los participantes una biopsia de TA y una de sangre periférica. Al analizar la metilación de los genes estudiados (*AOC3*, *LIPE*, *SOD3*, *AQP7* y *CETP*), que están asociados al desarrollo de adiposidad, reportaron que sólo existe correlación con la metilación del DNA extraído de TA con la adiposidad, fenómeno que no se observó con DNA obtenido de sangre periférica.

Existen más evidencias que demuestran la importancia de evaluar los estatus de metilación de manera tejido específico, aunque también pacientes que están sanos pueden presentar metilación de algunos genes que proponen sean empleados, sobre todo, como marcadores tumorales (Guan y cols., 2013). Adalsteisson y cols. (2012) reportan que un factor poco favorable para llevar a cabo análisis de metilación en sangre total es la heterogeneidad de tipos celulares concentrados en este fluido. Este grupo evaluó el perfil de metilación de 4 genes en sangre, y observaron que existen diferencias estadísticamente significativas al comparar la metilación de células mononucleares vs. Polimorfonucleares. La especificidad tisular y la poca información que brindan los tejidos no específicos como los leucocitos de sangre periférica sobre los patrones de metilación es un área de mucho debate, sin embargo, el uso de DNA extraído de leucocitos o de cordón umbilical es una práctica común en estudios epidemiológicos debido a que estas son las únicas fuentes de DNA disponibles (Relton y cols., 2012).

Zmetakova y cols. (2013) usaron diferentes muestras biológicas: tumores, plasma y células de sangre periférica de pacientes con cáncer de seno y de controles sanos para medir la metilación de 11 genes y observaron que la frecuencia de metilación del DNA en las mujeres con cáncer fue mayor en los genes comúnmente no metilados, algunos son supresores de tumores como *RASSF1A* (71.9%), *ADAM23* (38%) Y *CXCL12* (34.4%), incrementándose a 86%, 53% y 64% respectivamente. En los pacientes se encontraron mayores niveles de metilación en genes supresores de tumores como *CXCL12*, *ESR1* y *TIMP3* respecto a los controles, pero los valores no excedían el 15% de diferencia. No se encontró correlación entre la metilación encontrada en tumores y la metilación en sangre de las pacientes. Respecto al análisis de la metilación en muestras de plasma, se encontraron valores cercanos entre pacientes y controles.

Además, Huang y cols. (2016) reportaron que la metilación evaluada en TA y sangre era similar en sujetos obesos, no así en aquellos con IMC bajos, en donde se observa menos correlación. De los 20,073 genes analizados, sólo 1961 mostraron una correlación entre TA y sangre. Entre los hallazgos más importantes señalan lo siguiente: la metilación de los genes *FASN* (del inglés, *Fatty Acid Synthase*) y *HIF3A* (del inglés, *Hypoxia-Inducible Factor-3*) en TA presentaron una asociación importante con el IMC, pero esta no se observa en sangre, Por último, en lo que respecta al gen *C21orf81* (silenciador génico) la metilación en TA o en sangre, no fue significativa. La discordancia encontrada en la metilación de los genes en tejido específico y sangre se enriquecen en los procesos biológicos relacionados a la respuesta inmune, a la activación o diferenciación de linfocitos y leucocitos, así como a la coagulación sanguínea. La metilación del DNA puede proveernos una ventana hacia los componentes de los tejidos, se sabe que distintos inmunofenotipos presentan regiones diferencialmente metiladas. Esto apoya la oportunidad de analizar en sangre para definir el perfil de células inmunes en cualquier situación normal o de enfermedad usando como marcador la metilación del DNA, incluso más que la citometría de flujo. Es importante mencionar que la comparación del perfil de metilación en diferentes tejidos sería capaz revelar la existencia de heterogeneidad de los tejidos, lo cual podría brindarnos un nuevo mecanismo

para detectar la susceptibilidad a desarrollar una enfermedad. Esto garantiza un estudio más completo, que incluye la evaluación de la metilación de DNA después de la fenotipificación específica, anatómica, histología y temporal. Los autores concluyen que la metilación en tejidos periféricos o en sangre, no refleja el perfil de metilación del tejido diana. Debido a estos resultados, es necesario evaluar la utilidad de medir la metilación en sangre para establecer un diagnóstico certero en el desarrollo de múltiples enfermedades.

Por otro lado, Dusntan y cols. (2017) midieron la metilación de *LEP*, *ICAM-1*, *CRH* y *LINE-1* en la saliva de adolescentes obesos con edades comprendidas de 10 a 15 años y reportaron una asociación positiva únicamente entre la metilación del gen de leptina y el IMC. Al estratificar de acuerdo con el género y al grado de obesidad se encontraron que la asociación descrita es mayor en los participantes del género masculino que presentaron obesidad. Con base en sus resultados, proponen que la medición de la metilación del gen de leptina en saliva es una herramienta útil para realizar estudios de metilación y obesidad particularmente en niños y adolescentes que presentan cierto temor a la venopunción. Las ventajas que presenta hacer uso de este tipo de muestra son entre otras: es una técnica no invasiva; de bajo costo y de acuerdo con los resultados, biológicamente consistente. Este tipo de muestra podría enfocarse en el estudio de los cambios epigenéticos durante el asentamiento y desarrollo de la obesidad.

Se ha establecido que la metilación del DNA desempeña un papel importante en el control de la expresión génica, por ejemplo, durante el desarrollo para asegurar la inactivación del cromosoma X o la impronta genómica. Además, se ha observado que alteraciones en los patrones de metilación se asocian con algunas enfermedades, entre los que se encuentran varios tipos de cáncer; un aumento en la metilación de islas CpG no metiladas se ha vinculado con el silenciamiento de los genes supresores de tumores (Zhu y cols., 2016).

Zöchbauer-Müller y cols. (2001) Evaluaron la disminución de la expresión del gen FHIT (del inglés, *Fragile Histidine Triad*), un gen supresor de tumores y su nivel de metilación. Analizaron la metilación de este gen en 107 pacientes con

cáncer primario de pulmón, 39 de tejido sano de pulmón, 39 de carcinomas primarios de seno, y en 49 y 22 líneas celulares cancerosas de pulmón y seno 107 respectivamente. La metilación de FHIT correlacionó de manera positiva con una disminución en la expresión de mRNA en cáncer de seno y de pulmón. Los autores dicen que la metilación de DNA de FHIT podría ser usado como un marcador de estos tipos de cáncer.

Existen diversos estudios que han reportado la asociación de la metilación de DNA con la expresión de mRNA y con la expresión de la proteína. Li y cols., (2016) encontraron que la hipermetilación del gen *FOSL2* (del inglés, *FOS-like antigen 2*) medido en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 presenta también una baja en los niveles de expresión del mRNA y de la proteína circulante. Shilpa y cols. (2014) evaluaron la metilación del gen *MGMT* (O-6methylguanine-DNA methyltransferase) en carcinoma epitelial de ovario, de acuerdo con sus resultados, se sugiere que la metilación de este gen no correlaciona de manera absoluta con su expresión. Zmetakova y cols. (2013), evaluaron el perfil de metilación de 11 genes, de los cuales, sólo, APC y CXCL12 mostraron una disminución en la media del perfil de metilación y un aumento en la expresión de la proteína correspondiente.

Incluso, cuando el análisis de metilación se hace tejido específico, los resultados no suelen ser consistentes. En un estudio realizado en Alemania en población adulta, la metilación del gen de adiponectina medida en TAS no mostró asociación con la expresión de la proteína, ni con parámetros antropométricos, sin embargo, la metilación de los genes *LPL* y *PPAR-λ* realizada en este estudio mostraron una fuerte asociación entre la expresión y la distribución de grasa corporal (Drogan y cols., 2015).

Las marcas epigenéticas, pueden ser modificadas mediante factores ambientales, la importancia del estilo de vida que incluye la actividad física, adicciones y el tipo de alimentación es objeto de estudio intensivo con el fin de entender la importancia de estos parámetros sobre la epigenética, y, por ende, de su participación en la aparición y desarrollo de una enfermedad. Milagro y

cols. (2009) realizaron un estudio en ratas a las cuales se alimentó con una dieta de cafetería durante 11 semanas; mostraron ganancia de peso superior al grupo control, RI y mayor cantidad de TA retroperitoneal, además, los niveles séricos de leptina estaban elevados, así como el mRNA del gen de leptina en el TA retroperitoneal. Los niveles de metilación en el gen de leptina en los roedores alimentados con dieta de cafetería mostraron una correlación inversa y significativa, lo cual sugiere que la hipometilación del promotor de leptina en la mayoría de las ratas obesas podría ser inducida por la diferenciación adipocitaria como lo han observado otros autores en células 3T3-L1 y en adipocitos humanos.

A pesar de que el ambiente puede influir de manera importante en el perfil epigenético, existe evidencia de que algunas regiones en el genoma pueden, de manera autónoma, determinar el estado de metilación. Diversos estudios enfocados en la variación de la metilación en el DNA en humanos se ha demostrado que las variaciones genéticas presentan influencia sobre la metilación del DNA en diferentes tipos celulares, pero los mecanismos por los cuales ocurren estas variaciones aún no están del todo claros (Gutierrez-Arcelus y cols., 2013).

IX. Conclusiones

Los resultados de este trabajo de investigación permiten concluir que:

1. Los adolescentes Ob-RI presentan incrementos en los niveles de insulina, leptina, colesterol y TGs comparados con los Ob no RI.
2. La concentración de SICAM-1 es mayor en el grupo de adolescentes Ob-RI; la RI se asocia de manera positiva con leptina y sICAM-1 y negativa con adiponectina.
3. El perfil de metilación del gen de adiponectina no presenta diferencia entre grupos. La metilación del gen de leptina presentó diferencias en los sujetos obesos con RI vs. los eutróficos.
4. La leptina presentó asociación entre una disminución del perfil de metilación y un aumento en la concentración sérica de la proteína. El perfil de metilación de los sujetos Ob-RI fue menor que en los eutróficos; mientras que la concentración sérica de leptina fue mayor.

X. Perspectivas

De acuerdo con los resultados obtenidos para el gen de leptina, se puede plantear el uso de una estrategia experimental cuantitativa que permita conocer con certeza que sitios CpG están implicados de manera directa y significativa sobre el IMC y las concentraciones de adipocinas.

Al no ser concluyentes los resultados obtenidos para la metilación del gen de adiponectina, se recomienda analizar otra isla CpG.

Es necesario evaluar en otras islas CpG del gen de adiponectina, o bien, tratar de establecer si la regulación de la expresión del gen está mediada por otro mecanismo epigenético.

Debido a la alta representatividad de la metilación del gen de leptina en sangre, sería interesante evaluar si existe también hidroximetilación.

XI. Bibliografía

- Abdul-Ghani MA, DeFronzo RA. Pathogenesis of insulin resistance in skeletal muscle. *J Biomed Biotechnol*, 2010; 476279.
- Achari A, Jain SK. Adiponectin, a therapeutic target for obesity, diabetes, and endothelial dysfunction. *Int J. Mol. Sci.* 2017; 18(6): 1321.
- Adalsteinsson BT, Gudnason H, Aspelund T, Harris TB y cols. Heterogeneity in White Blood Cells Has Potential to Confound DNA Methylation Measurements. *PLoS ONE* 2012; 7(10): e46705.
- Agha G, Houseman A, Kelsey KT, Eaton CB, y cols. Adiposity is associated with DNA methylation profile in adipose tissue. *Int J. Epidemiol* 2015; 44(4): 1277–1287.
- Ahrens W, Moreno L, Mårild S, Molnár D, y cols. Metabolic syndrome in young children: Definitions and results of the IDEFICS study. *Int J of Obes* 2014; 38: S4–S14.
- Alberti KG, Zimmet, P, Shaw J. The metabolic syndrome - A new worldwide definition. *Lancet* 2005; 366(9491): 1059–1062.
- Almanza-Pérez JC, Blancas-Flores G, García-Macedo R, Alarcón-Aguilar FJ, y cols. Leptina y su relación con la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2. *Gaceta Médica de México* 2008; 144(6): 535–542.
- Anderson M. Understanding the childhood obesity epidemic. Colorado State University Extension, Nutrition Resources. Disponible en: <http://www.ext.colostate.edu/pubs/foodnut/09317.htm>
- Archer T. Epigenetic Changes Induced by Exercise. *JRDS* 2015: 1(2) 71–74.
- Badimon L, Martínez J. Disfunción endotelial. *Rev Esp Cardiol* 2006; 6 (1): 21A
- Baker AR, Silva NF, Quinn DW, Harte AL, y cols. Human epicardial adipose tissue expresses a pathogenic profile of adipocytokines in patients with cardiovascular disease. *Cardiovasc Diabetol* 2006; 5: 1.
- Balkau B, Mhamdi L, Oppert J, y Nolan J. Physical activity and insulin sensitivity the RISC study. *Diabetes* 2008; 57: 2613–2618.
- Barres R, Zierath JR. DNA methylation in metabolic disorders 1 – 4. *The Am J Clin Nut* 2011; 93 (4): 897S-900.

- Barrès R, Zierath JR. The role of diet and exercise in the transgenerational epigenetic landscape of T2DM. *Nat Rev Endocrinol*. 2016; 12(8): 441–451.
- Bays HE, Toth PP, Kris-Etherton PM, Abate N, y cols. Obesity, adiposity, and dyslipidemia: A consensus statement from the National Lipid Association. *J Clin Lipidol* 2013; 7(4): 304–383.
- Bedford MT, Richard S. Arginine methylation: An emerging regulator of protein function. *Mol. Cell* 2005; 18: 263-272.
- Beltowski J. Leptin and the regulation of endothelial function in physiological and pathological conditions. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2012; 39(2): 168–178.
- Benomar Y, Gertler A, De Lacy P, Crépin D, y cols. Central resistin overexposure induces insulin resistance through toll-like receptor 4. *Diabetes* 2013; 62(1): 102–144.
- Bernlohr DA, Jenkins AE, Bennaars A A. Chapter 10 Adipose tissue and lipid metabolism. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes, 4th edition*. 263–289. Elsevier Sciences.
- Bishop KS, Ferguson LR. The interaction between epigenetics, nutrition and the development of cancer. *Nutrients* 2015; 7(2): 922–947.
- Booth FW, Roberts CK, Laye MJ. Lack of exercise is a major cause of chronic diseases. *Compre Physiol* 2012; 2(2): 1143–1211.
- Bouchard L, Hivert MF, Guay SP, St-Pierre J, y cols. Placental adiponectin gene DNA methylation levels are associated with mother's blood glucose concentration. *Diabetes* 2012; 61(5): 1272–80.
- Bouchard L, Thibault S, Guay SP, Santure M, y cols. Leptin gene epigenetic adaptation to impaired glucose metabolism during pregnancy. *Diabetes Care* 2010; 33(11): 2436–41.
- Breitfeld J, Stumvoll M, Kovacs P. Genetics of adiponectin. *Biochimie* 2012; 94(10): 2157–2163.
- Burns, SF, Lee S, y Arslanian SA. In Vivo Insulin Sensitivity and Lipoprotein Particle Size and Concentration in Black and White Children. *Diabetes Care* 2009; 32(11): 2087–2093.
- Byun SH, Kwon EB, y Kim SY. The relationship between serum adiponectin and inflammatory cytokines in obese Korean juveniles. *Korean J Pediatr* 2014; 57(12) 533–537.

- Campión J, Milagro FI, y Martínez JA. Individuality and epigenetics in obesity. *Obes Rev* 2009; 10: 383-392.
- Cannon B, Nedergaard J. Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiol Rev* 2004; 84: 277–359.
- Caruso C, Balistreri CR, Candore G. The role of adipose tissue and adipokines in obesity-related inflammatory diseases. *Mediators of Inflamm* 2010: 1-19.
- Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS, Chan JA, y cols. MicroRNA-21 Is an Antiapoptotic Factor in Human Glioblastoma Cells. *Cancer Res* 2005; 65(14): 6029–6033.
- Chartoumpakis DV, Habeos GL, Ziros PG, Psyrogiannis AI, y cols. Brown Adipose Tissue Responds to Cold and Adrenergic Stimulation by Induction of FGF21. *Mol Med*. 2011; 17(7-8): 736–740.
- Cereijo R, Villarroya J, Villarroya F. Non-sympathetic control of brown adipose tissue. *Int J Obes* 2015; 5(Suppl 1): S40–S44.
- Cines B, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, y cols. Endothelial Cells in Physiology and in the Pathophysiology of Vascular Disorders. *Blood* 1998; 91(10): 3527–3561.
- Choquet H y Meyre D. Genetics of Obesity: What have we Learned? *Curr Genomics* 2011; 12(3): 169–179.
- Cojocar M, Cojocar IM, Siloși I, y Rogoz S. Role of leptin in autoimmune diseases. *Maedica J Clin Med* 2013; 8(1): 75-79.
- Cruz HJ, Licea PM, Hernández GP, Yanes QM, y cols. Disfunción endotelial y diabetes mellitus Endothelial dysfunction and diabetes mellitus. *Rev Cub Endocrin* 2012; 23(2):166-185.
- D'Adamo ED, Guardamagna O, Chiarelli F, Bartuli y cols. Atherogenic Dyslipidemia and Cardiovascular Risk Factors in Obese Children. *Int J Endocrinol* 2015, 1–9. ID Artículo 912047.
- Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 2004; 109(III): III-27-III32.
- De Giorgis T, Marcovecchio ML, Giovanni ID, Giannini C, y cols. Triglycerides-to-HDL ratio as a new marker of endothelial dysfunction in obese prepubertal children. *Eur J Endocrin* 2014; 170(2): 173–180.

- Deiullis JA. MicroRNAs as regulators of metabolic disease: Pathophysiologic significance and emerging role as biomarkers and therapeutics. *Int J Obes* 2016; 40(1): 88–101.
- Del Turco S, Navarra T, Gastaldelli A, Basta G. Protective role of adiponectin on endothelial dysfunction induced by AGEs: A clinical and experimental approach. *Microvasc Res* 2011; 82(1): 73–76.
- Dias GR, Negrão CE, Krieger ME. Óxido nítrico y sistema cardiovascular: activación celular, reactividad vascular y variante genética. *Arq. Bras. Cardiol* 2011; 96(1): 68-75
- Dimitriadis G, Mitrou P, Lambadiari V, Maratou E, y cols. Insulin effects in muscle and adipose tissue. *Diabetes Res Clin Pract* 2011; 93(1): S52–S59.
- Dionne IJ, Garant MJ, Nolan AA, Pollin TI, y cols. Association between obesity and a polymorphism in the β_1 -adrenoceptor gene (Gly389Arg ADRB1) in Caucasian women. *Int J of Ob*, 2002; 26: 633-639.
- Dridi S, Taouis M. Adiponectin and energy homeostasis: consensus and controversy. *J Nutr Bioche* 2009; 20(11): 831–839.
- Drogan D, Boeing H, Janke J, Schmitt B, y cols. Regional distribution of body fat in relation to DNA methylation within the LPL, ADIPOQ and PPAR α promoters in subcutaneous adipose tissue. *Nutr Diabetes* 2015; 5(7): e168-3.
- Du X, Edelstein D, Obici S, Higham N, Zou, MH, y cols. Insulin resistance reduces arterial prostacyclin synthase and eNOS activities by increasing endothelial fatty acid oxidation. *J Clin Invest* 2006; 116(4): 1071–1080.
- Dunstan J, Bressler JP, Moran TH, Pollak JS, y cols. Associations of LEP, CRH, ICAM-1, and LINE-1 methylation, measured in saliva, with waist circumference, body mass index, and percent body fat in mid-childhood. *Clin Epigenetics* 2017; 9(1): 29.
- Durand MJ, Gutterman DD. Diversity in mechanisms of endothelium-dependent vasodilation in health and disease. *Microcirculation* 2013; 20(3), 239–247.
- Dzikowska-Diduch O, Domienik-Karłowicz J, Górska E, Demkow U, y cols. E-selectin and sICAM-1, biomarkers of endothelial function, predict recurrence of venous thromboembolism. *Thromb Res* 2017; 157: 173–180.

- Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. ENSANUT, 2016. Disponible en: http://promocion.salud.gob.mx/dgps/descargas1/doctos_2016/ensanut_mc_2016-310oct.pdf
- Esau C, Kang X, Peralta E, Hanson E, y cols. MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 2004; 279(50): 52361–52365.
- Esteller M. Epigenetic gene silencing in cancer: The DNA hypermethylome. *Hum Mol Genet* 2007; 16(1): R50–R59.
- Farjo KM, Farjo R, Halsey S, Moiseyev G, Ma J. Retinol-Binding Protein 4 Induces Inflammation in Human Endothelial Cells by a NADPH Oxidase- and Nuclear Factor Kappa B-dependent and Retinol-Independent Mechanism. *Mol Cell Bio* 2012; 32(24): 5103–5115.
- Fischle W, Wang Y, Allis CD. Histone and chromatin cross-talk. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15(2): 172–183.
- Freedman DS, Kahn HS, Mei Z, Grummer-Strawn LM, y cols. Relation of body mass index and waist-to-height ratio to cardiovascular disease risk factors in children and adolescents: the Bogalusa Heart Study. *Am J Clin Nutr* 2007; 86(1): 33–40.
- Friedman JM. Obesity in the new millennium. *Nature* 2000; 404. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/35007504.pdf>
- Garanty-Bogacka B, Syrenicz M, Syrenicz A, Gebala A, y cols. Serum markers of inflammation and endothelial activation in children with obesity-related hypertension. *Neuro.Endocrinol.Lett.* 2005; 26: 242–246.
- García-Cardona, MC, Huang F, García-Vivas JM, López-Camarillo C, y cols. DNA methylation of leptin and adiponectin promoters in children is reduced by the combined presence of obesity and insulin resistance. *Int J Obes* 2014; 38(11): 1457–1465.
- Gesta S, Tseng YH, Kahn CR. Developmental Origin of Fat: Tracking Obesity to Ghosh A. Explaining overweight and obesity in children and adolescents of Asian Indian origin: the Calcutta childhood obesity study. *Indian J Public Health* 2014; 58(2): 125-128.
- Gibney ER, Nolan CM. Epigenetics and gene expression. *Heredity* 2010; 105(1): 4–13.
- Giralt M, Villarroya F. White, brown, beige/brite: different adipose cells for different functions? *Endocrinology* 2013; 154(9): 2992-3000.

- Giordano A, Frontini A, Cinti S. Convertible visceral fat as a therapeutic target to curb obesity. *Nat Rev Drug Discov* 2016; 15(6): 405-424.
- Głównska-Olszewska B, Tołwińska J, Łuczyński W, Konstantynowicz J, Bossowski A. Cardiovascular risk in nonobese hypertensive adolescents: A study based on plasma biomarkers and ultrasonographic assessment of early atherosclerosis. *J Hum Hypertens* 2013; 27(3): 191–196.
- Głównska B, Urban M, Peczyńska J, Florys B. Soluble adhesion molecules (sICAM-1, sVCAM-1) and selectins (sE selectin, sP selectin, sL selectin) levels in children and adolescents with obesity, hypertension, and diabetes. *Metab. Clin. Exp.* 2005; 54(8): 1020–1026.
- Goldstein BJ, Scalia R. Adiponectin: A novel adipokine linking adipocytes and vascular function. *J Clin. Endocrinol. Metab.* 2004; 89(6): 2563–2568.
- Gonzalez M, Lind L, Söderberg S. Leptin and endothelial function in the elderly: The Prospective Investigation of the Vasculature in Uppsala Seniors (PIVUS) study. *Atherosclerosis* 2013; 228(2): 485–490.
- Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory Mechanisms in Obesity. *Annu Rev Immunol* 2011; 29(1): 415–445.
- Guan Z, Zhang J, Song S, Dai D. Promoter methylation and expression of TIMP3 gene in gastric cancer. *Diagn Pathol.* 2013; 8: 110.
- Guenther M, James R, Marks J, Zhao S, y cols. Adiposity distribution influences circulating adiponectin levels. *Trans Res* 2014; 164(4): 270–277.
- Gustafson B. Adipose Tissue, Inflammation and Atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 2010; 17(4): 332–341.
- Gutierrez-Arcelus M, Lappalainen T, Montgomery SB, Buil A, y cols. Passive and active DNA methylation and the interplay with genetic variation in gene regulation. *eLife* 2013; (2): 1–18.
- Haluskova J. Epigenetic studies in human diseases. *Folia Biol (Praha)* 2010; 53: 86-93.
- Hanssen M, Broeders E, Samms MR, Vosselman J, y cols. Serum FGF21 levels are associated with brown adipose tissue activity in humans. *Scientific Reports* 2005; 5 (10275): 1-8.
- Harms M, Seale P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nature medicine* 2013; 19: 1252-1263.

- Hartge MM, Unger T, Kintscher U. The endothelium and vascular inflammation in diabetes. *Diab Vasc Dis Res* 2007; 4(2): 84–88.
- Hasegawa Y, Saito T, Ogihara T, Ishigaki Y, y cols. Blockade of the nuclear factor- κ B pathway in the endothelium prevents insulin resistance and prolongs life spans. *Circulation* 2012; 125(9): 1122–1133.
- Hernández-Cordero S, Cuevas-Nasu L, Morán-Ruán MC, Méndez-Gómez Humarán y cols. Overweight and obesity in Mexican children and adolescents during the last 25 years. *Nutr Diabetes* 2017; 7(3): , e247
- Hernández B, Cuevas-Nasu L, Shamah-Levy T, Monterrubio EA, y cols. Factors associated with overweight and obesity in Mexican school-age children: results from the National Nutrition Survey 1999. *Salud Pública de México* 2003; 45: 551–557.
- Hida K, Wada J, Eguchi J, Zhang H, y cols. Visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor: a unique insulin-sensitizing adipocytokine in obesity. *PNAS* 2005; 102(30): 10610–10615.
- Hida K, Wada J, Eguchi J, Zhang H, y cols. Visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor: a unique insulin-sensitizing adipocytokine in obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005; 102(30): 10610–10615
- Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 2006; 444(7121): 860–867.
- Houde A, Légaré C, Hould F, Lebel S, y cols. Cross tissue comparisons of Leptin and adiponectin DNA methylation profile. *Adypocytes*, 2014; 3 (2): 132-140.
- Houde A, Légaré C, Biron S, Lescelleur O, Biertho L, y cols. Leptin and adiponectin DNA methylation levels in adipose tissues and blood cells are associated with BMI, waist girth and LDL-cholesterol levels in severely obese men and women. *BMC Med Genet* 2015; 1(16): 29.
- Huang AL, Silver AE, Shvenke E, Schopfer DW, y cols. Predictive value of reactive hyperemia for cardiovascular events in patients with peripheral arterial disease undergoing vascular surgery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27(10): 2113–2119

- Huang F, Del-Río-Navarro BE, de Castro GT, Alcántara S, y cols. Weight loss induced by 6-month lifestyle intervention improves early endothelial activation and fibrinolysis in obese adolescents. *Child Care Health Dev* 2011; 37(3): 377–384.
- Huang KC, Chen CL, Chuan LM, Ho SR, y cols. Plasma adiponectin levels and blood pressures in nondiabetic adolescent females. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(9): 4130–4134.
- Huang Y-T Chub S, Loucksc EB, Lind C-L y cols. Epigenome-wide profiling of DNA methylation in paired samples of adipose tissue and blood. *Epigenetics* 2016; 11(3): 227-236.
- Hwang SJ, Ballantyne CM, Sharrett AR, Smith LC, y cols. Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. *Circulation* 1997; 96(12): 4219–25.
- Ito H, Ohshima A, Inoue M, Ohto N, y cols. Weight reduction decreases soluble cellular adhesion molecules in obese women. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2012; 29(5–6): 399–404.
- Jacobsson JA, Danielsson P, Svensson V. Major gender differences in association of FTO gene variant among severely obese children with obesity and obesity related phenotypes. *BBRC*. 2008; 368: 476-82.
- Jéquier E. Leptin signaling, adiposity, and energy balance. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 967: 379–88.
- Jezovnik M. How to assess endothelial function for detection of pre-clinical atherosclerosis. *E-Journal ESC Council for Cardiology Practice*, 2011; 10(10). Disponible en: <https://www.escardio.org/Journals/E-Journal-of-Cardiology-Practice/Volume-10/How-to-assess-endothelial-function-for-detection-of-pre-clinical-atherosclerosis>
- Joshi SR, Parikh RM, Das AK. Insulin--history, biochemistry, physiology and pharmacology. *J Assoc Physicians India* 2007; 55 Suppl(July): 19–25.
- Kelishadi R, Mirmoghtadaee P, Najafi H, Keikha M. Systematic review on the association of abdominal obesity in children and adolescents with cardio-metabolic risk factors. *Journal Res Med Sci* 2015; 20(3): 294–307.
- Khan M, Joseph F. Adipose Tissue and Adipokines: The Association with and Application of Adipokines in Obesity. *Scientifica* 2014. Artículo ID 328592.

- Kiess W, Petzold S, Töpfer M, Garten A, y cols. Adipocytes and adipose tissue. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2007; 22(1): 135–153.
- Kim J. Endothelial nuclear factor kB in obesity and aging: Is endothelial nuclear factor kB a master regulator of inflammation and insulin resistance? *Circulation* 2012; 125(9): 1081–1083.
- Kim Y, Hwang S, Bae Y, J SJ. MiR-21 regulates adipogenic differentiation through the modulation of TGF- β signaling in mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue. *Stem Cells* 2009; 27(12): 3093–3102.
- Kissebah A, Krakover K. Regional Adiposity and Morbidity. *Physiol Rev.* 1994; 74(October): 761–811.
- Knudson JD, Dincer UD, Zhang C, Swafford AN, y cols. Leptin receptors are expressed in coronary arteries, and hyperleptinemia causes significant coronary endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289(1): H48-56.
- Komura N, Maeda N, Mori T, Kihara S, Adiponectin Protein Exists in Aortic Endothelial Cells. *PLoS ONE* 2013; 8(8): 1–5.
- Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature* 2000; 404(6778): 635–643.
- Korda M, Kubant R, Patton S, Malinski T Leptin-induced endothelial dysfunction in obesity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 295(4): H1514-21.
- Korek E, Krauss H. Novel adipokines: their potential role in the pathogenesis of obesity and metabolic disorders. *Postępy Higieny I Medycyny Doświadczalnej* 2015; 69, 799–810.
- Kristensen LS, Treppendahl MB, Grønbaek K. Analysis of Epigenetic Modifications of DNA in Human Cells. *Curr Protoc Hum Genet* 2013; (77): 1–22.
- Krssak M, Petersen KF, Dresner A, Dipietro L, y cols. Intramyocellular lipid concentration are correlated with insulin in humans: a H¹ NMR spectroscopy. *Diabetologia* 1999; 42:113-116.
- Kubota N, Terauchi Y, Yamauchi T, Kubota T, y cols. Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *J Biol Chem* 2002; 277(29): 25863–25866.
- Kubota T, Kubota N, Kumagai H, Yamaguchi S, y cols. Impaired insulin signaling in endothelial cells reduces insulin-induced glucose uptake by skeletal muscle. *Cell Metabol.* 2011; 13(3): 294–307.

- Kuroda A, Rauch TA, Todorov I, Ku HT, y cols. Insulin gene expression is regulated by DNA methylation. *PLoS ONE* 2009; 4(10):10.371.
- Kwon H, Pessin JE. Adipokines mediate inflammation and insulin resistance. *Front Endocrinol* 2013; 4(JUN): 71.
- Lee S, Bacha F, Gungor N, Arslanian S. Comparison of Different Definitions of Pediatric Metabolic Syndrome: Relation to Abdominal Adiposity, Insulin Resistance, Adiponectin, and Inflammatory Biomarkers. *J Pediatr* 2008; 152(2): 177–184.e3.
- Lehr S, Hartwig S, Sell H. Adipokines: A treasure trove for the discovery of biomarkers for metabolic disorders. *Proteomics Clin Appl* 2012; 1(2): 91-101.
- Leturque A, Brot-Laroche E, Le Gall M, Stolarczyk E, y cols. The role of GLUT2 in dietary sugar handling. *J Physiol Biochem.* 2005; 61(4): 529–537.
- Ley SH, Harris SB, Connelly PW, Mamakeesick M, y cols. Adipokines and incident type 2 diabetes in an aboriginal canadian population: The sandy lake health and diabetes project. *Diabetes Care* 2008; 31(7): 1410–1415.
- Li J, Li S, Hu Y, Cao G, y cols. The Expression Level of mRNA, Protein, and DNA Methylation Status of FOSL2 of Uyghur in XinJiang in Type 2 Diabetes. *J Diabetes Res* 2016. Artículo ID 5957404.
- Li Q, Park K, Li C, Rask-Madsen C, y cols. Induction of vascular insulin resistance and endothelin-1 expression and acceleration of atherosclerosis by the overexpression of protein kinase C- β isoform in the endothelium. *Circ. Res* 2013; 113(4): 418–427.
- Lobstein T, Baur L, Uauy R. Obesity in children and young people: a crisis in public health. *Obes Rev.* 2004; 5: 4-104.
- Maffeis C, Banzato C, TALAMINI G. Waist-to-Height Ratio, a Useful Index to Identify High Metabolic Risk in Overweight Children. *J Pediatr* 2008; 152:207:13.
- Makki K, Froguel P, Wolowczuk I. Adipose Tissue in Obesity-Related Inflammation and Insulin Resistance: Cells, Cytokines, and Chemokines. *ISRN Inflamm* 2013; 1–12.
- Marchi M, Lisi S, Curcio M, Barbuti S, y cols. Human leptin tissue distribution, but not weight loss-dependent change in expression, is associated with methylation of its promoter. *Epigenetics* 2011; 6 (10): 1198-1206.

- Marsit, C. J. (2015). Influence of environmental exposure on human epigenetic regulation. *J. Exp. Biol* 218(1), 71–79
- Martin C, Zhang Y. The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6 (11): 838-349
- Mason JC, Kapahi P, Haskard DO. Detection of increased levels of circulating intercellular adhesion molecule 1 in some patients with rheumatoid arthritis but not in patients with systemic lupus erythematosus. Lack of correlation with levels of circulating vascular cell adhesion molecule. *Arthritis Rheum* 1993; 36(4): 519–527.
- Matsubara M, Maruoka S, Katayose S. Inverse relationship between plasma adiponectin and leptin concentrations in normal-weight and obese women. *Eur. J. Endocrinol.* 2002; 147(2): 173–180.
- McSorley PT, Young IS, McEneaney J, Fee H, y cols. Susceptibility of low-density lipoprotein to oxidation and circulating cell adhesion molecules in young healthy adult offspring of parents with type 2 diabetes. *Metab. Clin.Exp.* 2004; 53(6): 755–759.
- Merabet E, Dagogo-Jack S, Coyne DW, Klein S, Increased Plasma Leptin Concentration in End-Stage Renal Disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(3): 847–850.
- Milagro FI, Campión J, Goyenechea E, Paternain L, y cols. High fat diet-induced obesity modifies the methylation pattern of leptin promoter in rats. *J Physiol Biochem* 2009; 65(1): 1–9.
- Moosavi A, Ardekani AM. Role of epigenetics in biology and human diseases. *Irani Biome J* 2016; 20(5): 246–258.
- Moreno GM. Definición y clasificación de la obesidad. *RM CL* 2012; 23(2): 124–128.
- Mubarak KK. A review of of prostaglandin analogs in the management of patients with pulmonary arterial hypertension. *Respir Med* 2010; 104(1): 9-21.
- Munsch S, Beglinger C (eds): Obesity and Binge Eating Disorder. *Bibl Psychiatr.* 2005; 171: 1–20
- Nagaraju GP, Rajitha B, Aliya S, Kotipatruni RP, y cols. The role of adiponectin in obesity-associated female-specific carcinogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2016; 31: 37–48.

- Expert panel on integrated guidelines for cardiovascular health and risk reduction in children and adolescents: summary report. *Pediatrics* 2011; 128: S213-56.
- Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final Report. *Circulation* 2002; 106(25): 3143-421.
- Ogawa Y, Kikuchi T, Nagasaki K, Hiura M, y cols. Usefulness of serum adiponectin level as a diagnostic marker of metabolic syndrome in obese Japanese children. *Hypertens Res* 2005; 28(1): 51–7.
- OMS. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. *World Health Organization Technical Report Series*. 2003. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42665/1/WHO_TRS_916.pdf
- OMS. (2015). Obesidad y Sobrepeso. *Nota Descriptiva N°311*, 2. Disponible en: <https://doi.org/http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>.
- Osegbe I, Okpara H, Azinge E. Relationship between serum leptin and insulin resistance among obese Nigerian women. *Ann Afr Med* 2016; 15(1): 14–9.
- Ouchi N, Kobayashi H, Kihara S, Kumada M, Adiponectin stimulates angiogenesis by promoting cross-talk between AMP-activated protein kinase and Akt signaling in endothelial cells. *The J. Biol. Chem.* 2004; 279(2): 1304–9.
- Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat.Rev.Immunol.* 2011; 11(2): 87–97.
- Palou A, Picó C, Bonet ML, Oliver P. The uncoupling protein, thermogenin. *Int. J Biochem Cell Biol.* 1998; 30(1): 7–11.
- Pan DA, Lillioja S, Kriketos AD, Milner MR, y cols. Skeletal Muscle Triglyceride Levels Are Inversely Related to Insulin Action. *Diabetes* 1997; 46(6): 983–988.
- Pan American Health Organization. (2003). 132nd SESSION OF THE EXECUTIVE COMMITTEE. *English*, (June), 23–27. Disponible en: <http://www1.paho.org/english/gov/ce/ce132-23a-e.pdf>
- Papas MA, Alberg AJ, Ewing R, Helzlsouer KJ, y cols. The built environment and obesity. *Epidemiol Rev* 2007; 29(1): 129–143.

- Paracchini V, Pedotti P, Taioli E. Genetics of leptin and obesity: A HuGE review. *Am J Epidemiol* 2005; 162(2): 101–114.
- Paradis S, Ruvkun G. Signals from AGE-1 PI3 kinase to the DAF-16 transcription factor *Caenorhabditis elegans* Akt / PKB transduces insulin receptor-like signals from AGE-1 PI3 kinase to the DAF-16 transcription factor. *Genes & Development* 1998; 12: 2488–2498.
- Park A, Kim W K, Bae KH. Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells* 2004; 6(1): 33–42.
- Park CS, Cho K, Bae DR, Joo NE, y cols. Methyl-donor nutrients inhibit breast cancer cell growth. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2008 Jul-Aug;44(7):268-272.
- Perera F, Herbstman J. Prenatal environmental exposures, epigenetics, and disease. *Brain Behav Immun* 2011; 31(3): 363–373.
- Perseghin G, Scifo P, De Cobelli F, Pagliato E, Intramyocellular triglyceride content is a determinant of in vivo insulin resistance in humans: A ¹H-¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy assessment in offspring of type 2 diabetic parents. *Diabetes* 1999; 48(8): 1600–1606.
- Phillips D, Caddy S, Ilic V, Fielding BA, y cols. Intramuscular triglyceride and muscle insulin sensitivity: Evidence for a relationship in nondiabetic subjects. *Metab. Clin. Exp.* 1996; 45(8): 947–950
- Plant S, Shand B, Elder P, Scott R. Adiponectin attenuates endothelial dysfunction induced by oxidised low-density lipoproteins. *Diab Vasc Dis Res.* 2008; 5(2): 102–8.
- Plagemann A, Thomas Harder T, Matthias Brunn M, Harder A, y cols. Hypothalamic proopiomelanocortin promoter methylation becomes altered by early overfeeding: an epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome. *Journal of Physiology* 2009: 4963–4976.
- Poirier P, Giles TD, Bray GA, Hong Y, y cols. Obesity and cardiovascular disease: Pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss: An update of the 1997 American Heart Association Scientific Statement on obesity and heart disease from the Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical. *Circulation* 2006; 114(6): 898-918.
- Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol* 2010; 28(10): 1057–1068.

- Qi Y, Nie Z, Lee YS, Singhal NS, y cols. Loss of resistin improves glucose homeostasis in leptin deficiency. *Diabetes* 2006; 55(11): 3083–3090.
- Quinones MJ, Hernandez-Pampaloni M, Schelbert H, Bulnes-Enriquez I, y cols. Coronary vasomotor abnormalities in insulin-resistant individuals. *Ann Intern Med.* 2004; 140(9): 700–708.
- Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, Nishigaki Y, y cols. The vascular endothelium and human diseases. *Int J Biol Sci* 2013; 9(10): 1057–1069.
- Rask-madsen C, Li Q, Freund, B, Feather D, y cols. Loss of insulin signaling in vascular endothelial cells accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E null mice. *Cell Metab* 2011; 11(5): 379–389.
- Relton CL, Groom A, Pourcain B, Sayers AE, y cols. DNA methylation patterns in cord blood DNA and body size in childhood. *PLoS ONE* 2012; 7(3): e31821 .
- Ricciotti E, FitzGerald GA. Prostaglandins and Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31(5): 986–1000.
- Ricquier D, Nechad M, Mory G. Ultrastructural and biochemical characterization of human brown adipose tissue in pheochromocytoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1982; 54(4): 803–807.
- Ridker PM, Hennekens CH, Roitman-Johnson B, Stampfer MJ, y cols. Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. *Lancet* 1998; 351(9096): 88–92.
- Rosenfeld L. Insulin: discovery and controversy. *Clin Chem.* 2002; 48(12): 2270–2288.
- Rothlein R, Mainolfi EA, Czajkowski M, Marlin SD. A form of circulating ICAM-1 in human serum. *J. Immunol.* 1991; 147(11): 3788–93.
- Ruan H, Dong LQ. Adiponectin signaling and function in insulin target tissues. *J Mol Cell Biol* 2016; 8(2): 101–109.
- Sabin MA, Holly JM, Shield JP, Turner SJ, y cols. Mature subcutaneous and visceral adipocyte concentrations of adiponectin are highly correlated in prepubertal children and inversely related to body mass index standard deviation score. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2006; 91(1): 332–335.
- Saely CH, Geiger K, Drexel H. Brown versus white adipose tissue: A mini-review. *Gerontology* 2012; 58(1): 15-23.

- Santos JM, Tewari S, Benite-Ribeiro SA. The effect of exercise on epigenetic modifications of PGC1: The impact on type 2 diabetes. *Med Hypotheses* 2014; 82(6): 748–753.
- Sbarbati A, Osculati F, Silvagni D, Benati D, y cols. Obesity and inflammation: evidence for an elementary lesion. *Pediatrics* 2006; 117(1): 220–223.
- Segula D. Complications of obesity in adults: a short review of the literature. *Malawi Med J* 2014; 26(1): 20–24.
- Serdula MK, Ivery D, Coates RJ, Freedman DS, y cols. Do Obese Children Become Obese Adults? A Review of the Literature. *Prev Med* 1993; 22(2): 167–177.
- Shawky RM, Sadik DI. Genetics of obesity. *EJMHG* 2012; 13: 11–17.
- Shijubo N, Imai K, Shigehara K, Honda Y, y cols. Soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in sera and bronchoalveolar lavage fluid of patients with idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary sarcoidosis. *Clin Exp Immunol* 1994; 95(1): 156–161.
- Shilpa V, Bhagat R, Premalata CS, Pallavi VR, y cols. Relationship between promoter methylation and tissue expression of MGMT gene in ovarian cancer. *Indian J Med Res* 2014; 140(5): 616–623.
- Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Review series Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 2006; 116(7): 1793–1801
- Stanley TL, Zanni MV, Johnsen S, Rasheed S, y cols. TNF- α antagonism with etanercept decreases glucose and increases the proportion of high molecular weight adiponectin in obese subjects with features of the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96(1): E146-50
- Steinberger J, Daniels SR, Eckel RH, Hayman L, y cols. Progress and Challenges in Metabolic Syndrome in Children and Adolescents: A Scientific Statement from the American Heart Association Atherosclerosis, Hypertension, and Obesity in the Young Committee of the Council on Cardiovascular Disease in the Young. *Circulation* 2009; 119(4): 628–647.
- Stern JH, Rutkowski JM, Scherer PE. Adiponectin, Leptin, and Fatty Acids in the Maintenance of Metabolic Homeostasis through Adipose Tissue Crosstalk. *Cell Metab* 2016; 23(5): 770-7778884.
- Stöger R. In vivo methylation patterns of the leptin promoter in human and mouse. *Epigenetics* 2006; 1(4):155-62.

- Sweeney G. Cardiovascular effects of leptin. *Nat. Rev. Cardiol.* 2010; 7(1): 22–29.
- Teppo AM, Willebrand EV, Honkanen E, Ahonen J, y cols. Soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) after kidney transplantation: the origin and role of urinary sicam-1? *Transplantation* 2005; 71(8): 1113–1119.
- Thomson JP, Skene PJ, Selfridge J, Clouaire T, y cols. CpG islands influence chromatin structure via the CpG-binding protein Cfp1. *Nature* 2010; 464(7291): 1082–1086.
- Tilg H, Moschen A. Inflammatory Mechanism in the regulation of Insulin resistance. *Mol Me* 2008; 14 (3-4): 222-231.
- Tsukada N, Matsuda M, Miyagi K, Yanagisawa N. Increased levels of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and tumor necrosis factor receptor in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Neurology* 1993; 43(12): 2679–2682.
- Tzoulaki I, Murray GD, Lee AJ, Rumley A, y cols. C-reactive protein, interleukin-6, and soluble adhesion molecules as predictors of progressive peripheral atherosclerosis in the general population: Edinburgh artery study. *Circulation* 2005; 112(7): 976–983.
- Valle M, Martos R, Gascón F, Cañete R, y cols. Low-grade systemic inflammation, hypoadiponectinemia and a high concentration of leptin are present in very young obese children, and correlate with metabolic syndrome. *Diabetes Metab* 2005; 31(1): 55–62.
- Van der Aa M, Farsani SF, Kromwijk L, de Boer A, y cols. How to Screen Obese Children at Risk for Type 2 Diabetes Mellitus? *Clinical Pediatrics* 2014; 53(4): 337–342.
- Verhamme P, Hoylaerts MF. The pivotal role of the endothelium in haemostasis and thrombosis. *Acta Clin Belg* 2006; 61(5): 213-219.
- Waki H, Tontonoz P. Endocrine functions of adipose tissue. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis*, 2007; 2(February): 31–56.
- Walley AJ, Blakemore AI, Froguel P. Genetics of obesity and the prediction of risk for health. *Hum. Mol. Genet.* 2006; 15(2): 124–130.

- Wang TN, Chang WT, Chiu YW, Lee CY, y cols. Relationships between changes in leptin and insulin resistance levels in obese individuals following weight loss. *Kaohsiung J Med Sci* 2013; 29(8): 436–443.
- Wang Y, Lam KS, Yau M, Xu A. Post-translational modifications of adiponectin: mechanisms and functional implications. *Biochem. J* 2008; 409(3): 623–633.
- Wardle J, Carnell S, Haworth CM, Farooqi IS, y cols. Obesity Associated Genetic Variation in *FTO* Is Associated with Diminished Satiety. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93(9): 3640–3643.
- Wasim M. Role of leptin in obesity. *J Obes Weight Loss Ther.* 2015; 5:258.
- Whiteman SC, Bianco A, Knight RA, Spiteri MA. Human rhinovirus selectively modulates membranous and soluble forms of its intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) receptor to promote epithelial cell infectivity. *J Biol Chem.* 2003; 278(14): 11954–11961.
- Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 1993; 75(5): 855–862.
- Williams DP, Going SB, Lohman TG, Harsha DW, y cols. Body Fatness and Risk for Elevated Blood-Pressure, Total Cholesterol, and Serum-Lipoprotein Ratios in Children and Adolescents. *Am J Public Health* 1992; 82(3): 358–363.
- Williams MD, Mitchell GM. MicroRNAs in insulin resistance and obesity. *Exp Diabetes Res* 2012. Artículo ID 484696.
- Winer JC, Zern TL, Taksali SE, Dziura J, y cols. Adiponectin in Childhood and Adolescent Obesity and Its Association with Inflammatory Markers and Components of the Metabolic Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(11): 4415–4423.
- Witkowska M, Borawska MH. Soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1): an overview. *Eur Cytokine Netw* 2004; 15(2): 91–98.
- Wu J, Cohen P, Spiegelman BM. Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown? *Genes & Dev.* 2013; 27: 234-250.
- Yang Q, Graham TE, Mody N, Preitner F, y cols. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* 2005; 436(7049): 356–362.

- Zhang M, Cheng H, Zhao X, Hou D, y cols. Leptin and Leptin-to-Adiponectin Ratio Predict Adiposity Gain in Nonobese Children over a Six-Year Period. *Child Obes* 2017; 13(3): 213–221.
- Zhu H, Wang G, Qian J. Transcription factors as readers and effectors of DNA methylation. *Nat Rev Genet.* 2016 August 01; 17(9): 551–565.
- Zhu W, Cheng KK, Vanhoutte PM, Lam KS, y cols. Vascular effects of adiponectin: molecular mechanisms and potential therapeutic intervention. *Clin Sci* 2008; 114(5): 361–374.
- Zmetakova I, Danihel L, Mego M, Kajabova V, y cols. Evaluation of protein expression and DNA methylation profiles detected by pyrosequencing in invasive breast cancer. *Neoplasma* 2013; 60(6): 635–646.
- Zöchbauer-Müller S, Fong KM, Maitra A, Zo S, y cols. 5 ' CpG Island Methylation of the FHIT Gene Is Correlated with Loss of Gene Expression in Lung and Breast Cancer Advances in Brief. *Cancer Res* 2001; 61(9): 3581–3585.