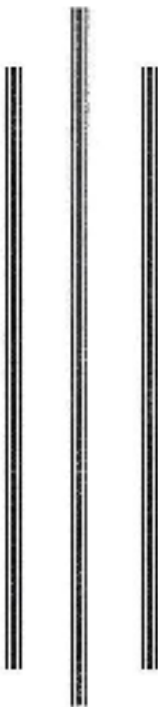




UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
 FACULTAD DE MEDICINA
 DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
 HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

**Daño oxidativo al ácido
 desoxirribonucleico (ADN) en pacientes
 obesos del Hospital Infantil de México
 Federico Gómez**



T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN ENDOCRINOLOGÍA PEDIÁTRICA

PRESENTA
Dr. Roberto de Jesús Zuart Ruíz



DIRECTOR DE TESIS
Dra en Ciencias Patricia Guadalupe Medina Bravo



MÉXICO D.F., Febrero 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

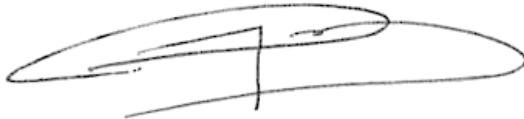
HOJA DE FIRMAS

Dra. Rebeca Gómez Chico Velasco

Directora de Enseñanza y Desarrollo Académico

Asesor de tesis y metodológico:

Dra en Ciencias Patricia Guadalupe Medina Bravo



DEDICATORIA

Con todo mi cariño para las personas que hicieron todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba, a ustedes por siempre mi corazón y mi agradecimiento.

Papá, Mamá y Hermana.

Gracias a su sabiduría, influyeron en mi, la madurez para lograr todos los objetivos, es para ustedes está tesis en agradecimiento.

Gracias abuelos

A la **Dra. en C. Patricia Guadalupe Medina Bravo** quien influyó con sus lecciones y experiencias en formarme como una persona de bien y preparada para los retos que pone la vida en mi profesión, le dedico estas páginas de mi tesis.

A mis maestros la **Dra. Leticia Margarita García Morales** y el **Dr. Darío Jorge Mario Molina Díaz** quienes nunca desistieron al enseñarme, y continúan depositando su sabiduría.

A la Dra. en C. Rocío Sánchez Urbina, en especial a la Dra. en C. Pilar García Roca y Bióloga Arlene Díaz Calderón, por su valiosa colaboración para realizar esta tesis.

ÍNDICE	Páginas
INTRODUCCIÓN	4
MARCO TEÓRICO	
<i>Obesidad infantil, factores de riesgo y comorbilidades</i>	5
<i>Obesidad abdominal</i>	6
<i>Adipocitocinas</i>	7
<i>Obesidad, resistencia a la insulina y riesgo de Diabetes Mellitus</i>	8
<i>Estrés Oxidativo</i>	9
<i>8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OhdG)</i>	11
ANTECEDENTES	13
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	18
JUSTIFICACIÓN	18
OBJETIVO GENERAL	19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
MATERIAL Y MÉTODOS	19
PLAN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO	23
DESCRIPCIÓN DE VARIABLES	23
RESULTADOS	28
DISCUSIÓN	30
CONCLUSIONES	32
CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES	33
REFERENCIAS	34
LIMITACIONES DEL ESTUDIO	38
ANEXOS	39

Introducción

La obesidad en la niñez es uno de los problemas de salud pública más importantes a nivel mundial y constituye uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (ECV) tales como hipertensión arterial, dislipidemias, alteraciones en el metabolismo de la glucosa y diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Estas enfermedades se inician en la infancia y progresan durante la adolescencia y su mecanismo fisiopatológico está estrechamente relacionado con el grado de adiposidad central o abdominal, resistencia a la insulina (RI) e hiperinsulinemia compensatoria (1-3).

El estrés oxidativo es una alteración en el equilibrio de las especies reactivas de oxígeno (ERO) y antioxidantes que lleva al daño de los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos. El 8-OHdG es resultado de la modificación de una base en el ADN por oxidación de la deoxiguanosina, se considera como el marcador más sensible y útil de daño oxidativo al ADN. La importancia de esta lesión se deriva del hecho que se encuentra de manera abundante en el ADN y es mutagénico (37).

Debido a que la población mexicana es el primer lugar mundial de obesidad infantil, y por grupo étnico tiene alto riesgo para presentar alteraciones metabólicas relacionadas con RI, ésta conlleva a un alto grado de estrés oxidativo. Por lo tanto dicha población podría tener alto riesgo de daño al ADN, que a su vez le confiere riesgo de carcinogénesis por mutación, así como proliferación endotelial y alto riesgo de aterosclerosis (44).

Marco teórico

Obesidad infantil, factores de riesgo y comorbilidades

La obesidad en la niñez es uno de los problemas de salud pública más importantes a nivel mundial y constituye uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (ECV) tales como hipertensión arterial, dislipidemias, alteraciones en el metabolismo de la glucosa y diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Estas enfermedades se inician en la infancia y progresan durante la adolescencia y su mecanismo fisiopatológico está estrechamente relacionado con el grado de adiposidad abdominal, resistencia a la insulina (RI) e hiperinsulinemia compensatoria (1-3).

En México de acuerdo a los datos de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición del año 2006 (ENSANUT 2006), la prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad en niños de 5 a 11 años fue de aproximadamente 26% en ambos sexos (4). En el 2012, los resultados de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT 2012) revelaron un incremento de sobrepeso y obesidad para ambos sexos en el grupo en edad escolar, siendo la prevalencia de sobrepeso y obesidad de 34% (5). En cuanto a los adolescentes, en el 2006 se reportó que uno de cada tres tenía sobrepeso u obesidad (4), mientras que en el año 2012, el 35% de los adolescentes tuvo sobrepeso u obesidad (5)

Para definir la obesidad habitualmente se realiza una estimación indirecta del contenido de grasa corporal. El método comúnmente utilizado es la determinación del índice de masa corporal (IMC), el cual se calcula dividiendo el peso en kilogramos entre el cuadrado de la altura en metros (kg/m^2). Aunque el IMC es una medida indirecta de la adiposidad su determinación es práctica, fácil de obtener, confiable, y se ha asociado con riesgo de mortalidad cardiovascular en la edad adulta (4). En niños y adolescentes no se dispone de definiciones y puntos de corte

estandarizados para establecer los diagnósticos de sobrepeso u obesidad que se apliquen en todo el mundo y se requiere utilizar curvas y tablas de referencia que sean válidas y útiles en cada entorno (6). Sin embargo, a nivel internacional es aceptada una definición de sobrepeso si el IMC es \geq p85 pero \leq p95 para edad y género, y obesidad si el IMC es \geq p95 para edad y género.

Uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de obesidad es el antecedente de obesidad en uno o ambos padres, sedentarismo, malos hábitos de alimentación y peso al nacimiento (7). Así mismo, se ha demostrado que más que la obesidad generalizada es la acumulación de grasa a nivel abdominal la que se asocia con mayor riesgo de comorbilidades metabólicas desde la infancia (8).

Obesidad abdominal

La acumulación de grasa a nivel abdominal parece tener un papel determinante en el desarrollo de RI, que es uno de los mecanismos fisiopatológicos implicados en el desarrollo de alteraciones en el metabolismo de glucosa (9). A nivel del abdomen la grasa se divide en dos compartimentos: grasa subcutánea y grasa visceral, esta última es la suma de la grasa mesentérica más la grasa retroperitoneal. En varios estudios se ha observado que la grasa visceral es un tipo de grasa metabólicamente más activa, ya que drena directamente al sistema porta-hepático, disminuyendo la depuración hepática de insulina y la sensibilidad hepática a la acción de la misma, condicionando una hiperinsulinemia sistémica (10) y RI, por lo tanto, el acumulo de grasa a nivel visceral tendrá mayores efectos deletéreos y mayor riesgo de alteraciones metabólicas (11).

La predisposición genética, disminución de la realización de actividad física y dieta baja en fibra y alta en grasas saturadas incrementan la adiposidad visceral. La grasa visceral secreta citocinas inflamatorias y adipocitocinas [leptina, resistina, IL 6, inhibidor del plasminógeno activador 1 (PAI-1), factor de necrosis tumoral alfa (FNTa), así como ácidos grasos no esterificados. Estos factores producen

resistencia a la insulina a nivel de músculo esquelético e hígado por hiperinsulinemia, con lo que contribuye a la disfunción endotelial y aterogénesis (19).

La acumulación de lípidos en la pared arterial es una característica de la enfermedad aterosclerótica inicial. Este proceso se correlaciona con niveles séricos elevados de colesterol total (CT), C-LDL y de otras partículas lipoprotéicas. Las lipoproteínas de baja densidad, especialmente las LDL oxidadas tienen numerosos efectos sobre el endotelio, incluyendo la inducción de la expresión de moléculas de adhesión (20). Además, las concentraciones disminuidas de colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL-C) también se relacionan con la disfunción endotelial, debido a una menor actividad antioxidante y antiinflamatoria de estas lipoproteínas (21).

Adipocitocinas

Anteriormente se consideraba que el tejido adiposo era únicamente un reservorio, en la actualidad se reconoce como un órgano endócrino que participa en la regulación del metabolismo de glucosa y lípidos, en el balance energético y la respuesta inflamatoria e inmune. El tejido adiposo visceral tiene una gran actividad metabólica, produciendo una gran cantidad de citocinas, lo cual soporta el concepto de que la grasa per se, es un fuerte determinante de la inflamación sistémica y el responsable de la RI así como del incremento en el riesgo cardiovascular.

Las citocinas se clasifican en dos tipos, de acuerdo a sus acciones:

- Factores que inducen resistencia a la insulina: PCR, resistina, factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interleucina-6 (IL-6), inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1), angiotensinógeno, adiposina y proteína de unión a retinol 4 (RBP4).
- Factores sensibilizadores a la insulina: adiponectina.

Obesidad, resistencia a la insulina y riesgo de Diabetes Mellitus

La Asociación Americana de Diabetes (ADA) recomienda medir la glucosa plasmática en ayuno (GPA) cada 2 años en los niños en riesgo de DM2. La obesidad se define como uno de los factores de riesgo para lo cual es necesario la medición de GPA. Además, la guía diferencia entre glucosa plasmática en ayuno como una medida de tamizaje y la prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG) como herramienta diagnóstica. Si GPA está alterada ($GPA \geq 100\text{mg/dL}$), se recomienda realizar una prueba diagnóstica adicional con PTOG (29). La sola determinación de GPA es insuficiente para detectar todos los casos de intolerancia a la glucosa y se recomienda añadir la medición de las concentraciones de triglicéridos en suero al tamizaje cada 2 años. Los estudios sobre el uso de la HbA1c describen conclusiones contradictorias con respecto a el uso de la HbA1c para la identificación de intolerancia a la glucosa o DM2 en edad pediátrica. La hiperinsulinemia o resistencia a la insulina (RI) se ha identificado como factor de riesgo independiente de intolerancia a la glucosa o DM2. La prevalencia de RI e IGT es mayor en niños obesos que en los niños de peso normal, lo que implica una relación entre RI e IGT y la obesidad. Por otra parte, los estudios en los niños obesos han demostrado más niños con intolerancia a la glucosa que glucosa plasmática en ayuno alterada, lo que implica que el tamizaje con glucosa plasmática en ayuno (eventualmente seguida de un PTOG si glucosa plasmática en ayuno $\geq 100\text{mg/dL}$) no identificará a todos los niños con intolerancia a la glucosa (30).

Un método sencillo para determinar la resistencia a la insulina es el modelo de evaluación homeostático de resistencia a la insulina (HOMA-IR). Este modelo utiliza GPA e insulina plasmática en ayunas (IPA) para calcular la resistencia a la insulina. Dado que la RI está relacionada con intolerancia a la glucosa y DM2, el uso de la IPA como una herramienta de detección adicional puede diferenciar con mayor precisión que niños deben someterse a una PTOG para diagnosticar intolerancia a la glucosa o diabetes (31).

Estrés oxidativo

La mayor parte de los radicales libres derivan del oxígeno molecular (O_2) como consecuencia de su activación a través de su reducción secuencial o monovalente. Ésta, consiste en la captación progresiva de 4 electrones por parte del O_2 , provocando su reducción a dos moléculas de agua (32). Este proceso químico se acompaña de la generación de radicales libres (Fig. 1).

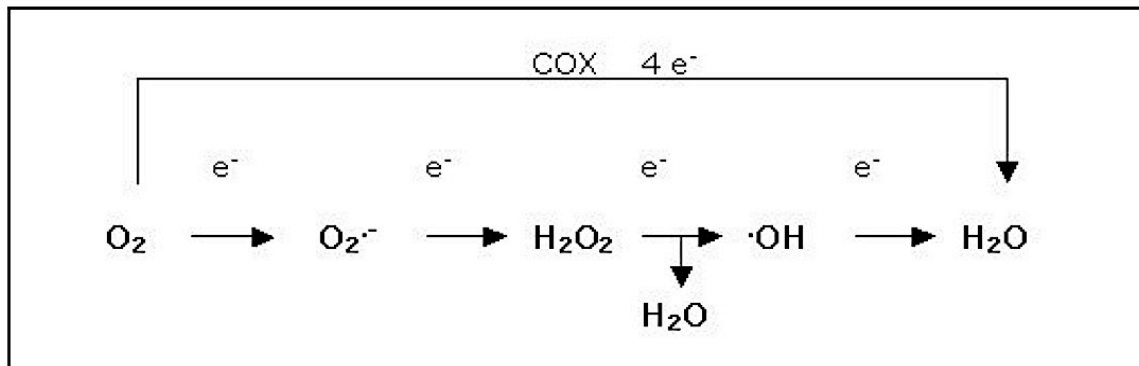


Figura 1. Formación de radicales libres. Citocromo oxidasa mitocondrial (**COX**), radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo ($\cdot OH$), electrones (e^-).

Mediante este mecanismo, el O_2 molecular se reduce parcialmente para dar lugar a los intermediarios de este gas, que son producto del metabolismo oxidativo normal de las células, lo que justifica la existencia de efectivos sistemas antioxidantes para contrarrestar su actividad citotóxica y hacer compatible el estilo de vida aerobia (32).

El estrés oxidativo es una alteración en el equilibrio de las especies reactivas de oxígeno (ERO) y antioxidantes, que lleva al daño de los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos. Esta alteración puede ser el resultado por los bajos niveles de antioxidantes o por el aumento en la producción de ERO. En general, los ERO se generan como subproductos del metabolismo celular y la radiación ionizante, y lo constituyen el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radicales

hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), y oxígeno atómico (singlete) ($^1\text{O}_2$), así como especies reactivas de nitrógeno, que son moléculas compuestas de nitrógeno y de oxígeno reactivo (33).

El radical libre más reactivo es el hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) con una vida media estimada de aproximadamente unos 10^{-9} s, lo que le confiere su gran toxicidad con importantes implicaciones fisiopatológicas en diversas entidades nosológicas. En cambio, el radical peroxilo ($\text{ROO}\cdot$) tiene una vida media relativamente larga, del orden de segundos. Se forma a partir de hidroperóxidos orgánicos como los lípidos, o por pérdida de hidrógeno en $\text{ROOH}\cdot$. El anión superóxido (H_2O_2) se genera como producto de reacciones catalizadas enzimáticamente, como en las reacciones de deshidrogenasas flavoproteínicas (xantina oxidasa, aldehído oxidasa, etc.) de oxidasas e hidroxilasas (diamino oxidasa, citocromo P450, galactosa oxidasa) y en reacciones no enzimáticas del oxígeno con la riboflavina o la cisteína. La producción de H_2O_2 a partir del oxígeno se puede llevar a cabo por muchas enzimas como superóxido dismutasa, glucosa oxidasa, D-aminoácido oxidasa, etc. así como por reacciones químicas, como la auto-oxidación del ácido ascórbico catalizada por el cobre. Algunos autores describen la relación del H_2O_2 con los factores de transcripción NF- κ B (factor de transcripción nuclear kappa B) y AP-1 (proteína activadora 1), capaces de inducir la transcripción de genes como la IL-2 (interleucina-2), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), antígenos del complejo de histocompatibilidad y c-Fos. Por otra parte también se ha comprobado que otro agente oxidante como el t-BOOH aumenta la expresión de antígenos HLA de clase I a través de la activación de NF- κ B, c-Fos y c-jun en células de fibrosarcoma murino (34).

El Oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) constituye una forma excitada del oxígeno molecular. Si al oxígeno basal (forma triplete), que es un birradical con espines paralelos, se le suministra energía suficiente, uno de sus dos electrones desapareados sufre una inversión de espín quedando ambos antiparalelos, lo que le confiere una gran reactividad (oxígeno singlete). Su vida media es del orden de 10^{-6} segundos. Puede formarse en la oxidación del NADPH en los microsomas, en la actividad de varios

enzimas como la xantina oxidasa, la lactoperoxidasa, la lipooxigenasa y prostaglandina sintetasa, entre otros. Algunos de los óxidos de nitrógeno son radicales libres, al tener electrones desapareados. Entre ellos está el radical nitrosilo, producido por la reducción monovalente del óxido nítrico (ON) y el dióxido de nitrógeno (NO_2^+). Se forma enzimáticamente a partir de la arginina, reacción catalizada por la óxido nítrico sintetasa. Se han descrito efectos citotóxicos y citoprotectores para el óxido nítrico. Sin embargo, un exceso de óxido nítrico es citotóxico. La formación de un anión peroxinitrico (ONOO^-) puede inducir la peroxidación lipídica e interferir con la señalización celular por interacción de residuos de tirosina en proteínas (35).

8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG)

El ácido desoxirribonucleico (ADN) puede sufrir daños oxidativos en todos sus componentes, la lesión activa los mecanismos reparadores con la disminución de concentraciones intracelulares de NAD-H, NDAP-H, GSH y ATP. Esta depleción provoca en la célula un aumento de niveles de calcio que induce la liberación de metales pesados a nivel citosólico y posteriormente la expansión de especies reactivas y destrucción celular. Cuando un radical libre interactúa con las bases de ADN, provocan la aparición de bases modificadas, que pueden ser determinadas como medida indirecta del estrés oxidativo sobre los ácidos nucleicos.

Una de las lesiones más frecuente es la hidroxilación de la deoxiguanosina en la porción C8, lo que da lugar a la formación de 8-hidroxi-deoxiguanosina (8-OHdG) que a su vez sufre un paso más de oxidación en el organismo pasando al isómero cetónico 8-oxo-2'-deoxiguanosina (8-oxo-dG) (36).

El 8-OHdG es resultado de la modificación de una base en el ADN por oxidación de la deoxiguanosina, se considera como el marcador mas sensible y útil de daño oxidativo al ADN (37). La importancia de esta lesión se deriva del hecho que se encuentra de manera abundante en el ADN y es mutagénico (38). Evidencia reciente

sugiere que las lesiones 8-OHdG presentes en el ADN durante la replicación celular resulta en mutaciones somáticas, lo que puede contribuir a la proliferación del músculo liso en la patogénesis de placas ateroscleróticas. Es importante que las lesiones en la célula, mitocondria y ADN nuclear por radicales libres, sean reparadas. Sin embargo, el sistema antioxidante se bloquea con niveles altos de glucosa y obesidad, lo que conlleva a mayor actividad de los radicales libres y mayor daño a los tejidos (36).

El daño oxidativo a las bases, puede consistir tanto en una lesión mutagénica o lesión letal. Una lesión letal por lo general representa una barrera para las polimerasas de ADN, dejando de ese modo un vacío en la hebra de DNA replicada, mientras que una lesión mutagénica ha alterado las propiedades de apareamiento de bases que codifica para un nuevo nucleótido.

La oxidación de la guanina a 8-oxoguanina (8-oxo G) y timina a 5, 6-dihidroxi-5, 6-dihidrotimina (glicol timina) son dos aductos oxidativos abundantes. De hecho, aparte de los sitios abásicos, 8-oxo-2'-desoxiguanosina (8-oxo-dG) es la lesión más frecuente encontrada después de la exposición del ADN a la reacción química de Fenton (**Figura 2**). Ésta consiste en la reducción del H_2O_2 por iones de metales de transición, siendo el más importante el ión ferroso (38).

Se ha propuesto que las reacciones se inician por adición de radicales hidroxilo al carbono 8 (C8) de desoxiguanosina (dG), produciendo 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG). Sin embargo, la forma tautomérica preferida para este aducto es 8-oxo-dG (39).

Antecedentes

A principios del 2014, alrededor de 13, 000 artículos científicos se han reportado bajo el tema general de biomarcadores del estrés oxidativo basado en una búsqueda en la base de datos de PubMed. En estos documentos, se utiliza una amplia gama de marcadores para evaluar el daño oxidativo a los ácidos nucleicos, proteínas, y lípidos, así como las actividades de los antioxidantes y el estado antioxidante **(Cuadro-2)**. Así mismo, la búsqueda en la base de datos PubMed, bajo el tema de 8-OHdG como biomarcador de estrés oxidativo en edad pediátrica arroja 87 resultados, incluyendo como etiología del estrés oxidativo diversas enfermedades, y asociado con obesidad infantil como característica descriptiva de los sujetos en estudio, solamente 5 resultados.

La tasa de excreción de daño oxidativo del ADN es inversamente proporcional al tiempo de vida. Adelman et al. (1988) evaluaron glicol-timina y aductos de glicol de timidina en las muestras de orina de cuatro especies de mamíferos diferentes. La excreción urinaria de productos oxidativos del ADN, se presume que sean bases modificadas ó nucleósidos liberados del ADN celular por reparación de escisión y se cree que son un indicador general de daño oxidativo al ADN. Los resultados demostraron que este biomarcador de daño oxidativo se correlaciona altamente con la tasa metabólica específica de ratones, ratas, monos y humanos. Por consiguiente, los ratones excretan 18 veces más aductos de glicol que los seres humanos, y los monos secretaron 4 veces más aductos de glicol, todos ellos con peso normal (39).

La hipótesis del estrés oxidativo por el envejecimiento (o la hipótesis de los radicales libres, como fue propuesta por primera vez) es actualmente una de las explicaciones más populares de cómo se produce el envejecimiento a nivel bioquímico. El principio básico de la hipótesis del estrés oxidativo, es que la pérdida de la función fisiológica relacionada con la edad y el envejecimiento, son debido a la acumulación progresiva e irreversible del daño oxidativo. Durante la última década, la hipótesis del estrés oxidativo del envejecimiento ha ganado una amplia aceptación

debido a que numerosos estudios han demostrado una fuerte correlación entre el aumento de la edad y la acumulación de daño oxidativo a macromoléculas celulares (40) y porque el aumento de la supervivencia observado con la restricción dietética se ha correlacionado con reducción del daño oxidativo. También parece que ciertos tipos de lesiones patológicas que surgen con la edad se asocian con mayores niveles de daño oxidativo a macromoléculas celulares (41).

Como se puede observar, la patogénesis y progresión de numerosas enfermedades de los niños y adolescentes parecen estar vinculados a estrés oxidativo inducido por ERO. El estrés oxidativo también podría contribuir al daño tisular inducido por ciertos medicamentos (por ejemplo, analgésicos, agentes anticancerígenos, y fármacos inmunosupresores).

El tejido oxidado por las condiciones patológicas podría tener consecuencias más graves en edad pediátrica que en los adultos dada la necesidad para el crecimiento y desarrollo de tejido que coincida con el crecimiento somático, además que la duración de la vida es más larga en los niños que en los adultos. La reducción primaria o secundaria de estrés oxidativo podría por lo tanto ser importante en los niños. De hecho, el uso de antioxidantes ha dado lugar a nuevos enfoques terapéuticos para enfermedades que implican un mayor estrés oxidativo (42, 43).

Todos los tipos de biomoléculas pueden ser dañados por las ERO, y ahora se ha demostrado que el estrés oxidativo se asocia con diversas enfermedades humanas o condiciones patológicas, tales como el envejecimiento, la hipertensión, la insuficiencia renal, alteraciones inmunes, neurodegeneración, lesión por reperfusión, daño por radiación, y muchos otros trastornos degenerativos (44); ocupando un lugar destacado en la etiología y progresión de la diabetes (45) numerosos tipos de cáncer, y la aterosclerosis coronaria y carotídea (46). Los aumentos en los niveles de glucosa en sangre por encima de 5,5 mmol/l, pero por debajo del punto de corte de la diabetes de 7 mmol/l se han demostrado que aumenta los radicales libres y conduce a complicaciones asociadas a la diabetes. (47).

El aumento del Índice de Masa Corporal (IMC) en rangos de sobrepeso y obesidad, se encuentra asociado con riesgo elevado para daño del ADN por estrés oxidativo (48) y enfermedad cardiovascular (49, 50). Los pacientes con DM2 presentan mayor daño oxidativo del ADN, el cual se ha medido por la cantidad del metabolito 8 hidroxil 2´deoxiguanosina (8-OHdG); el cual, se ha propuesto como biomarcador en el diagnóstico de diabetes mellitus (51).

La obesidad está asociada con inflamación, debido al aumento de la producción de citoquinas en el tejido graso abdominal, el aumento en la síntesis de reactantes de fase aguda, y la activación de vías de señalización pro-inflamatorias. Además, el estrés oxidativo aumentado es relevante en el inicio de la inflamación en la obesidad. Productos finales de glicación avanzada (AGEs) están formados por glicación no enzimática y se acumulan lentamente en los fluidos y tejidos del cuerpo durante el envejecimiento, y más rápidamente en estados de enfermedad asociados con la hiperglucemia y mayor estrés oxidativo y carbonilo, por ejemplo: la diabetes y la insuficiencia renal crónica.

Sebekova K. *et al* (2009) describen la primera evidencia de que la obesidad en la adolescencia y la infancia se caracteriza por niveles plasmáticos de AGEs más bajos, a pesar de una menor sensibilidad a la insulina, mayor estrés oxidativo (niveles significativamente mayores de 8OHdG urinario sujetos obesos comparados con el grupo control $p=0.04$) y mayor microinflamación (52).

Pérez-Navero J.L. *et al* (2008), encontraron que 38 varones puberales (edad 13.8 ± 0.05 años) sin obesidad ni sobrepeso, tenían concentraciones superiores significativas de los productos de lipoperoxidación comparado con 36 varones prepuberales (edad 10.7 ± 0.07 años) ($p < 0,001$), aportando la interrogante que en la pubertad hay un aumento de los productos de lipoperoxidación que podrían estar influyendo en la aparición de estrés oxidativo en esta etapa de la vida (53).

Se ha sugerido que el estrés oxidativo tiene un papel importante en el proceso de aterosclerosis en edad pediátrica, sin embargo hay pocos estudios al respecto. Francesco Matino *et al* (2007) reportan que 41 niños con hipercolesterolemia (edad media 9.28 ± 0.5 años) y 40 niños (edad media 9.02 ± 0.7 años), presentan niveles más altos de 8OHdG (0.55 ± 0.06 ng/ml vs. 0.21 ± 0.02 ng/ml, $p < 0.001$) comparado con niños sin dislipidemia. Así mismo, se documenta una correlación positiva significativa entre el 8-OHdG y sCD40L en niños con niveles altos de C-LDL ($r = 0,676$: $p < 0.001$) vs niños con cifras normales ($r = 0,878$: $p < 0,001$). Con lo anterior podríamos inferir que los niños con hipercolesterolemia tienen un aumento precoz de estrés oxidativo que puede ser responsable de la regulación positiva de CD40L (citocina inflamatoria implicada en el inicio y progresión de la aterosclerosis) y potencialmente predisponer a la aterosclerosis prematura (54).

En estudios previos, los biomarcadores se han medido usando técnicas de química analítica, incluyendo cromatografía líquida de alta resolución y cromatografía gaseosa-espectrometría de masas. Recientemente, sistemas para detección de varios biomarcadores de estrés oxidativo se han creado en base a anticuerpos monoclonales específicos y ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA por sus siglas en inglés enzyme-linked immunosorbent assay) (55).

Kazunari Kaneko *et al* (2012), evaluaron en 100 japoneses sanos con rango de edad 0-15 años, 8-oxodG en orina utilizando dos métodos: inmunocromatografía por medio de un analizador automático y por ELISA. El resultado obtenido fue que los niveles de 8-oxodG y creatinina urinaria expresada como ICR-001, correlacionó con las concentraciones medidas por ELISA ($r_s = 0.945$, $p < 0.0001$) y el método enzimático ($r_s = 0.988$, $p < 0.0001$). Además de describirse niveles mas altos en los individuos mas jóvenes y disminución durante la adolescencia (56).

Planteamiento del problema

La obesidad en la niñez es uno de los problemas de salud pública más importantes a nivel mundial. En nuestro país, se reporta un incremento en la prevalencia de sobrepeso y obesidad, tanto en niños como en adolescentes. La presencia de diversos factores de riesgo cardiometabólico como dislipidemia, HTA, alteraciones del metabolismo de la glucosa y otros factores de riesgo no clásicos como disminución de adiponectina, incremento de leptina y PCR se asocian con la presencia de obesidad. Estos factores de riesgo se encuentran presentes desde la infancia y están estrechamente relacionadas con el incremento de grasa a nivel abdominal, RI e hiperinsulinemia compensadora.

La obesidad, se considera un estado pro inflamatorio, al estar involucradas diversas citocinas inflamatorias, esto conlleva a estrés oxidativo, que se caracteriza por el desequilibrio entre las moléculas de acción oxidante y los mecanismos de defensa antioxidante, transformándose en un daño a las macromoléculas, lo que desencadena el deterioro y la muerte celular.

Este fenómeno se ha asociado a la disminución progresiva de las funciones fisiológicas que ocurren con el avance de la edad. En la literatura se describe la correlación directa con niveles altos de lipoprotein lipasa de alta densidad y el biomarcador del daño al ADN (determinado por niveles altos de 8-OHdG en orina), así como correlación directa con proteínas ateroscleróticas; en adultos existe evidencia que el daño al ADN (determinado por niveles 8-OHdG en suero) se encuentra significativamente elevado en individuos con obesidad (848.5 ± 103 pg/ml; $P < 0.001$) y en aquellos con sobrepeso (724 ± 102 pg/ml; $P < 0.005$) comparado con el grupo con IMC normal (196.5 ± 327 pg/ml) (57). La obesidad tiene un efecto positivo en aumentar los niveles de glucosa plasmática en ayuno, por mecanismos ya estudiados de resistencia a la insulina, contribuyendo al daño oxidativo al ADN.

En la bibliografía publicada hasta el momento, el estrés oxidativo y el daño al DNA en la infancia y en la adolescencia está fundamentalmente dirigida a establecer la posible relación con diferentes procesos patológicos, y sabiendo que el EO proviene del desequilibrio antes mencionado, y las terapias futuras podrían estar dirigidas a la mejoría del sistema antioxidante para evitar comorbilidades asociadas y prolongar su presentación, es de suma importancia evaluar en la población infantil la presencia de factores de riesgo cardiovascular y más aún, si el daño al ADN por estrés oxidativo es dependiente de la obesidad y/o de los factores de riesgo directamente.

Pregunta de investigación

¿Existe asociación entre la concentración sérica de 8-OHdG y obesidad en niños prepúberes?

Justificación

Debido a que la población mexicana es el primer lugar mundial de obesidad infantil, y por grupo étnico es de alto riesgo para presentar alteraciones metabólicas relacionadas con RI, lo que conlleva a alto grado de estrés oxidativo; podemos inferir que tenemos alto riesgo de daño al ADN, que a su vez le confiere riesgo de carcinogénesis por mutación, así como proliferación endotelial y alto riesgo de aterosclerosis.

Dado que en diferentes etapas madurativas se producen cambios biológicos que condicionan al menos en parte, cambios en los biomarcadores del EO, como en la etapa puberal, en las que el crecimiento y desarrollo son más acentuados, lo que traduce variaciones en sus biomarcadores. Es importante tratar de determinar si la obesidad en la infancia previo al inicio de la pubertad, esta relacionada directamente con niveles altos de 8OHdG que traduce al daño al ADN, y si los factores de riesgo metabólico están correlacionados de manera directa con dicho biomarcador.

Ya que hasta el momento los resultados en población pediátrica son escasos, y en población mexicana no existe un solo estudio realizado, sería de utilidad la determinación del daño oxidativo al ADN por medio de la medición de 8OHdG en suero de escolares prepúberes con obesidad, lo cual podrá generar información útil para futuros protocolos dirigidos hacia el tratamiento de las enfermedades aminorando el estrés oxidativo a largo plazo.

Objetivos General

Evaluar la asociación entre obesidad y concentraciones de 8OHdG en niños prepúberes con obesidad

Objetivos específicos

1. Comparar los niveles séricos de 8-OHdG, en niños obesos y niños eutróficos.
2. Comparar los niveles de glucosa basal y dos horas, insulina basal y dos horas, triglicéridos, colesterol total, C-HDL, C-LDL, en niños obesos y eutróficos.
4. Comparar las concentraciones de adiponectina total y PCR, en niños obesos y niños eutróficos.
5. Determinar si existe correlación del IMC y niveles de 8OHdG, adiponectina, PCR, triglicéridos, C-HDL, circunferencia de cintura.

Material y Métodos

Estudio transversal comparativo.

Se incluyeron un total de 68 niños en edades de 8 a 12 años de edad que acudían al Hospital Infantil de México Federico Gómez.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

Grupo 1 [niños con obesidad]

- Ambos sexos
- IMC \geq p95 de acuerdo a edad y sexo, según tablas de los Center for Disease Control (CDC)
- Estadio de Tanner I-II

Grupo 2 [niños eutróficos]

- Ambos sexos
- IMC \geq p25 y $<$ p75 de acuerdo a edad y sexo, según tablas de los CDC
- Estadio de Tanner genital I-II

Los criterios de exclusión de los dos grupos fueron:

- Ser portadores de enfermedades crónicas como diabetes mellitus, síndrome de Cushing, cardiopatías, enfermedades reumatológicas, padecimientos genéticos asociados a obesidad, hipotiroidismo congénito o adquirido.
- Pacientes que no tuvieran completos los estudios de laboratorio y gabinete.
- Pacientes que no completaran la valoración clínica o antropométrica.

METODOLOGÍA

Se incluyeron 68 niños que cumplieron con los criterios de inclusión, los cuales se dividieron en dos grupos: Grupo 1 (niños con obesidad) y Grupo 2 (eutróficos), para tomarlo como grupo de referencia, ya que en la población infantil no existen valores de referencia en la distribución de la grasa abdominal, tampoco en población mundial infantil sana, los valores de referencia de 8OHdG.

Toma de muestras

Todos los pacientes se citaron con ayuno de 12 horas para la extracción de una muestra de sangre de la vena cubital (determinación de glucosa, insulina, adiponectina, colesterol total, C-HDL, triglicéridos y se calculó el C-LDL). Se realizó una prueba de tolerancia oral a la glucosa (posterior a la primera toma de muestra de sangre venosa, se administró vía oral una solución de glucosa anhidra a 1.75 mg/kg de peso corporal, máximo de 75 grs., y se tomó a los 120 minutos una muestra de sangre para la determinación de glucosa e insulina). El procesamiento de las muestras de colesterol total, colesterol HDL y triglicéridos fue llevado a cabo en el laboratorio clínico del Hospital Infantil de México por un método semiautomatizado de peroxidasa en el equipo Dimension de Siemens, la cuantificación de PCR se llevó a cabo por el método de nefelometría en el equipo Dabe Behring de Siemens, la medición de insulina basal y de 120 minutos se realizó por quimioluminiscencia en el equipo immulite 1000 de Siemens y la determinación de adipocitocinas se realizaron con los kits del laboratorio Millipore por el método de ELISA, en el laboratorio de farmacología del Hospital Infantil de México. La 8-OHdG se realizó con los kits de EIA, CEDARLANE, por ensayo competitivo.

A todos los participantes se les hizo un cuestionario para investigar factores socio-demográficos, antecedentes familiares de obesidad, DM2, HTA y cardiopatía isquémica prematura. Además se les realizó antropometría y un examen físico por un pediatra endocrinólogo.

Medición de 8-OHdG

Previo al procesamiento de las muestras para la medición del perfil metabólico, la sangre se centrifugó y se separó el suero en alícuotas, 200mcl las destinadas para la determinación de 8OHdG, mismas que se congelaron a -70° C.

Los niveles séricos de 8-OHdG fueron medidos usando un kit de EIA, CEDARLANE, Canada. Es un ensayo competitivo que puede ser usado para la cuantificación de 8OHdG en orina, plasma, cultivo celular y otras muestras matrices. La prueba utiliza una placa recubierta con anti-IgG de ratón y un trazador que consiste en un conjugado de enzima-8-OHdG. Este formato tiene la ventaja de proporcionar una baja variabilidad y aumento de la sensibilidad en comparación con los ensayos que utilizan una placa de antígeno recubierto. El EIA, CEDARLANE, típicamente muestra un IC_{50} (50% B/Bo) y IC_{80} (80% B/Bo) valores aproximadamente entre 100 y 30 pg/mL, respectivamente, realizados en adultos.

Es importante mencionar que el anticuerpo usado en éste ensayo, reconoce tanto el 8-OHdG libre como unido al ADN. Por ello las concentraciones reportadas de 8OHdG por el método de análisis EIA no coinciden con aquellos reportados por LC-MS (cromatografía líquida-espectrometría de masas), donde solo se considera el nucleósido único.

El ensayo esta basado en la competencia entre 8-hidroxi-2'-deoxi-guanosina (8-OHdG) y 8-OH-dG-acetilcolinesterasa (AChE) conjugada (trazador 8-OHdG) para una cantidad limitada de anticuerpos monoclonales. Las muestras se sometieron a descongelamiento como lo señalan las recomendaciones para manejo de material de DNA, para evitar su ruptura o daño. El procesamiento de las muestras, desde la centrifugación previa para separar fibrina que pudieran dar falsas lecturas, hasta el manejo de las mismas y cultivo de DNA; se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación de Nefrología y metabolismo mineral óseo, del Hospital infantil de México. Se siguieron las instrucciones del inserto, y la lectura posterior a 18 hrs de incubación, se llevo a cabo en un lector de placas multimodal de alto rendimiento diseñado para la investigación en ciencias biológicas y de los mercados de descubrimiento de fármacos, Synergy 2 marca Biotek.

Plan de análisis estadístico

Se realizó estadística descriptiva de las variables demográficas (media y desviación estándar, si la distribución es normal). Para las variables cualitativas se uso X^2 , para las cuantitativas se utilizó t de Student. Se realizó análisis de correlación de Pearson entre el IMC y diversas variables clínicas y bioquímicas. Los valores son expresados en DE. La significancia estadística se consideró con una $p \leq 0.05$. El programa estadístico empleado fue STATA V.o 11.0

Descripción de variables

VARIABLE DEPENDIENTE:

Niveles séricos de 8-OHdG

VARIABLES DEPENDIENTES SECUNDARIAS:

perfil de lípidos (Colesterol total, Triglicéridos, C-HDL, C-LDL),
adiponectina total,
PCR,
Circunferencia abdominal.

VARIABLE INDEPENDIENTE:

Obesidad.

VARIABLES POTENCIALMENTE CONFUSORAS:

Edad, sexo, IMC, tensión arterial sistólica y diastólica, antecedentes familiares de DM2, ECV y grado de obesidad.

Definición operativa de las variables

Edad

Definición conceptual: tiempo transcurrido a partir del nacimiento de la persona.

Definición operacional: tiempo transcurrido desde el nacimiento del paciente hasta su inclusión en el estudio.

Escala de medición: cuantitativa continua.

Sexo

Definición conceptual: características biológicas que clasifican a las personas en hombres o mujeres.

Definición operacional: hombre o mujer.

Escala de medición: nominal, dicotómica.

Peso

Definición conceptual: parámetro antropométrico que valora el estado nutricional del organismo.

Definición operacional: se determinó mediante báscula de pie (precisión de 100 grs.), con el paciente en el centro de la plataforma de báscula distribuyendo el peso por igual en ambas piernas, sin que el cuerpo este en contacto con nada que haya alrededor y con los brazos colgando libremente a ambos lados del cuerpo. La medida se realiza con el paciente en bata clínica y se aproxima a la décima de kilogramo más próxima.

Escala de medición: cuantitativa, continua.

Unidad de medición: kilogramos.

Talla

Definición conceptual: Parámetro antropométrico que valora el crecimiento del organismo y es la distancia entre el vértex y el plano de sustentación.

Definición operacional: el paciente se coloca de pie, con los talones juntos y apoyados en el tope posterior del estadiómetro. Se coloca la cabeza del paciente en

el plano de Frankfurt y se realiza una tracción de la cabeza a nivel de las apófisis mastoides. Se desciende lentamente la plataforma horizontal del estadiómetro hasta contactar con la cabeza del paciente. En esta medida el paciente debe estar descalzo. Se obtiene la talla máxima y se ajusta al centímetro más próximo.

Escala de medición: cuantitativa, continua.

Cintura

Definición conceptual: parte más estrecha del tronco, entre las costillas y la cadera.

Definición operacional: es la circunferencia obtenida a la mitad de la distancia entre la décima costilla y la cresta iliaca, con el paciente en posición erecta. Se utilizó una cinta métrica flexible como instrumento de medición (precisión de 1 mm). Se ajustó al centímetro más próximo.

Escala de medición: cuantitativa, continua.

Índice de masa corporal (IMC)

Definición conceptual: medida de relación entre peso y talla.

Definición operacional: Se calculó utilizando la fórmula de Quetelet.

$$\text{IMC} = \text{peso (kg)} / \text{altura (m}^2\text{)}$$

Escala de medición: cuantitativa, continua.

Tensión arterial

Definición conceptual: es la presión que ejerce la sangre contra la pared de las arterias.

Definición operacional: se determina con el paciente sentado, en reposo durante 5 minutos. Con un esfigmomanómetro calibrado y con un brazalete que cubra los 2/3 del brazo derecho, se realizan tres mediciones promediándose los valores de las dos últimas tomas.

Escala de medición: cuantitativa, continua.

Colesterol HDL (C-HDL)

Definición conceptual: cantidad de colesterol contenido en las lipoproteínas de alta densidad, las cuales se encargan de transportarlo al hígado para que vuelva a la circulación o excretarlo.

Definición operacional: cantidad de colesterol en las lipoproteínas de alta densidad, determinado por un método semiautomatizado de peroxidasa en el equipo Dimension de Siemens.

Escala de medición: cuantitativa, continua.

Colesterol LDL (C-LDL)

Definición conceptual: cantidad de colesterol en las lipoproteínas de baja densidad.

Definición operacional: calculado mediante la fórmula de Friedewald modificada por De Long.

Escala de medición: cuantitativa, continua.

Triglicéridos

Definición conceptual: grasa formada por una molécula de alcohol (llamada glicerol o glicerina) y por tres moléculas de ácidos grasos.

Definición operacional: determinado mediante un método semiautomatizado de peroxidasa en el equipo Dimension de Siemens.

Escala de medición: cuantitativa, continua.

Glucemia

Definición conceptual: cantidad de glucosa circulante en plasma

Definición operacional: determinada mediante un método semiautomatizado con técnica peroxidasa en el equipo Dimension de Siemens.

Escala de medición: cuantitativa, continua.

Insulina

Definición conceptual: hormona que interviene en la regulación del metabolismo de carbohidratos

Definición operacional: concentración sérica de insulina en mU/ml determinada mediante quimioluminiscencia con analizador Inmulite.

Escala de medición: cuantitativa, continua

Estadio Puberal

Definición conceptual: periodo del desarrollo, desde la aparición de los caracteres sexuales secundarios hasta adquirir la madurez sexual.

Definición operacional: estadios de maduración sexual establecido de acuerdo a los cuadros gráficos de Marshall y Tanner

Escala de medición: ordinal

Adiponectina total

Definición conceptual: Hormona proteica producida exclusivamente por el tejido adiposo con acción anti-aterogénica y anti-inflamatoria.

Definición operacional: concentración sérica de adiponectina en mcg/ml determinada mediante ELISA.

Escala de medición: cuantitativa, continua.

8-hidroxi-2´deoxi-guanosina

Definición conceptual: nucleósido oxidado del ADN, producto de la oxidación de la deoxiguanosina, se considera como el marcador mas sensible y útil daño oxidativo al ADN.

Definición operacional: concentración sérica de 8-OHdG en pg/ml determinada mediante EIA.

Escala de medición: cuantitativa, continua.

Resultados

En la **tabla 1** se muestran las características clínicas de los individuos en estudio. Se encontró que existe diferencia significativa en el peso, el IMC y la circunferencia de cintura, entre el grupo de niños con obesidad vs el grupo de niños con IMC normal. La distribución del género, la edad, la talla, TAS y TAD fue similar entre ambos.

	Niños con obesidad (n=58)	Controles (n=10)	p
Edad (años)	10.19 ± 2.29	9.79 ± 1.68	0.594
Sexo (M/F)	29 / 9	8/2	0.079
Peso (Kg)	50.00 (26.0-96.0)	31.00 (24.0-68.0)	<0.001
Talla (m)	1.41 ± 0.13	1.36 ± 0.1	0.244
IMC (kg/m ²)	26.28 ± 4.74	17.85 ± 2.31	<0.001
TAS (mmHg)	96.23 ± 12.20	90.37 ± 14.44	0.187
TAD (mmHg)	60.44 ± 10.20	60.56 ± 7.75	0.995
Circunferencia de cintura (cm)	80.93 ± 12.78	66.33 ± 8.78	<0.001

Tabla 1. Características clínicas y antropométricas de niños con obesidad vs grupo control.

En la **tabla 2** se muestran los antecedentes heredofamiliares de los niños con obesidad vs grupo control. El antecedente de DM2 y obesidad en la familia, fue más frecuente en el grupo de niños con obesidad en comparación con el grupo control, sin embargo solo se observa significancia estadística el antecedente familiar de DM2 en los niños obesos vs grupo control eutrófico.

	Niños con obesidad (n=58)	Controles (n=10)	p
Antecedentes familiares de obesidad (si/no)	51 / 7	8 / 2	0.494
Antecedentes familiares de DM2 (si/no)	51 / 7	5 / 5	0.004
Antecedentes familiares de HTA (si/no)	45/ 13	9 / 1	0.415
Antecedentes familiares de ECV (si/no)	48 / 10	2 / 8	0.74

Tabla 2. Antecedentes heredofamiliares de niños con obesidad vs grupo control.

En el análisis bivariado del perfil metabólico se observa que la insulina basal así como la de 120 minutos posterior a prueba de tolerancia oral a la glucosa, las concentraciones de triglicéridos y PCR fueron mayores en los niños con obesidad vs grupo control ($p=0.008$, 0.016 , 0.049 , 0.016 , 0.001 respectivamente). En cuanto a los niveles de glucosa en ayuno y 2 horas posterior a la prueba de tolerancia oral a la glucosa, no se observa diferencia entre ambos grupos.

Los niveles de colesterol total, C-HDL y C-LDL, así como los niveles de adiponectina total tampoco presentaron diferencia significativa entre ambos grupos. Se observa una diferencia significativa en las concentraciones de 8-OHdG entre ambos grupos (**tabla 3**).

	Niños con obesidad (n=58)	Controles (n=10)	p
Glucosa basal (mg/dL)	87.47 ± 10.76	85.62 ± 12.03	0.933
Glucosa 120 minutos (mg/dL)	107.84 ± 22.67	107.38 ± 28.79	0.969
Insulina basal (UI/L)	8.48 (2.0-43.0)	2.67 (2.0-14.0)	0.008
Insulina 120 minutos (UI/L)	59.0 (6.0-300.0)	43.94 (4.0-237.0)	0.016
Colesterol total (mg/dL)	162.78 ± 29.03	155.31 ± 27.01	0.483
Triglicéridos (mg/dL)	110.0 (35.0-468.0)	67.00 (47.0-127.0)	0.049
C-HDL (mg/dL)	40.00 ± 9.41	54.41 ± 23.46	0.092
C-LDL (mg/dL)	100.05 ± 28.25	87.38 ± 19.92	0.185
PCR	0.32 (0.31-1.40)	0.35 (0.31-0.41)	0.016
Adiponectina total	8.57 ± 1.76	10.52 ± 1.84	0.135
8-deoxiguanosina (pg/mL)	13,494.0 (534.0-64,410.0)	1,886.0 (188.0-8,111.0)	0.001

Tabla 3. Características bioquímicas de niños con obesidad vs grupo control.

Se realizó una análisis de correlación entre distintas variables tanto clínicas como bioquímicas con el IMC, obteniendo una correlación positiva entre circunferencia de cintura, tensión arterial sistólica, tensión arterial diastólica (r 0.89 $p<0.001$, r 0.429 $p=0.001$, r 0.252 $p=0.041$ respectivamente). Así como una correlación negativa con niveles C-HDL, adiponectina total y 8-OHdG (r -0.489 $p=0.007$, r -0.315 $p=0.009$ respectivamente) (**tabla 4**).

Índice de masa corporal (IMC kgm²)		
	r	p
Circunferencia de cintura (cm)	0.89	<0.001
TAS (mm/Hg)	0.429	<0.001
TAD (mm/Hg)	0.252	0.041
C-HDL (mg/dL)	-0.328	0.007
Triglicéridos (mg/dL)	0.173	0.166
PCR (UI/L)	0.089	0.475
Adiponectina (mg/dL)	-0.489	0.007
8-deoxiguanosina (pg/mL)	-0.315	0.009

Tabla 4. Análisis de correlación entre IMC y variables metabólicas.

Discusión

Éste es el primer estudio que intenta valorar y asociar la presencia de 8OHdG como marcador de daño oxidativo al ADN en niños prepúberes con obesidad, así como describir la diferencia bioquímica en el perfil metabólico. El principal resultado de este estudio es la existencia de concentraciones superiores en el biomarcador indicador de daño oxidativo 8OHdG en pacientes de edad pediátrica prepúberes obesos vs niños eutróficos.

Hasta principios del 2014, no hay un estudio en población pediátrica que mida los niveles séricos de 8OHdG en el rango de edad y estadio de tanner específico, como se llevó a cabo. Lo anterior cobra mucho valor ya que como es bien documentado los niveles de 8OHdG es directamente proporcional a la tasa metabólica. Por lo que para poder establecer valores de referencia en pacientes sanos, es necesario medir los niveles de dicho metabolito y separarlos por grupo etario y estadio de tanner, lo cual se asocia con tasa metabólica y crecimiento somático.

Aún con las solas cifras de insulina podemos inferir con los valores de diferencia significativa entre los grupos, que la obesidad incrementa el fenómeno de hiperinsulinismo, que conlleva a una resistencia periférica a la insulina, lo que precede a la hiperglicemia y finalmente al desarrollo de diabetes mellitus tipo 2. Este hallazgo de niveles altos de insulina basal y 2hrs PTOG en obesos, es muy importante ya que se encontró correlación negativa con los niveles de adiponectina, lo que explica la disminución de la acción de la insulina en tejidos periféricos, los niveles de adiponectina se asocian de manera inversa con la cantidad de grasa visceral y con resistencia a la acción de la insulina, lo que se confirma en el presente estudio al encontrar correlación positiva de la circunferencia abdominal y el IMC. Además las adiponectinas proveen un efecto antiaterogénicos y antiinflamatorio, que también se confirma con la correlación positiva de los niveles de PCR y el IMC, así como correlación positiva con cifras de TAS y TAD y el IMC.

A nivel metabólico, el hallazgo de niveles mayores de triglicéridos en el grupo de obesos vs control, puede explicarse por malos hábitos de higiene dietética, que tampoco se midió dicha variable en el presente estudio. Es de llamar la atención que no hubo diferencia significativa entre los niveles de C-HDL en ambos grupos, sin embargo al analizar los resultados los valores promedio de ambos grupos se encuentran en rangos bajos y límite superior, hubiera sido conveniente describir el nivel de actividad física y correlacionarlo con niveles de C-HDL de cada grupo.

Por lo reportado en la literatura en pocos estudios de población pediátrica con patología en el contexto de obesidad, las cifras encontradas son muy altas comparadas con lo descrito, sin embargo hay que tomar en consideración que no hay valores establecidos para 8OHdG en suero, lo reportado sido en determinaciones de orina y en edades puberales y mayores. Puede explicarse por lo descrito previamente en ratas, monos y ratones, donde se correlaciona de manera positiva los niveles de 8OHdG y la tasa metabólica, infiriendo que durante las etapas de mayor crecimiento se encontrarán mayores niveles de 8OHdG. Además que el tipo de ensayo para el análisis de muestra determina no solamente la fracción libre

de 8OHdG sino también la unida a ADN, es el primer reporte en edad pediátrica en literatura universal que describe los niveles de 8OHdG libre y unido a ADN en pacientes obesos de edad pediátrica sin otras patologías, a nivel México no se había realizado ninguna de determinación de 8OHdG en edad pediátrica independientemente de la patología.

Conclusión

Nosotros encontramos niveles muy elevados de 8OHdG en ambos grupos (13, 494.0 pg/mL para obesos y 1, 886 pg/mL para controles eutróficos) con respecto a lo publicado en adultos obesos elevado en obesos (848.5 \pm 103 pg/ml) y en sujetos con sobrepeso (724 \pm 102 pg/ml) comparado con el grupo control (196.5 \pm 327 pg/ml) (57).

La obesidad tiene un efecto positivo en aumentar los niveles de glucosa plasmática en ayuno, por mecanismos ya estudiados de resistencia a la insulina, contribuyendo al daño oxidativo al ADN, nosotros no encontramos una correlación positiva, sin embargo en edad pediátrica es mas frecuente encontrar hiperinsulinismo y resistencia a la insulina, más que alteraciones en la glucosa en ayuno y en PTOG; no podemos concluir que hay una correlación directa con hiperinsulinismo y daño oxidativo al ADN, sin embargo por la correlación positiva de los niveles de insulina con niveles de IMC si podemos inferir que la obesidad favorece y hasta acelera el fenómeno de estrés oxidativo por medio de el aumento de la resistencia a la insulina, y disminución de los factores protectores como es el caso de la adiponectina, con una correlación negativa significativa.

El presente estudio genera información importante para continuar nuevos protocolos de investigación orientados hacia el daño oxidativo del ADN y nuevas rutas terapéuticas para evitar las comorbilidades asociadas a estrés oxidativo.

Cronograma de actividades

ACTIVIDAD	2013											2014					
	Mar	Abr	Mayo	Jun	Jul	Ago	Sept	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr	Mayo	Jun	Jul
Selección del tema de investigación. Diseño del proyecto.																	
Revisión de la Literatura																	
Realización del marco teórico, planteamiento del problema																	
Diseño del proyecto: Metodología, Variables, criterios de inclusión, exclusión																	
Selección de la población y muestra																	
Elaboración de instrumentos de recolección de datos																	
Procesamiento de muestras en laboratorio de Investigación de Nefrología (determinación de 8OHdG)																	
Aplicación de instrumentos de recolección (base de datos)																	
Análisis y procesamiento de los resultados																	
Elaboración de resultados, gráficas, tablas, etc.																	
Elaboración del reporte final (Elaboración de conclusiones y discusión)																	

Referencias bibliográficas

1. Katzmarzyk PT, Srinivasan SR, Chen W, Malina RM, Bouchard C, Berenson GS. Body mass index, waist circumference, and clustering of cardiovascular disease risk factors in a biracial sample of children and adolescents. *Pediatrics*. 2004;114:198-205.
2. Thompson DR, Obarzanek E, Franko DI, Barton BA, Morrison J, Biro FM, et al. Childhood overweight and cardiovascular disease risk factors: The National Heart, Lung, and Blood Institute Growth and Health Study. *J Pediatr* 2007;150:18-25.
3. Hossain P, Kavar B, Nahas ME. Obesity and diabetes in the developing world. A growing challenge. *N Engl J Med*. 2007;356:213-5.
4. Olaiz-Fernández G, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Rojas R, Villalpando-Hernández S, Hernández-Avila M, et al. Encuesta nacional de salud y nutrición 2006. Cuernavaca Morelos México: Instituto Nacional de Salud Pública; 2006.
5. Gutiérrez JP R-DJ, Shamah-Levy T, Villalpando-Hernández S, Franco A, Cuevas-Nasu L, Romero-Martínez M H-ÁM, editors. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública (MX); 2012.
6. Steinberger J, Daniels SR, Eckel RH, et al. 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; Council on Cardiovascular Nursing; and Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. *Circulation*. 2009; 119: 627-647.
7. Kipping RR, Jago R, Lawlor DA. Obesity in children. Part 1: Epidemiology, measurement, risk factors, and screening *BMJ*. 2008;337:1824.
8. Medina-Bravo P M-SR, Rosas-Fernandez P, Galvan-Duarte R, Velazquez-Lopez RL, Torres-Tamayo M. Decrease in Serum Adiponectin Levels Associated with Visceral Fat Accumulation Independent of Pubertal Stage in Children and Adolescents. *Archives of Medical Research*. 2011;42:115-21.
9. Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*. 2000;106:473-81.
10. Lebovitz HE, Banerji MA. Point: Visceral Adiposity Is Causally Related to Insulin Resistance. *Diabetes Care*. 2005;28(9):2322-2325.
11. Carroll JF, Chiapa AL, Rodriguez M, Phelps DR, Cardarelli KM, Vishwanatha JK, et al. Visceral Fat, Waist Circumference, and BMI: Impact of Race/ethnicity. *Obesity*. 2008;16(3):600.
12. Asayama K, Dobashi K, Hayashibe H, Kodera K, Uchida N, Nakane T, et al. Threshold values of visceral fat measures and their anthropometric alternatives for metabolic derangement in Japanese obese boys. *International Journal of Obesity*. 2002;26:208-13.

13. Liska D, Dufour S, Zern TL, Taksali S, Calí AMG, Dziura J, et al. Interethnic Differences in Muscle, Liver and Abdominal Fat Partitioning in Obese Adolescents. *PLoS ONE*. 2007;2(6):e569.
14. Janssen I HS, Allison DB, Kotler DP, Ross R. Body mass index and waist circumference independently contribute to the prediction of nonabdominal, abdominal subcutaneous and visceral fat. *Am J Clin Nutr*. 2002;75:683–8.
15. Vander Kooy K SJ. Techniques for the measurement of visceral fat: a practical guide. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1993;17:187 – 96.
16. He Q HM, Thornton J, Wang J, Pierson RN Jr, Heshka S, Gallagher D. Sex-specific fat distribution is not linear across pubertal groups in a multiethnic study. . **Obes Res** 2004;12:725–33.
17. E. S. Visceral adipose tissue in children and adolescents: a review. *Nutr Res Rev*. 2009;22:137-47.
18. Freedman DS KL, Serdula MK, Dietz WH, Srinivasan SR, Berenson GS. Relation of age at menarche to race, time period and anthropometric dimensions: the Bogalusa Heart Study. *Pediatrics*. 2002;110:e43.
19. Gallagher EJ LD, Karnieli E. The metabolic syndrome--from insulin resistance to obesity and diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2008;37(3):559-79.
20. Guerci B, Böhme P, Kearney-Schwartz A, Zannad F, Drouin P. Endothelial dysfunction and type 2 diabetes. Part 2: altered endothelial function and the effects of treatments in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab*. 2001;27:436-47.
21. Hansel B, Giral P, Nobecourt E, Chantepie S, Bruckert E, Chapman MJ, et al. Metabolic Syndrome Is Associated with Elevated Oxidative Stress and Dysfunctional Dense High-Density Lipoprotein Particles Displaying Impaired Antioxidative Activity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 October 1, 2004;89(10):4963-71.
22. Clos TWD. "Function of C-reactive protein" *Annals of Medicine* 2000;32(4):274–8.
23. Zulet MA PB, Navarro C, Martí A, Martínez JA. Biomarcadores del estado inflamatorio: nexos de unión con la obesidad y complicaciones asociadas. *Nutr Hosp*. 2007;22(5):511-27.
24. Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocrine reviews*. 2005;26(3):439-51.
25. Punthakee Z, Delvin EE, O'Loughlin J, Paradis G, Levy E, Platt RW, et al. Adiponectin, Adiposity, and Insulin Resistance in Children and Adolescents. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2006;91:2119-25.
26. Jaquet D, Deghmoun S, Chevenne D, Czernichow P, Levy-Marchal C. Low serum adiponectin levels in subjects born small for gestational age: impact on insulin sensitivity. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2005;30(1):83-7.
27. Araki S DK, Kubo K , Asayama K , Shirahata A. High molecular weight, rather than total, adiponectin levels better reflect metabolic abnormalities associated with childhood obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91:5113–6.

28. Giuseppe Murdolo BN, Federica Celi, Miranda Donati, Vittorio Bini, Francesco Papi, Gabi Gornitzka, Serena Castellani, Michael Roden, Adriano Falorni, Christian Herder, Alberto Falorni. Inflammatory Adipokines, High Molecular Weight Adiponectin, and Insulin Resistance : A Population-Based Survey in Prepubertal Schoolchildren. *PLoS ONE*. 2011;6(2):1-10.
29. American Diabetes Association. Type 2 diabetes in children and adolescents. *Diabetes Care*. 2000;23:381-389.
30. Marloes P. van der Aa, Soulmaz Fazeli Farsani, Lisa A. J. Kromwijk, Anthonius de Boer, Catherijne A. J. Knibbe, Marja M. J. van der Vorst. How to Screen Obese Children at Risk for Type 2 Diabetes Mellitus ? *Clinical Pediatrics* 2014, Vol. 53(4) 337–342.
31. Turchiano M, Sweat V, Fierman A, Convit A. Obesity, metabolic syndrome, and insulin resistance in urban high school students of minority race/ethnicity. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2012;166:1030-1036.
32. Fridovich I. Superoxide dismutases: defense against endogenous superoxide radical. *Ciba Found Symp*. 1978;65:77-93.
33. Brune B, Zhou J & von Knethen A. Oxidative stress and NO. *Kidney Int*. 2003; 63: 22–24.
34. Viña J., Sáez G.T., Wiggins D., Roberts A.F., Ems R.H. and Krebs H.A. "The effect of cysteine oxidation on isolated hepatocytes". *Biochem. J*. 1983;1:39-44.
35. Oliva M.R., Iradi A., Garrido M., Ramos A. M., Oltra P., Muñiz P. and Sáez G. Oxidative stress induces the expression of the major histocompatibility complex in murine tumor cells. *Free Radic. Res*. 2001;35:119-128.
36. Evans M & Dizdaroglu M. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutation Research*. 2004;567:1–61.
37. Tuzgen S, Hamnimoglu H, Tanriverdi T, Kacira T, Sanus G, Atukereny P, Dashti R, Gumustasy K, Canbaz B & Kaynar M. Relationship between DNA damage and total antioxidant capacity in patients with glioblastoma multiforme. *Clinical Oncology* 2007; 19: 177–181.
38. Andreassi M & Botto N. Coronary atherosclerosis and somatic mutations: and overview of the contributive factors for oxidative DNA damage. *Mutation Research*. 2003; 543:67–86.
39. Warren James., et al. The Role of DNA Damage and Repair in Cell Ageing. *Adv in Cell Aging and Geront*. 2001;4:41-72.
40. Alexey A. Moskaleva, Mikhail V. Shaposhnikova, Ekaterina N. Plyusninaa, Alex Zhavoronkov, Arie Budovskyd, Hagai Yanaie, Vadim E. Fraifelde. The role of DNA damage and repair in aging through the prism of Koch-like criteria. *Ageing Res Rev*. 2013;12:661–684.
41. Hamilton ML., Van Remmen H., et al. Does oxidative damage to DNA increase with age?. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98(18):10469-10474.
42. Ceriello, A New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a “causal” antioxidant therapy. *Diabetes Care*. 2003;26:1589–1596.

43. Tsukahara H, Haruta T, Todoroki Y, Hiraoka M, Noiri E, Maeda M et al Oxidant and antioxidant activities in childhood meningitis. *Life Sci.* 2002;71:2797–2806.
44. H. Tsukahara and K. Kaneko (eds.), *Studies on Pediatric Disorders, Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice.* 2104:137-148.
45. Maritim A, Sanders R & Watkins JB III. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *Jour of Bioch Mol Toxicol.* 2003;17:24–38.
46. Andreassi M & Botto N. DNA damage as a new emerging risk factor in atherosclerosis. *Trends in Cardiovascular Medicine.* 2003;13:270–275.
47. Nwose E, Richards R, Kerr P, Tinley R & Jelinek H. Oxidative damage indices for the assessment of subclinical diabetic macrovascular complications. *British Journal of Biomedical Science* 2008;65:136–141.
48. Hofer T, Karlsson HL & Moller L. DNA oxidative damage and strand breaks in young healthy individuals: a gender difference and the role of life style factors. *Free Radical Research* 2006;40:707–714.
49. Wannamethee S, Shaper A, Whincup P & Walker M. Overweight and obesity and the burden of disease and disability in elderly men. *International Journal of Obesity.* 2004; 28: 1374–1382.
50. AuerR, LauD&ReimerR. Obesity in Canadian children. *Canadian Medical Association Journal.* 2001; 164: 1563–1565.
51. Chao-Qiang L, Katherine LT, Laurence DP, Xian A, Bibiana G, John G, Mohsen M & Jose MO. PPARGC1 A variation associated with DNA damage, diabetes, and cardiovascular diseases. *Diabetes* (2008); 57: 809–816.
52. Katari'Na S'Ebekova', Veronika Somoza, Monika Jarc' Us'Kova, August Heidland, Ludmila Podracka'. Plasma advanced glycation end products are decreased in obese children compared with lean controls. *Internat Jour of Ped Obes.*2009;4:112-118.
53. J.L. Pérez-Naveoa, J.D. Benitez-Sillero, M. Gil-Camposa, M. Guillén-del Castillo. Cambios en biomarcadores del estrés oxidativo inducidos por la pubertad. *An Pediatr (Barc).* 2009;70(5):424–428.
54. Francesco Martino, Pasquale Pignatelli, Eliana Martino, Francesco Morrone, Roberto Carnevale, Serena Di Santo, Barbara Buchetti, Lorenzo Loffredo, Francesco Violi. Early Increase of Oxidative Stress and Soluble CD40L in Children With Hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol* 2007;49: 1974–8.
55. Noiri E, Tsukahara H. Parameters for measurement of oxidative stress in diabetes mellitus: applicability of enzyme-linked immunosorbent assay for clinical evaluation. *J Inv Med.* 2005; 53:167–175.
56. Kazunari Kaneko, Takahisa Kimata, Shoji Tsuji, Atsushi Ohashi, Yuichiro Imai, Hiroaki Sudo, Naoyuki Kitamura. Measurement of urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2-deoxyguanosine in a novel point-of-care testing device to assess oxidative stress in children. *Clinica Chimica Acta.* 2012;413:1822–1826.

Limitación del estudio

- El instrumento de medición para 8OhdG requiere de precisión durante el procesamiento de las muestras indicado por el fabricante, en éste caso se realizo por el residente que presenta la tesis (residente de endocrinología de 5º año) y experto en laboratorio químico, pudiendo haber errores durante el proceso.
- Estudio transversal que no nos establece causalidad, sólo asociación.
- Fueron dos los lectores de las placas de cultivo de DNA, no se tomó en cuenta el error interobservador
- El tamaño de la muestra es adecuado, no así el de sus controles que es muy pequeño.

Anexos

Cuadro 1.0 Enfermedades y condiciones asociadas con el estrés oxidativo en niños

Alérgicas / Inmunológicas	Dermatitis atópica, asma bronquial, artritis crónica, púrpura de Henoch-Schönlein, enfermedad de Kawasaki, lupus eritematoso sistémico, síndrome de vasculitis
Cardiovascular	Cirugía cardíaca, bypass cardiopulmonar, hipertensión esencial.
Endocrinológicas/metabólico	Diabetes mellitus, la deficiencia de glutatión sintetasa, hipertiroidismo, bocio por deficiencia de yodo, enfermedades mitocondriales, fenilcetonuria, adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X.
Ambiental/toxicológico	Exposición a metales carcinogénicos (cromo, arsénico), la exposición al ozono, el tabaquismo pasivo, la residencia urbana.
Gastrointestinal/hepático	Hepatitis autoinmune, estreñimiento crónico, enfermedad inflamatoria intestinal, hígado graso no alcohólico, hepatitis viral, enfermedad de Wilson.
Genética	Síndrome de Cockayne, síndrome de Down, síndrome de Zellweger.
Hematológicas	Leucemia aguda, β -talasemia, protoporfiria eritropoyética, anemia de Fanconi, anemia de células falciformes.
Infecciosa	Bronquiolitis aguda, mononucleosis infecciosa, otitis media aguda, amigdalitis aguda, infección por adenovirus, la otitis media crónica, amigdalitis crónica, leishmaniasis cutánea, infección por VIH,

	encefalitis por sarampión, meningitis, choque séptico.
Neonatales	Asfixia, preeclampsia materna, síndrome de dificultad respiratoria, nacimiento prematuro, retinopatía.
Neurológicas / musculares	Ataxia telangiectasia, trastorno de hiperactividad con déficit de atención, trastornos del espectro, trastorno de los ácidos orgánicos cerebrales, parálisis cerebral, distrofia muscular congénita, epilepsia, ataxia de Friedreich, la miopatía inflamatoria, trastorno músculo esquelético por deficiencia de selenio, la atrofia muscular espinal.
Nutrición	La hiperlipidemia, kwashiorkor, obesidad.
Farmacológico / terapéutico	Analgésicos, medicamentos contra el cáncer, las drogas inmunosupresoras, irradiación de cuerpo entero.
Renal	Glomerulonefritis, síndrome nefrótico, insuficiencia renal, infección del tracto urinario.

Cuadro 2.0 Biomarcadores para el estrés oxidativo

<i>1. Formación de moléculas modificadas por especies reactivas de oxígeno</i>	
Peroxidación de lípidos	Malondialdehído-lisina, 4-hidroxi-2-nonenal-lisina, acrolein-lisina, F2-isoprostano.
Daño Oxidativo al ADN	8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina (8-oxodG), conocido como 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG)
Glico-oxidación	Carboximetil-lisina, pentosidina, argpirimidina,

	metilglioxal
Nitro-oxidación	Nitrotirosina, nitrito/nitrato
Otros	<i>o</i> , <i>o'</i> -Ditirosina, ortotirosina, metabolitos oxidativos de la bilirrubina, dehidroascorbato, glutatión oxidado, ácido tiobarbitúrico.
<i>II. Moléculas y enzimas antioxidantes</i>	
Enzimas	Superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, glutatión-S-transferasa, tioredoxina reductasa, heme oxigenasa.
Proteínas	Albúmina, ferritina, transferrina, lactoferrina, ceruloplasmina, tioredoxina, proteína fijadora de ácidos grasos tipo L.
Moléculas de bajo peso molecular	Bilirrubina, tocoferoles, carotenoides, ubiquinone, ascorbato, glutatión, cisteína, urato, nitrito/nitrato, selenio.
Otras	Reactividad antioxidante total, potencial antioxidante total de captura de radicales

Figura 2. Reacción de Fenton-Haber-Weiss. El superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) reduce el hierro férrico (Fe^{3+}) a ferroso (Fe^{2+}) y éste reduce mono electrónicamente al peróxido de hidrógeno (H_2O_2) dando lugar a la formación del radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), altamente reactivo.

