



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS *FTO* rs9939609 y *BDNF* rs6265 CON
LA CONCENTRACIÓN PERIFÉRICA DE BDNF Y EL BALANCE ENERGÉTICO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BEATRIZ ROSALES RODRÍGUEZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. HAYDEÉ ROSAS VARGAS
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. RAMÓN MAURICIO CORAL VÁZQUEZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
DR. CARLOS GUADALUPE PÉREZ PLASENCIA
FES-IZTACALA, UNAM

MÉXICO, D.F. AGOSTO, 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.



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 08 de junio de 2015, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **ROSALES RODRÍGUEZ BEATRIZ** con número de cuenta **404087540**, con la tesis titulada **"ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS *FTO* rs9939609 Y *BDNF* rs6265 CON LA CONCENTRACIÓN PERIFÉRICA DE BDNF Y EL BALANCE ENERGÉTICO"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. HAYDEE ROSAS VARGAS**:

Presidente: DR. ALONSO ANTONIO VILCHES FLORES
Vocal: DRA. ILEANA PATRICIA CANTO CETINA
Secretario: DR. RAMÓN MAURICIO GORAL VÁZQUEZ
Suplente: DR. SAMUEL CANIZALES QUINTEROS
Suplente: DR. CARLOS GUADALUPE PÉREZ PLASENCIA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 30 de junio de 2015

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por el apoyo recibido en el transcurso de la Maestría.

A CONACYT por su invaluable apoyo al otorgar la beca 288759 para la realización de este trabajo de investigación.

Agradezco al Instituto Mexicano del Seguro Social por el acceso a la beca económica con folio 2014-029. En adición, el presente proyecto se registró ante el Fondo de Investigación en Salud con el número R-2012-785-057 y recibió financiamiento por el correspondiente convenio FIS/IMSS/PROT/G12/1113.

Finalmente agradezco al Comité Tutor, los Doctores Coral Vázquez y Pérez Plasencia por sus comentarios acertados, en particular un agradecimiento especial a la Dra. Haydeé Rosas Vargas por su incomparable guía académica.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Considero que concluir el posgrado más que experiencia profesional, representó un avance a nivel personal en el que agradezco la inspiración y aprendizaje brindados por mi asesora de tesis. Especial gratitud a mis padres por ser mi fortaleza.

DEDICATORIA

Siempre a ti, mamá

INDICE

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABLAS	ii
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
Obesidad	5
Balance energético	6
El Hipotálamo en el control del balance energético homeostático	8
La influencia genética en características relacionadas con la obesidad	11
Función molecular de FTO	14
Localización celular	14
FTO, sensor nutricional intracelular	15
FTO y su función desmetilasa de ácidos nucleicos	17
FTO, coactivador transcripcional	18
Aspectos funcionales del SNP rs9939609	18
Influencia del SNP rs9939609 en la ingesta alimentaria	20
Factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF)	23
Polimorfismo <i>BDNF</i> rs6265	26
Planteamiento del problema	29
HIPÓTESIS	29
OBJETIVOS	30
Objetivo General	30
Objetivos Particulares:	30

ANTECEDENTES	31
MATERIALES Y MÉTODOS	33
Selección de Participantes.....	33
Evaluación del estado nutricional	34
Determinación de la Ingesta energética	34
Determinación del gasto energético	35
Determinación del balance energético.....	36
Obtención de las muestras biológicas	36
Procesamiento de Suero sanguíneo.....	37
Cuantificación de BDNF sérico	37
Extracción de ADN	38
Genotipificación de <i>FTO</i> rs9939609	38
Genotipificación de <i>BDNF</i> rs6265.....	41
Análisis estadísticos	42
RESULTADOS.....	45
I. Participantes.....	45
II. Determinación de la ingesta energética y el gasto energético total.....	47
III. Determinación de las frecuencias alélicas y genotípicas de <i>FTO</i> rs9939609	49
IV. Determinación de las frecuencia alélicas y genotípicas de <i>BDNF</i> rs6265....	49
V. Asociación de parámetros antropométricos con los polimorfismos <i>FTO</i> rs9939609 y <i>BDNF</i> rs6265.	50
VI. Asociación de parámetros relacionados con la ingesta y gasto energético con los polimorfismos <i>FTO</i> rs9939609 y <i>BDNF</i> rs6265.....	51

VII. Análisis del balance energético	54
VIII. Asociación de los polimorfismos rs9939609 y rs6265 con el balance energético (Variable categórica).....	55
IX. Correlación entre los niveles séricos de BDNF y el IMC	56
X. Asociación de los polimorfismos rs9939609 y rs6265 con el balance energético y la concentración periférica de BDNF. Análisis de puntaje agregado.	57
DISCUSIÓN	60
CONCLUSIONES.....	67
LITERATURA CITADA.....	69
ANEXO I.....	83
ANEXO II.....	88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Control hipotalámico de la ingesta alimentaria.....	10
Figura 2. Modelo de regulación de la expresión de <i>FTO</i> en función de la disponibilidad de aminoácidos y el acoplamiento funcional de <i>FTO</i> con mTORC1..	16
Figura 3. Representación esquemática que indica la ubicación del SNP <i>FTO</i> rs9939609 (T>A) en relación con el sitio de unión al factor de transcripción CUTL1.	19
Figura 4. Resumen esquemático en el que se indican los principales hallazgos obtenidos en relación con <i>FTO</i>	22
Figura 5. Procesamiento de BDNF.....	24
Figura 6. BDNF y TrkB, su expresión en el proceso de regulación de la ingesta alimentaria.....	27
Figura 7. Prevalencia de balance energético insuficiente, adecuado y excedido registrada en el total de los participantes.	55
Figura 8. Prevalencia de genotipos combinados de los polimorfismos rs9939609 y rs6265.	58

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características generales de los participantes incluidos en el estudio.....	46
Tabla 2. Variables relacionadas con la ingesta y gasto energético de acuerdo al género de los participantes.....	48
Tabla 3. Frecuencia alélicas y genotípicas de <i>FTO</i> rs9939609.....	49
Tabla 4. Frecuencias alélicas y genotípicas de <i>BDNF</i> rs6265.....	49
Tabla 5. Asociación de parámetros antropométricos con los polimorfismos <i>FTO</i> rs9939609 y <i>BDNF</i> rs6265.....	51
Tabla 6. Asociación de la ingesta y gasto energético con los polimorfismos <i>FTO</i> rs9939609 y <i>BDNF</i> rs6265.....	52
Tabla 7. Asociación de la ingesta relativa de macronutrientes con los polimorfismos <i>FTO</i> rs9939609 y <i>BDNF</i> rs6265.....	53
Tabla 8. Asociación de los polimorfismos <i>FTO</i> rs9939609, <i>BDNF</i> rs6265 con el balance energético y la concentración sérica de BDNF.....	56
Tabla 9. Asociación de los polimorfismos <i>FTO</i> rs9939609 y <i>BDNF</i> rs6265 (puntaje agregado) con el balance energético y la concentración periférica de BDNF.....	59

RESUMEN

En población Mexicana se ha reportado previamente la asociación significativa de los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) *FTO* rs9939609 y *BDNF* rs6265, con obesidad de tipo mórbida. Estos genes se expresan predominantemente en regiones hipotalámicas y en función del estatus nutricional, por lo que se ha planteado que este patrón de expresión afecta potencialmente el balance energético. Recientemente, en un modelo murino sometido a restricción alimentaria, se indicó la relación funcional entre *FTO* y *BDNF*. El objetivo principal de este trabajo de investigación consistió en analizar la asociación de los SNPs *FTO* rs9939609 y *BDNF* rs6265 con la concentración sérica de BDNF y el balance energético en población Mexicana. Se reclutaron 209 participantes de ambos géneros, con un rango de edad de 20-60 años. La genotipificación se realizó por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real con sondas Taqman (Applied Biosystems), incorporando réplicas y controles genotipificados por secuenciación. La ingesta energética promedio y el gasto energético total (GET), requeridos para establecer el balance energético se determinaron con el registro de tres recordatorios de 24 horas y la actividad física referida por los participantes, respectivamente. El balance energético se categorizó, considerando el cálculo de un porcentaje de adecuación $[(\text{Ingesta energética}/\text{Gasto Energético Total}) \times 100]$, en insuficiente (inferior a 90%), adecuado (rango 90-110%) o excedido (superior a 110%). La concentración sérica de BDNF se cuantificó con ensayos ELISA (Abcam) obteniendo coeficientes de variación inferiores al 13%. Los análisis de asociación correspondientes se realizaron con el programa SPSS 22.0. La

distribución genotípica para los SNPs de interés resultó en equilibrio de Hardy Weinberg. El análisis de los polimorfismos por separado y la combinación de ambos en un puntaje agregado no indicaron evidencias de asociación entre rs9939609 y rs6265 con el balance energético. No obstante, es importante resaltar que el 65% de individuos del género masculino portadores del alelo A rs9939609 (TA + AA) reportan un balance energético excedido. En relación con la concentración sérica de BDNF el análisis incluyó estratificación por género, balance energético y genotipo (puntaje agregado). El valor de P se aproximó ($P=0.054$) a la significancia estadística estipulada convencionalmente, lo que permite sugerir que la concentración sérica de BDNF registrada en participantes del género masculino con balance energético insuficiente, portadores de uno (Genotipos rs9939609+ rs6265: TA+GG, TT+GA) y dos alelos polimórficos de menor frecuencia (Genotipos rs9939609+rs6265: TA+GA, TT+AA, AA+GG) disminuye con respecto a participantes con genotipos rs9939609 y rs6265 silvestres.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren una influencia ligera dependiente de género de los polimorfismos rs9939609 y rs6265 sobre la concentración periférica de BDNF, y el balance energético, en combinación con otros factores genéticos y ambientales aún por definirse.

ABSTRACT

In Mexican population it has previously reported the significant association of single nucleotide polymorphisms (SNPs) FTO rs9939609 and BDNF rs6265 with obesity. These genes are predominantly expressed in hypothalamic regions and in terms of nutritional status, which has been suggested that this expression pattern potentially affects energy balance. Recently, in a murine model under food restriction, it was indicated the functional relationship between FTO and BDNF. The main objective of this research was to analyze the association of SNPs rs9939609 FTO and BDNF rs6265 with serum BDNF and energy balance in Mexican population. Two hundred and nine participants of both genders were included, with an age range of 20-60 years. Genotyping was performed by real time polymerase chain reactions with Taqman probes (Applied Biosystems), incorporating duplicates and controls. The average energy intake and total energy expenditure, required to establish the energy balance were determined by three 24-hour recalls and physical activity reported by the participants, respectively. Individualized energy balance, based on each participant energy needs and daily energy intake, was calculated considering the adequacy percentage $[(\text{Energy intake} / \text{total energy expenditure}) \times 100]$ on insufficient (less than 90%), suitable (range 90-110%) or exceeded (over 110 %). BDNF serum was measured by ELISA assays (Abcam) obtaining coefficients of variation of less than 13%. Association analyses were performed with SPSS 22.0 software. The genotype distribution for SNPs of interest was in Hardy Weinberg equilibrium. The analysis of polymorphisms separately, and the combination of both in an aggregate score

indicated no evidence of association between rs9939609 and rs6265 in the energy balance. However, it is important to note that 65% of male FTO rs9939609 A allele carriers (AT + AA) reported an energy balance exceeded. Regarding BDNF serum analysis included gender stratification, energy balance and genotype (aggregate score). The value of P approached ($P = 0.054$) to the statistical significance conventionally stipulated, suggesting differences in serum BDNF on participants male with insufficient energy balance, carrying one (Genotyping rs9939609 + rs6265: TA + GG , TT + GA) and two minor alleles (Genotypes rs9939609 +rs6265: TA + GA, TT + AA, AA + GG) with respect to participants with genotype rs9939609 and rs6265 wild type.

The results obtained in this study suggest the slight influence, gender-dependent of rs9939609 and rs6265 polymorphisms with the peripheral concentration of BDNF and energy balance in combination with additional genetic and environmental factors yet to be defined.

INTRODUCCIÓN

Obesidad

El sobrepeso y la obesidad se caracterizan por la acumulación excesiva de tejido adiposo corporal, proceso que generalmente subyace a la alteración prolongada en el balance energético (1). El índice de masa corporal (IMC) es un indicador de la relación entre el peso y la talla corporal (kg/m^2) que se utiliza frecuentemente para el diagnóstico de sobrepeso y obesidad en adultos (2). En México, las cifras oficiales estimadas en el año 2012 reportan que la prevalencia de adultos con sobrepeso (IMC: 25-29.9 kg/m^2) y obesidad (IMC: $>30\text{kg}/\text{m}^2$) corresponde al 38.8 y 32.4 %, respectivamente (3), lo que representa un problema de salud pública nacional debido a que se ha determinado que en estos individuos se incrementa el riesgo de desarrollar diversas comorbilidades metabólicas incluyendo diabetes tipo II, dislipidemia, alteraciones cardiovasculares e hipertensión, enfermedades pulmonares, osteoarticulares y determinados tipos de cáncer (4, 5).

El reciente incremento en la prevalencia de sobrepeso y obesidad, documentado a nivel nacional (3), sugiere la interacción crítica de factores ambientales y genéticos que afectan el balance energético. Particularmente, los factores ambientales incluyen el estrato socio-económico, el área de residencia, la ocupación, el estado de salud, los hábitos dietéticos particulares (1) y la atenuación de la actividad física asociada a la industrialización, el transporte mecanizado y la urbanización (6). En adición, el entorno actual potencializa el consumo excesivo de energía debido a la creciente disponibilidad y accesibilidad de alimentos palatables con elevado contenido energético, y al incremento de las porciones alimentarias

comercializadas (7). En este contexto, se requiere identificar con exactitud los mecanismos fisiológicos que subyacen la regulación de la ingesta alimentaria con el propósito de implementar estrategias efectivas para el tratamiento y prevención de la obesidad (8).

Balance energético

Los componentes básicos del balance energético incluyen la ingesta alimentaria, los depósitos de energía y el gasto energético total (GET) (6).

El balance energético adecuado requiere que la relación entre la cantidad de kilocalorías (kcal) ingeridas y el GET resulte equivalente. El balance positivo implica que la ingesta supere al GET, lo que deriva en el subsecuente incremento de masa corporal (9). En contraste, un estado de balance energético insuficiente requiere que el GET supere a la ingesta, promoviendo la reducción de masa corporal. El GET se calcula en base a los requerimientos energéticos individuales, considerando la sumatoria del Gasto Energético Basal (GEB), parámetro definido por la cantidad de energía requerida para que un organismo en reposo mantenga sus funciones vitales; el efecto térmico de los alimentos (ETA), que se refiere al gasto energético que implica la absorción, digestión y el metabolismo de los alimentos consumidos; y el gasto energético por actividad física (GEAF), que representa el componente más variable del GET, determinado en función de la cantidad de actividad física realizada y el costo energético correspondiente (8).

En 2003, Hill *et al.* (7) describieron un análisis de datos clínicos y demográficos, recabados en encuestas nacionales dirigidas a adultos norteamericanos (20-40

años) en el periodo comprendido entre 1992-2000, efectuado con el propósito de definir la tasa de incremento promedio anual en el peso corporal y estimar la cantidad de energía en exceso requerida para el mantenimiento de un balance energético positivo. Con base en la tendencia anual de incremento en el peso corporal (0.8-0.9 kg/año) se calculó teóricamente que este incremento, documentado en el 90% de la población analizada, es promovido por un exceso en la ingesta energética correspondiente a 100 kcal/día. Recientemente, la visión tradicional de que el balance energético es regulado por circuitos neuronales específicos se ha ampliado para incluir mecanismos de memoria, aprendizaje, recompensa, atención, toma de decisiones, y emotividad. Adicionalmente, con la finalidad de distinguir entre el proceso de ingesta impulsado por señales metabólicas implicadas en la promoción de la sensación de apetito y la ingesta regulada por estímulos hedónicos y/o ambientales en ausencia de requerimiento energético, se han adaptado los términos control "homeostático" y "no homeostático", respectivamente. El sistema no homeostático se integra por aspectos relacionados con la abundancia de alimentos en el medio ambiente actual, y la fácil disponibilidad (bajo esfuerzo físico y costo) de alimentos densamente energéticos y altamente palatables (12).

La ingesta energética requiere un complejo control fisiológico y ambiental. En este sentido, el exceso resulta generalmente de alteraciones en los mecanismos fisiológicos que promueven o inhiben la ingesta, conduciendo a un balance energético excedido y el subsecuente aumento de peso corporal. Se ha definido que la combinación de estímulos sensoriales y nutricionales inherentes a la ingesta alimentaria como la densidad calórica, la textura y el contenido de

macronutrientes promueven potencialmente la sobreingesta energética y el incremento de grasa corporal (11). En particular, proteínas, lípidos e hidratos de carbono generan diversas respuestas fisiológicas que afectan la intensidad y la duración de la saciedad. En contraste, las respuestas inhibitorias atribuidas a los macronutrientes incluyen la distensión gástrica, la producción y secreción de diversos péptidos derivados del proceso digestivo (colesistoquinina, péptido similar al glucagón, oxintomodulina, péptido YY y enterostatina) que promueven respuestas específicas en los sistemas de neurotransmisores implicados en la regulación de la ingesta y el gasto energético (12).

El Hipotálamo en el control del balance energético homeostático

El balance energético implica la participación de múltiples circuitos neuronales (Fig.1) que integran diversos procesos cognitivos, hedónicos, emocionales y homeostáticos en función de múltiples factores, incluyendo mecanismos genéticos y epigenéticos (13).

En el hipotálamo se detectan factores locales y circulantes relacionados con el estado energético de un organismo. La integración de estas señales culmina en la generación de respuestas fisiológicas específicas, anorexigénicas u orexigénicas, destinadas a inhibir e inducir la ingesta alimentaria, respectivamente. El hipotálamo está constituido por distintos núcleos incluyendo el núcleo arqueado (ARC), el núcleo paraventricular (PVN), el área hipotalámica lateral (LHA), el núcleo ventromedial (VMN), y el núcleo dorsomedial (DMN). El ARC se sitúa adyacente a la eminencia media (ME), área que presenta una barrera

hematoencefálica semipermeable, por lo que su posición favorece la detección de fluctuaciones hormonales y nutrimentales en el torrente sanguíneo. En el ARC, se localizan dos tipos neuronales anatómica y funcionalmente distintos (Fig.1): a) subconjunto de neuronas que coexpresan el neuropéptido orexigénico Y (NPY) y el péptido relacionado a agouti (AgRP), y b) neuronas que coexpresan neuropéptidos anorexigénicos, el transcrito regulado por cocaína y anfetamina (CART) y la hormona estimulante de melanocitos α (α -MSH, un producto derivado del procesamiento de la proopiomelanocortina (POMC)). Las neuronas que residen en el ARC-PVN-LH se interconectan y son susceptibles a la influencia de factores periféricos, incluyendo las hormonas leptina e insulina. Los efectos anorexigénicos incluyen la inhibición de las neuronas AgRP y la activación de POMC, lo que promueve su procesamiento en α -MSH, neuropéptido que activa al receptor de melanocortina tipo 4 (MC4R), que induce la expresión del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF, por sus siglas en inglés) implicado en la supresión de la ingesta alimentaria (12, 14, 15). En contraste, en condiciones de privación alimentaria la actividad de las neuronas NPY/AgRP es estimulada (16), lo que determina la secreción de NPY. Este neuropéptido interactúa con los receptores Y1 y Y5, que modulan distintos procesos relacionados con el balance energético positivo. Adicionalmente, AgRP antagoniza el efecto de α -MSH en MC4R (17).

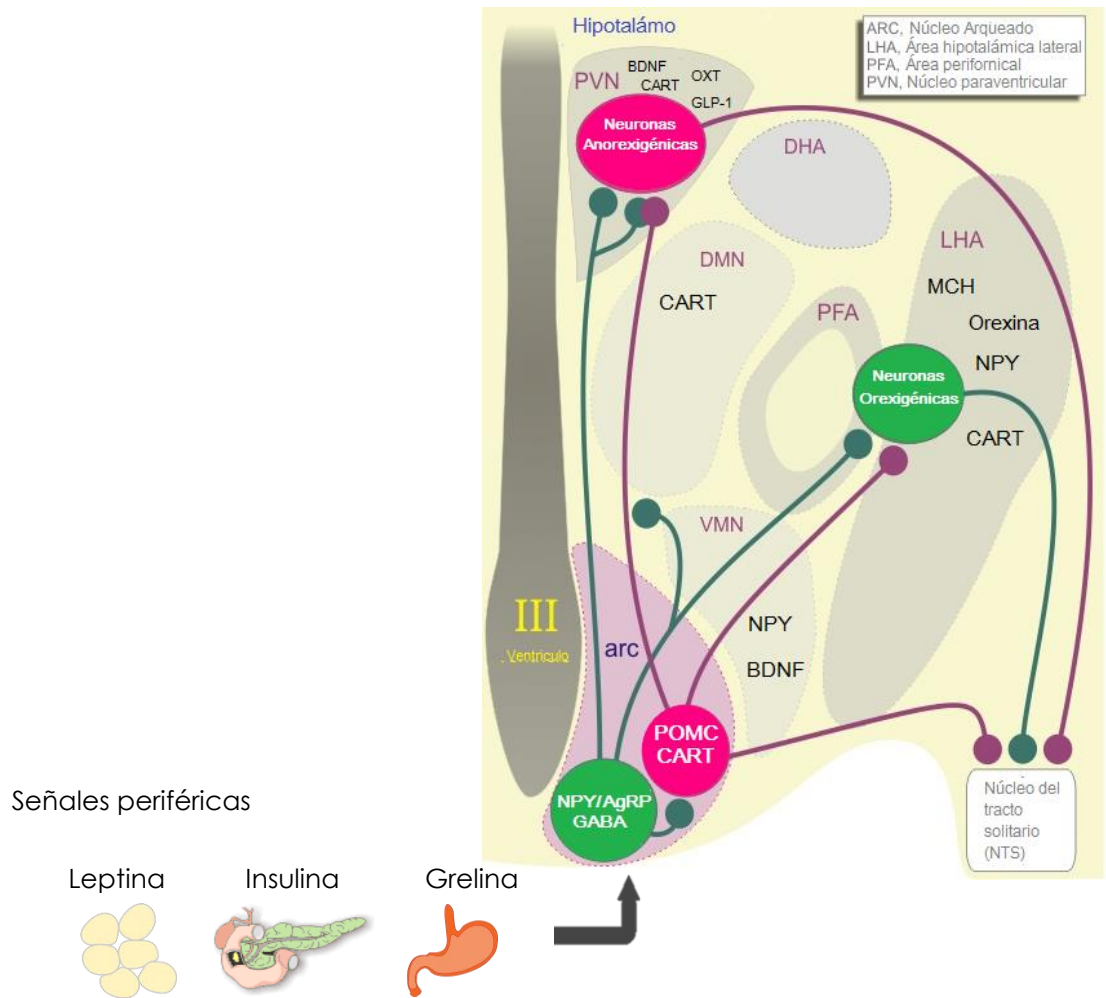


Figura 1. Control hipotalámico de la ingesta alimentaria. Existen señales periféricas que actúan directamente en neuronas que coexpresan NPY/AgRP y POMC/CART, con efectos orexigénicos y anorexigénicos, respectivamente. DHA= Área hipotalámica dorsal; OXT=Oxitocina; BDNF=Factor neurotrófico derivado de cerebro; CART=transcrito regulado por cocaína y anfetamina, GLP-1= Péptido similar a glucagón; MCH=Hormona concentradora de melatonina. Figura modificada de Yeo y Heisler, 2012 (15).

La influencia genética en características relacionadas con la obesidad

Se ha indicado que los factores genéticos contribuyen en la etiología de diversas características asociadas a obesidad, incluyendo el porcentaje de grasa corporal, la relación circunferencia de cintura/cadera, el comportamiento alimentario y el balance energético (18). En este contexto, los modelos animales representan una importante contribución al desarrollo de hipótesis que conducen a la identificación de genes, sus productos proteicos y los mecanismos putativos que influyen en procesos relacionados con la ingesta alimentaria (8). Estos han permitido definir que, en limitados casos, la obesidad es un desorden monogenético, causado por mutaciones específicas en genes relacionados principalmente con la diferenciación neuronal de la región hipotalámica PVN y en el establecimiento de la vía anorexigénica correspondiente al sistema leptina/melanocortina, crítico en la regulación del balance energético (18). En contraste, generalmente la obesidad exhibe complejos patrones de heredabilidad, resultado de la contribución de diversas variantes genéticas e influenciados por la alterada susceptibilidad a los factores ambientales descritos previamente. Particularmente, en población mexicana se estimó que la heredabilidad, concepto que se refiere a la proporción de la variación en la masa corporal que es atribuida a la variación genética entre los individuos, corresponde a un rango entre el 36 y 62% (19). La identificación de variantes genéticas, en particular de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, por sus siglas en inglés) relacionados con el IMC se efectuó con la aplicación de estudios de asociación de genoma completo (GWAS) (20), procedimiento que se

basa en el análisis comparativo de las frecuencias genotípicas registradas en individuos afectados con el fenotipo de interés y sujetos control (21).

Los SNPs se caracterizan por la sustitución de un nucleótido (1/1200 pb en promedio) en secuencias específicas de DNA, con frecuencia genotípica correspondiente al 1% o superior (22, 23), al ser identificados se registran en la base de datos dbSNP con un número único SNP ID de referencia (rs #). Los SNPs con efecto funcional se clasifican en regulatorios (rSNP), ARN estructurales (srSNP) y codificantes (cSNP). Los rSNP se localizan en secuencias promotoras y afectan la expresión génica. Los srSNP se ubican en regiones no traducidas (5'UTR y 3'UTR) y regiones intrónicas, lo que afecta potencialmente el procesamiento de los transcritos incluyendo el *splicing*, maduración, estabilidad y transporte. Con respecto a los cSNP, característicos de regiones exónicas, se subdividen en sinónimos y no sinónimos. En concreto, los cSNP no sinónimos implican la modificación de la secuencia aminoacídica de la proteína, lo que conduce potencialmente a la aparición de un codón de paro prematuro que trunca la proteína resultante. En adición, la sustitución de un aminoácido repercute en la actividad catalítica enzimática, la afinidad a los receptores correspondientes, e inclusive en la alteración del transporte y secreción de los productos proteicos (24).

En población mexicana se determinó que los SNPs rs9939609 y rs6265 identificados en *FTO* [fat, mass and obesity associated gene (gen ligado a masa grasa y obesidad)] y *BDNF* [brain derived neurotrophic factor (factor neurotrófico derivado de cerebro)] respectivamente, se asociaron con obesidad y con mayor significancia con el tipo III o mórbida (IMC >40) (25). León-Mimila *et al.* (25)

destacan que *FTO* se asoció significativamente con obesidad en el análisis de casos y controles, no obstante, dicha asociación no se extiende al IMC. En infantes se descartó la asociación de *FTO* con el IMC, resultados que coinciden con lo reportado en un estudio longitudinal en el que se determinó que el efecto de *FTO* se intensifica a partir de la edad de 20 años (26). Por otra parte, la ausencia de asociación de *FTO* y *BDNF* con el IMC en adultos correspondió con la asociación significativa prioritariamente con obesidad mórbida, y a que únicamente el 2% de los adultos incluidos en el estudio presentó tal estado nutricional (25). Sin embargo, debido a que *FTO* y *BDNF* se expresan en proporción superior en regiones hipotalámicas, se ha sugerido que esta asociación afecta el balance energético.

En 2007, cuatro GWAS independientes que incluyeron cohortes condujeron a la determinación de que *FTO*, gen ubicado en el cromosoma 16q12.2 con una extensión aproximada de 400 Kb (27) representa, en población europea, el principal elemento genético que contribuye con el desarrollo de obesidad poligenética (4, 28, 29, 30). Frayling *et al.* (4) indicaron que el SNP rs9939609, identificado en el primer intrón de *FTO* y descrito como la sustitución del nucleótido timina (T) por adenina (A), se asoció significativamente con el incremento del IMC en infantes y adultos (4). Sus resultados evidenciaron que el 16% de adultos de origen europeo con genotipo AA presentan en promedio un incremento de 3 kg en el peso corporal en comparación con individuos homocigotos TT (4). En este contexto, se determinó que cada copia del alelo A representó en los individuos analizados un incremento en el IMC de $\sim 0,4 \text{ kg/m}^2$ (4).

Función molecular de FTO

Localización celular

FTO se localiza en el núcleo celular (31), colocalizando con factores implicados en el proceso de splicing: SART1 (U4/U6.U5 tri-snRNP-associated protein), SC35 (serine/arginine-rich-splicing factor 2) y Pol II-S2P (RNA polymerase II phosphorylated at Ser2) (32). En un análisis subsecuente se determinó que *Fto* colocaliza en el núcleo celular de neuronas que sintetizan oxitocina, neuropéptido modulador de la saciedad, en el PVN. En adición, se describió que la sobreexpresión de *Fto* se relaciona con un incremento en los niveles del transcrito de oxitocina, por lo que se sugirió que *Fto* probablemente influye en la expresión de éste péptido (33). La expresión de *FTO* es ubicua, no obstante, los niveles del transcrito son relativamente superiores en el Sistema Nervioso Central (SNC) en comparación con tejidos periféricos (31). En la región hipotalámica, el ARC, la expresión de *Fto* es regulada bidireccionalmente en función del estatus nutricional, lo que sugiere su función potencial en la regulación del balance energético (31, 34). Sin embargo, los resultados obtenidos al respecto son inconsistentes. El trabajo realizado con un modelo murino sometido a un periodo de restricción alimentaria por 48 horas evidenció el decremento de los niveles de expresión de *Fto* (31). En contraste, Boender *et al.* (34) con un esquema distinto de restricción alimentaria, en el que se administró el alimento únicamente en el periodo de 13:00 a 15:00 horas, reportaron el incremento significativo en el transcrito de *Fto* en el ARC y VMN. Contradictoriamente, Stratigopoulos *et al.* (35) y McTaggart *et al.* (36), reportaron la ausencia de alteración en los niveles de mRNA *Fto* en

condiciones de ayuno durante 40 y 18 horas, respectivamente. Por otra parte, a nivel proteínico McTaggart *et al.* (36) así como Wang *et al.* (37) registraron una disminución de Fto hipotalámico en animales expuestos a un esquema de restricción alimentaria correspondiente al 60% del consumo *ad libitum* establecido para animales control.

FTO, sensor nutricional intracelular

Recientemente, a través de aproximaciones *in vitro* se determinó que la expresión de FTO es regulada por la disponibilidad nutricional. En células HEK293 la privación de glucosa y aminoácidos esenciales condujo a la reducción de los niveles del transcrito y de producto proteico de FTO, sugiriendo el mecanismo potencial por el que FTO se vincula con el metabolismo energético (38).

Se han caracterizado modelos murinos en los que la alteración de Fto en condiciones *in vitro* e *in vivo* implica alteraciones fisiológicas. Gulati *et al.* (39) demostraron que fibroblastos embrionarios derivados de un modelo murino *knockout Fto*, presentaron una reducida tasa de crecimiento y traducción. Se evidenció que en esta condición, el complejo multisintetasa (MSC), que coordina la función de aminoacil-tRNA sintetasas en el proceso de traducción, es subregulado (39). El ensamble deficiente de este complejo conduce al decremento en la tasa traduccional. Sin embargo, la re-expresión de Fto restablece los niveles de MSC y la eficiencia en la traducción (39). Particularmente, la deficiencia de Fto afecta la fosforilación de la cinasa S6K1 (S6 cinasa 1), efector importante en la vía de señalización mTORc1 (complejo 1 blanco de rapamicina en mamíferos) implicada

en la regulación del proceso de traducción y el crecimiento celular. En adición, el decremento en la actividad de mTORC1 en respuesta a la privación de aminoácidos se rescata a través de la sobreexpresión de *Fto* exógeno (39). La aparente regulación de la expresión de *FTO* en función de la disponibilidad de aminoácidos aunado al acoplamiento funcional de FTO con el MSC y mTORC1 se integran en un modelo (40) que implica la participación de FTO en la regulación de procesos metabólicos (Fig. 2). Los mecanismos exactos, sin embargo, requieren investigación complementaria.

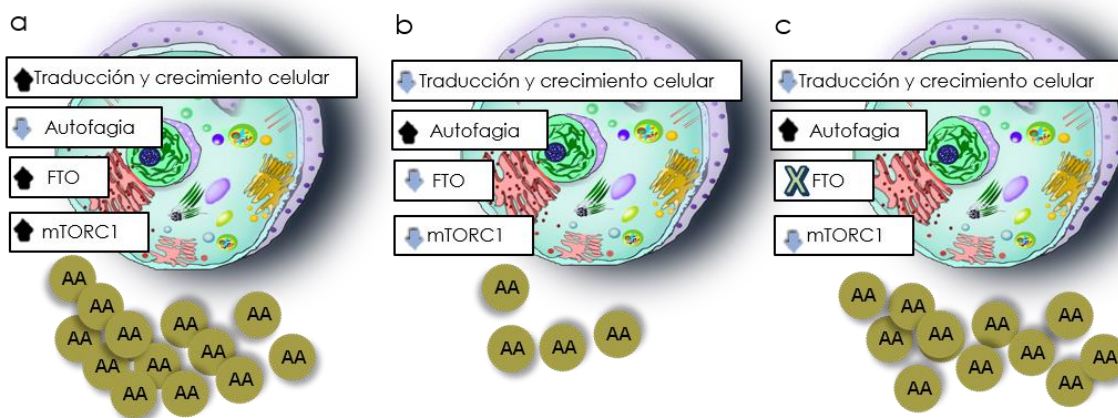


Figura 2. Modelo de regulación de la expresión de *FTO* en función de la disponibilidad de aminoácidos y el acoplamiento funcional de FTO con mTORC1. a) En óptima disponibilidad de aminoácidos, se mantiene la concentración de FTO y la actividad de mTORC1, permitiendo la apropiada traducción y crecimiento celular, así como la inhibición de la autofagia. b) La deficiencia de aminoácidos reduce los niveles de FTO y la actividad de mTORC1, la traducción y el crecimiento celular. c) La ausencia de FTO (X) se interpreta como insuficiencia de aminoácidos, por lo tanto se reduce la actividad de mTORC1 e incrementa la autofagia. AA=Aminoácidos, mTORC1=Complejo 1 blanco de rapamicina en mamíferos. Imagen modificada de Loos y Yeo, 2014 (40).

FTO y su función desmetilasa de ácidos nucleicos

A través de un análisis bioinformático se identificó que la secuencia de *FTO* conserva sitios de unión a Fe (II) y 2-oxoglutarato (2-OG), característicos de proteínas dioxigenasas dependientes de 2-OG (31). El sustrato de *FTO*, 2-OG (conocido adicionalmente como alfa cetoglutarato) es un importante producto intermediario en el ciclo de Krebs derivado de la descarboxilación de oxalosuccinato y subsecuentemente descarboxilado a succinil-CoA. En un inicio se planteó la relación de 2-OG con *FTO* en el metabolismo, no obstante debido a que la K_m de 2-OG para *FTO* corresponde a 2.88 μM , 10 veces superior a la concentración fisiológica de 2-OG, se consideró improbable que la función de *FTO* implique la regulación del estado metabólico a través de la detección de los niveles disponibles de 2-OG (41).

Ensayos *in vitro* posteriores demostraron que *FTO* posee la capacidad de desmetilar ácidos nucleicos, en particular 3-metilimidina (m³T) en DNA de cadena sencilla y en RNA de cadena sencilla cataliza la desmetilación de 3-metiluracilo (m³U) y 6-metiladenosina (31, 32). La interacción selectiva de *FTO* con ácidos nucleicos de cadena sencilla es definida por la presencia de un bucle adicional en el extremo carboxilo terminal de la proteína. Adicionalmente, la capacidad de *FTO* por distinguir 3-meT o 3-meU del resto de nucleótidos es conferida por la interacción de puentes de hidrógeno con los átomos de oxígeno en el grupo carboxilo de los nucleótidos 3-meT o 3-meU (42). En relación con esta función desmetilasa de ácidos nucleicos, se ha planteado la participación de *FTO* en la

regulación transcripcional de genes relacionados con la homeostasis energética (43).

FTO, coactivador transcripcional

Recientemente, se determinó que Fto actúa como coactivador transcripcional de la proteína de unión al enhancer CCAAT beta (C/EBP β), función que sugiere su participación en la regulación epigenética de genes relacionados con el proceso de regulación del balance energético y adipogénesis (44). En este contexto, diversos estudios reportan la asociación anatómica o funcional de FTO con neuropéptidos anorexigénicos y orexigénicos implicados en la regulación del metabolismo energético (34, 45, 46). Resulta de particular interés, la interacción funcional entre FTO y BDNF, gen que codifica a un neuropéptido anorexigénico vinculado críticamente con el proceso de regulación de la ingesta alimentaria y asociado previamente con el IMC (25, 45).

Aspectos funcionales del SNP rs9939609

El SNP rs9939609 (T>A) se ubica en el primer intrón de *FTO*, región que incluye diversos SNPs descritos en 2007 por Frayling *et al.* (4) (Fig. 3). Los alelos polimórficos en esta región determinan el incremento o disminución de la tasa de transcripción, no obstante, el elevado desequilibrio de ligamiento (LD) con que estas variantes genéticas son heredadas dificulta la identificación del SNP funcionalmente relevante (47). En 2008, Stratigopoulos *et al.* (35) reportaron que el alelo A (considerado de riesgo) del SNP rs8050136, heredado en completo LD

con rs9939609, interacciona con el factor de transcripción CUTL1 (cut-like homeobox 1). En particular la isoforma P110 de CUTL1 actúa como un potenciador que regula la expresión de *FTO*, incrementando la actividad de la región mínima de su promotor (48). En este contexto, Berulava y Horsthemke (47) analizaron RNA heterogéneo nuclear aislado de linfocitos y fibroblastos de individuos con genotipo TA rs9939609 e identificaron que los niveles del transcrito con el alelo A son superiores con respecto a los que presentan el alelo T, planteando la posible asociación de rs9939609 con el incremento de la expresión de *FTO*.

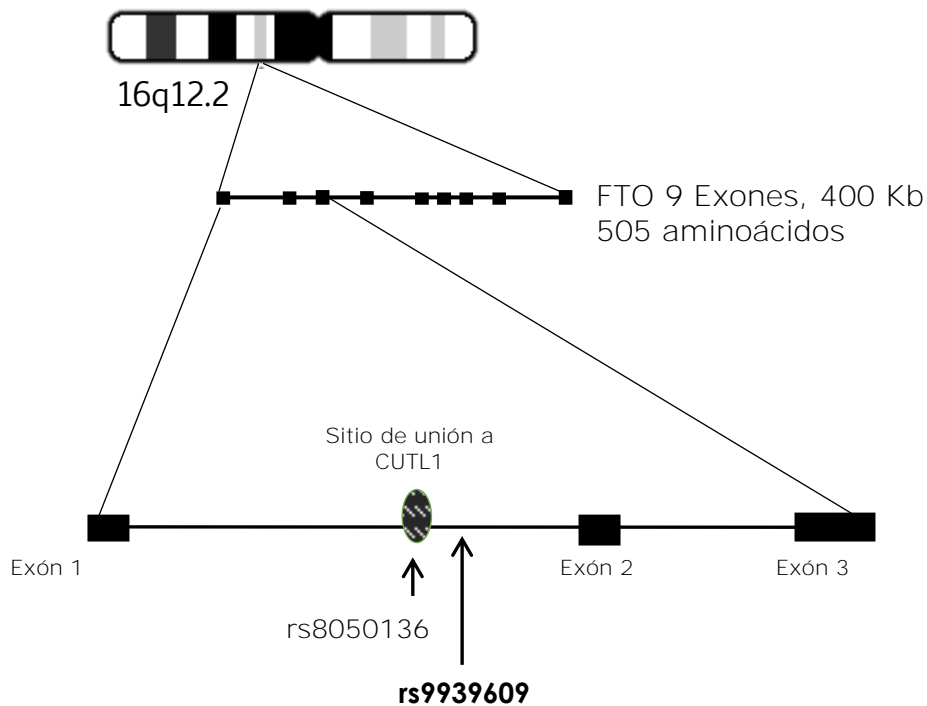


Figura 3. Representación esquemática que indica la ubicación del SNP *FTO* rs9939609 (T>A) en relación con el sitio de unión al factor de transcripción CUTL1.

El creciente interés en aportar información concluyente que permita caracterizar la función de *FTO* en la homeostasis energética contribuyó al desarrollo de diversos modelos murinos. Particularmente, en el trabajo realizado por Church *et al.* (49) se relacionó la sobreexpresión ubicua de *Fto* con hiperfagia e incremento en el peso y masa grasa corporal. Este resultado correspondió con la alteración de la ingesta energética (descrita a continuación) en humanos portadores del alelo A rs9939609, reforzando el planteamiento de que este SNP se relaciona con el incremento en la actividad o expresión de *FTO*.

Influencia del SNP rs9939609 en la ingesta alimentaria

Es importante reconocer que los modelos animales representan herramientas útiles que permiten investigar el efecto funcional relacionado con rs9939609, sin embargo los resultados obtenidos a partir de su estudio no necesariamente coinciden con las observaciones obtenidas en humanos.

La literatura relacionada con la asociación de rs9939609 y la ingesta energética se ha incrementado, sin embargo los resultados no son totalmente consistentes. En diversos estudios se reporta la ausencia de asociación (50-52). En contraste, investigaciones que incluyen principalmente infantes y adolescentes, determinaron la existencia de asociaciones estadísticamente significativas. Los resultados obtenidos al respecto, refieren que individuos portadores del alelo A rs9939609 presentan un incremento significativo de la ingesta alimentaria (53-56), atribuible probablemente a un incremento en el consumo de lípidos (54, 57) o por la preferencia de alimentos con elevado contenido energético (53).

En línea con los estudios previos, se reportó recientemente que individuos adultos portadores del alelo A rs9939609 presentan postprandialmente supresión atenuada del hambre (44, 46).

En particular, Karra *et al.* (46) detectaron, mediante la aplicación de técnicas de resonancia magnética (MRI) funcional, que sujetos con genotipo AA rs9939609 registraron postprandialmente una reducción deficiente de los niveles circulantes de acil-grelina, lo que repercutió significativamente en la actividad neuronal de áreas cerebrales relacionadas con la regulación hedónica y homeostática de la ingesta alimentaria (46). Los resultados permitieron sugerir que FTO interactúa con grelina en la modulación de la saciedad y el apetito.

Con respecto a la asociación de rs9939609 con el gasto energético, ésta aún no se ha definido con exactitud debido a que existen resultados contrastantes. La mayoría de los reportes al respecto indican la ausencia de asociación de rs9939609 con el gasto energético (54, 55). Por otra parte, en relación con la actividad física, se ha determinado que ésta atenúa en un 27% el efecto descrito de rs9939609 sobre el IMC (58).

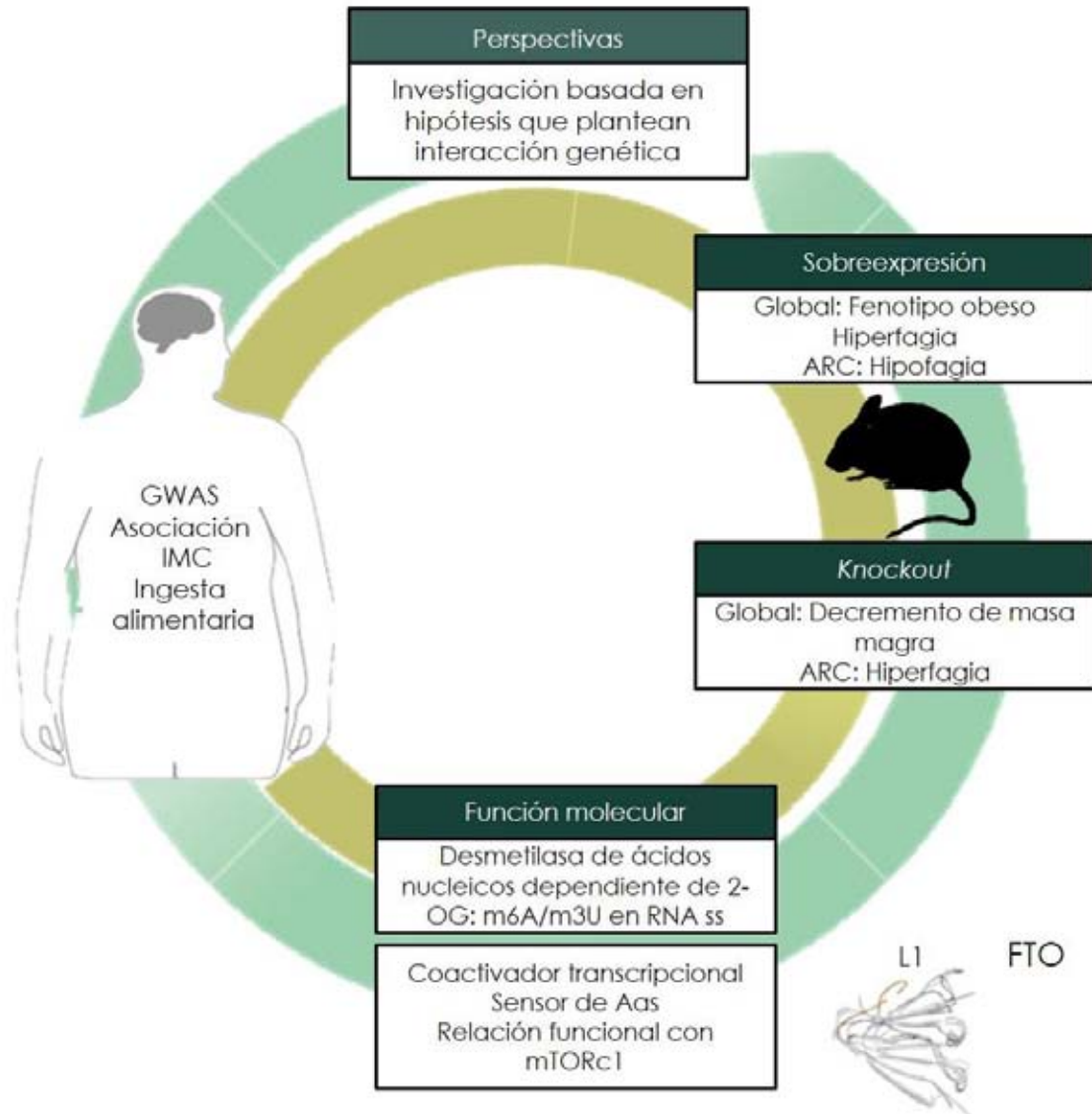


Figura 4. Resumen esquemático en el que se indican los principales hallazgos obtenidos en relación con FTO. Se representa el bucle adicional (L1) que determina la especificidad de la proteína. Se plantea, en perspectiva, que las hipótesis generadas con el empleo de modelos murinos que postulan la interacción de *FTO* con otros genes implicados en la regulación del balance energético, requieren ser analizadas en humanos. RNA ss= RNA de cadena sencilla, m3U= 3-metiluracilo, m6A= 6-metiladenosina. Figura modificada de Hess y Brüning, 2014 (63).

Factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF)

El gen *BDNF* que codifica al precursor del péptido (pro) BDNF se ubica en la región cromosómica 11p13 y comprende una extensión aproximada de 70 kb e incluye 11 exones. La expresión de *BDNF* es altamente regulada a nivel transcripcional por nueve promotores funcionales que originan por *splicing* alternativo 34 transcritos con extremos 5'UTR distintos. Se ha sugerido que los promotores alternativos están implicados en la expresión tejido-específica, proporcionando complejidad adicional en la regulación de la expresión de *BDNF*. En particular, los transcritos que incluyen los exones II, III, IV, V, y VII son específicos de tejido neuronal, en tanto que otros mRNAs se expresan en niveles variables en tejidos no neuronales (60). BDNF, durante la etapa de desarrollo, promueve la diferenciación, el desarrollo y la sinaptogénesis en el sistema nervioso central y periférico (61). En el SNC adulto, la expresión de *BDNF* predomina en el cuerpo mamilar, hipocampo, corteza frontal, tracto olfatorio e hipotálamo (60). Periféricamente, BDNF es sintetizado en células vasculares endoteliales, células inmunológicas y en músculo esquelético (62- 64). BDNF presenta la capacidad de cruzar bidireccionalmente la barrera hematoencefálica (65). En un modelo animal se determinó que la concentración de BDNF cerebral/periférico es similar durante distintas etapas de desarrollo, y específicamente la concentración de BDNF sérico correlacionó positivamente con la concentración de BDNF cortical (66). Rasmussen *et al.* (67) refieren que en condiciones normales el cerebro contribuye con el 70-80% de BDNF en circulación. En la periferia la mayor proporción de BDNF es secretado a la circulación, internalizado y almacenado en plaquetas (62). En contraste,

Hohenadel *et al.* (68) reportaron que la concentración de BDNF circulante registrada en sujetos de descendencia hispana no presentó asociación significativa con el estatus funcional (mutaciones de pérdida o ganancia de función) de MC4R, sugiriendo que BDNF periférico no refleja directamente la secreción hipotalámica de BDNF y/o que la vía de señalización que implica la participación de MC4R (leptina-POMC) no representa una función regulatoria significativa sobre la expresión de BDNF.

El exón IX codifica a una proteína pre pro-BDNF que incluye 250 aminoácidos (32 kDa) que es procesada intra o extracelularmente por enzimas proteolíticas (Fig. 5) para generar el péptido denominado pro-BDNF (28 kDa) o a la forma madura (mBDNF) de la proteína (14 kDa) (69).

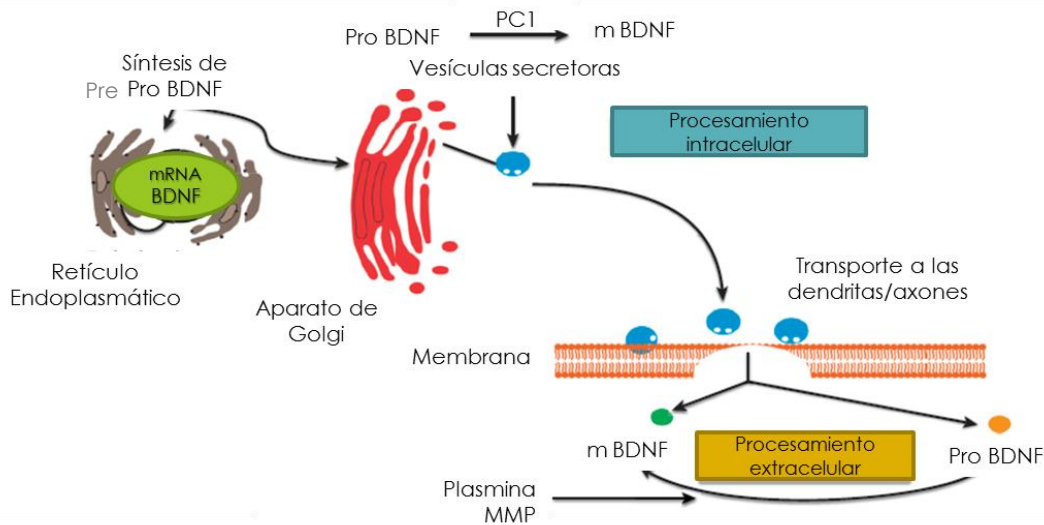


Figura 5. Procesamiento de BDNF. El procesamiento intracelular implica la acción de proconvertasas (PC1), en tanto que el procesamiento extracelular es efectuado por plasmina y metaloproteinasas (MMP). mBDNF= BDNF maduro. Imagen modificada de Marossi y Mattson, 2014 (70).

La acción biológica de BDNF es modulada por dos tipos de receptores funcionalmente distintos, el receptor p75 y el receptor tipo tirosina cinasa B (TrkB). Pro-BDNF se une preferencialmente a p75, receptor que pertenece a la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral y que fundamentalmente induce apoptosis (71). En contraste, BDNF maduro interactúa con el receptor TrkB, que al dimerizarse incrementa la actividad catalítica de su dominio intracelular y conduce a la correspondiente autofosforilación de determinados residuos de tirosina, proceso que permite la activación y reclutamiento de proteínas implicadas en tres principales vías de señalización intracelular: la fosforilación de la tirosina Y515 activa la vía de señalización de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y la que incluye al fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3-K), que promueven diferenciación y desarrollo neuronal. La fosforilación del residuo Y816 activa la vía de la fosfolipasa C (PLC) asociada generalmente con plasticidad sináptica y neurotransmisión (72).

En adición a la participación de BDNF/TrkB en procesos fisiológicos relacionados con memoria y aprendizaje (73), se identificó su implicación en la regulación del peso corporal a través de la manipulación de diversos modelos murinos *knockout* (74). En humano, BDNF y su receptor TrkB se expresan en diversos núcleos hipotalámicos incluyendo VMN, DMH, LH y PVN asociados con la modulación de la conducta alimentaria y el balance energético (73). BDNF es sintetizado en el VMN (Fig. 6) en función del estado nutricional y en respuesta subsecuente a la vía anorexigénica leptina-proopiomelanocortina (75). En el PVN, BDNF regula la señalización de la hormona liberadora de corticotropinas (CRH) y urocortina. CRH

es una hormona que en respuesta a estímulos estresantes inhibe la ingesta alimentaria e incrementa el gasto energético a través del aumento de la actividad del sistema nervioso simpático (76). Urocortina, proteína perteneciente a la familia de factores liberadores de corticotropinas, inhibe el apetito con mayor potencia que CRH (77). Periféricamente, los péptidos gástricos anorexigénicos secretados a la circulación durante un estado de balance energético positivo afectan la expresión de *BDNF*. En este contexto, el polipéptido pancreático (PP) induce la expresión de *BDNF* en el VMN (78), en tanto que colecistoquinina (CCK) eleva transitoriamente la concentración de *BDNF* en el hipotálamo (79). La acción de *BDNF* incluye la reducción de la expresión de NPY en el ARC (80).

En conjunto, estas evidencias indican que *BDNF* contribuye prominentemente en el control de la ingesta alimentaria a través de su interacción con vías de señalización que regulan el balance energético (81).

Polimorfismo *BDNF* rs6265

El SNP rs6265 caracterizado en *BDNF* implica la sustitución de una guanina (G) por una adenina (A) en la posición 196 del exón IX (G196A), lo que resulta en la sustitución del aminoácido valina por metionina en el codón 66 ubicado en el prodominio de la proteína. Val66Met se ha asociado con diversos fenotipos de relevancia clínica incluyendo trastornos alimentarios (82) e incremento en el IMC (83).

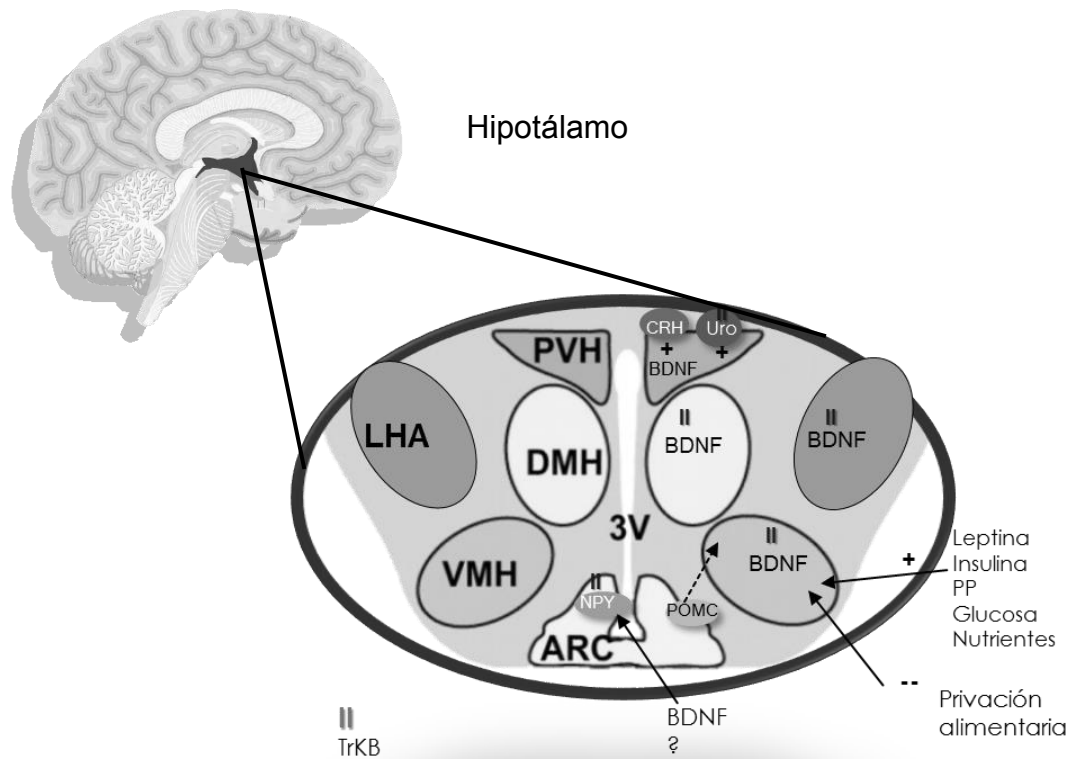


Figura 6. BDNF y TrkB, su expresión en el proceso de regulación de la ingesta alimentaria. Se indican las regiones hipotálámicas y los factores periféricos y centrales que regulan la expresión de BDNF y TrkB. La línea punteada representa el efecto positivo de POMC, propuesto previamente, sobre la expresión de BDNF. En el ARC el signo de interrogación indica que se desconoce el mecanismo por el cual BDNF periférico presenta un efecto negativo en la expresión de NPY. CRH=Hormona liberadora de corticotropinas; PP=Polipéptido pancreático; Uro=Urocortina; 3 V=Tercer ventrículo. Imagen modificada de Ríos, 2013 (81).

La sustitución Val66Met afecta la dinámica de interacción entre BDNF y dos proteínas cruciales en su procesamiento: a) sortilina, que al interactuar con menor afinidad con el prodominio de BDNF conduce a la alteración de la secreción de

BDNF, b) transilina, con la sustitución de Val66 por el alelo Met la interacción es ineficiente, lo que genera la reducción de la translocación del mRNA hacia las dendritas neuronales, sitios en los que el transcrito es traducido por la maquinaria de síntesis de proteínas (84).

Respecto a la asociación de *BDNF* rs6265 con el IMC, se determinó que sujetos con genotipo GG presentan un IMC significativamente menor en comparación con los genotipos GA y AA (85, 86). En contraste, Ribasés *et al.* (82) reportan que rs6265 se asoció con anorexia nerviosa (AN) y con un IMC inferior a 18.5 kg/m², sugiriendo que el alelo A afecta la susceptibilidad para desarrollar trastornos alimentarios incluyendo AN de tipo restrictiva, AN que incluye episodios de atracón y bulimia nerviosa. Adicionalmente, se describió en un estudio que incluyó infantes, la ausencia de asociación de rs6265 con el riesgo de desarrollar trastornos alimentarios e inclusive con el IMC (87). Particularmente en el estudio realizado por León-Mimila *et al.* (25) referido previamente, en población mexicana se determinó la asociación significativa de rs6265 con obesidad de tipo mórbida.

Planteamiento del problema

En la actualidad no se ha establecido si en el humano existe una relación fisiológica entre *FTO* y *BDNF* que explique el o los efectos fenotípicos a los que se les ha vinculado de manera independiente.

Con el interés de establecer un primer nivel de conexión entre genes asociados a la regulación de la ingesta alimentaria, en este proyecto se analizó la interacción entre dos importantes reguladores implicados en la ingesta alimentaria; *FTO* y *BDNF*. Los resultados de este estudio constituyen la base para la elaboración de una estrategia metodológica más compleja que permita identificar experimentalmente a múltiples genes involucrados en la regulación del balance energético y en particular de la ingesta alimentaria. El profundizar en el conocimiento de estos mecanismos permitirá dilucidar los procesos implicados en el desarrollo de la obesidad y el sobrepeso, así como definir nuevos blancos de abordaje para el tratamiento y prevención de la obesidad que refuercen intervenciones con mayores posibilidades de éxito.

HIPÓTESIS

Los polimorfismos *FTO* rs9939609 y *BDNF* rs6265 se asocian con la disminución de la concentración de *BDNF* en un estado de balance energético excedido en el que la ingesta supera el gasto energético, en sujetos adultos.

OBJETIVOS

Objetivo General

Analizar la asociación de los polimorfismos *FTO* rs9939609 y *BDNF* rs6265 con la concentración sérica de BDNF y el balance energético.

Objetivos Particulares:

- Conformar un banco de muestras de ADN y suero de un grupo de adultos de 20 a 60 años de edad.
- Evaluar el balance energético correspondiente en cada uno de los participantes incluidos en el estudio.
- Determinar los niveles de BDNF circulante en muestras de suero.
- Identificar la correlación entre los niveles séricos de BDNF y el IMC
- Realizar la genotipificación de los SNPs *FTO* rs9939609 y *BDNF* rs6265.
- Correlacionar los resultados del análisis de los SNPs en *FTO* y *BDNF* con los niveles séricos de BDNF y el balance energético.

ANTECEDENTES

Retomando el planteamiento en el que se indica que entre *FTO* y *BDNF* existe una relación funcional atribuible a su expresión predominante en núcleos hipotalámicos y a que los SNPs rs9939609 y rs6265, descritos previamente se asocian con el desarrollo de alteraciones específicas en la ingesta alimentaria, en 2011, a partir de un análisis *in silico* realizado por Rask-Andersen *et al.* (45), *BDNF* se identificó como gen candidato en co-regulación fisiológica con *FTO*. En este estudio se propuso un modelo, integrando datos previos, en el que *FTO* participa como cofactor transcripcional de *C/EBP β* en la vía de señalización *BDNF-TrkB* (45) e integrándose en el círculo de autorregulación positiva que exhibe *BDNF*.

Subsecuentemente, con la finalidad de validar los resultados obtenidos, se evaluó la expresión de *FTO* y *BDNF* hipotalámicos en un modelo murino sometido a privación alimentaria por un lapso de 16 horas. En esta condición se registró un incremento significativo en la expresión de *FTO* y un decremento en los niveles del transcrito de *BDNF*, lo que sugirió que *FTO* y *BDNF* se encuentran inversamente correlacionados.

Los resultados referidos difieren con Lin *et al.* (88), que a través de ensayos de co-inmunoprecipitación indicaron la interacción funcional de *FTO* con la proteína cinasa dependiente de calcio-calmodulina (*CaMKII*).

CaMKII fosforila múltiples sustratos incluyendo al factor de transcripción *CREB*. Se ha definido previamente que *CREB* regula la expresión de *BDNF* y *NPY1R*. En línea con este hallazgo, estos investigadores reportan que la sobreexpresión de

FTO en células de neuroblastoma humano retrasa la desfosforilación de CREB, lo que resulta en un incremento significativo de los niveles de los transcritos de *BDNF* y *NPY1R*.

Estos resultados contrastantes reafirman que a pesar de que el conocimiento derivado de la aplicación de modelos animales es sumamente valioso, es indispensable emprender estudios en humanos que permitan confirmar la relación funcional entre estas moléculas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de Participantes

El tamaño de muestra se determinó con el programa Quanto en base a parámetros referentes a la frecuencia alélica de los polimorfismos de interés reportadas en la base de datos HapMap, la prevalencia y riesgo (OR) asignados para sobrepeso y obesidad en población mexicana. Considerando los parámetros previamente descritos, con un poder estadístico del 80%, se obtuvo un estimado de 296 participantes.

En el periodo comprendido entre Septiembre 2012-Septiembre 2014 se reclutaron 250 individuos de ambos géneros con un rango de edad de 20-60 años, que aceptaron ser incluidos en el proyecto de investigación mediante la firma de una carta de consentimiento informado (Anexo I). El reclutamiento se realizó principalmente en las distintas unidades de investigación que conforman al Hospital de Pediatría, Oncología y Especialidades, ubicados en el Centro Médico Nacional Siglo XXI (CMNSXXI). Se excluyeron del análisis a participantes sometidos a tratamiento con psicofármacos o en estado de embarazo debido a que en estas condiciones se altera la expresión de BDNF. Por otra parte, se eliminaron los participantes en los que la muestra biológica resultó insuficiente, refirieron un esquema de recordatorios de alimentación de 24 horas (R-24) incompleto y/o en el registro de los recordatorios R24 subestimaron su ingesta calórica (Ver apartado de Determinación de la ingesta energética). Un recordatorio R-24 se consideró subestimado en función de que la relación entre la ingesta calórica y el GEB resultara inferior a 0.9 (89).

Evaluación del estado nutricional

Se realizó un análisis de bioimpedancia eléctrica (Bioimpedómetro TANITA SC-331S) con el que se determinaron parámetros antropométricos incluyendo el peso corporal, estatura, índice de masa corporal (IMC) y porcentaje de grasa corporal. La bioimpedancia representa un método que permite la estimación de la composición corporal y se fundamenta en la oposición de los tejidos corporales al paso de una corriente eléctrica emitida por electrodos táctiles.

El peso, que representa un indicador de masa corporal total expresado en kilogramos (kg), y la estatura son parámetros antropométricos requeridos para el cálculo del IMC [Peso (kg)/ talla (m²)]. El IMC se utilizó para categorizar el estado nutricional de los participantes en función de los puntos de corte propuestos por la Organización Mundial de Salud (Bajo Peso: <18.5 kg/m²; Peso Adecuado: 18.5-24.9 kg/m²; Sobrepeso: 25-29.9 kg/m² y Obesidad:>30 kg/m²).

Determinación de la Ingesta energética

La ingesta energética total y la ingesta relativa de macronutrientes (% de energía) se cuantificó utilizando el programa informático NUTRIKCAL VO Versión 1.1, que integra tablas nutricionales de composición de alimentos específicas para población mexicana. La información nutricional indicada en las etiquetas de los productos procesados referidos por los participantes se adicionó a la base de datos correspondiente.

La determinación de la ingesta energética requiere la evaluación prospectiva de este parámetro a través del registro de tres recordatorios de alimentación R-24, registros que refieren la descripción detallada de alimentos y bebidas que

conforman la dieta de los participantes, incluyendo técnicas de preparación e indicando horarios y la porción ingerida (Anexo II). Se solicitó que únicamente se incluyera el registro de la ingesta alimentaria correspondiente a los días lunes-viernes, excluyendo fines de semana. Con el propósito de obtener una valoración adecuada de la ingesta energética se realizó una entrevista en la que se incluyó una extensa colección de imágenes de alimentos impresos en tamaño real (Nutrikit). Este apoyo visual permitió corroborar la porción alimentaria referida por el participante. La ingesta energética estimada se reportó como el promedio de los tres R24 registrados y se expresó como kcal/d.

Determinación del gasto energético

El programa informático NUTRIKCAL VO versión 1.1 se utilizó para determinar parámetros relacionados con el Gasto energético total (GET), el gasto energético basal (GEB) y el gasto energético por actividad física (GEAF). En particular, la estimación del GEB, parámetro definido como la cantidad de energía requerida para el funcionamiento de un organismo en reposo absoluto, se obtuvo con base en la aplicación de ecuaciones específicas, establecidas por la FAO-OMS 2004, que incluyen la edad, género y peso corporal de cada participante.

El GEAF y el nivel de actividad física se estimaron con la aplicación de un cuestionario en el que los participantes refirieron la actividad física que realizaron en un lapso de 24 horas. En base a una lista que incluyó actividades cotidianas, deportivas y recreacionales se registraron los minutos invertidos por el participante. La información obtenida se registró en el software NUTRIKCAL VO

1.1 para calcular los equivalentes metabólicos (MET), parámetro que considera la cantidad de energía invertida en el tiempo dedicado a realizar determinada actividad. El total resultante se divide entre 24 para obtener un factor que permitió categorizar la intensidad de la actividad física en Muy Ligera, Ligera, Moderada e Intensa. El GET se calculó sumando los valores correspondientes al GEB y GEAF.

Determinación del balance energético

Para establecer el balance energético se relacionó la ingesta energética promedio de cada uno de los participantes incluidos en el análisis con el GET correspondiente y se obtuvo un porcentaje de adecuación de la dieta consumida con respecto a los requerimientos energéticos.

El porcentaje de adecuación se determinó en base a la fórmula:

$$\% \text{ adecuación} = (\text{Ingesta energética} / \text{Gasto Energético Total}) \times 100$$

Se consideró que los participantes con un porcentaje de adecuación correspondiente al rango establecido entre el 90 y 110% presentan un estado de balance energético adecuado. Los participantes con un porcentaje de adecuación inferior al 90% o superior al 110% indicado previamente, se categorizaron en un balance energético insuficiente o excedido, respectivamente (90).

Obtención de las muestras biológicas

Se solicitó que los participantes acudieran al laboratorio ubicado en la Unidad de Genética Humana, Hospital de Pediatría, CMSXXI en condiciones de ayuno (8 a 12 horas) para la extracción de 5 ml de sangre periférica por venopunción con técnica estandarizada. Se documentó la fecha, hora y se registró en los tubos

correspondientes la clave única de identificación designada para los participantes de este trabajo de investigación.

Procesamiento de Suero sanguíneo

La sangre contenida en tubos vacutainer sin anticoagulante se centrifugó quince minutos a 1100 rpm (Centrifuga ThermoScientific Biofuge PrimeR) con la finalidad de recuperar el sobrenadante en tubos de 1.5 ml y centrifugar a 1800g (Spectrofuge 24D Labnet) por diez minutos. El sobrenadante obtenido se transfirió y almacenó a -70°C en crioviales debidamente identificados para su posterior análisis.

Cuantificación de BDNF sérico

La concentración periférica de BDNF se determinó con un Ensayo de Inmunoabsorción enzimática ligado a enzimas (ELISA) utilizando un kit comercial (ABCAM ab99978). Con la finalidad de ajustar la concentración de BDNF en las muestras analizadas con la curva estándar (0-16 ng/ml) se examinaron diluciones de suero 1:200. Los estándares y las muestras de suero con el anticuerpo específico para BDNF se incubaron por un lapso de 16 horas a 4° C.

La concentración de la proteína BDNF se cuantificó espectrofotométricamente en el equipo EPOCH utilizando una longitud de onda de 450 nm. El coeficiente de variación (%) registrado entre los duplicados resultó inferior a 15, lo cual se considera dentro de un rango aceptable.

Extracción de ADN

La sangre periférica total, obtenida por venopunción y recolectada en un tubo vacutainer con EDTA, se procesó para purificar ADN genómico con el kit comercial FavorPrep™ Blood Genomic DNA Extraction ® de acuerdo con las instrucciones referidas por el proveedor. Se verificó la integridad de los ácidos nucleicos con electroforesis en gel de agarosa al 1%, el procedimiento se realizó en una cámara horizontal por 30 minutos a 90 volts, transcurrido este lapso el ADN se visualizó con luz UV en un equipo transiluminador. El ADN se cuantificó por espectrofotometría (260 nm) utilizando un equipo NanoDrop® (Thermo Scientific) con la finalidad de realizar alícuotas de ADN ajustadas a una concentración de 10 ng/µl, éstas se almacenaron a -20°C para su óptima preservación hasta la realización de los análisis de genotipificación correspondientes.

Genotipificación de *FTO* rs9939609

Inicialmente se solicitó al Dr. Samuel Canizales (Instituto Nacional de Medicina Genómica) el acceso a alícuotas de ADN con genotipos rs9939609 previamente caracterizados. Los genotipos TT, TA y AA, corroborados a través de la secuenciación de un fragmento de ADN de 149 pb que incluye la variante rs9939609, se incluyeron como controles en los ensayos de genotipificación subsecuentes. En la población analizada, el SNP rs9939609 se secuenció en todos los individuos que resultaron homocigotos para el alelo A en los ensayos de genotipificación debido a que en la fase de estandarización inicial fue complicado obtener una adecuada discriminación entre los genotipos de interés.

Amplificación y secuenciación de *FTO* rs9939609

Para la amplificación del fragmento de ADN que incluye al SNP rs9939609, se utilizaron primers referidos previamente (91):

Secuencia Primer Sentido: 5'-TCTAGGTTCTTGGCGACTGC-3'

Secuencia Primer Antisentido: 5'-GTTAATGGCTTCAGGGTACCAGC-3'

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final se realizó en un termociclador Biometra TProfessional de acuerdo con las siguientes especificaciones: la reacción de 25 µL incluyó 100 ng de ADN genómico, Buffer PCR 1X (2.5 µL), 0.375 mM MgCl₂ (0.75 µL), 0.05 mM dNTP's (0.5 µL), 10 µM de primer sentido, 10 µM de primer antisentido, y 1.25 U de Taq DNA polimerasa. Las condiciones programadas en el equipo constaron de una etapa inicial de desnaturalización a 95°C por 5 minutos, posteriormente se efectuaron 36 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, alineamiento a 62°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 32 segundos. Posterior a la reacción de PCR, se verificó en un gel de agarosa al 2% que el producto obtenido correspondiera a un amplicón con un tamaño esperado de 149 pb. Finalmente, con el propósito de eliminar residuos de ADN y reactivos enzimáticos contaminantes, el producto de PCR se purificó con el Kit FavorPrep PCR Clean-Up (FAVORGENE) efectuando el procedimiento establecido por el proveedor. El producto de PCR se eluyó finalmente en 35 µL de agua ultrapura para proceder con la reacción de secuenciación correspondiente.

En la reacción de secuenciación de *FTO* rs9939609 se utilizó el Kit Big-Dye Terminator UV 3.1 (Applied Biosystems), utilizando como ADN molde 10 ng del producto de PCR purificado previamente. La reacción de secuenciación constó de

una etapa de desnaturalización inicial a 96°C por un minuto y 25 ciclos bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 96°C por 10 segundos, alineamiento a 50°C por 5 segundos y extensión a 60°C por 4 minutos. Finalizado el ciclaje descrito previamente, la reacción de secuenciación se purificó con el Kit DyeEx 2.0 Spin (Qiagen) conforme al procedimiento indicado por el proveedor con el propósito de remover los terminadores fluorescentes no incorporados. La reacción purificada se liofilizó (Concentrator 5301 Eppendorf) para ser procesado posteriormente debido a que la electroforesis subsecuente se efectuó en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Los electroferogramas resultantes se analizaron con el programa Chromas Lite.

Ensayo de discriminación alélica *FTO* rs9939609

El análisis de discriminación alélica se realizó con un ensayo de Genotipificación TaqMan SNP (Applied Biosystems ID C-30090620-10) por PCR en tiempo real. La reacción de genotipificación (25 µL) incluyó 20 ng de ADN genómico, 12.5 µL de TaqMan Genotyping Master Mix (Applied Biosystems), 10.188 µL de agua Milli-Q y 0.312 µL (1X) del ensayo de Genotipificación TaqMan (80×) que incluye sondas que incorporan a los fluoróforos VIC y FAM que efectúan la discriminación alélica correspondiente al SNP rs9939609:

Secuencia[VIC/FAM]:GGTTCCTTGCGACTGCTGTGAATTT[**A/T**]GTGATGCACTT
GGATAGTCTCTGTT. Alelo A: VIC, Alelo T: FAM

Las condiciones programadas en el termociclador (LightCycler® Nano System) correspondieron a 95° C por 10 minutos y 50 ciclos de amplificación que

incluyeron fases de desnaturalización a 92° C por 15 segundos, alineamiento y extensión a 60° C por 60 segundos. Los datos obtenidos se analizaron con el LightCycler® Nano System Software 1.0.

Genotipificación de *BDNF* rs6265

En relación con el polimorfismo rs6265, inicialmente se realizó la estandarización de los ensayos de discriminación alélica. Se utilizaron 16 alícuotas de ADN genómico correspondientes a infantes obesos mexicanos con genotipos rs6265 caracterizados previamente por la técnica de RFLPs (Caracterización de polimorfismos por el tamaño de fragmento producto de restricción enzimática) para un estudio conducido por la Dra. Haydeé Rosas Vargas (UIM Genética Humana, Hospital Pediatría, CMN SXXI). En este ensayo de estandarización, los resultados obtenidos efectivamente correspondieron con el genotipo determinado inicialmente por RFLPs por lo que se seleccionaron tres alícuotas pertenecientes a individuos con genotipos GG, GA y AA rs6265 para incluirlos como control en los análisis de genotipificación subsecuentes. La discriminación alélica se realizó con sondas TaqMan SNP (AppliedBiosystems ID C_11592758_10) por PCR en tiempo real. La reacción de genotipificación (12.5 µL) incluyó 10 ng of ADN genómico, 6.25 µL de TaqMan Genotyping Master Mix (AppliedBiosystems), 0.156 µL (1X) del ensayo de Genotipificación (80x) y 5.094 µL de agua.

La secuencia [VIC/FAM]:CCTCATCCAACAGCTCTTCTATCAC[G/A]GTGTTTCGAA GTGTAGCCAATGAT corresponde a las sondas Taqman diseñadas para el ensayo de discriminación alélica referente al SNP rs6265. Alelo G: VIC, Alelo A: FAM. Las condiciones programadas en el termociclador (LightCycler® Nano

System) para el ensayo de genotipificación incluyó una fase inicial de 10 minutos a 95° C y 40 ciclos de amplificación bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 92° C por 15 segundos, alineamiento y extensión a 60° C por 60 segundos. Los datos obtenidos se analizaron con el LightCycler® Nano System Software 1.0.

Análisis estadísticos

La asociación de los polimorfismos *BDNF* rs6265 y *FTO* rs9939609 con la concentración de BDNF circulante y el balance energético se determinó con un análisis estadístico multivariado efectuado con el programa informático IBM SPSS Statistics 22.0. Para normalizar la distribución, las variables se transformaron logarítmicamente. Las variables cuantitativas se reportaron como el promedio \pm desviación estándar (DE), en contraste las variables categóricas se indicaron en números absolutos y frecuencias. La asociación de los genotipos de interés con parámetros antropométricos, variables relacionadas con el balance energético y la concentración periférica de BDNF se analizó con el Modelo Lineal General univariante (ANOVA) ajustado por determinadas covariables (indicadas en la sección de resultados correspondientes). Previo al análisis de asociación se realizó un test de χ^2 para comprobar que las frecuencias genotípicas y alélicas coincidieran con lo establecido por el principio de equilibrio de Hardy-Weinberg, que postula que la transmisión de los alelos de los progenitores a los descendientes es independiente y no ocurren fenómenos distorsionadores, como la aparición de mutaciones o la selección de alelos (21).

El análisis de asociación incluyó la evaluación de tres modelos genéticos: aditivo, dominante y recesivo. Estadísticamente, un polimorfismo constituye una variable categórica, lo que permite definir diversos modelos de heredabilidad posibles cuya verosimilitud se determina a través de la adecuada codificación de los genotipos (25). El modelo aditivo, implica asumir que cada copia del alelo polimórfico de menor frecuencia incrementa uniformemente el efecto del genotipo sobre el fenotipo en análisis (rs9939609: 0= TT; 1=TA; 2=AA. rs6265: 0=GG; 1=GA; 2= AA). En el modelo dominante se asume que portar una o dos copias del alelo polimórfico de menor frecuencia impacta similarmente en el fenotipo de interés (rs9939609: 0= TT; 1=TA, AA. rs6265: 0=GG; 1=GA, AA); adicionalmente, el modelo recesivo plantea que se requieren dos alelos polimórficos de menor frecuencia para alterar cierto fenotipo, en este contexto individuos con genotipo homocigoto para el alelo común y los heterocigotos se comparan con respecto a individuos homocigotos para el alelo polimórfico de menor frecuencia (rs9939609: 0= TT, TA; 1=AA. rs6265: 0=GG, GA; 1= AA). El test χ^2 se aplicó para determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativas en la distribución de las frecuencias genotípicas de rs9939609 y rs6265 registradas en relación con el balance energético categorizado como Insuficiente, Adecuado y Excedido, asumiendo un modelo genético dominante. Se utilizó este modelo debido a que la frecuencia genotípica de los individuos homocigotos para el alelo A de ambos polimorfismos resultó inferior al 20%, y con la finalidad de incrementar el poder estadístico del análisis, este genotipo se agrupó con el genotipo heterocigoto correspondiente.

Adicional al análisis de asociación individual conducido en los polimorfismos de interés, las frecuencias genotípicas de ambos polimorfismos se examinaron con un modelo aditivo referido por Ortega-Azorín *et al.* (92) en el que a cada variante polimórfica de menor frecuencia (alelo A) se le asigna un puntaje. El rango de valores en este puntaje agregado derivado de la combinación de los alelos de ambos polimorfismos comprende de 0 a 4 puntos: individuos homocigotos para los alelos silvestres=0, portadores de un alelo polimórfico de menor frecuencia=1; participantes portadores de dos alelos polimórficos de menor frecuencia=2 e individuos portadores de tres o cuatro alelos polimórficos de menor frecuencia=3 o 4, respectivamente.

En este contexto, el puntaje agregado para los genotipos *FTO* rs9939609 y *BDNF* rs6265 correspondió a los valores descritos a continuación:

Genotipos <i>FTO</i> rs9939609+ <i>BDNF</i> rs6265	Puntaje
TT+GG	0
TA+GG, TT+GA	1
TA+GA, TT+AA, AA+GG	2
AA+GA, TA+AA	3
AA+AA	4

En cada análisis realizado un valor de $P < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

RESULTADOS

I. Participantes

En el periodo comprendido entre Septiembre 2012-Septiembre 2014 se reclutaron 250 participantes. No obstante, se eliminaron 41 individuos conforme a los criterios previamente descritos en la sección de Materiales y Métodos, por lo que para el análisis de resultados se incluyó a un total de 209 sujetos; 112 de género femenino y 97 participantes masculinos. La edad se registró en el rango de 20-56 años y el promedio correspondió a 29.55 ± 9.34 años. Se determinó que este parámetro no difiere significativamente entre el género femenino y masculino al registrar una edad promedio de 30.35 ± 10.07 y 28.61 ± 8.37 , respectivamente (Tabla1). En la Tabla 1 se incluyen los valores promedio \pm DE referentes al peso corporal y porcentaje de grasa corporal, parámetros determinados por bioimpedancia eléctrica. Con el análisis estadístico realizado (t-student), se observaron diferencias significativas que indicaron que el género femenino presenta un porcentaje de grasa corporal ($P=1.17E-19$) y peso corporal ($P=2.07E-10$) superior al género masculino. Es importante destacar que lo anterior coincide con reportes previos en los que se ha descrito que en mujeres la grasa corporal presenta un incremento normal de un 10 % con respecto a los hombres (93). Se sugiere que esta diferencia es debida principalmente por el efecto de hormonas sexuales e implicadas en el metabolismo que determinan la distribución regional de la adiposidad corporal (94). El exceso de grasa corporal en las mujeres se distribuye principalmente subcutánea y periféricamente (glúteos, senos y muslos). En contraste, en hombres el exceso de grasa corporal es almacenado

predominantemente en la cavidad abdominal (93, 94). En concordancia con el argumento previo, los criterios adaptados a población mexicana establecen que la grasa corporal normal en el género masculino y femenino representa el 16-24% y 24-31%, respectivamente (95). En relación con el análisis del estatus nutricional, los participantes incluidos en este estudio exhibieron un IMC en el rango de 16.5-40 kg/m² y el IMC promedio registrado en el total de participantes correspondió a 24.29±3.77 kg/m². No se identificaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al género en función de que hombres y mujeres registraron un IMC promedio de 24.66±3.90 kg/m² y 23.98±3.65 kg/m², respectivamente.

Tabla 1. Características demográficas y clínicas registradas en los participantes

	Total n=209	Mujeres n=112	Hombres n=97
Edad (años)	29.55±9.34	30.35±10.07	28.61±8.37
Peso corporal (kg)	65.76±12.67	60.73±10.39	71.58±12.61*
Grasa corporal (%)	24.22±8.46	28.70±7.36	19.05±6.49*
IMC (kg/m ²)	24.29 ±3.77	23.98±3.65	24.66±3.90
Estatus nutricional:			
Bajo Peso n(%)	11(5.3)	5(4.5)	6(6.2)
Normopeso n(%)	108(51.7)	64(57.1)	44(45.4)
Sobrepeso n(%)	78(37.3)	37(33.0)	41(42.3)
Obesidad n(%)	12(5.7)	6(5.4)	6(6.2)

La clasificación del estatus nutricional se realizó en función del índice de masa corporal (IMC): Bajo Peso: <18.5 kg/m²; Normopeso: 18.5-24.9 kg/m²; Sobrepeso: 25-29.9 kg/m² y Obesidad:>30 kg/m². *P<0.01.

El 51.7% de los participantes de este proyecto de investigación resultaron individuos que presentan un IMC adecuado al considerar la clasificación propuesta por la OMS. El 37.3% y 5.7% de los participantes se categorizó en el estado nutricional correspondiente a sobrepeso y obesidad, respectivamente. El 5.3 % restante se incluyó en un estado nutricional categorizado como bajo peso. La prevalencia de peso insuficiente, normopeso, sobrepeso y obesidad entre participantes de género masculino y femenino no difirió significativamente ($\chi^2 = 4.115$, $P=0.128$).

II. Determinación de la ingesta energética y el gasto energético total

En la Tabla 2 se exhiben los valores promedio \pm DE obtenidos para las variables relacionadas con la ingesta energética, el gasto energético y el porcentaje de adecuación correspondiente. Con respecto a la ingesta energética, parámetro calculado con el programa NUTRIKCAL VO 1.1 en base a tres recordatorios de alimentación (R-24) referidos por los participantes, el promedio de kcal ingeridas considerando el total de individuos correspondió a 2026.42 ± 633.71 . Se determinó que la cantidad de kcal/día ingeridas por el género femenino resultó significativamente inferior ($P=2.56 \text{ E-}16$) a la referida por participantes masculinos. Sin embargo, cabe resaltar que el género masculino presentó adicionalmente un GEB, GEAF y GET superior ($P<0.01$) con respecto a las mujeres, lo que se traduce en un porcentaje de adecuación promedio correspondiente a un balance energético excedido. No obstante, tal exceso se concentra en los individuos con sobrepeso y en la mínima proporción de participantes con obesidad incluidos en el análisis (Tabla 2).

Con respecto a la ingesta relativa, que representa el porcentaje de energía proveniente de la ingesta de macronutrientes incluyendo, lípidos, carbohidratos y proteínas, se determinó que en el total de los participantes la ingesta de lípidos representó un valor promedio de $32.73 \pm 6.37\%$, el $50.08 \pm 7.56\%$ correspondió a carbohidratos y en proteínas se registró una ingesta relativa del $17.26 \pm 4.73\%$. En este análisis no se identificaron diferencias estadísticamente significativas en la ingesta relativa de macronutrientes entre los géneros masculino y femenino.

Tabla 2. Variables relacionadas con la ingesta y el gasto energético de acuerdo al género de los participantes.

	Total n=209	Mujeres n=112	Hombres n=97
Ingesta energética (Kcal/d)	2026.42 ± 633.71 (1027-3744)	1708.29 ± 455.73 (1027-3034)	$2393.74 \pm 612.83^*$ (1391-3744)
Lípidos (%)	32.73 ± 6.37	33.03 ± 6.45	32.38 ± 6.28
Carbohidratos (%)	50.08 ± 7.56	50.69 ± 6.97	49.37 ± 8.17
Proteínas (%)	17.26 ± 4.73	17.33 ± 4.66	17.19 ± 4.84
GEB(Kcal/d)	1493.28 ± 258.34	1313.41 ± 126.71	$1700.97 \pm 211.44^*$
GEAF (Kcal/d)	307.44 ± 91.24	276.56 ± 65.12	$342.78 \pm 103.57^*$
GET(Kcal/d)	1800.70 ± 316.86	1590.18 ± 159.17	$2043.78 \pm 277.20^*$
% de adecuación	112.70 ± 30.32 Excedido	107.61 ± 27.53 Adecuado	$118.58 \pm 32.42^*$ Excedido

Entre paréntesis se indica el rango en kcal consumido. Porcentaje de adecuación: $<90\%$ = insuficiente, $90-110\%$ = adecuado, $>110\%$ = excedido. $*P<0.01$.

III. Determinación de las frecuencias alélicas y genotípicas de *FTO* rs9939609

Con los ensayos de discriminación alélica efectuados para la genotipificación del polimorfismo *FTO* rs9939609 se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas correspondientes (Tabla 3). Se determinó que éstas se encuentran en equilibrio Hardy Weinberg ($\chi^2= 3.37$, $p= 0.066$).

Tabla 3. Frecuencias alélicas y genotípicas de *FTO* rs9939609

	Alelos		Genotipos		
	T	A	TT	TA	AA
n	337	81	140	57	12
Frecuencia	0.81	0.19	0.67	0.27	0.06

IV. Determinación de las frecuencia alélicas y genotípicas de *BDNF* rs6265

En la Tabla 4 se indican las frecuencias alélicas y genotípicas determinadas para el polimorfismo *BDNF* rs6265. Se determinó que éstas se ajustan a lo establecido por el principio de equilibrio Hardy Weinberg ($\chi^2=0.044$, $p= 0.94$).

Tabla 4. Frecuencias alélicas y genotípicas de *BDNF* rs6265

	Alelos		Genotipos		
	G	A	GG	GA	AA
n	361	57	156	49	4
Frecuencia	0.86	0.14	0.75	0.23	0.02

V. Asociación de parámetros antropométricos con los polimorfismos *FTO* rs9939609 y *BDNF* rs6265.

En la Tabla 5 se representan los resultados obtenidos con el análisis Modelo Lineal General (ANOVA), efectuado con el propósito de identificar la asociación de los polimorfismos *FTO* rs9939609 y *BDNF* rs6265 con parámetros antropométricos, específicamente el IMC y grasa corporal. Es importante destacar que a pesar de que estas variables se excluyeron de los objetivos que conformaron el presente trabajo de investigación, no se descartó su análisis y se decidió incluirlos para complementar el reporte de resultados. Estos parámetros se analizaron con los modelos genéticos aditivo, dominante y recesivo, indicando los valores de P correspondientes.

Se determinó que los participantes con genotipo AA rs9939609 registraron un IMC y adiposidad corporal inferior en comparación a individuos con genotipo TT rs9939609, no obstante estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas. Análogamente a los resultados referidos previamente, los valores promedio obtenidos para el IMC y % grasa corporal estratificados por genotipos *BDNF* rs6265, no difirieron significativamente. Sin embargo, en este análisis se detectó que el valor de P obtenido con el modelo aditivo, indica una tendencia en la que los individuos con genotipo homocigoto para el alelo A rs6265 presentan un IMC inferior con respecto a los individuos homocigotos para el alelo G (Tabla 5).

Tabla 5. Asociación de parámetros antropométricos con los polimorfismos *FTO* rs9939609 y *BDNF* rs6265.

SNP	Genotipo (n)	Edad (años)	IMC (kg/m ²)	Grasa Corporal (%)
rs9939609	TT (140)	29.07±9.34	24.24±3.86	24.05±8.68
	TA (57)	29.92±8.87	24.51±3.68	24.77±8.14
	AA (12)	33.33±11.26	23.91±3.40	23.63±7.92
	P ad	0.161	0.715	0.718
	P dom	0.292	0.971	0.566
	P rec	0.149	0.390	0.807
rs6265	GG (156)	29.69±9.59	24.44±3.90	24.58±8.47
	GA (49)	29.08±8.81	23.93±3.49	23.28±8.67
	AA (4)	29.50±6.75	22.95±0.50	21.62±5.24
	P ad	0.723	0.271	0.422
	P dom	0.694	0.321	0.496
	P rec	0.991	0.449	0.490

Se registran los valores promedio ± DE. Se indica la significancia estadística obtenida con los modelos genéticos aditivo (P ad), dominante (P dom) y recesivo (P rec). En los parámetros antropométricos se ajustó por covariables incluyendo género y edad.

VI. Asociación de parámetros relacionados con la ingesta y gasto energético con los polimorfismos *FTO* rs9939609 y *BDNF* rs6265.

Los valores promedio ± DE correspondientes a la ingesta energética y gasto energético total (GET) registrados en participantes con los genotipos rs9939609 y rs6265 se exhiben en la Tabla 6. Se determinó que participantes portadores del alelo A rs9939609 refirieron en promedio una ingesta de kcal/día significativamente superior (P=0.035) a la cifra reportada por participantes con genotipo homocigoto para el alelo T. En contraste, para el SNP rs6265 no se

determinaron diferencias estadísticamente significativas en relación con este parámetro. Los SNPs analizados no se asociaron con el GET debido a que se descartó la existencia de diferencias con significancia estadística.

Tabla 6. Asociación de la ingesta y gasto energético con los polimorfismos *FTO* rs9939609 y *BDNF* rs6265

SNP	Genotipo (n)	Ingesta energética (kcal/d)	GET (kcal/d)
rs9939609	TT (140)	1998.22±645.53(1027,3744);1839	1788.29±331.78
	TA (57)	2104.50±641.40(1111,3575);1983	1837.80±293.34
	AA (12)	1984.41±435.94(1461,2473);1975	1769.33±243.48
	P ad	0.079	0.560
	P dom	0.035*	0.229
	P rec	0.834	0.341
rs6265	GG (156)	2013.27±624.13(1027,3744);1896	1798.59±311.71
	GA (49)	2020.63±622.47(1194,3669);2005	1810.83±339.75
	AA (4)	2610.00±1026.79(1493,3617);2665	1759.00±300.10
	P ad	0.822	0.683
	P dom	0.721	0.611
	P rec	0.733	0.870

Se registran los valores promedio ± DE; en la ingesta energética entre paréntesis se representa el rango y adyacente a éste se indica la mediana. El análisis se ajustó por covariables incluyendo género, edad, IMC, y porcentaje de grasa corporal. La ingesta energética se ajustó adicionalmente por el % de adecuación.

En adición al análisis de la ingesta de kcal total, se examinó la asociación de los polimorfismos de interés con la ingesta relativa de macronutrientes. Los resultados

obtenidos evidenciaron que el porcentaje de energía derivado de la ingesta de carbohidratos y proteínas, difiere significativamente entre los genotipos rs6265 (Tabla 7). En este contexto, se determinó que individuos con genotipo homocigoto y heterocigoto para el alelo A refieren una ingesta relativa significativamente inferior en proteínas y superior en carbohidratos con respecto a lo registrado por individuos homocigotos para el alelo G.

Tabla 7. Asociación de la ingesta relativa de macronutrientes con los polimorfismos *FTO* rs9939609 y *BDNF* rs6265.

SNP	Genotipo (n)	Lípidos (E%)	CH (E%)	Proteínas (E%)
rs9939609	TT (140)	33.14±6.50	49.62±7.87	17.47±5.07
	TA (57)	31.98±6.16	51.33±6.81	16.51±3.71
	AA (12)	31.58±5.75	49.55±7.25	18.41±4.85
	P ad	0.211	0.432	0.680
	P dom	0.203	0.233	0.364
	P rec	0.541	0.683	0.434
rs6265	GG(156)	32.91±6.74	49.25±7.55	17.72±5.08
	GA(49)	32.12±5.34	52.65±7.34	15.97±3.28
	AA(4)	33.08±1.25	51.16±3.55	15.50±1.69
	P ad	0.535	0.013*	0.016*
	P dom	0.460	0.007*	0.013*
	P rec	0.882	0.823	0.489

E% representa el porcentaje de energía derivado de la ingesta de los macronutrientes correspondientes. Se indica la significancia estadística obtenida con los modelos genéticos aditivo (P ad), dominante (P dom) y recesivo (P rec) al ajustar por covariables incluyendo el género, edad, IMC, porcentaje de grasa corporal, ingesta energética total y GET. *P<0.05.

En este contexto, individuos homocigotos AA rs6265 presentan una ingesta relativa de carbohidratos superior al referido por participantes homocigotos para el alelo G ($P_{ad}=0.013$ y $P_{dom}=0.007$) en tanto que la ingesta relativa de proteínas resultó significativamente inferior en individuos portadores del alelo A ($P_{ad}=0.016$ y $P_{dom}=0.013$). Con respecto al polimorfismo *FTO* rs9939609, se descartó su asociación con las variables referidas previamente debido a que no se identificaron diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos rs9939609 (Tabla 7).

VII. Análisis del balance energético

El análisis referente al balance energético implicó que por participante se calculara el porcentaje de adecuación calórica ($\text{Ingesta energética} / \text{Gasto Energético Total} \times 100$) para determinar y categorizar el balance energético correspondiente en insuficiente, adecuado o excedido. Complementando lo descrito previamente en la Tabla 2, la Figura 7 indica que el 45 % ($n=95$) de los participantes incluidos en este proyecto de investigación refirió una ingesta energética excedida (adecuación superior al 110%), el 25 % de los participantes ($n=52$) presentó un balance energético que resultó adecuado (adecuación en el rango 90-110%), en contraste el 30 % restante ($n=62$) registró un balance energético insuficiente (adecuación inferior al 90%).

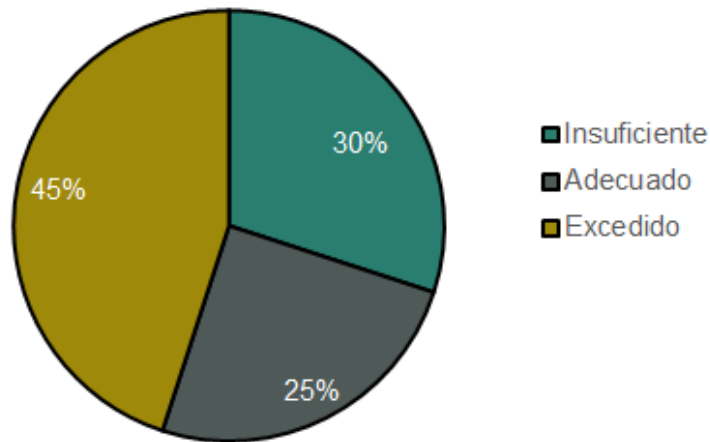


Figura 7. Prevalencia de balance energético insuficiente, adecuado y excedido registrada en el total de los participantes.

VIII. Asociación de los polimorfismos rs9939609 y rs6265 con el balance energético (Variable categórica).

En inicio, la asociación de rs9939609 y rs6265 con el balance energético se evaluó independientemente con un análisis de χ^2 en el que se asumió un modelo genético dominante para incrementar el poder estadístico. En la Tabla 8 se exhiben las frecuencias genotípicas de los polimorfismos rs6265 y rs9939609 en relación con el género y el balance energético categorizado como Insuficiente, Adecuado y Excedido. Con el análisis de χ^2 no se identificaron diferencias estadísticamente significativas que sugieran la asociación del balance energético con rs6265 (Población total $\chi^2=0.110$, $p= 0.995$. Análisis por género: Hombres $\chi^2=0.303$, $p= 0.859$; Mujeres $\chi^2=0.444$, $p= 0.801$) o rs9939609 (Población total $\chi^2=2.798$, $p= 0.247$. Análisis por género: Hombres $\chi^2=3.773$, $p= 0.152$; Mujeres $\chi^2=0.153$, $p= 0.926$). No obstante, cabe destacar que el 65% de individuos masculinos portadores del alelo A rs9939609 (TA+AA) presentaron un balance energético excedido.

Tabla 8. Asociación de los polimorfismos *FTO* rs9939609, *BDNF* rs6265 con el balance energético

Balance energético		<i>FTO</i> rs9939609		<i>BDNF</i> rs6265	
		TT	TA+AA	GG	GA+AA
		n(%)	n(%)	n(%)	n(%)
Insuficiente	Total	45(32)	17(25)	46(29)	16(30)
	Hombres	17(27)	5(15)	16(23)	6(22)
	Mujeres	28(36)	12(34)	30(35)	10(38)
Adecuado	Total	37(27)	15(21)	39(25)	13(25)
	Hombres	18(29)	7(20)	19(27)	6(22)
	Mujeres	19(25)	8(23)	20(23)	7(27)
Excedido	Total	58(41)	37(54)	71(46)	24(45)
	Hombres	28(44)	22(65)	35(50)	15(56)
	Mujeres	30(39)	15(43)	36(42)	9(35)

Población total $\chi^2=0.110$, $p= 0.995$. Análisis por género: Hombres $\chi^2=0.303$, $p= 0.859$; Mujeres $\chi^2=0.444$, $p= 0.801$) o rs9939609 (Población total $\chi^2=2.798$, $p= 0.247$. Análisis por género: Hombres $\chi^2=3.773$, $p= 0.152$; Mujeres $\chi^2=0.153$, $p= 0.926$).

IX. Correlación entre los niveles séricos de BDNF y el IMC

El análisis de correlación entre estas variables incluyendo al total de participantes indicó un valor correspondiente a -0.70, lo que representa que a mayor IMC la concentración de BDNF se reduce. Sin embargo, este valor no resultó estadísticamente significativo ($P=0.315$). Al estratificar por género, se obtuvo un coeficiente de correlación negativa no significativa (Hombres: $r=-0.081$, $P=0.429$; Mujeres: $r=-0.051$, $P=0.593$).

X. Asociación de los polimorfismos rs9939609 y rs6265 con el balance energético y la concentración periférica de BDNF. Análisis de puntaje agregado.

Con base en el modelo de análisis de genotipos combinados propuesto por Ortega-Azorín *et al.* (96) las frecuencias genotípicas de ambos polimorfismos se examinaron con un modelo aditivo en el que a cada variante polimórfica de menor frecuencia (alelo A) se le asigna un puntaje. Los valores asignados en este análisis corresponden a un rango de 0 a 4 puntos. En este contexto, con el puntaje agregado derivado de la combinación de los alelos de ambos polimorfismos, se determinó que la prevalencia de individuos homocigotos para los alelos silvestres (0 puntos) correspondió al 51.7 %; el 33.0 % presentó un alelo polimórfico de menor frecuencia en FTO o BDNF (1 punto); el 12.9 % de los participantes presentó dos alelos polimórficos de menor frecuencia (2 puntos) y el 2.4% restante representa a participantes con tres alelos polimórficos de menor frecuencia (3 puntos). En este trabajo de investigación no se identificaron individuos que presentaran 4 alelos polimórficos de menor frecuencia (Figura 8).

El análisis estadístico (prueba exacta de Fisher) no indicó diferencias significativas entre las frecuencias genotípicas que sugieran la asociación de rs9939609 y rs6265 con el balance energético. No obstante, es importante enfatizar que los participantes del género masculino que poseen tres alelos polimórficos de menor frecuencia (Genotipos rs9939609+rs6265: AA+GA o TA+AA) refieren en su totalidad un balance energético excedido (Tabla 9). En la Tabla 9 se indican los

valores promedio correspondientes a la concentración sérica de BDNF estratificados por género, balance energético y genotipo.

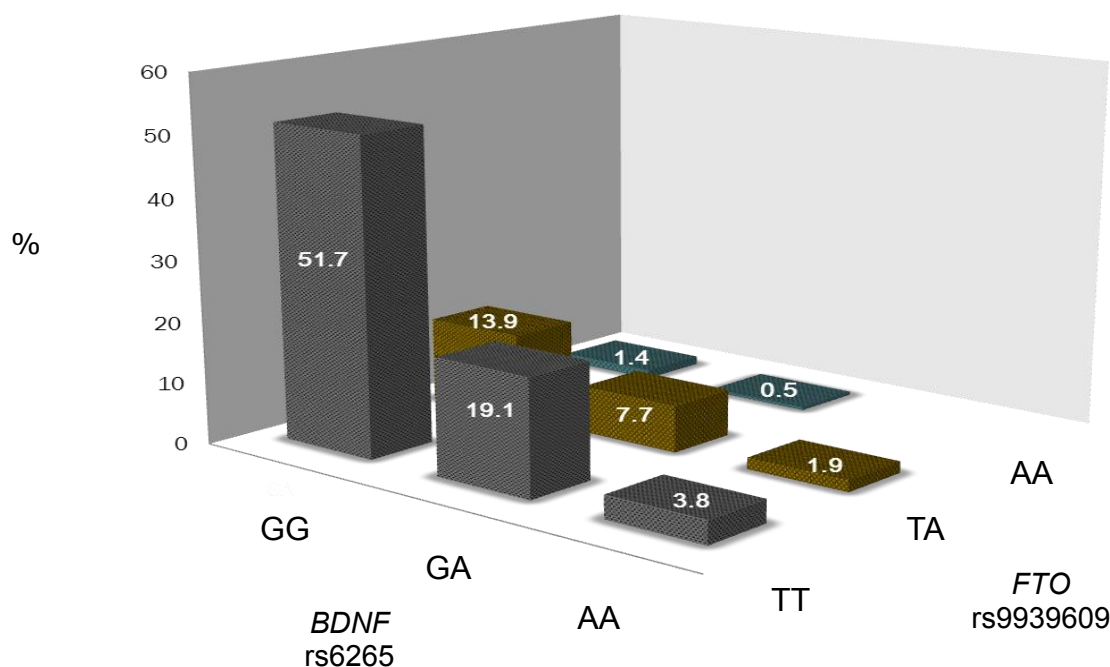


Figura 8. Prevalencia de genotipos combinados de los polimorfismos rs9939609 y rs6265.

Los genotipos de interés se analizaron con el puntaje agregado descrito previamente, aplicando un Modelo lineal general que permitió el ajuste por diversas covariables, incluyendo edad, IMC, factor de actividad física, estatus de fumador y horas de sueño. Con este análisis se identificaron diferencias cercanas a la significancia estadística ($P=0.054$) en la concentración sérica de BDNF registrada en participantes del género masculino portadores de uno (Genotipos rs9939609+rs6265: TA+GG, TT+GA) y dos alelos polimórficos de menor frecuencia (Genotipos rs9939609+rs6265: TA+GA, TT+AA, AA+GG) con respecto a individuos masculinos con genotipos rs9939609 y rs6265 silvestres.

Tabla 9. Asociación de los polimorfismos *FTO* rs9939609 y *BDNF* rs6265 (puntaje agregado) con el balance energético y la concentración periférica de BDNF.

Balance energético		<i>FTO</i> rs9939609+ <i>BDNF</i> rs6265								P
		TT+GG (0) ^a		TA+GG, TT+GA (1) ^a		TA+GA, TT+AA, AA+GG (2) ^a		AA+GA, TA+AA (3) ^a		
		n(%)	BDNF sérico (ng/ml)	n(%)	BDNF sérico (ng/ml)	n(%)	BDNF sérico (ng/ml)	n(%)	BDNF sérico (ng/ml)	
Total		33(30)	459.09±396.48	24(35)	364.75±119.92	5(19)	489.12±176.04	0	-----	0.578
Insuficiente	Hombres	12(27)	402.03±184.27	9(24)	293.05±108.14	1(8)	287.10	0	-----	0.054
	Mujeres	21(33)	491.70±479.34	15(49)	407.77±107.97	4(29)	539.62±155.94	0	-----	0.773
Adecuado	Total	29(27)	371.04±118.71	15(22)	379.10±152.42	6(22)	368.75±99.32	2(40)	299.45±44.19	0.754
	Hombres	13(30)	382.79±106.37	9(24)	354.23±100.40	3(23)	403.00±121.18	0	-----	0.478
	Mujeres	16(25)	361.50±130.52	6(19)	416.41±214.79	3(21)	334.50±80.36	2(67)	299.45±44.19	0.543
Excedido	Total	46(43)	367.68±189.12	30(43)	388.48±139.21	16(59)	430.60±185.36	3(60)	379.13±75.97	0.487
	Hombres	19(43)	379.13±199.14	20(52)	375.30±138.80	9(69)	424.42±223.79	2(100)	351.75±83.93	0.463
	Mujeres	27(42)	359.63±185.16	10(32)	414.85±143.59	7(50)	438.56±137.81	1(33)	433.90	0.534

^a Puntaje agregado que indica el número de alelos polimórficos de menor frecuencia (A) al combinar los genotipos *FTO* rs9939609 y *BDNF* rs6265. La variable categórica se analizó con la prueba exacta de Fisher; el Modelo lineal general se aplicó para analizar la variable cuantitativa. Prueba exacta de Fisher: Ambos géneros=5.718 P=0.441; Género Masculino F=4.421 P=0.621; Género Femenino F=5.613 P=0.444.

DISCUSIÓN

En el 45% de los participantes se identificó un criterio de adecuación superior al 110%, indicativo de un estado de balance energético positivo en el que la ingesta energética excede al GET. En adición, con base a los criterios de ingesta diaria recomendada de macronutrientes (96) se determinó que en el total de individuos analizados la ingesta relativa de carbohidratos es insuficiente (rango: 55-63%). En contraste, el porcentaje de energía derivado de la ingesta de lípidos y proteínas excede las recomendaciones estipuladas (25-30% y 12-15%, respectivamente). Este perfil de ingesta de macronutrientes probablemente contribuyó a que los participantes presentaran, en promedio, valores normales de IMC y grasa corporal. En concordancia con este planteamiento, se ha documentado que dietas enfocadas en la reducción de la ingesta de carbohidratos y en el incremento de proteínas y lípidos, resultan equivalentes e inclusive superan la eficiencia de dietas estándar (que implican la reducción en la ingesta de lípidos) aplicadas para regular el peso corporal (97, 98).

En el presente trabajo se descartó la asociación de los polimorfismos de interés con el IMC, el porcentaje de grasa corporal o con el gasto energético. Sin embargo, se determinó que rs9939609 y rs6265 se asocian significativamente con la ingesta energética. Los participantes portadores del alelo A rs9939609 refirieron un incremento promedio correspondiente a 100 kcal/día en comparación con individuos homocigotos para el alelo T. Para rs6265 se estimó que el porcentaje de energía derivado de la ingesta de carbohidratos y proteína difirió con respecto a lo referido por individuos homocigotos para el alelo G.

Los resultados obtenidos en relación con *BDNF* rs6265 son consistentes con Ma *et al.* (86) que descartaron la asociación de este polimorfismo con la ingesta energética total. Por otra parte, la evidencia de asociación entre rs9939609 y la ingesta energética coincidió con diversos reportes previos (53-56). Sin embargo, estos resultados difieren con Liu *et al.* (50) y Dougkas *et al.* (99). En particular, para Liu *et al.* (50), la asociación incluyó a variables antropométricas, el IMC y la circunferencia de cadera. En adición, contrastan con relación a McCaffery *et al.* (100), que reportan la ausencia de asociación de rs9939609 con la ingesta. Sin embargo, su análisis indicó que sujetos con genotipo AA rs6265 incrementan la ingesta energética en promedio 100 kcal/día con respecto a individuos homocigotos para el alelo G. En la ingesta relativa de macronutrientes, no identificaron diferencias estadísticamente significativas, lo que resulta inconsistente con lo reportado en el presente estudio. La heterogeneidad entre los resultados referidos probablemente es promovida por diversas variables incluyendo el diseño experimental aplicado, el ajuste de covariables, la interacción de factores ambientales y/o genéticos no establecidos y a la variabilidad genética existente entre las poblaciones analizadas.

Es importante destacar que el procedimiento utilizado en el presente estudio para determinar la ingesta energética se fundamenta en el auto-reporte retrospectivo, lo que implica ciertas limitantes metodológicas debido a que los participantes no controlan con total precisión las porciones alimentarias que registran. En adición, existen factores psicosociales relacionados con el interés por la aceptación social y la autopercepción de la imagen corporal que determinan que individuos con sobrepeso y obesidad tiendan a omitir información o reducir episodios de ingesta

de alimentos, principalmente aquellos con elevado contenido lipídico (101). En contexto con el planteamiento anterior, en el presente estudio se incluyó el registro de tres recordatorios de alimentación de 24 horas, lo que posiblemente implicó una mayor representatividad de la variación habitual en la dieta. Adicionalmente, se entrevistó a cada uno de los participantes, incorporando utensilios de cocina y fotografías en tamaño real de diversos alimentos para estimar con mayor precisión la porción alimentaria referida.

Con respecto a la asociación de rs6265 con parámetros antropométricos, se observó que los participantes con genotipo AA registraron en promedio un IMC y porcentaje de grasa corporal inferior en comparación con individuos portadores del alelo G. Sin embargo, las diferencias no resultaron estadísticamente significativas. Esta observación coincidió con Perkovic *et al.* (102), que en un estudio longitudinal que abarcó 35 años, indicaron la ausencia de asociación del polimorfismo rs6265 con el IMC. En contraste, los estudios conducidos en adultos que refieren la asociación entre estas variables son discrepantes en función de que se incluyen reportes en los que la asociación se identifica con el alelo de menor frecuencia A (103) o con el alelo silvestre G (25). En población mexicana, León-Mimila *et al.* (25) reportaron la asociación significativa del alelo G rs6265 con obesidad, en particular de tipo mórbida, que no exhibió representatividad en nuestra población de estudio. Los resultados reportados en el presente trabajo no descartan la asociación entre el SNP rs6265 y rs9939609 con la composición corporal, se sugiere que se aumente el tamaño de muestra incluyendo una mayor proporción de participantes con obesidad mórbida (Tipo III), debido a que en este trabajo de

investigación la prevalencia de individuos con este estado nutricional resultó inferior al 1%.

En el análisis de los polimorfismos de manera independiente o en combinación con un puntaje agregado no se identificaron diferencias estadísticamente significativas entre la frecuencia genotípica de los polimorfismos *BDNF* rs6265 y *FTO* rs9939609 con respecto al balance energético insuficiente, adecuado o excedido. No obstante, es importante resaltar los participantes masculinos portadores del alelo A incluidos en este trabajo de investigación (TA+AA) que representan el 65% refieren un balance energético excedido en contraste con hombres homocigotos para el alelo T rs9939609 (44%). El presente estudio no apoya la hipótesis de que individuos portadores del alelo A para los polimorfismos *FTO* rs9939609 (TA+AA) y *BDNF* rs6265 (GA+AA) registrarían un balance energético excedido asociado al decremento de la concentración de BDNF sérico. En el análisis con el puntaje agregado se observó que la concentración sérica de BDNF disminuye en participantes de género masculino con balance energético insuficiente, portadores de uno o dos alelos polimórficos de menor frecuencia (A) rs9939609 y rs6265 con respecto a participantes homocigotos para los alelos silvestres. Sin embargo, el valor de P obtenido (0.054) no alcanzó el nivel aceptado para considerar que existan diferencias estadísticamente significativas. Se sugiere que la tendencia identificada en este trabajo de investigación se analice en un tamaño de muestra mayor para detectar o descartar asociaciones con un poder estadístico superior.

Los resultados obtenidos en sujetos adultos, concuerdan con Rask Andersen *et al.* (45) que analizaron la expresión de los genes *Fto* y *Bdnf* en un modelo murino expuesto a restricción alimentaria por 16 horas. En estas condiciones se registró que los niveles del transcrito *Fto* en el hipotálamo se incrementan y en contraste, *Bdnf* disminuye significativamente, la evidencia anterior permitió sugerir que los genes en cuestión se relacionaban funcionalmente.

En un estudio previo, se reportó que el efecto *in vitro* del polimorfismo rs6265 implica la alteración de la secreción de BDNF (104). Consistentemente, en humanos, el alelo A rs6265 se asoció con la alteración de la concentración sérica de BDNF (105). Sin embargo, existen trabajos en los se descartó la asociación entre este polimorfismo y los niveles circulantes de BDNF (106, 107). Es importante destacar que en concordancia con trabajos previos (108, 109), los niveles séricos de BDNF y el IMC correlacionaron negativamente sin que el valor de P fuera significativo. No obstante, existen trabajos contrastantes que reportan que la concentración sérica de BDNF evaluada en mujeres correlaciona positiva y significativamente con el peso corporal e IMC (110). La falta de concordancia entre los resultados previos sugiere que son requeridos análisis en los que se examine el impacto de factores fisiológicos y ambientales sobre la concentración de BDNF; en este trabajo el análisis de asociación incluyó el ajuste por diversas covariables incluyendo género, IMC, % de grasa corporal, horas de sueño, actividad física y el estatus de fumador.

Con respecto a la asociación de los polimorfismos de interés con el género, en particular con rs9939609 se han publicado estudios que refieren que el efecto del

genotipo rs9939609 difiere con el género. Shahid *et al.* (111), establecieron la asociación de rs9939609 con el aumento en IMC, peso corporal y circunferencia cadera/cintura en mujeres adultas de origen Pakistani, resultados que contrastan con el análisis realizado por Kring *et al.* (112), en población de origen danés, que determinó la asociación de este SNP con el género masculino. Se ha sugerido que los resultados inconsistentes se relacionan con la variación en la distribución de grasa corporal característica entre hombres y mujeres. Al respecto, se considera que existen diferencias de género asociadas a la regulación del balance energético en respuesta a la restricción o exceso calórico. Las hormonas sexuales incluyendo testosterona, estrógeno y estradiol influyen en la proporción y distribución diferencial de los patrones de almacenamiento, movilización y utilización de los depósitos de tejido adiposo (113, 94).

Retomando las referencias citadas previamente es posible proponer que los resultados reportados en el presente trabajo implican la interacción funcional entre hormonas sexuales y señales de adiposidad: estrógeno y leptina, respectivamente. Estas están implicadas en la regulación diferencial del balance energético y la variación en los patrones regionales de distribución de adiposidad corporal asociada al género.

En relación con el balance energético insuficiente, es importante reiterar que éste implica una respuesta lipolítica en la que los triglicéridos almacenados en el tejido adiposo se hidrolizan en ácidos grasos libres (AG) y glicerol, lo que reduce los depósitos energéticos y por consiguiente, los niveles de leptina circulantes. En adición, se ha indicado previamente que la adiposidad corporal en el género masculino se distribuye principalmente en la cavidad abdominal. En esta región los

niveles de leptina secretados resultaron inferiores a lo reportado para el tejido adiposo subcutáneo, que en contraste representa la mayor proporción de grasa corporal en mujeres. Considerando los aspectos anteriores, se sugiere que en hombres con balance energético insuficiente, portadores de uno o dos alelos de menor frecuencia para los SNPs de interés, se reduce la secreción de leptina, lo que impactaría en la regulación de la expresión de BDNF. En adición, la interacción funcional entre los efectos relacionados con rs9939609 y rs6265, representaría un aspecto contribuyente en el decremento de los niveles séricos de BDNF en conjunción con otros factores que aún deberán determinarse

CONCLUSIONES

- i) Los participantes presentaron en promedio un balance energético excedido. Sin embargo, el IMC y porcentaje de grasa corporal se clasificaron en los rangos normales.
- ii) El perfil de ingesta de macronutrientes referido por los participantes indicó que la ingesta relativa de carbohidratos es insuficiente, la ingesta de lípidos y proteínas resultó excedida.
- iii) No se identificó asociación de rs9939609 y rs6265 con parámetros antropométricos y el gasto energético total.
- iv) La ingesta energética total referida por individuos homocigotos para el alelo A rs9939609 difirió significativamente en comparación con individuos portadores del alelo T.
- v) La ingesta relativa de carbohidratos y proteínas registrada por los portadores del alelo A rs6265 difirió significativamente con respecto a individuos homocigotos para el alelo G.
- vi) Las frecuencias genotípicas de los SNPs rs9939609 y rs6265 no difieren significativamente entre individuos estratificados por género y balance

energético insuficiente, adecuado y excedido. No obstante, los participantes masculinos que portan tres alelos polimórficos de menor frecuencia (Genotipos rs9939609+rs6265: AA+GA o TA+AA) refieren en su totalidad un balance energético excedido.

- vii) No se detectó correlación significativa entre los niveles séricos de BDNF y el IMC.

- viii) En el análisis con el puntaje agregado para los polimorfismos rs9939609 y rs6265, se identificó como tendencia que los niveles séricos de BDNF difieren, en participantes masculinos con un balance energético insuficiente, portadores de una o dos copias del alelo polimórfico de menor frecuencia (A) con respecto a individuos homocigotos para los alelos silvestres.

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación sugieren la asociación de FTO rs9939609 con respecto al género y el balance energético que requieren mayor investigación, denotando la necesidad de incrementar el tamaño de muestra con la finalidad de establecer o descartar la asociación entre BDNF y FTO con el poder estadístico suficiente, adicionalmente se plantea la implementación métodos alternativos para determinar con mayor eficiencia la ingesta o el gasto energético y por consiguiente el balance energético correspondiente.

LITERATURA CITADA

1. Fernández JR, Casazza K, Divers J, López-Alarcón M. (2008) Disruptions in energy balance: Does nature overcome nurture?. *Physiology & Behavior* 94:105-112.
2. <http://www.who.int/>. Organización Mundial de la Salud. Consultado en Diciembre 2014.
3. <http://www.ensanut.insp.mx/>. Encuesta Nacional de Nutrición 2012. Consultado en Diciembre 2014.
4. Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, *et al.* (2007) A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science* 316:889-894.
5. Fredriksson R, Hägglund M, Olszewski PK, *et al.* (2008) The Obesity Gene, FTO, Is of Ancient Origin, Up-Regulated during Food Deprivation and Expressed in Neurons of Feeding-Related Nuclei of the Brain. *Endocrinology* 149(5):2062-2071.
6. Hill JO, Wyatt HR, Peters JC (2012) Energy Balance and Obesity. *Circulation* 126(1):126-132.
7. Hill JO, Wyatt HR, Reed GW, Peters JC. (2003) Obesity and the Environment: Where Do We Go from Here? *Science* 299:853-855.
8. Crowley VE. (2008) Overview of human obesity and central mechanisms regulating energy homeostasis. *Ann Clin Biochem.* 45 (Pt3):245-255.
9. Hill JO, Commerford R. (1996) Exercise, fat balance and energy balance. *International Journal of Sports Nutrition* 6:80-92.

10. Berthoud HR. (2006) Homeostatic and Non-homeostatic Pathways Involved in the Control of Food Intake and Energy Balance. *Obesity* 14(5):197-200.
11. Guyenet SJ, Schwartz MW. (2012) Clinical review: Regulation of food intake, energy balance, and body fat mass: implications for the pathogenesis and treatment of obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 97(3):745-755.
12. Blundell JE, King NA. (1996) Overconsumption as a cause of weight gain: behavioural-physiological interactions in the control of food intake (appetite). *Ciba Found Symp.* 201:138-54.
13. Schneeberger M, Gomis R, Claret M. (2014) Hypothalamic and brainstem neuronal circuits controlling homeostatic energy balance. *Journal of Endocrinology* 220: T25–T46.
14. Aponte Y, Atasoy D, Sternson SM. (2011) AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nat. Neurosci.* 14:351-355.
15. Yeo SHG, Heisler KL. (2012) Unraveling the brain regulation of appetite: lessons from genetics. *Nature Neuroscience* 15:1343-1349.
16. Kalra SP, Dube MG, Sahu A, *et al.* (1991) Neuropeptide Y secretion increases in the paraventricular nucleus in association with increased appetite for food. *PNAS* 88:10931-10935.
17. Ollmann MM, Wilson BD, Yang YK, *et al.* (1997) Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by Agouti-related protein. *Science* 278:135-138.
18. Choquet H, Meyre D. (2012) Molecular Basis of Obesity: Current Status and Future Prospects. *Current Genomics* 12:154-168.

19. Bastarrachea RA, Kent JW Jr, Rozada G, *et al.* (2007) Heritability and genetic correlations of metabolic disease-related phenotypes in Mexico: preliminary report from the GEMM Family Study. *Hum Biol.* 79:121-129.
20. Day FR, Loos RJ. (2011) Developments in obesity genetics in the era of genome wide association studies. *J Nutrigenet Nutrigenomics* 4: 222-238.
21. Iniesta R, Guinóa E, Moreno V. (2005) Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios Epidemiológicos. *Gac Sanit.* 19(4):333-341.
22. Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, *et al.* (2001) dbSNP: the NCBI data base of genetic variation. *Nucleic AcidsRes.*29:308-311.
23. Lyon HN, Hirschhorn JN. (2005) Genetics of common forms of obesity: a brief overview. *Am J Clin Nutr* 82(1):215S-217S.
24. Ramírez-Bello J, Vargas-Alarcón G, Tovilla-Zárate C, *et al.* (2013) Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP): implicaciones funcionales de los SNP reguladores (rSNP) y de los SNP-ARN estructurales (srSNP) en enfermedades complejas. *Gaceta Médica de México.* 149:220-228.
25. León-Mimila P, Villamil-Ramírez H, Villalobos-Comparán M, *et al.* (2013) Contribution of Common Genetic Variants to Obesity and Obesity-Related Traits in Mexican Children and Adults. *PLoS One.* 8(8):e70640.
26. Hardy R, Wills AK, Wong A, *et al.* (2010) Life course variations in the associations between FTO and MC4R gene variants and body size. *Hum Mol Genet.* 19(3):545-552.
27. Cheung MM, Yeo GS. (2011) FTO biology and obesity: why do a billion of us weigh 3 kg more. *Front Endocrinol* 2:1-9.

28. Scuteri A, Sanna S, Chen WM, *et al.* (2007) Genome-wide association scan shows genetic variants in the FTO gene are associated with obesity-related traits. *PLoS Genet.* 3(7):e115.
29. Hinney A, Nguyen TT, Scherag A. (2007) Genome wide association (GWA) study for early onset extreme obesity supports the role of fat mass and obesity associated gene (FTO) variants. *PLoS One* 2(12):e1361.
30. Dina C, Meyre D, Gallina S, *et al.* (2007) Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nat. Genet.* 39(6):724-726.
31. Gerken T, Girard CA, Tung YL, *et al.* (2007) The Obesity-Associated FTO Gene Encodes a 2-Oxoglutarate–Dependent Nucleic Acid Demethylase. *Science* 318(5855): 1469-1472.
32. Jia G, Fu Y, Zhao X, *et al.* (2011) N6-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nat Chem Biol.* 7(12):885-887.
33. Olszewski PK, Fredriksson R, Eriksson JD, *et al.* (2011) Fto colocalizes with a satiety mediator oxytocin in the brain and upregulates oxytocin gene expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 408(3):422-426.
34. Boender AJ, van Rozen AJ, Adan RA. (2012) Nutritional state affects the expression of the obesity-associated genes *Etv5*, *Faim2*, *Fto*, and *Negr1*. *Obesity* 20(12):2420-2425.
35. Stratigopoulos G, Padilla S, LeDuc CA. (2008) Regulation of *Fto/Ftm* gene expression in mice and humans *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008 April ; 294(4): R1185–R1196.

36. McTaggart JS, Lee S, Iberl M, *et al.* (2011) FTO Is Expressed in Neurones throughout the Brain and Its Expression Is Unaltered by Fasting. PLoS ONE 6(11): e27968.
37. Wang P, Yang F, Du H, *et al.* (2011) Involvement of Leptin Receptor Long Isoform (LepRb)-STAT3 Signaling Pathway in Brain Fat Mass and Obesity-Associated (FTO) Down regulation during Energy Restriction. Mol Med 17(5-6):523-532.
38. Cheung MK, Gulati P, O'Rahilly S, *et al.* (2013) FTO expression is regulated by availability of essential amino acids. International Journal of Obesity 37: 744-747.
39. Gulati P, Cheung MK, Antrobus R, *et al.* (2013) Role for the obesity-related FTO gene in the cellular sensing of amino acids. Proc Natl Acad Sci. 110(7):2557-2562.
40. Loos JFR, Yeo SHG. (2014) The bigger picture of FTO-the first GWAS-identified obesity gene. Nature Reviews Endocrinology 10:51-61.
41. Ma M, Harding HP, O' Rahilly S. (2012) Kinetic analysis of FTO (fat mass and obesity-associated) reveals that it is unlikely to function as a sensor for 2 oxoglutarate. Biochem J. 444(2):183-187.
42. Han Z, Niu T, Chang J, *et al.* (2010) Crystal structure of FTO protein reveals basis for its substrate specificity. Nature. 464(7292):1205-1209.
43. Den Hoed M, Westerterp-Plantenga MS, Bouwman FG, *et al.* (2009) Postprandial responses in hunger and satiety are associated with the rs9939609 single nucleotide polymorphism in FTO. Am J Clin Nutr. 90:1426-1432.

44. Wu Q, Saunders RA, Szkudlarek-Mikho M, *et al.* (2010) The obesity-associated Fto gene is a transcriptional coactivator. *Biochem Biophys Res Commun.* 401(3): 390-395.
45. Rask-Andersen M, Sällman-Almén M, Olausen HR, *et al.* (2011) Functional coupling analysis suggests link between the obesity gene FTO and the BDNF/NTRK2 signaling pathway. *BCM Neurosci* 12:117-125.
46. Karra E, O'Daly G, Choudhury AI, *et al.* (2013) A link between FTO, ghrelin, and impaired brain food-cue responsivity. *J Clin Invest* 123(8):3539-3551.
47. Berulava T, Horsthemke B. (2010) The obesity-associated SNPs in intron 1 of the FTO gene affect primary transcript levels. *Eur J Hum Genet* 18:1054-1056.
48. Stratigopoulos G, LeDuc CA, Cremona ML. (2011) Cut-like homeobox 1 (CUX1) regulates expression of the fat mass and obesity-associated and retinitis pigmentosa GTPase regulator-interacting protein-1-like (RPGRIP1L) genes and coordinates leptin receptor signaling. *J Biol Chem.* 286(3):2155-2170.
49. Church C, Moir L, McMurray F, *et al.* (2010) Overexpression of Fto leads to increased food intake and results in obesity. *Nat Genet.* 42(12):1086-1092.
50. Liu G, Zhu H, Lagou V, *et al.* (2010) FTO variant rs9939609 is associated with body mass index and waist circumference, but not with energy intake or physical activity in European- and African-American youth. *BMC Medical Genetics* 11:57-68.
51. Hasselbalch AL, Ängquist L, Christiansen L, *et al.* (2010) A Variant in the Fat Mass and Obesity-Associated Gene (FTO) and Variants near the Melanocortin-4 Receptor Gene (MC4R) Do Not Influence Dietary Intake. *J Nutr.* 140(4):831-834.
52. Hakanen M, Raitakari OT, Lehtimäki T, *et al.* (2009) FTO genotype is

associated with body mass index after the age of seven years but not with energy intake or leisure-time physical activity. *J Clin Endocrinol Metab.*94:1281-1287.

53. Cecil JE, Tavendale R, Watt P, *et al.* (2008) An obesity-associated FTO gene variant and increased energy intake in children. *N Engl J Med.* 359:2558-2566.

54. Timpson NJ, Emmett PM, Frayling TM, *et al.* (2008) The fat mass-and obesity-associated locus and dietary intake in children. *Am J Clin Nutr.*88:971-978.

55. Speakman JR, Rance KA, Johnstone AM. (2008) Polymorphisms of the FTO gene are associated with variation in energy intake, but not energy expenditure. *Obesity (Silver Spring).*16:1961-1965.

56. Wardle J, Carnell S, Haworth MAC, *et al.* (2008) Obesity associated genetic variation in FTO is associated with diminished satiety. *J Clin Endocrinol Metab.* 93:3640-3643.

57. Tanofsky-Kraff M, *et al.* (2009) The FTO gene rs9939609 obesity-risk allele and loss of control over eating. *Am J Clin Nutr.* 90:1483-1488.

58. Kilpeläinen TO, Qi L, Brage S, *et al.* (2011) Physical Activity Attenuates the Influence of FTO Variants on Obesity Risk: A Meta-Analysis of 218,166 Adults and 19,268 Children. *PLOS Medicine* 8(11):e1001116.

59. Hess ME, Brüning JC. (2014) The fat mass and obesity-associated (FTO) gene: Obesity and beyond? *Biochimica and Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 842(10):2039-2047.

60. Pruunsild P, Kazantseva A, Aid T, *et al.* (2007) Dissecting the human BDNF locus: Bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters. *Genomics* 90(3): 397-406.

61. Reichardt, LF. (2006). Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 361:1545-1564.
62. Nakahashi T, Fujimura H, Altar CA, *et al.* (2000) Vascular endothelial cells synthesize and secrete brain-derived neurotrophic factor. *FEBS Lett* 470:113-117.
63. Kerschensteiner M, Gallmeier E, Behrens L, *et al.* (1999) Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? *J Exp Med* 189:865-870.
64. Matthews VB, Aström MB, Chan MH. (2009) Brain-derived neurotrophic factor is produced by skeletal muscle cells in response to contraction and enhances fat oxidation via activation of AMP-activated protein kinase. *Diabetologia* 52(7):1409-1418.
65. Pan W, Banks WA, Fasold MB, *et al.* (1998) Transport of brain-derived neurotrophic factor across the blood brain barrier. *Neuropharmacology* 37:1553-1561.
66. Karege F, Schwald M, Cisse M. (2002) Postnatal developmental profile of brain derived neurotrophic factor in rat brain and platelets. *Neurosci Lett.* 328:261-328:
67. Rasmussen P, Brassard P, Adser H, *et al.* (2009) Evidence for a release of brain-derived neurotrophic factor from the brain during exercise. *Exp Physiol.* 94(10):1062-1069.
68. Hohenadel MG, Thearle MS, Grice BA, *et al.* (2014) Brain-derived neurotrophic factor in human subjects with function-altering melanocortin-4 receptor variants. *Int J Obes (Lond).* 38(8):1068-1074.

69. Goodman LJ, Valverde J, Lim F, *et al.* (1996) Regulated release and polarized localization of BDNF in hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci* 7:222-238.
70. Marosi K, Mattson MP (2014) BDNF mediates adaptive brain and body responses to energetic challenges. *Trends Endocrinol Metab.* 25(2):89-98.
71. Rodríguez-Tebar A, Dechant G, Barde YA. (1990) Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve growth factor receptor. *Neuron* 4:487-492.
72. Phillips C, Baktir MA, Srivatsan M, *et al.* (2014) Neuroprotective effects of physical activity on the brain: a closer look at trophic factor signaling. *Front Cell Neurosci.* 8: 170.
73. Rosas-Vargas H, Martínez-Ezquerro JD, Bienvenu T (2011) Brain-derived neurotrophic factor, food intake regulation, and obesity. *Arch Med Res* 42(6):482-494.
74. Rios M, Fan G, Fekete C. (2001) Conditional deletion of brain-derived neurotrophic factor in the postnatal brain leads to obesity and hyperactivity. *Mol Endocrinol.* 15(10):1748-1757.
75. Xu B, Goulding EH, Zang K, *et al.* (2003) Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nat Neurosci* 6:736-742.
76. Richard D (1993) Involvement of corticotropin-releasing factor in the control of food intake and energy expenditure. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 697:155-172.
77. Spina M, Merlo-Pich E, Chan RK, *et al.* (1996) Appetite-suppressing effects of urocortin, a CRF-related neuropeptide. *Science* 273:1561-1564.

78. Sainsbury A, Shi YC, Zhang L, *et al.* (2010) Y4 receptors and pancreatic polypeptide regulate food intake via hypothalamic orexin and brain-derived neurotrophic factor dependent pathways. *Neuropeptides* 44:261-268.
79. Bariohay B, Lebrun B, Moyse E, *et al.* (2005) Brain-derived neurotrophic factor plays a role as an anorexigenic factor in the dorsal vagal complex. *Endocrinology* 146:5612-5620.
80. Wang C, Bomberg E, Billington C, *et al.* (2007) Brain-derived neurotrophic factor in the hypothalamic paraventricular nucleus reduces energy intake. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 293:R1003-1012.
81. Rios M (2013) BDNF and the central control of feeding: accidental bystander or essential player? *Trends Neurosci.* 36(2):83-90.
82. Ribasés M, Gratacòs M, Armengol L (2003) Met66 in the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) precursor is associated with anorexia nervosa restrictive type. *Mol Psychiatry.* 8(8):745-751.
83. Shugart YY, Chen L, Day INM, *et al.* (2009) Two British women studies replicated the association between the Val66Met polymorphism in the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and BMI. *European Journal of Human Genetics* 17:1050-1055.
84. Chen ZY, Ieraci A, Teng H, *et al.* (2005). Sortilin controls intracellular sorting of brain-derived neurotrophic factor to the regulated secretory pathway. *J Neurosci* 25:6156-6166.
85. Beckers S, Peeters A, Zegers D, *et al.* (2008) Association of the BDNF Val66Met variation with obesity in women. *Molecular Genetics and Metabolism* 95(1-2):110-112.

86. Ma X, Qiu W, Smith CE, *et al.* (2012) Association between BDNF rs6265 and Obesity in the Boston Puerto Rican Health Study. *Journal of Obesity* 12:1-8.
87. Arija V, Ferrer-Barcala M, Aranda N, *et al.* (2010) BDNF Val66Met polymorphism, energy intake and BMI: a follow-up study in schoolchildren at risk of eating disorder. *BMC Public Health* 10:363 -374
88. Lin L, Hales CM, Garber K, *et al.* (2014) Fat mass and obesity-associated (FTO) protein interacts with CaMKII and modulates the activity of CREB signaling pathway. *Human Molecular Genetics* 23(12): 3299-3306.
89. Briefel RR, Sempos CT, McDowell MA, *et al.* (1997) Dietary methods research in the third National Health and Nutrition Examination Survey: underreporting of energy. *Am J Clin Nutr.*65(suppl):I203S-9S.
90. Suverza A, Haua K. (2010) El ABCD de la evaluación del Estado de Nutrición. McGraw Hill.331 pp.
91. Szymon S, Bik-Multanowski M, Balwierz W, *et al.* (2011) Homozygosity for the rs9939609T allele of the FTO gene may have protective effect on becoming overweight in survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Journal of genetics.* 90(2): 365-368.
92. Ortega-Azorín C, Sorlí JV, Asensio EM, *et al.* (2012) Associations of the FTO rs9939609 and the MC4R rs17782313 polymorphisms with type 2 diabetes are modulated by diet, being higher when adherence to the Mediterranean diet pattern is low. *Cardiovascular Diabetology.* 11:137-149.
93. Nammi S, Koka S, Chinnala KM, Boini KM. (2004). Obesity: An overview on its current perspectives and treatment options. *Nutrition Journal* 14(3):3-11.

94. Shi H, Seeley RJ, Clegg DJ (2009) Sexual differences in the control of energy homeostasis. *Frontiers in Neuroendocrinology* 30(3):396-404.
95. Nieman DC (1999) Exercise testing and prescription: A health-related approach. En: Lee and Nieman *Nutritional Assessment*, 2007, p201.
96. Bourges H, Casanueva E, Rosado JL. (2008) Recomendaciones de ingestión de nutrimentos para la población mexicana. Bases fisiológicas. Energía, proteínas, lípidos, hidratos de carbono, fibra. México: Editorial Médica Panamericana.
97. Foster GD, Wyatt HR, Hill JO, *et al.* (2008) A randomized trial of a low carbohydrate diet for obesity. *N Engl J Med.* 348:2082-2090.
98. Shai I, Schwarzfuchs D, Henkin Y, *et al.* (2008) Weight loss with a low carbohydrate, Mediterranean, or low-fat diet. *N Engl J Med.* 359: 229-241.
99. Dougkas A, Yaqoob P, Givens IG, *et al.* (2013) The impact of obesity-related SNP on appetite and energy intake. *British Journal of Nutrition* 110:1151-1156.
100. McCaffery JM, Papandonatos GD, Peter I, *et al.* (2012) Obesity susceptibility loci and dietary intake in the Look AHEAD Trial. *Am J Clin Nutr.* 95:1477-1486.
101. Johansson G, Wikman A, Ahren AM, *et al.* (2001) Underreporting of energy intake in repeated 24-hour recalls related to gender, age, weight status, day of interview, educational level, reported food intake, smoking habits and area of living. *Public H Health Nutr.*4: 919-927.
102. Perkovic MN, Mustapic M, Pavlovic M, *et al.* (2013) Lack of association between brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism and body mass index change over time in healthy adults. *Neurosci Lett.* 17(545):127-131.

103. Gunstad J, Schofield P, Paul RH, *et al.* (2006) BDNF Val66Met polymorphism is associated with body mass index in healthy adults. *Neuropsychobiology*. 53(3):153-6.
104. Egan MF, Kojima M, Callicot JH, *et al.* (2003) The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell* 112(2):257-269.
105. Lang UE, Hellweg R, Sander T, *et al.* (2009) The Met allele of the BDNF Val66Met polymorphism is associated with increased BDNF serum concentrations. *Molecular Psychiatry* 14:120-122.
106. Suriyaprom K, Tungtrongchitr R, Thawnasom K. (2014) Measurement of the levels of leptin, BDNF associated with polymorphisms *LEP* G2548A, *LEPR* Gln223Arg and *BDNF* Val66Met in Thai with metabolic syndrome. *Diabetol Metab Syndr*. 6:6-15.
107. Terracciano A, Grazia Piras M, Lobina M, *et al.* (2013) Genetics of serum BDNF: Meta-analysis of the Val66Met and genome-wide association study. *World J Biol Psychiatry*. 14(8):583-589.
- 108: Araya AV, Orellana X, Espinoza J. (2008) Evaluation of the effect of caloric restriction on serum BDNF in overweight and obese subjects: preliminary evidences. *Endocr* 33:300-304.
109. El-Gharbawy AH, Adler-Wailes DC, Mirch MC, *et al.* (2006) Serum Brain-Derived Neurotrophic Factor Concentrations in Lean and Overweight Children and Adolescents. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 91(9):3548-3552.

110. Monteleone P, Tortorella A, Martiadis V. (2004) Opposite changes in the serum brain-derived neurotrophic factor in anorexia nervosa and obesity. *Psychosom Med.* 66(5):744-748.
111. Shahid A, Rana S, Shahid S, *et al.* (2013) Common Variant of FTO Gene, rs9939609, and Obesity in Pakistani Females. *BioMed Research International.* 2103:1-7.
112. Kring SII, Holst C, Zimmermann E, *et al.* (2008) FTO gene associated fatness in relation to body fat distribution and metabolic traits throughout a broad range of fatness, *PLoS ONE.* 3(8):1-7.
113. Power ML, Schulkin J. (2008) Sex differences in fat storage, fat metabolism, and the health risks from obesity: possible evolutionary origins. *Br J Nutr.* 99(5):931-40.

ANEXO I



**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD**

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN EL PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

“Efecto del polimorfismo rs9939609 del gen FTO sobre la concentración periférica de BDNF y la ingesta calórica”

Registro CNIC R-2012-785-057

México, D.F. a _____ de _____ de 201__

PROPÓSITO DEL ESTUDIO

La obesidad es una enfermedad que se desarrolla por diferentes causas entre las que se encuentran una alimentación excesiva y la falta de ejercicio, pero también tiene causas hereditarias que varían en cada persona. Es por ello que resulta importante explorar los posibles cambios hereditarios también llamados genéticos que puedan representar una mayor predisposición para el desarrollo de la obesidad.

En este caso, lo estamos invitando a participar en un estudio de investigación en el que se analizará la relación entre estos cambios genéticos relacionados con la obesidad y su asociación con la forma en que cada persona piensa sobre su alimentación. Este estudio se lleva a cabo en la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana del Centro Médico Nacional Siglo XXI. Al igual que a usted, se invitará a todos los trabajadores de los Hospitales de este Centro Médico que quieran participar.

Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Por favor, lea la información que le proporcionamos y haga las preguntas que desee antes de decidir si desea o no participar.

PROCEDIMIENTOS

Al participar en este proyecto implica su colaboración con una persona capacitada y autorizada por el investigador responsable para:

a) Tomar sus medidas corporales que incluyen estatura y circunferencia de cintura, así como el peso corporal. De esta manera conoceremos si su peso es normal o si tiene el exceso de peso propio de la obesidad. También se le realizarán preguntas en relación a sus actividades físicas y sobre sus antecedentes clínicos como parte del estudio. Toda la información se mantendrá confidencial, es decir, sólo la investigadora responsable y los

colaboradores autorizados que participan en el estudio conocerán estos datos y no tendrán permitido comunicárselo a nadie más.

b) Llenar tres recordatorios de alimentación de 24 horas para lo que se le proporcionarán los formatos necesarios y se le darán instrucciones precisas. Este cuestionario nos permitirá calcular cuánta energía (calorías) en forma de alimentos consume en un día normal.

c) Contestar un cuestionario sobre conductas de la alimentación (S-EDÉ-Q). Este cuestionario nos permitirá saber cómo es que piensa sobre su manera de alimentarse. Se le darán las instrucciones para contestarlo y una vez que no tenga dudas podrá hacerlo por usted mismo. Los resultados obtenidos serán confidenciales.

d) Tomar una muestra de 10 ml de sangre (equivalen aproximadamente a dos cucharadas) de la vena de uno de sus brazos. Para esto se le pedirá que acuda en ayuno de 10-12 horas. Este procedimiento no representa ningún riesgo salvo una leve molestia local. A partir de la muestra de sangre se obtendrá el material hereditario también conocido como material genético, que es la información contenida en cada ser humano que determina las características de cada persona como el color del pelo y la piel; y se transiere de padres a hijos, la mitad de la madre y la mitad del padre. Al obtener este material genético podremos conocer una pequeña parte de esa información y analizar si tiene relación con la obesidad y la alimentación. Ya que se trata de un proceso difícil de realizar, en este estudio sólo analizaremos una mínima parte de esta información genética; sin embargo, si usted lo autoriza, podremos guardar parte del material genético durante diez años más para estudios futuros relacionados con este que nos permitan analizar otra parte de la información.

Toda la información obtenida del material genético y el material genético en sí se manejará mediante un código en lugar de su nombre que aseguren su confidencialidad y se mantendrán bajo resguardo por la investigadora responsable en la Unidad de Investigación en Genética Humana. Una vez que pase el tiempo por el que se autorice el uso de este material, o en caso de que decida retirarse del estudio, el material genético se desintegrará mediante la utilización de productos químicos, siguiendo las normas de seguridad del Hospital.

POSIBLES RIESGOS Y MOLESTIAS

Las mediciones de peso y talla son métodos que no ocasionan dolor, incomodidad o riesgo alguno. Las molestias durante la toma de muestra de sangre puede causar un poco de dolor o una pequeña molestia. En algunos casos es posible que se le pueda formar un moretón.

POSIBLES BENEFICIOS POR PARTICIPAR EN EL ESTUDIO

No recibirá pago alguno por su participación en este estudio, ni este estudio implica gasto alguno para usted.

Su participación en este estudio no significa un beneficio directo para usted pero sí es importante para una mejor comprensión de la obesidad, con lo que la población en general se podrá beneficiar en un futuro.

RESULTADOS

No se le proporcionarán los resultados de los estudios que se realicen con la muestra de sangre, ya que no son una prueba diagnóstica ni su conocimiento altera las recomendaciones que se le puedan hacer para mejorar su condición de salud. Sin embargo, a partir de las medidas corporales se le informará si su peso representa un riesgo para su salud y se le canalizará para su tratamiento en su clínica correspondiente.

PARTICIPACIÓN O RETIRO

Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Si usted decide no participar, seguirá recibiendo la atención médica brindada por el IMSS como derechohabiente o trabajador. Se le ofrecerán los procedimientos establecidos dentro de los servicios de atención médica del IMSS, es decir, que si usted no desea participar en el estudio su decisión no afectará su relación con el IMSS y su derecho a obtener los servicios de salud u otros servicios que recibe del IMSS.

Si en un principio desea participar y posteriormente cambia de opinión, usted puede abandonar el estudio en cualquier momento. El abandonar el estudio en el momento que quiera no modificará de ninguna manera los beneficios que usted tiene como derechohabiente del IMSS. Para los fines de esta investigación sólo utilizaremos la información que usted nos brinde desde el momento en que acepte participar hasta el momento en que nos haga saber que ya no desea participar, si esto llega a ocurrir.

PRIVACIDAD Y CONFIDENCIALIDAD

Las muestras y toda la información sobre su persona proporcionada al investigador, o derivada de los análisis se mantendrán bajo resguardo del investigador responsable y se manejarán con una clave o código para mantener su anonimato.

El equipo de investigadores involucrados en este estudio sabrán de su participación, sin embargo nadie más tendrá acceso a la información que usted nos proporcione durante su participación en este estudio al menos que usted así lo desee. Sólo proporcionaremos su

información si fuera necesario para proteger sus derechos o su bienestar, o si lo requiere la ley.

Cuando los resultados de este estudio sean publicados o presentados en conferencias, no se dará información que pudiera revelar su identidad. Su identidad siempre se mantendrá protegida y oculta, para lo que asignaremos un número o código que utilizaremos para identificar sus datos y que utilizaremos en lugar de su nombre.

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Se me ha explicado con claridad en qué consiste este estudio, además he leído (o alguien me ha leído) el contenido de este formato de consentimiento. Se me ha dado la oportunidad de hacer preguntas y todas mis preguntas han sido contestadas a mi satisfacción. Se me ha dado copia de este formato.

Al firmar este formato estoy de acuerdo en participar en la investigación que aquí se describe.

Para el estudio de genes, por favor marque con una X la caja a la izquierda de la opción que corresponda a su decisión:

<input type="checkbox"/>	Si autorizo que se tome la muestra para este estudio y estudios futuros.
<input type="checkbox"/>	Si autorizo que se tome la muestra sólo para este estudio.

Nombre y firma del participante

Fecha

FIRMA DEL ENCARGADO DE OBTENER EL CONSENTIMIENTO INFORMADO

Le he explicado el estudio de investigación al participante y he contestado todas sus preguntas. Considero que comprendió la información descrita en este documento y libremente da su consentimiento a participar en este estudio de investigación.

Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento

Fecha

