



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ASOCIACIÓN DE AMINOÁCIDOS CON SOBREPESO, OBESIDAD Y
COMPLICACIONES METABÓLICAS EN UNA POBLACIÓN INFANTIL
MEXICANA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

ELVIRA ZURISADAI OCAMPO MEDINA

DIRECTOR DE TESIS

DRA. SOFÍA MORÁN RAMOS



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2017



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Carmen Adriana Mendoza Rodríguez**

VOCAL: **Profesor: Ignacio Camacho Arroyo**

SECRETARIO: **Profesor: Sofía Morán Ramos**

1er. SUPLENTE: **Profesor: Marisol Hernández Salas**

2° SUPLENTE: **Profesor: Ignacio González Sánchez**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN LA UNIDAD DE GENÓMICA DE POBLACIONES APLICADA A LA SALUD INMEGEN – FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Sofía Morán Ramos

SUSTENTANTE:

Elvira Zurisadai Ocampo Medina

ÍNDICE

RESUMEN	1
I. ANTECEDENTES	2
1. Sobrepeso y obesidad en niños	2
1.1 Evaluación del sobrepeso y la obesidad	2
1.2 Prevalencia en México	3
2. Complicaciones metabólicas asociadas	3
2.1 Síndrome metabólico	4
2.2 Resistencia a la insulina	4
2.3 Dislipidemias	5
3. Metabolómica	6
3.1 Campos de estudio	6
3.2 Aplicaciones en el estudio de sobrepeso y obesidad	7
4. Perfil de aminoácidos en sobrepeso y obesidad	7
4.1 Estudios de metabolómica en adultos	7
4.2 Estudios de metabolómica en niños	8
5. Aminoácidos de cadena ramificada (BCAA) y complicaciones metabólicas	9
5.1 BCAA y resistencia a la insulina	9
5.2 Mecanismos moleculares relacionados con resistencia a la insulina y BCAA	9
5.3 BCAA y otras alteraciones metabólicas	12
II. JUSTIFICACIÓN	13
III. HIPÓTESIS	13
IV. OBJETIVOS	13
V. METODOLOGÍA	14
1. Población de estudio	14
2. Mediciones antropométricas	14
3. Mediciones de parámetros bioquímicos	15
4. Mediciones de metabolómica	15
4.1 Preparación de las muestras	15
4.2 Análisis de las muestras en espectrometría de masas	16

4.3 Análisis preliminar.....	16
5. Análisis estadístico.....	17
VI. RESULTADOS	19
1 Parámetros antropométricos y bioquímicos.....	19
2. Clasificación por estado nutricional	21
3. Metabolómica.....	23
3.1 Aminoácidos	23
3.2 Acilcarnitinas	25
4. Asociación de metabolitos séricos con rasgos de alteraciones metabólicas	29
4.1 Aminoácidos y rasgos de alteraciones metabólicas	29
4.2. Acilcarnitinas y rasgos de alteraciones metabólicas	31
5. BCAA, AA y alteraciones metabólicas.....	33
VII. DISCUSIÓN	35
VIII. CONCLUSIONES	45
IX. REFERENCIAS	46

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Clasificación del estado nutricional en niños

Tabla 2. Parámetros antropométricos y bioquímicos agrupados por sexo.

Tabla 3. Parámetros antropométricos y bioquímicos agrupados por edad

Tabla 4. Parámetros antropométricos agrupados de acuerdo al estado nutricional

Tabla 5. Parámetros bioquímicos agrupados de acuerdo al estado nutricional

Tabla 6. Clasificación estructural de las acilcarnitinas

Tabla 7. Correlaciones parciales entre parámetros antropométricos, bioquímicos y niveles séricos de aminoácidos

Tabla 8. Correlaciones parciales entre parámetros antropométricos, bioquímicos y niveles séricos de acilcarnitinas

Tabla 9. Distribución de la población en función del estado metabólico

Tabla 10. Comparación en niveles de aminoácidos en niños con resistencia a la insulina e hipertrigliceridemia.

Figura 1. Prevalencia nacional de sobrepeso y obesidad en población de 5 a 11 años de edad en México.

Figura 2. Niveles séricos de aminoácidos.

Figura 3. Niveles séricos de acilcarnitinas de cadena corta.

Figura 4. Niveles séricos de acilcarnitinas de cadena media y larga.

RESUMEN

El sobrepeso y la obesidad infantil se asocian con diferentes anormalidades metabólicas como hiperglicemia, hipertrigliceridemia y resistencia a la insulina. Estas alteraciones pueden conducir al desarrollo de enfermedades en la edad adulta como diabetes mellitus tipo 2. Aunque el sobrepeso y la obesidad son los principales factores involucrados en el desarrollo de complicaciones metabólicas, se ha propuesto otros factores que también podrían estar involucrados en el desarrollo de las mismas.

La metabolómica ha surgido como una alternativa para identificar biomarcadores de riesgo de alteraciones metabólicas que puedan servir tanto para su prevención como para su tratamiento. En niños se han identificado perfiles metabolómicos, particularmente de aminoácidos, asociados con el sobrepeso, la obesidad y comorbilidades relacionadas.

En este estudio, se buscó identificar un perfil metabolómico asociado con el sobrepeso, la obesidad y las principales alteraciones metabólicas que se presentan en la población infantil mexicana. Para ello, se realizaron mediciones antropométricas, bioquímicas y metabolómicas (por espectrometría de masas) en niños de 5 a 12 años.

Los niveles séricos de los aminoácidos de cadena ramificada (leucina y valina) y los aromáticos (fenilalanina y tirosina) fueron mayores en niños con percentiles de índice de masa corporal más altos y se asociaron con un mayor porcentaje de grasa, mayor índice HOMA (resistencia a la insulina) y mayores niveles séricos de triglicéridos, colesterol LDL (C-LDL) y ácido úrico. Además, los elevados niveles de los aminoácidos de cadena ramificada y aromáticos pudieron diferenciar a los niños con resistencia a la insulina e hipertrigliceridemia de los niños sin ninguna de estas alteraciones.

En conclusión, el uso de la metabolómica en el estudio de sobrepeso, obesidad y alteraciones metabólicas parece ser una buena aproximación para identificar metabolitos asociados no solo al estado nutricional sino también a la prevalencia de las anormalidades metabólicas, pues éstas podrían presentarse incluso en niños que no presenten sobrepeso ni obesidad.

I. ANTECEDENTES

1. Sobrepeso y obesidad en niños

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), el sobrepeso y la obesidad se definen como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud. Su prevalencia ha aumentado considerablemente en los últimos años hasta considerarse como una epidemia mundial, reportándose alrededor de 1 billón de adultos con sobrepeso y al menos 300,000 millones de ellos con obesidad (Ghoorah, et. al., 2016).

El sobrepeso y la obesidad se asocian con aumento en la morbilidad y en el riesgo del padecimiento de otras enfermedades crónicas (COFEMER, et. al., 2012). Aunque la obesidad está caracterizada por un desbalance energético debido a una vida sedentaria, un alto consumo de calorías o ambos (National Institutes of Health, 1998), se considera una enfermedad multifactorial pues resulta de una compleja interacción entre los aspectos genéticos, dietarios, sociales y ambientales (Kiess, et. al., 2001).

1.1 Evaluación del sobrepeso y obesidad

La prevalencia de sobrepeso y obesidad ha sido comúnmente determinada a través del Índice de Masa Corporal (BMI, por sus siglas en inglés) que toma en cuenta el peso y la altura de un individuo (McKinney, et. al., 2013). En niños y adolescentes esta evaluación debe estar controlada por la edad y el género debido a la gran cantidad de cambios en la grasa corporal que hay conforme a la edad y a que la cantidad de grasa difiere entre niños y niñas. Es por esto que para los niños la clasificación del estado nutricional se basa en el percentil de BMI (Tabla 1) conforme a lo establecido por la CDC (Center for Disease Control and Prevention).

Tabla 1. Clasificación del estado nutricional en niños por percentil de índice de masa corporal

Percentil de BMI	<5	5-85	85-95	>95
Estado Nutricional	Bajo Peso	Normopeso	Sobrepeso	Obesidad

1.2 Prevalencia en México

En el 2011, México se ubicó en el cuarto lugar de los países con mayor índice de obesidad infantil en el mundo (Sassi, et. al., 2012; COFEMER, et. al., 2012)

En el 2012, la ENSANUT realizó un comparativo de la prevalencia nacional de sobrepeso y obesidad en niños y adolescentes y se observó que hubo un aumento de niños con sobrepeso y obesidad en el año 2006 comparado con el año 1999, pero que el porcentaje permaneció prácticamente igual entre los años 2006 y 2012 (Encuesta Nacional de Salud y Nutrición, et. al., 2012).

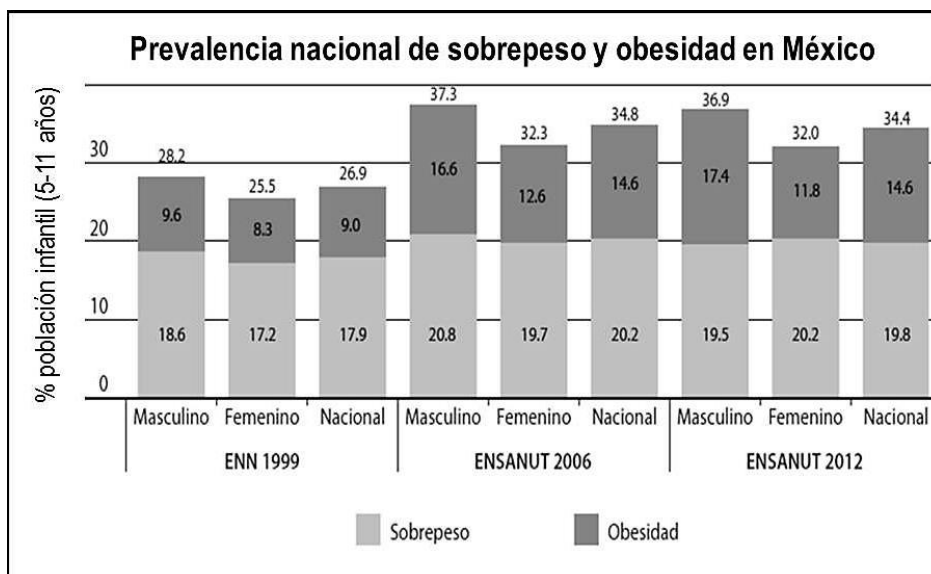


Figura 1. Prevalencia nacional de sobrepeso y obesidad en población de 5 a 11 años de edad, de la Encuesta Nacional de Nutrición (ENN) 99 y la Encuesta Nacional de la Salud y Nutrición (ENSANUT) 2006 y ENSANUT 2012, de acuerdo con los criterios propuestos por la OMS. México, ENSANUT 2012

Estas cifras son preocupantes pues se sabe que aproximadamente la mitad de los adolescentes obesos y más de un tercio de niños obesos permanecerán con obesidad en la edad adulta y ésta puede tener un importante efecto a largo plazo en la morbilidad y mortalidad (Wang, et. al., 2006).

2. Complicaciones metabólicas asociadas

En niños existen una serie de factores de riesgo asociados a la prevalencia de sobrepeso y obesidad y que, además, se han relacionado con el desarrollo de enfermedades y complicaciones metabólicas que pueden presentarse en la adultez. Estos factores incluyen aumento en la presión arterial, aumento en los niveles séricos

de glucosa, triglicéridos y colesterol LDL (C-LDL), bajos niveles de colesterol HDL (C-HDL), y aumento de la adiposidad en la parte abdominal (Alberti, et. al., 2009).

2.1 Síndrome metabólico

Una de las principales consecuencias metabólicas del sobrepeso y la obesidad es la manifestación del síndrome metabólico. Aunque se han indicado una serie de parámetros antropométricos y bioquímicos para su diagnóstico, no existe un consenso fijo acerca de los valores de estos parámetros para su diagnóstico en niños y adolescentes (Cook, et. al., 2003; De Ferranti, et. al., 2004; Weiss, et. al., 2004; IDF). No obstante, todas estas clasificaciones propuestas toman en cuenta los niveles de glucosa, triglicéridos y C-HDL, así como la medición de presión arterial y adiposidad abdominal.

2.2 Resistencia a la insulina

Se ha demostrado que la severidad del sobrepeso y la obesidad tienen un efecto adverso en la sensibilidad a la insulina y que esto puede conducir al desarrollo de otras complicaciones metabólicas. Es importante que exista un buen funcionamiento de la insulina pues participa en el metabolismo de macronutrientes como proteínas, lípidos y carbohidratos y en el crecimiento celular.

La resistencia a la insulina es un fallo en la función de la insulina de mediar la captura y almacenamiento de glucosa por parte del músculo y tejido adiposo y la liberación de glucosa por parte del hígado. Esta anormalidad metabólica es el principal conector entre el sobrepeso y la obesidad y el desarrollo de comorbilidades relacionadas, como diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) y dislipidemias (Ho, et. al., 2014; Weiss, et. al., 2008).

Debido a la importancia de la insulina en el control metabólico y al rol que desempeña en el desarrollo de anormalidades metabólicas en sobrepeso y obesidad, se han propuesto diversos métodos para evaluar el grado de resistencia a la insulina. Aun cuando el estándar de oro es la técnica del clamp hiperglucémico-euglucémico (Tfayli, et. al., 2009), se han desarrollado métodos menos invasivos como el modelo de evaluación de homeostasis de resistencia a la insulina (HOMA-IR, por sus siglas en inglés). El HOMA-IR es el método más empleado en la investigación clínica y se calcula

con el producto de los niveles en ayuno de glucosa e insulina, dividido por una constante, conforme a la siguiente ecuación:

$$\text{HOMA} - \text{IR} = \frac{\text{glucosa} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right) * \text{insulina} \left(\frac{\mu\text{U}}{\text{mL}} \right)}{405} \quad (\text{Mathews, et. al., 2009})$$

2.3 Dislipidemias

En sobrepeso y obesidad existe un exceso de tejido adiposo (Faenza, et. al., 2016) y esto puede estar ocasionado tanto por un aumento en la cantidad de adipocitos como en el tamaño de los mismos. La hipertrofia de los adipocitos puede llevar al desbalance en la liberación de hormonas, pues es bien sabido que el tejido adiposo es un órgano endocrino que produce hormonas que participan en la regulación del metabolismo corporal (Janesick, et. al., 2016).

Los individuos con resistencia a la insulina severa se caracterizan por aumento en la deposición de lípidos en los compartimentos viscerales y este incremento está relacionado con un perfil metabólico aterogénico en niños obesos (Bacha, et. al., 2003). A su vez, el almacenamiento de grasa ectópica y el incremento en los niveles de ácidos grasos pueden desencadenar mecanismos celulares intrínsecos y extrínsecos que inhiben la señalización de insulina en músculo e hígado.

La resistencia a la insulina en el tejido adiposo causa disminución en la captura de glucosa y una ineficiente producción de glicerol, impidiendo así la reesterificación de ácidos grasos no esterificados intracelulares. El exceso de ácidos grasos no esterificados llegará al hígado, estimulando así la síntesis de triglicéridos y la producción y liberación de VLDLs. En niños con sobrepeso y obesidad es común observar aumento en la lipólisis basal y en los niveles en circulación de triglicéridos, VLDL, LDL y ApoB. (Miccoli, et. al., 2008). La combinación de niveles séricos anormales de lípidos y lipoproteínas está asociada con un mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares, referidas como 'dislipidemias aterogénicas' (Grundy, 1997).

La resistencia a la insulina promueve que no solo en tejido adiposo, sino también en músculo esquelético haya una disminución en la captura y el metabolismo de la

glucosa, y que en hígado haya un aumento en la liberación de la misma. La captura y oxidación ineficientes de glucosa son consecuencia de la resistencia a la insulina en el músculo, mientras que en el hígado lo es el aumento en la producción de glucosa (Ho, et. al., 2014).

3. Metabolómica

3.1 Campos de estudio

Debido a que ha incrementado el número de niños que padecen complicaciones metabólicas asociadas al sobrepeso y la obesidad, se ha buscado desarrollar técnicas de alta eficiencia que ayuden en la identificación de biomarcadores de riesgo de padecimientos metabólicos. Una de estas técnicas es la metabolómica, la cual consiste en el estudio de moléculas de bajo peso (metabolitos) que son productos del metabolismo celular (Patti, et. al., 2012).

La metabolómica dirigida o *targeted metabolomics*, por su nombre en inglés, es el método en el cual se analiza una determinada lista de metabolitos, usualmente enfocados en una o varias rutas metabólicas relacionadas. Esta aproximación se emplea cuando hay una pregunta específica, de índole bioquímico, relacionada a una fisiopatología. Cuando se trabaja con muestras sanguíneas como plasma o suero, los metabolitos analizados pueden ser empleados como ‘firmas metabólicas’ potenciales de la enfermedad (Roberts, et. al., 2014).

Con el desarrollo de la espectrometría de masas, ahora es posible medir rápidamente miles de metabolitos simultáneamente, a partir de una mínima cantidad de muestra. Adicionalmente, herramientas bioinformáticas y software permiten el análisis comprensible de los metabolitos celulares sin la presencia de sesgos. La aplicación de estas nuevas técnicas ha permitido la elucidación de nuevas rutas metabólicas que están implicadas en el desarrollo de múltiples enfermedades (Patti, et. al., 2012).

3.2 Aplicaciones en el estudio de sobrepeso y obesidad

La metabolómica, como una disciplina emergente para la evaluación del perfil metabólico, puede contribuir a un mejor entendimiento de padecimientos metabólicos y los riesgos clínicos que estos pueden presentar. Asimismo, puede proveer un estimado

en 'tiempo real' del estado de la enfermedad y reflejar los efectos integrados de la genómica, transcriptómica y proteómica, siendo útil como una herramienta no solo de diagnóstico, sino de predicción e incluso de terapéutica para estas enfermedades (Shah, et. al., 2012).

La aplicación de análisis de metabolómica parece ser una estrategia efectiva para la prevención, monitoreo y respuesta al tratamiento de las anomalías metabólicas que se presentan en el sobrepeso y la obesidad, así como para la detección de biomarcadores de riesgo relacionados a estas complicaciones metabólicas. Además, puede ser una buena alternativa para estratificar a los individuos que podrían desarrollar posteriores enfermedades como DM2 o enfermedades cardiovasculares, incluso de manera independiente al grado de sobrepeso u obesidad (Milburn, et. al., 2013).

4. Perfil de aminoácidos en sobrepeso y obesidad

4.1 Estudios de metabolómica en adultos

Estudios de metabolómica realizados en adultos obesos han identificado un perfil metabólico asociado a resistencia a la insulina, diabetes y enfermedades cardiovasculares (Newgard, et. al., 2009; Huffman, et. al., 2009)

Descubrimientos recientes han apuntado al estudio de asociación entre los efectos causados por la resistencia a la insulina y la alteración en el metabolismo intermediario de aminoácidos y lípidos, donde la acumulación mitocondrial de especies lipídicas oxidadas incompletamente ha sido implicada en el desarrollo de resistencia a la insulina (Mihalik, et. al., 2010).

Para el caso de los aminoácidos, se ha observado que un aumento en los niveles en circulación de algunos de ellos, en particular de los aminoácidos de cadena ramificada (BCAA, por sus siglas en inglés) y los aromáticos (AA), se dan en conjunto con la obesidad y con la resistencia a la insulina, a menudo antes del diagnóstico clínico de DM2 (Adams, 2011). Tanto los aminoácidos de cadena ramificada (valina, leucina e isoleucina) como los aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano) son de naturaleza hidrofóbica y no poseen carga a pH 7.

Se sabe que los niveles de BCAA están relacionados al desarrollo de síndrome metabólico y enfermedades cardiovasculares en sujetos obesos (Batch, et. al., 2013) y en diferentes estudios clínicos se ha encontrado un incremento en los niveles de BCAA en circulación que correlaciona positivamente con resistencia a la insulina, el índice HOMA y los niveles de hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}), este último un marcador de altos niveles glicémicos (Fiehn, et. al., 2010; Lynch, et. al., 2014).

Se ha demostrado que el incremento en las concentraciones de BCAA en plasma interrumpe la señalización de insulina a nivel molecular e inhibe el transporte de glucosa. Estos mecanismos subrayan el hecho de que estos aminoácidos pueden promover la resistencia a la insulina. Por ello se ha postulado la existencia de una 'marca' de aminoácidos, incluyendo los BCAA y sus metabolitos (como las acil carnitinas C3 y C5), que correlaciona con resistencia a la insulina en obesidad en adultos (Newgard, et. al., 2009).

4.2 Estudios de metabolómica en niños y adolescentes

En múltiples estudios en niños y adolescentes se ha encontrado asociación positiva de aminoácidos, particularmente los BCAA y AA, con sobrepeso, obesidad y alteraciones metabólicas relacionadas. En una cohorte transversal de niños hispanos se encontraron mayores niveles de los BCAA, AA y las acilcarnitinas C3 y C5 en niños obesos en comparación con niños normopeso (Butte, et. al., 2015). En un estudio longitudinal de niños alemanes se encontró una asociación positiva de los niveles de tirosina con el índice HOMA, tanto al inicio del estudio como en el seguimiento a un año (Hellmuth, et. al., 2016). En adolescentes americanos obesos se asoció el índice HOMA con una 'firma metabólica' compuesta por BCAA, ácido úrico y acilcarnitinas de cadena larga (Newbern, et. al., 2014). En un estudio longitudinal de niños coreanos se encontró que los niños obesos tenían mayores niveles de BCAA y que estos correlacionaban con el índice HOMA (Lee, et. al., 2015). En otro grupo de niños y adolescentes americanos, se asoció positivamente los niveles de BCAA con el z-score del BMI y, además, se señalaron a los BCAA como predictores de resistencia a la insulina en un seguimiento de 18 meses (McCormack, et. al., 2012). Finalmente, en una cohorte de niños americanos se encontró que los BCAA, las acilcarnitinas C3 y C5, los AA y los

andrógenos eran más altos en niños obesos comparados con los normopeso y también se asociaban con mayores índices de adiposidad (Perng, et. al., 2014).

La razón por la cual aumentan los niveles de BCAA en presencia de obesidad aún no se conoce en su totalidad. Una posibilidad es que, debido a que los individuos con sobrepeso y obesidad frecuentemente tienen un mayor consumo de alimentos, estén consumiendo un exceso de proteínas y, de esta manera, aumente la concentración de aminoácidos en circulación (Lynch, et. al., 2014). Otra opción es que la microbiota intestinal, que se ha relacionado con el desarrollo de obesidad en niños, esté produciendo una mayor cantidad de los BCAA y aumente su concentración en circulación (Pedersen, et. al., 2016).

5. Aminoácidos de cadena ramificada (BCAA) y complicaciones metabólicas

5.1 BCAA y resistencia a la insulina

Las anomalías en los niveles séricos de los BCAA pueden ser una manifestación temprana de las consecuencias metabólicas adversas del sobrepeso y la obesidad. Incluso, se han observado niveles elevados de BCAA mucho tiempo antes de que aparezcan indicadores de resistencia a la insulina como el aumento del índice HOMA (Wang, et. al., 2011).

5.2 Mecanismos moleculares relacionados con los BCAA y la resistencia a la insulina

Aun cuando no se han dilucidado totalmente los mecanismos moleculares por los cuales los BCAA se asocian con la resistencia a la insulina, se han postulado algunas hipótesis, las principales son: la señalización de los BCAA a través de mTOR y la disfunción en el metabolismo de los BCAA.

Señalización por mTOR

La diana de rapamicina en mamíferos (mTOR, por sus siglas en inglés) es una cinasa de serina/treonina que regula el crecimiento, la proliferación y la supervivencia celular (Thoreen, et. al., 2009). Tanto mTOR como su efector, la cinasa S6K1, participan en

una cascada de señalización hormonas-nutrientes que está relacionada a patologías como obesidad, diabetes y cáncer (Zoncu, et. al., 2015). mTOR existe en dos complejos: complejo 1 de mTOR (mTORC1) y complejo 2 de mTOR (mTORC2); ambos son estimulados por mitógenos pero solo mTORC1 se ve influenciado por los nutrientes (Dann, et. al., 2007). Se sabe que la hiperactivación de mTORC1, que a su vez activa a S6K1, causa una disminución en la función del sustrato del receptor de insulina (IRS), la cual es una proteína adaptadora que recluta efectores del receptor de insulina. La fosforilación de IRS, mediada por S6K1, lleva a la pérdida de sensibilidad a la insulina (Zoncu, et. al., 2015).

mTORC1 puede ser activado tanto por insulina como por aminoácidos. En sobrepeso y obesidad existe un exceso en la ingesta de nutrientes, lo cual puede resultar en un aumento de los niveles de BCAA que, junto con la insulina, activan la señalización por mTORC1 y S6K1. Cuando esta activación persiste, ocurre la fosforilación de IRS-1 e IRS-2, lo cual lleva a un aumento en la resistencia a la insulina (Adams, 2011). A su vez, el aumento en la resistencia a la insulina activa la proteólisis del músculo, liberando aminoácidos y aumentando de esta manera la concentración de BCAA en circulación (Lynch, et. al., 2014).

Disfuncionalidad en el metabolismo de los BCAA

Además de la activación persistente de mTORC1, se ha propuesto un segundo mecanismo que relacione los altos niveles de BCAA con resistencia a la insulina y el posterior desarrollo de DMT2. De acuerdo a esta hipótesis, la disfunción en el metabolismo de los BCAA podría resultar en la acumulación mitocondrial de intermediarios metabólicos altamente tóxicos. Estos (y nos lo BCAA directamente), causarían daños y muerte de las células pancreáticas y desencadenarían el desarrollo de resistencia a la insulina. Entre estos metabolitos se encuentran los α -cetoácidos y las acilcarnitinas asociadas al metabolismo de los BCAA (Lynch, et. al., 2014).

La apoptosis de las células β pancreáticas es una característica de diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2 (Halban, et. al., 2014; Butler, et. al., 2003). Mientras que, en la DMT1, la muerte de las células β se debe a mecanismos inmunitarios, en la DMT2, el fallo de las

células β y su consecuente apoptosis está más relacionado con las anomalías metabólicas existentes en el organismo y su consecuente elevación de intermediarios metabólicos (Thomas, et. al., 2009).

La disfunción en el metabolismo de los BCAA ocurre cuando hay mal funcionamiento o de las enzimas que participan en su catabolismo o una baja expresión de las mismas. Se sabe que la expresión de genes codificantes de enzimas catabólicas de los BCAA en tejido adiposo visceral está reducida en individuos con síndrome metabólico y obesidad, en comparación con individuos normopeso. (Lynch, et. al., 2014).

El primer paso en el metabolismo de los BCAA está controlado por la transaminasa mitocondrial de los BCAA (BCATm), presente en la mayoría de los tejidos (a excepción del hígado). El siguiente paso en el metabolismo de los BCAA es irreversible y está controlado por la deshidrogenasa de cetoácidos de cadena ramificada (BKCD), la cual oxida a los BCAA a sus respectivos cetoácidos de cadena ramificada (BCKA). Posteriormente, los BCKA son metabolizados en la matriz mitocondrial y eventualmente forman sustratos lipogénicos, cetogénicos o gluconeogénicos (en el caso del hígado).

Las acil-CoAs que se generan durante el catabolismo de los BCAA son convertidas a acilcarnitinas que pueden salir de la célula y transportarse a la circulación si sus concentraciones mitocondriales son muy altas (Newgard, et. al., 2012).

Las acilcarnitinas C5 comprenden las especies α -metilbutiril e isovaleril carnitinas y son intermediarios en el catabolismo de isoleucina y leucina, respectivamente. La acilcarnitina C3, que comprende propionil carnitina, es un producto del catabolismo de isoleucina y valina. Ambas, la C3 y la C5 forman parte de los intermediarios metabólicos que podrían estar siendo tóxicos para las células β pancreáticas y, de esta manera, ser los efectores de la resistencia a la insulina mediada por BCAA (Newgard, et. al., 2009),

Un posible tercer mecanismo es que, dado que se ha demostrado que leucina e isoleucina son secretagogos de insulina, la elevación crónica en la concentración de éstos potenciaría la secreción de insulina contribuyendo así al hiperinsulinismo (McCormack, et. al., 2012; Nair, et. al., 2005).

5.3 BCAA y otras alteraciones metabólicas

Además de resistencia a la insulina, estudios recientes han asociado los niveles de BCAA y otros aminoácidos con el riesgo de padecimientos cardiovasculares. En un estudio realizado en niños de Austria se relacionaron altos niveles de BCAA con aumento de los niveles séricos de triglicéridos (Mangge, et. al., 2016). En una población de niñas finlandesas también se asociaron altos niveles de BCAA con aumento de los niveles séricos de triglicéridos y se propuso que los BCAA podían predecir el riesgo de padecer hipertrigliceridemia en un seguimiento a 7.5 años (Wiklund, et. al., 2016). Además, los BCAA y AA se han visto relacionados con factores de riesgo metabólico como hipertrigliceridemia, hiperleptinemia e hiperuricemia en una cohorte de niños hispanos (Butte, et. al., 2015). En un grupo de niños americanos se asociaron los altos niveles de BCAA con riesgo cardiometabólico como triglicéridos, leptina, proteína C reactiva e interleucina 6 (Perng, et. al., et. al., 2014).

II. JUSTIFICACIÓN

Se sabe que el sobrepeso y la obesidad infantiles son un factor de riesgo para la aparición de comorbilidades como resistencia a la insulina e hipertrigliceridemia, que en edades adultas pueden desembocar en el desarrollo de enfermedades como DMT2 y enfermedades cardiovasculares. Por ello, es importante conocer qué otros factores estarían asociados con el desarrollo de estas comorbilidades. La metabolómica podría proporcionar información “en tiempo real” acerca de las vías metabólicas alteradas en el sobrepeso y la obesidad y de los metabolitos generados bajo estas condiciones. Aun cuando ya han sido realizados estudios de metabolómica en diferentes poblaciones infantiles, ninguno se ha llevado a cabo en niños mexicanos, a pesar de la alta prevalencia de sobrepeso y obesidad existente en esta población.

III. HIPÓTESIS

Los niveles séricos de BCAA y algunas acilcarnitinas estarán elevados en niños con sobrepeso y obesidad y se asociarán con rasgos indicadores de alteraciones metabólicas

IV. OBJETIVOS

Objetivo general

Describir la asociación de los niveles séricos de algunos aminoácidos y acilcarnitinas con el sobrepeso, la obesidad y rasgos indicadores de alteraciones metabólicas en una población infantil mexicana.

Objetivos particulares

- Analizar los parámetros antropométricos y bioquímicos de una población infantil mexicana.
- Medir la concentración en suero de aminoácidos y acilcarnitinas por medio de espectrometría de masas.
- Analizar si hay diferencias en los niveles de aminoácidos entre los diferentes estados nutricionales de los niños (bajo peso, normopeso, sobrepeso y obesidad).

- Evaluar si existe una correlación entre los niveles de aminoácidos y acilcarnitinas y otros parámetros bioquímicos relacionados a complicaciones metabólicas.
- Determinar si estos aminoácidos pueden diferenciar a los niños con alteraciones metabólicas, independientemente del estado nutricional.

V. METODOLOGÍA

1. Población de estudio

Se incluyeron un total de 845 niños que participaron en las convivencias de verano del Sindicato de la Secretaria de la Salud realizadas en los años 2013 y 2014.

Los criterios de inclusión fueron que tuvieran una edad de entre 5 y 12 años, que hubieran tenido un ayuno de al menos 8 horas antes de la toma de muestra sanguínea y que contaran con una carta de consentimiento informado firmada por los padres para la participación en dicho estudio. Los criterios de exclusión fueron que padecieran de alguna enfermedad crónica o que estuvieran tomando algún medicamento para obesidad o diabetes. El estudio fue aprobado por el comité de ética del Instituto Nacional de Medicina Genómica.

La población se dividió en cuatro grupos de estado nutricional, de acuerdo al criterio del percentil de índice de masa corporal (pBMI) propuesto para niños por la CDC: pBMI <5.0 = bajo peso, 5.0 < pBMI < 85.0 = Normopeso, 85.0 < pBMI < 95.0 = sobrepeso y 95.0 < pBMI = Obesidad.

2. Mediciones antropométricas

Durante la convivencia se realizaron las siguientes mediciones antropométricas: talla, peso, diámetro de cadera y cintura. La presión arterial se midió con un baumanómetro digital de muñeca Microlife y la composición corporal se midió por medio de bioimpedancia utilizando el equipo BIA Akem-RJL System.

La talla y el peso se emplearon para determinar el índice de masa corporal mediante la fórmula (Peso en Kg / altura² en cm) y la bioimpedancia permitió el cálculo del porcentaje de grasa corporal con el software RJL System - Body Composition.

Los percentiles de índice de masa corporal se calcularon conforme a los criterios establecidos por la CDC y los percentiles de la presión arterial sistólica y diastólica se calcularon con el programa estadístico SPSS.

3. Medición de parámetros bioquímicos

Se colectaron las muestras de sangre venosa posteriores a un ayuno de 8 a 12 horas. La obtención del suero se obtuvo de la siguiente manera: cada tubo se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos a fin de que el gel contenido en el tubo separara el suero del paquete globular.

Los parámetros bioquímicos: glucosa, colesterol total, colesterol HDL, triglicéridos, ácido úrico, apoB y proteína C reactiva fueron medidos en suero con métodos estandarizados comercialmente disponibles (UNICEL DxC600, Beckman coulter). Con los valores de triglicéridos (TG), colesterol total (CT) y colesterol HDL se calculó el colesterol LDL por medio de la siguiente ecuación (Friedwal, 1972):

$$\text{LDL} = \text{CT} - \text{HDL} - \frac{\text{TG}}{5}$$

La insulina se determinó por medio de un inmunoensayo (Access 2 Immunoassay System, Beckman coulter). La sensibilidad a la insulina se calculó de manera indirecta por medio del índice HOMA, para el cual se emplearon los datos de glucosa e insulina séricas (Mathews, et. al., 2009).

$$\text{HOMA} - \text{IR} = \frac{\text{glucosa} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right) * \text{insulina} \left(\frac{\mu\text{U}}{\text{mL}} \right)}{405}$$

4. Mediciones de metabólica

4.1 Preparación de las muestras

Las muestras de suero se colocaron en fichas de papeles filtro de 5cm x 5cm, poniendo un total de 90 µL de suero en cada papel filtro, distribuidos en tres alícuotas de 30 µL.

Para las muestras que no ajustaban los 90 μL se aseguró que al menos se colocaran los 30 μL necesarios para su medición. Aparte, en un tubo de 10 mL se colocaron 5 μL de cada una de las muestras a analizar para así formar pools de los años 2013 y 2014 que servirían como controles internos al momento de las mediciones. Los papeles filtro se secaron a temperatura ambiente durante 24 horas y se engraparon en hojas de identificación para su acomodo. Se hizo una perforación en cada uno de los papeles, utilizando el DBS Puncher Instrument PerkinElmer, y se colocaron en placas de microtitulación de 96 pozos.

4.2 Análisis de las muestras en espectrometría de masas

Para la medición de las muestras en el espectrómetro de masas se emplearon placas y reactivos pertenecientes al kit PerkinElmer NeoBase Non-derivatized MS/MS. En cada placa se colocaron tres controles analíticos altos, tres controles analíticos bajos y tres controles internos por cada año analizado (pools 2013 y 2014). A cada pozo se le añadieron 100 μL de solución de extracción, la cual contiene los estándares internos de aminoácidos, carnitinas y succinil acetona. Se cubrió la placa con un plástico auto adherente, contenido en el kit y se incubó a 45°C con agitación de 745 rpm durante 45 minutos. Después se dejó reposar a temperatura ambiente durante 3 minutos. Transcurrido este tiempo, las muestras se trasvasaron a placas termo-resistentes con fondo en V y se cubrió con papel aluminio para evitar la evaporación de las muestras. Se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas y finalmente cada placa se introdujo al equipo de espectrometría de masas para su lectura.

El software empleado en el tándem fue MS/MS Quattro Micro® Mass Lynx.

4.3 Análisis preliminar

Los datos fueron capturados en el software Microsoft Office Excel y se realizó un análisis preliminar en el programa estadístico en línea MetaboAnalyst 3.0 para observar el comportamiento de los resultados obtenidos. Los metabolitos que tuvieran valores por arriba de la media en un orden de diez veces eran reprocesados.

Se realizaron gráficas de Levey-Jennings para control de calidad, empleando los controles analíticos altos, los controles analíticos bajos y los controles internos, esto para cada uno de los metabolitos analizados.

Se calculó el coeficiente de variación de los controles analíticos y los controles internos localizados en la misma placa (intraplaca) y en diferentes placas (interplaca) para cada uno de los metabolitos analizados.

5. Análisis estadístico

Una vez completado el análisis previo, los datos se incorporaron a una base de datos en el software estadístico SPSS inc. donde, además de los resultados de aminoácidos y carnitinas, estaban incluidos los resultados de los parámetros antropométricos y bioquímicos previamente medidos y otros datos como edad, sexo, estado nutricional y año de convivencia.

Se realizó la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov para todos los parámetros bioquímicos y metabólicos y para aquellos que no tuvieran una distribución normal se calculó su logaritmo, de tal forma que alcanzaran una distribución normal.

Una vez comprobada la normalidad de los datos, se llevó a cabo la comparación de las medias de cada uno de los parámetros antropométricos, bioquímicos y metabolitos, esto entre los diferentes grupos de estado nutricional, entre los dos grupos de edades y por sexo. La comparación de medias se realizó por medio de las pruebas estadísticas t de student (para comparar dos grupos) y ANOVA de un factor con post hoc de Tukey (para comparar más de dos grupos), para ambas empleando una significancia de 0.05.

Se realizaron correlaciones parciales para identificar la asociación entre los aminoácidos y los parámetros antropométricos y bioquímicos. Para ello se emplearon los datos normalizados por logaritmo de los parámetros antropométricos y bioquímicos y los Z-score de los aminoácidos y acilcarnitinas. Los análisis se ajustaron por el percentil de índice de masa corporal, la edad y el sexo. Para los valores de p obtenidos en las correlaciones parciales, se realizó un ajuste por FDR (False Discovery Rate), que consiste en la corrección de errores de tipo 1 en las pruebas de hipótesis cuando se

realizan comparaciones múltiples. Esta corrección se realiza para identificar los resultados “falsos positivos”.

Posteriormente se llevó a cabo una clasificación de niños “metabólicamente sanos” y “metabólicamente comprometidos” basada en las dos anormalidades metabólicas más frecuentes en la población infantil mexicana: resistencia a la insulina e hipertrigliceridemia. Se empleó un punto de corte de HOMA >2.5 para resistencia a la insulina (Mathews, et. al., 2009) y triglicéridos séricos >100 mg/dL (De Ferranti, et. al., 2004).

Todos los cálculos estadísticos se llevaron a cabo con el programa estadístico SPSS Inc. Las tablas de los resultados se realizaron en Microsoft Office Excel y las gráficas de barras se realizaron con el software estadístico GraphPad Prism.

VI. RESULTADOS

Con el fin de conocer los rasgos de nuestra población, la primera parte de los análisis se realizó para determinar el efecto de la edad, el sexo y el estado nutricional sobre los parámetros antropométricos y bioquímicos.

1. Parámetros antropométricos y bioquímicos

Dado que se sabe que algunos parámetros antropométricos y bioquímicos varían entre niños y niñas (Mongraw-Chaffin, et. al., 2015), se realizó un análisis de acuerdo al sexo.

Como se observa en la tabla 2, la presión arterial sistólica, la circunferencia de cintura y los niveles séricos de glucosa fueron mayores en los niños que en las niñas. El porcentaje de grasa corporal, el índice HOMA y los niveles séricos de insulina y triglicéridos, fueron significativamente mayores en las niñas que en los niños.

Tabla 2. Parámetros antropométricos y bioquímicos agrupados por sexo

Parámetro	Niños	Niñas
n	440	405
Edad	9 (8-11)	9 (8-11)
pBMI	80.6 (47.1-94.7)	71.4 (41.0-89.3)
PAS*	99 (93-107)	98 (91-104)
PAD	69 (64-74)	68 (63-73)
% grasa corporal*	31.4 (23.3-39.8)	33.1 (25.3-40.4)
Cintura (cm)*	67.1 (58.9-77.3)	65.9 (58.7-73.6)
HOMA_IR*	1.24 (0.76-1.95)	1.39 (0.96-2.08)
INS (U/L) *	5.4 (3.5-8.7)	6.2 (4.5-9.3)
GLU (mg/dL) *	91 (87-96)	89 (85-95)
TG (mg/dL) *	80 (56-117)	90 (64-128)
CT (mg/dL)	164 (147-185)	166 (147-186)
C-HDL (mg/dL)	49 (41-56)	48 (41-55)
C-LDL (mg/dL)	97 (83-113)	97 (80-115)
AU (mg/dL)	4.7 (3.9-5.5)	4.7 (4.0-5.4)
pCr (mg/dL)	0.046 (0.010-0.219)	0.040 (0.010-0.119)
ApoB (mg/dL)	76.3 (65.9-88.5)	76.2 (63.8-89.2)

Parámetros antropométricos y bioquímicos agrupados por sexo. Los resultados se presentan como mediana y rango intercuartil. (*) = $p < 0.05$. Prueba t de Student, realizada con datos previamente normalizados por logaritmo. pBMI= percentil de índice de masa corporal. PAS = presión arterial sistólica, PAD = presión arterial diastólica, HOMA-IR=índice HOMA (resistencia a la insulina), GLU = glucosa, INS = insulina, TG = triglicéridos, AU = ácido úrico, CT = colesterol total, C-HDL= Colesterol HDL, C-LDL= Colesterol LDL, pCr = Proteína C reactiva, ApoB = Apolipoproteína B

Los parámetros antropométricos y bioquímicos también pueden variar de acuerdo a la edad de los niños, sobre todo cerca de la edad puberal (Newbern, et. al., 2014). Por ello se realizó un análisis estratificando por dos grupos de edad: de 5 a 9 años de edad y de 10 a 12 años de edad, que indica la pre-adolescencia.

Como se observa en la tabla 3, el percentil de índice de masa corporal, el porcentaje de grasa corporal, la circunferencia de cintura, la presión arterial sistólica y diastólica, el índice HOMA y los niveles séricos de insulina y glucosa fueron significativamente más altos en los niños de 10 a 12 años en comparación con los de 5 a 9 años. Por el contrario, los niveles séricos de colesterol total, HDL y LDL fueron significativamente mayores en los niños de 5 a 9 años en comparación con los niños de 10 a 12 años. Los niveles de triglicéridos, no mostraron diferencias significativas.

Tabla 3. Parámetros antropométricos y bioquímicos agrupados por edad

Parámetro	5-9 años	10-12 años
n	459	386
pBMI*	74.8 (41.8-92.7)	77.3 (44.6-92.8)
PAS*	97 (90-102)	102 (96-108)
PAD*	68 (63-72)	69 (64-74)
% grasa corporal*	30.5 (23.4-38.0)	34.3 (25.9-41.8)
HOMA_IR*	1.1 (0.7-1.7)	1.6 (1.1-2.5)
Cintura (cm)*	62.2 (55.5-71.0)	70.6 (64.2-81.1)
INS (U/L)*	5 (3-7)	7 (5-11)
GLU (mg/dL)*	90 (86-94)	91 (86-97)
CT (mg/dL)*	166 (150-186)	164 (146-184)
TG (mg/dL)	81 (55-115)	93 (64-135)
C-HDL(mg/dL)*	49 (42-58)	47 (40-54)
C-LDL(mg/dL)*	99 (83-115)	94 (80-112)
AU(mg/dL)	4.4 (3.8-5.0)	5.2 (4.4-5.9)
pCr (mg/dL)	0.046 (0.010-0.150)	0.041 (0.010-0.178)
ApoB (mg/dL)	76.2 (64.9-89.2)	76.4 (63.0-88.4)

Parámetros antropométricos y bioquímicos agrupados de acuerdo a edad (5-9 y 10-12 años). Los resultados se presentan como medianas y rango intercuartilar. (*) = $p < 0.05$. Prueba t de Student realizada con datos normalizados por logaritmo. pBMI = percentil de índice de masa corporal. PAS = presión arterial sistólica, PAD = presión arterial diastólica, HOMA-IR=índice HOMA (resistencia a la insulina), GLU = glucosa, INS = insulina, TG = triglicéridos, AU = ácido úrico, CT = colesterol total, C-HDL= Colesterol HDL, C-LDL= Colesterol LDL, pCr = Proteína C reactiva, ApoB = apolipoproteína B

De acuerdo a estos resultados, los cálculos posteriores tendrían que ser controlados por la edad y el sexo, puesto que se observan diferencias significativas al clasificar los resultados de acuerdo a estas variables.

2. Clasificación por estado nutricional

Se analizaron un total de 845 niños de 6 a 12 años y se agruparon de acuerdo a su estado nutricional. El 4% de los niños tuvieron bajo peso, un 57.8% fueron normopeso, el 18.6% tuvieron sobrepeso y el 19.6% presentaron obesidad.

Como se observa en la tabla 4, de los parámetros antropométricos analizados, el porcentaje de grasa y la circunferencia de cintura aumentaron significativamente entre los distintos grupos de estado nutricional, teniendo los valores más altos en niños obesos. Para la presión arterial sistólica no hubo diferencias significativas entre los grupos bajo peso y normopeso ni entre los grupos de sobrepeso y obesidad, pero sí entre bajo peso/normopeso y sobrepeso/obesidad. No hubo diferencias entre grupos para la presión arterial diastólica.

Tabla 4. Parámetros antropométricos agrupados al estado nutricional

Parámetro	Bajo Peso	Normopeso	Sobrepeso	Obesidad
n = 845	34 (4.0%)	488 (57.8%)	157 (18.6%)	166 (19.6%)
Sexo	H=16 , M=18	H=231, M=257	H=86, M=71	H=107, M=59
edad	9 (7-10)	9 (7-11)	10 (8-11)	9 (8-11)
pBMI	1.4 (0.6-2.3) a	55.5 (32.5-74.4) b	91.2 (88.1-92.9) c	97.4 (96.1-98.5) c
PAS	95 (84-100) a	97 (90-102) a	102 (97-109) b	105 (112-99) b
PAD	68 (62-72) a	68 (63-72) a	69 (65-75) a	72 (66-77) a
% grasa corporal	14.7 (11.4-18.5) a	26.9 (22.5-32.0) b	38.3 (35.2-41.4) c	45.6 (42.0-49.2) d
pGC	4.5 (2.0-9.3) a	34.0 (19.0-50.0) b	69.0 (58.5-79.0) c	88.0 (80.0-94.3) d
Cintura (cm)	53.1 (50.0-56.3) a	61.2 (56.6-66.8) b	74.5 (68.5-88.6) c	83.4 (76.5-88.8) d

Parámetros antropométricos agrupados de acuerdo al estado nutricional. Los resultados se presentan como mediana y rango intercuartil. ANOVA de un factor con post-hoc tukey realizada con datos normalizados por logaritmo, nivel de significancia 0.05. Para cada parámetro, letras distintas entre grupos indican diferencias significativas (**p<0.05**). pBMI= percentil de índice de masa corporal. PAS = presión arterial sistólica, PAD = presión arterial diastólica, pGC= percentil de grasa corporal.

En el caso de los parámetros bioquímicos, el índice HOMA y los niveles séricos de insulina fueron los únicos que tuvieron diferencias significativas entre todos los estados nutricionales, siendo los valores de los niños obesos los más altos (Tabla 5). En los niveles séricos de triglicéridos y de ácido úrico, no hubo diferencias significativas entre los niños de bajo peso y normopeso, pero sí hubo diferencias con respecto a los grupos de sobrepeso y obesos y también entre estos últimos. En los niveles de glucosa, colesterol total y colesterol LDL solo hubo diferencias significativas entre el grupo de los normopeso y el de los obesos. Para el colesterol HDL se encontraron diferencias significativas entre todos los grupos de estado nutricional excepto entre los niños de sobrepeso y obesos. La proteína C reactiva solo tuvo niveles significativamente mayores en los niños con obesidad en comparación con el resto de los grupos. Para la proteína ApoB, donde solo se contaba con los datos de los niños normopeso y obesos, los niños con obesidad tuvieron niveles significativamente más altos que los de los niños normopeso.

Tabla 5. Parámetros bioquímicos agrupados por estado nutricional

Parámetro	Bajo Peso	Normopeso	Sobrepeso	Obesidad
HOMA	0.85 (0.58-1.14) a	1.12 (0.73-1.51) b	1.55 (1.11-2.44) c	2.45 (1.60-3.71) d
INS (U/L)	3.8 (2.6-5.0) a	5.0 (3.3-6.6) b	7.3 (5.2-10.5) c	10.9 (6.9 16.0) d
GLU (mg/dL)	90 (84-93) ab	90 (86-95) a	90 (86-96) ab	91 (89-97) b
TG (mg/dL)	63 (54-77) a	73 (53-102) a	107 (73-148) b	118 (92-171) c
CT (mg/dL)	160 (146-190) ab	162 (146-181) a	174 (146-195) ab	174 (156-194) b
C-HDL (mg/dL)	56 (47-70) a	51 (44-59) b	44 (38-52) c	43 (37-49) c
C-LDL (mg/dL)	92 (76-112) ab	94 (81-110) a	101 (82-120) ab	104 (92-119) b
AU (mg/dL)	4.1 (3.6-4.7) a	4.5 (3.8-5.1) a	4.9 (4.2-5.8) b	5.3 (4.7-6.3) c
pCr (mg/dL)	0.010 (0.010-0.018) a	0.023 (0.010-0.063) a	0.041 (0.010-0.137) a	0.192 (0.080-0.434) b
ApoB (mg/dL)	-	71.3 (61.3-83.2) a	-	84.2 (73.3-98.6) b

Parámetros bioquímicos agrupados de acuerdo al estado nutricional. Los resultados se presentan como mediana y rango intercuartilar. ANOVA de un factor con post-hoc tukey realizada con datos normalizados por logaritmo, nivel de significancia 0.05. Para cada parámetro, letras distintas indican diferencias significativas entre grupos (**p<0.05**). HOMA =índice HOMA (indicador de resistencia a la insulina), GLU = glucosa, INS = insulina, TG = triglicéridos, AU = ácido úrico, CT = colesterol total, C-HDL= Colesterol HDL, C-LDL= Colesterol LDL, pCr = Proteína C reactiva, ApoB = apolipoproteína B.

3. Metabolómica

3.1 Aminoácidos

En las mediciones de metabolómica se analizaron 11 aminoácidos: Arginina, Citrulina, Glicina, Alanina, Metionina, Leucina, Valina, Fenilalanina, Tirosina, Ornitina y Prolina.

El análisis de metabolitos se realizó por estado nutricional. Como se observa en la figura 2, los aminoácidos de cadena ramificada (valina y leucina) y los aromáticos (fenilalanina y tirosina) tuvieron niveles progresivamente mayores entre los estados nutricionales excepto entre los grupos de bajo peso y normopeso donde no se encontraron diferencias significativas. Prolina fue significativamente mayor solo en el grupo de los niños obesos. Alanina tuvo diferencias significativas entre los niños normopeso y los niños con sobrepeso y obesidad. Arginina tuvo un comportamiento similar, teniendo diferencias significativas entre el grupo de bajo peso y el grupo de obesidad y entre el grupo de normopeso en comparación con los grupos de sobrepeso y obesidad. Ornitina solo mostró diferencias significativas entre los niños normopeso y los niños con obesidad. Citrulina, metionina y glicina no tuvieron diferencias significativas entre ninguno de los grupos.

Niveles séricos de aminoácidos

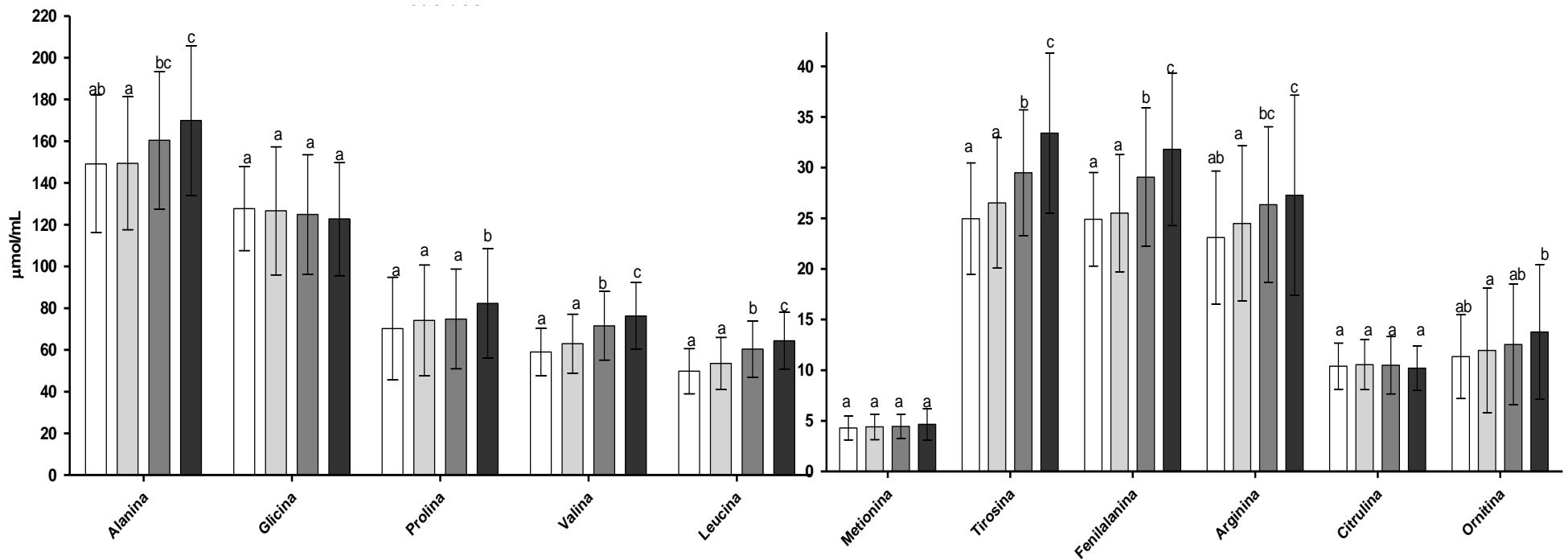


Figura 2. Niveles séricos de aminoácidos. Los resultados se presentan graficados como media y desviación estándar. ANOVA de un factor, post-hoc Tukey, nivel de significancia 0.05, realizado con datos previamente normalizados por logaritmo, Para cada aminoácido, letras diferentes indican que hay diferencias significativas entre grupos ($p < 0.05$).

3.2 Acilcarnitinas

Se midieron un total de 33 acilcarnitinas, de las cuales 18 se excluyeron del análisis porque su mediana estuvo por debajo del límite de sensibilidad del equipo. Para su análisis, las acilcarnitinas se clasificaron de acuerdo a la longitud de su cadena, conforme se muestra en la tabla 6 (Meyburg, et. al., 2001). Para el caso de las acilcarnitinas C5OH y C5DC se midieron también los niveles de sus isómeros estructurales C4DC y C6OH, respectivamente; sin embargo, dado, que el equipo no diferencia entre ambos compuestos, se conjuntaron los resultados como uno solo.

Tabla 6. Clasificación estructural de las acilcarnitinas		
Símbolo	Nombre de la acilcarnitina	Longitud de cadena
C0	Libre	Corta
C3	Propionil	Corta
C5	Isovaleril	Corta
C5OH/C4DC	Metilmalonil/3-Hidroxivaleril	Corta
C5DC/C6OH	Glutaril/3-Hidroxihexanoil	Corta/Media
C6DC	Adipil	Media
C8	Octanoil	Media
C8:1	Octenoil	Media
C10	Decanoil	Media
C10:1	Decenoil	Media
C12	Dodecanoil	Media
C12:1	Dodecenoil	Media
C14	Tetradecanoil (miristoil)	Larga
C14:1	Tetradecenoil	Larga
C14:2	Tetradecadienoil	Larga
C18:1	Octadecenoil (Oleil)	Larga

De acuerdo a la figura 3, los niveles séricos de la carnitina libre C0 y las acilcarnitinas C5 y C5DC/C6OH tuvieron niveles progresivamente mayores entre los estados nutricionales, habiendo diferencias significativas entre los niños normopeso, con sobrepeso y obesidad y entre los niños de bajo peso y los obesos. La acilcarnitina C3 solo tuvo niveles significativamente mayores en los niños obesos y las acilcarnitinas C5OH/C4DC fueron significativamente mayores en los niños con sobrepeso/obesidad, comparados con los niños de bajo peso/normopeso.

De acuerdo a la figura 4, para las acilcarnitinas de cadena media, solo la C8:1 tuvo diferencias significativas, en donde el grupo de los niños normopeso mostró niveles significativamente menores que los niños con sobrepeso y obesidad. Las demás acilcarnitinas, C6DC, C8, C10, C10:1, C12 y C12:1 no tuvieron diferencias significativas entre grupos. De las acilcarnitinas de cadena larga, únicamente la C18:1 tuvo valores significativamente mayores en los niños obesos con respecto a los niños normopeso; las C14, C14:1 y C14:2 no mostraron diferencias significativas.

Niveles séricos de acilcarnitinas de cadena corta

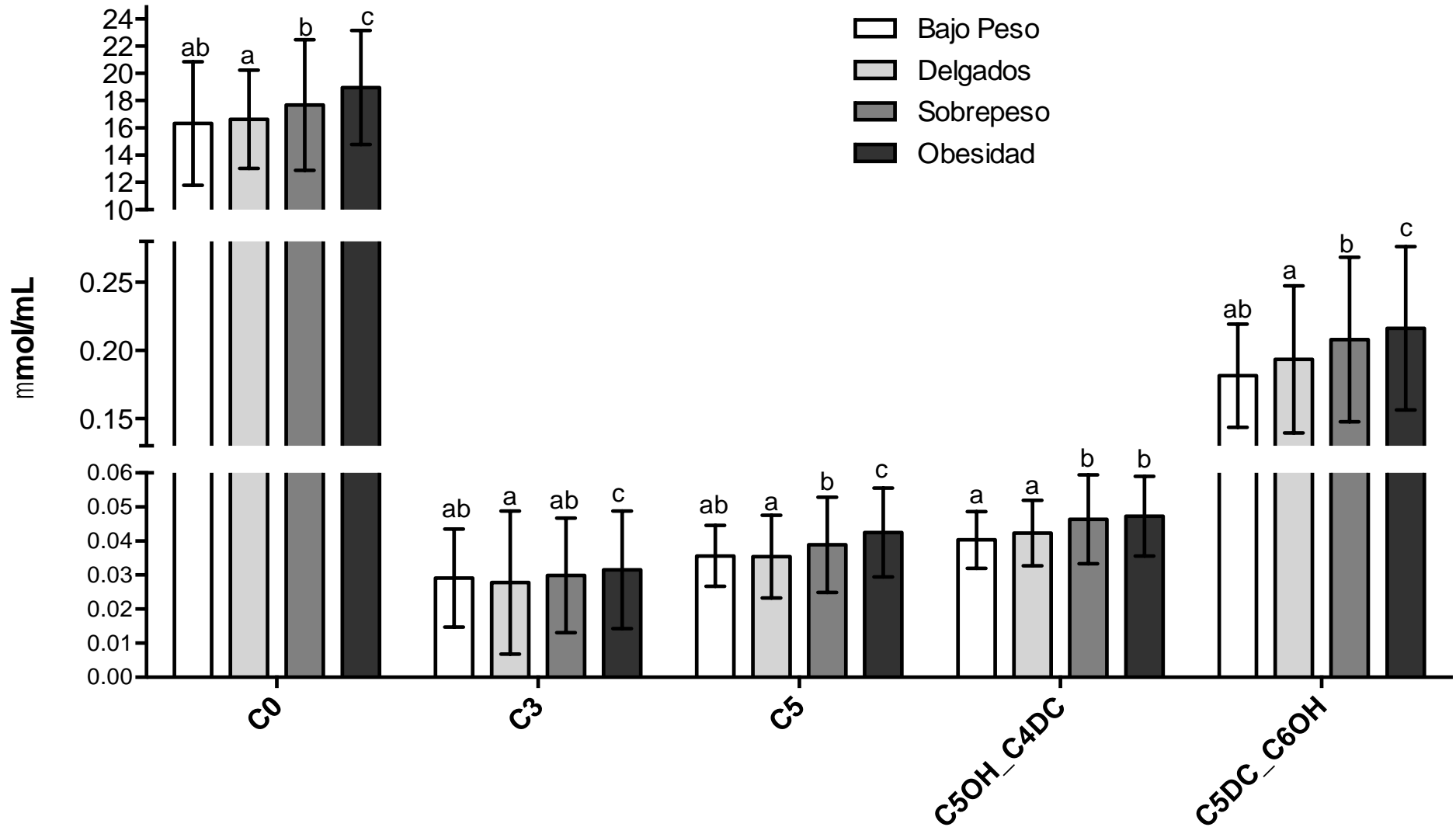


Figura 3. Niveles séricos de acilcarnitinas de cadena corta. Los resultados se graficaron como media y desviación estándar. ANOVA de un factor, post-hocTukey, nivel de significancia 0.05, realizado con datos previamente normalizados por logaritmo. Para cada acilcarnitina, letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos ($p < 0.05$).

Niveles séricos de acilcarnitinas de cadena media y larga

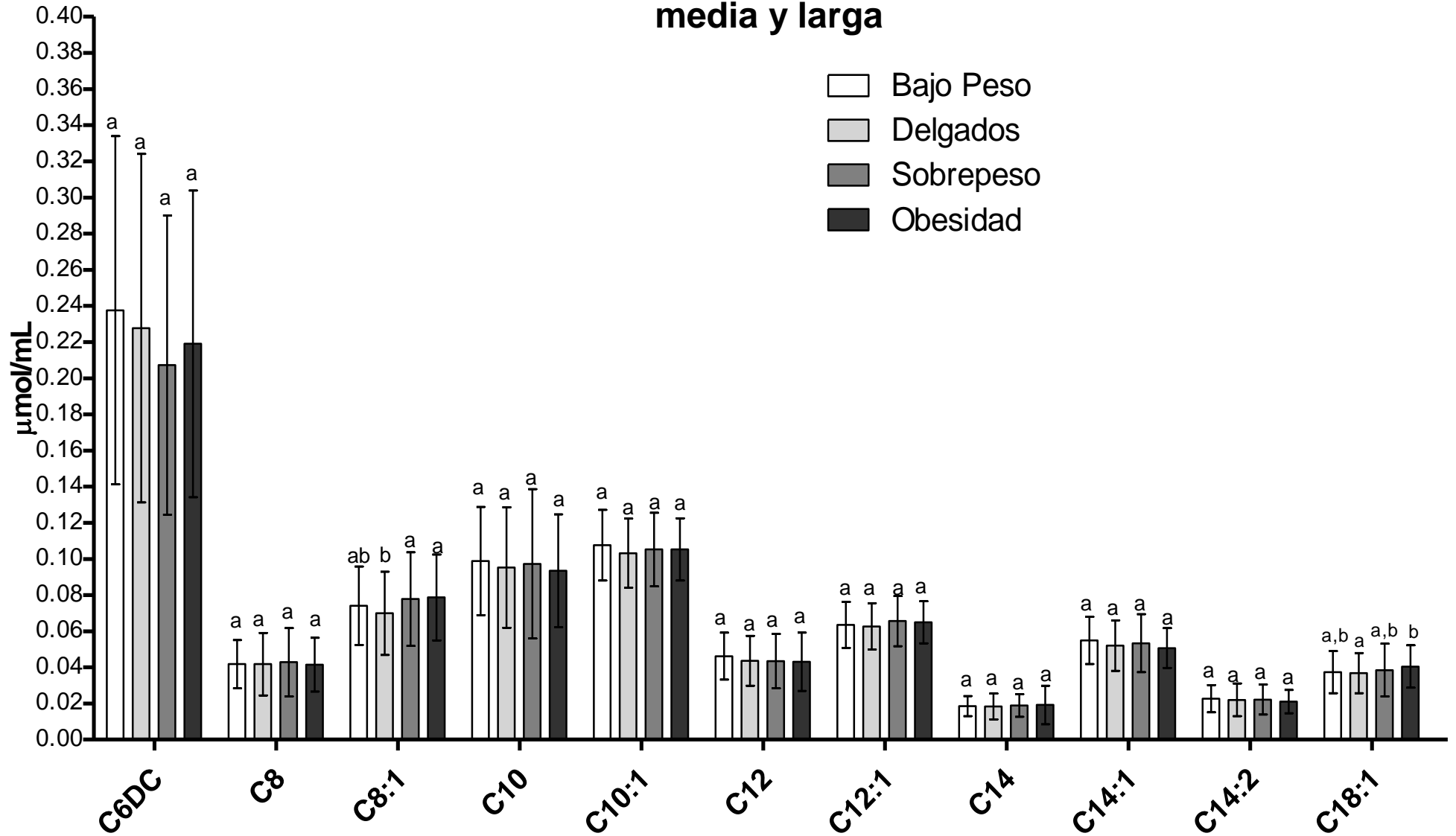


Figura 4. Niveles séricos de acilcarnitinas de cadena media y larga. Los resultados se graficaron como media y desviación estándar. ANOVA de un factor, post-hocTukey, nivel de significancia 0.05, realizado con datos previamente normalizados por logaritmo. Para cada acilcarnitina, letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos ($p < 0.05$).

4 Asociación de metabolitos séricos con rasgos de alteraciones metabólicas

Para el análisis de correlaciones se incluyeron todos los parámetros antropométricos y bioquímicos analizados. Los aminoácidos y acilcarnitinas incluidos en el análisis fueron aquellos que hubiesen tenido diferencias significativas entre al menos dos grupos de estado nutricional, esto es: arginina, alanina, leucina, valina, fenilalanina, tirosina, ornitina y prolina; C0, C3, C5, C5DC/C6OH, C50H/C6DC, C8:1 y C18:1. Se calculó el Z-score de los aminoácidos y acilcarnitinas para hacer las correlaciones parciales.

4.1 Aminoácidos y rasgos de alteraciones metabólicas

Como se muestra en la tabla 7, los aminoácidos de cadena ramificada (leucina y valina) y los aromáticos (fenilalanina y tirosina) correlacionaron positivamente con el porcentaje de grasa, la circunferencia de cintura, el índice HOMA y los niveles séricos de insulina, colesterol total y triglicéridos. Leucina y valina correlacionaron con C-LDL ($p=0.02$ y $p=0.002$, respectivamente), fenilalanina y tirosina con la proteína C reactiva ($p<0.00001$ y $p=0.004$, respectivamente) y únicamente leucina y fenilalanina con ácido úrico ($p=0.003$ y $p=0.01$, respectivamente).

Los niveles séricos de triglicéridos también correlacionaron positivamente con arginina, alanina, prolina y ornitina. De estos cuatro aminoácidos solo arginina, alanina y prolina correlacionaron positivamente con el índice HOMA y con los niveles séricos de insulina. Arginina y ornitina correlacionaron también con el porcentaje de grasa corporal y los niveles de colesterol total. Alanina correlacionó positivamente con la circunferencia de cintura mientras que ornitina correlacionó negativamente, además de haber correlacionado positivamente con C-HDL, C-LDL y ácido úrico.

Tabla 7. Correlaciones parciales entre parámetros antropométricos, bioquímicos y niveles séricos de aminoácidos

Parámetro	Aminoácido	Arginina	Alanina	Leucina	Valina	Fenilalanina	Tirosina	Prolina	Ornitina
% grasa corporal	r	0.13	0.05	0.12	0.13	0.13	0.14	0.04	0.13
	p	<0.001	0.223	0.002	<0.001	<0.001	<0.001	0.335	<0.001
Cintura	r	-0.03	0.09	0.09	0.13	0.12	0.14	0.04	-0.08
	p	0.531	0.015	0.021	<0.001	0.001	<0.001	0.326	0.039
HOMA_IR	r	0.13	0.17	0.09	0.12	0.09	0.18	0.14	0.07
	p	<0.001	<0.001	0.018	0.002	0.015	<0.001	<0.001	0.069
GLU	r	0.13	0.03	-0.06	-0.03	0.01	0.03	0.03	0.05
	p	<0.001	0.440	0.102	0.439	0.932	0.525	0.439	0.212
INS	r	0.11	0.17	0.11	0.13	0.1	0.18	0.14	0.07
	p	0.003	<0.001	0.006	<0.001	0.011	<0.001	<0.001	0.086
CT	r	0.11	0.04	0.14	0.16	0.11	0.09	-0.02	0.15
	p	0.004	0.326	<0.001	<0.001	0.004	0.020	0.645	<0.001
TG	r	0.1	0.23	0.19	0.17	0.17	0.19	0.18	0.13
	p	0.010	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
C-HDL	r	0.05	-0.03	-0.01	0.01	-0.02	-0.03	-0.03	0.1
	p	0.223	0.439	0.841	0.819	0.685	0.525	0.439	0.008
C-LDL	r	0.07	-0.01	0.09	0.12	0.07	0.04	-0.07	0.1
	p	0.064	0.721	0.021	0.002	0.078	0.294	0.078	0.015
AU	r	0.08	0.04	0.11	0.07	0.1	0.04	-0.04	0.08
	p	0.057	0.283	0.003	0.067	0.010	0.341	0.326	0.045
pCr	r	-0.01	-0.03	0.08	0.08	0.19	0.13	-0.03	-0.06
	p	0.896	0.540	0.097	0.088	<0.001	0.004	0.525	0.206

Correlaciones entre parámetros bioquímicos y aminoácidos. Para realizar las correlaciones se emplearon los datos normalizados por logaritmo para los parámetros bioquímicos y el Z score de los aminoácidos. Las correlaciones se ajustaron por percentil de índice de masa corporal, edad y sexo. Valores de p corregidos por FDR. En negritas se resaltan las correlaciones significativas ($p < 0.05$). HOMA-IR=índice HOMA (resistencia a la insulina), GLU = glucosa, INS = insulina, TG = triglicéridos, AU = ácido úrico, CT = colesterol total, C-HDL= Colesterol HDL, C-LDL= Colesterol LDL, pCr = Proteína C reactiva.

4.2 Acilcarnitinas y rasgos de alteraciones metabólicas

Como se muestra en la tabla 8, la carnitina libre (C0) y las acilcarnitinas C5DC/C6OH correlacionaron positivamente con la circunferencia de cintura ($p < 0.001$ y $p = 0.01$, respectivamente). La carnitina C0 también correlacionó positivamente con el ácido úrico, al igual que la C18:1 ($p = 0.01$ y $p < 0.001$, respectivamente). Únicamente la C3 correlacionó positivamente con el porcentaje de grasa corporal ($p = 0.03$) y las acilcarnitinas C5DC/C6OH correlacionaron positivamente con los niveles de triglicéridos ($p = 0.04$). La C18:1 correlacionó positivamente con los niveles de colesterol total y LDL ($p = 0.01$ y $p < 0.001$, respectivamente) y negativamente con el índice HOMA y los niveles séricos de glucosa e insulina.

Tabla 8. Correlaciones parciales entre parámetros antropométricos y bioquímicos y niveles séricos de acilcarnitinas

Parámetro	Acilcarnitina	C0	C3	C5	C50H/C4DC	C5DC/C6OH	C8:1	C18:1
% grasa corporal	r	0.05	0.1	0.01	-0.07	-0.03	0.03	0.003
	p	0.28	0.03	0.90	0.16	0.61	0.61	0.90
Cintura	r	0.18	-0.06	0.02	0.07	0.11	0.04	0.03
	p	<0.001	0.24	0.87	0.17	0.01	0.41	0.66
HOMA	r	-0.06	0.07	0.01	-0.07	-0.06	-0.02	-0.16
	p	0.24	0.17	0.93	0.17	0.24	0.87	<0.001
GLU	r	-0.06	0.07	-0.08	-0.05	-0.05	-0.01	-0.1
	p	0.30	0.23	0.69	0.20	0.28	0.87	<0.001
INS	r	-0.05	0.06	0.03	-0.06	-0.05	-0.02	-0.16
	p	0.23	0.17	0.10	0.26	0.34	0.98	0.03
CT	r	0.05	0.04	0.06	0.001	0.001	0.02	0.11
	p	0.35	0.48	0.24	0.90	0.90	0.87	0.01
TG	r	0.07	0.06	0.01	0.05	0.1	-0.07	-0.06
	p	0.17	0.24	0.90	0.34	0.04	0.17	0.24
C-HDL	r	-0.07	0.03	-0.03	-0.06	-0.09	0.03	0.09
	p	0.15	0.58	0.61	0.24	0.09	0.58	0.07
C-LDL	r	0.06	0.02	0.08	0.02	0.01	0.03	0.11
	p	0.23	0.87	0.15	0.86	0.91	0.68	0.02
AU	r	0.12	0.03	0.03	-0.05	0.001	0.05	0.13
	p	0.01	0.60	0.61	0.32	0.90	0.35	<0.001
pCr	r	0.08	-0.1	0.01	0.03	0.09	-0.02	-0.01
	p	0.17	0.12	0.98	0.82	0.15	0.87	0.98

Correlaciones entre parámetros bioquímicos y acilcarnitinas. Para realizar las correlaciones se emplearon datos transformados por logaritmo para su normalización para los parámetros bioquímicos y el Z score de las acilcarnitinas. Se ajustó por percentil de índice de masa corporal, edad y sexo. Valores de p corregidos por FDR. En negritas se resaltan las correlaciones significativas ($p < 0.05$). HOMA-IR=índice HOMA (resistencia a la insulina), GLU = glucosa, INS = insulina, TG = triglicéridos, AU = ácido úrico, CT = colesterol total, C-HDL= Colesterol HDL, C-LDL= Colesterol LDL, pCr = Proteína C reactiva.

Los parámetros de percentil de presión arterial sistólica y diastólica y apoB no se presentan por no tener correlación significativa con ningún aminoácido ni acilcarnitina.

5 BCAA, AA y anormalidades metabólicas

Una vez identificados los parámetros asociados en mayor medida al sobrepeso, la obesidad, los BCAA y los AA, se procedió a analizar si estos aminoácidos podrían diferenciar a los niños con alteraciones metabólicas de los niños sanos y si este efecto podría ser independiente del estado nutricional. Para ello se optó por realizar una clasificación de niños “metabólicamente sanos” y niños “metabólicamente comprometidos”.

Siendo que la resistencia a la insulina y la hipertrigliceridemia son las alteraciones metabólicas más comunes en la población infantil mexicana (Aradillas, et. al., 2007; Bibiloni, et. al., 2015) y a que son las que se asociaron en mayor medida a los BCAA y AA, los niños que presentaran ambas complicaciones metabólicas se clasificaron como “metabólicamente comprometidos” y los niños que no presentaran ninguna de las dos fueron clasificados como “metabólicamente sanos”. Los niños que solo presentaran una de estas dos anormalidades metabólicas no se tomaron en cuenta para este análisis. Los niños con bajo peso se omitieron de este análisis pues ninguno presentó valores anormales de índice HOMA ni triglicéridos.

Para identificar a los niños con hipertrigliceridemia y resistencia a la insulina se emplearon los valores de corte de 100 mg/dL para triglicéridos y HOMA>2.5 para resistencia a la insulina (De Ferranti, et. al., 2004; Cook, et. al., 2003).

En la tabla 9 se presenta la distribución de la población conforme a esta clasificación.

Tabla 9. Distribución de la población en función del estado metabólico

Edo. Nutricional	Metabólicamente sanos	Metabólicamente comprometidos	Una de las 2 anormalidades
Normopeso	71%	3%	26%
Sobrepeso	42%	20%	38%
Obesidad	25%	39%	36%

Como se muestra en la tabla 10, los niños normopeso “metabólicamente comprometidos” tuvieron niveles significativamente más altos en los niveles de los cuatro aminoácidos (ramificados y aromáticos) en comparación con los niños normopeso “metabólicamente sanos”. En los niños con sobrepeso se observó el mismo comportamiento, de los niños “metabólicamente anormales” teniendo mayores niveles de aminoácidos que los niños “metabólicamente sanos”. En el grupo de obesidad también se presentó el mismo patrón, salvo por fenilalanina que no tuvo diferencias significativas entre ambos grupos.

Tabla 10. Comparación de niveles de aminoácidos en niños con hipertrigliceridemia y resistencia a la insulina

Normopeso (n=488)	“sanos” n=350	“comprometidos” n=15	p
Leucina	50.3 (44.0-56.9)	59.7 (56.3-76.4)	0.0004
Valina	59.6 (53.1-67.9)	73.0 (65.6-84.6)	0.0002
Fenilalanina	23.7 (21.6-27.0)	30.2 (25.7-38.3)	0.002
Tirosina	25.0 (22.0-28.7)	30.4 (24.7-38.7)	0.02
Sobrepeso (n=157)	“sanos” n=66	“comprometidos” n=31	p
Leucina	53.5 (48.9-62.4)	61.7 (55.9-69.2)	0.007
Valina	64.7 (58.1-73.9)	74.3 (64.8-81.4)	0.004
Fenilalanina	25.9 (23.9-30.3)	28.5 (26.2-34.6)	0.022
Tirosina	27.0 (24.7-29.4)	30.5 (27.3-33.9)	0.016
Obesidad (n=166)	“sanos” n=42	“comprometidos” n=64	p
Leucina	60.5 (53.2-67.5)	65.5 (57.6-73.2)	0.031
Valina	72.9 (64.5-82.1)	78.2 (66.0-89.9)	0.049
Fenilalanina	29.0 (25.8-36.8)	29.6 (26.1-37.3)	0.401
Tirosina	30.3 (26.6-34.8)	33.3 (29.9-38.9)	0.009

Niveles de aminoácidos de cadena ramificada y aromáticos en niños con hipertrigliceridemia y resistencia a la insulina. Prueba t student, nivel de significancia 0.05. Se presentan las medias y los rangos intercuantiles. Datos normalizados por logaritmo. Puntos de corte empleados: Hipertrigliceridemia, TG>100 mg/dL. Resistencia a la insulina, HOMA-IR>2.5.

VII. DISCUSIÓN

A. Descripción poblacional

La caracterización de la población muestra que el porcentaje de niños con sobrepeso u obesidad es de 38.2% (18.6% y 19.6%, respectivamente), siendo así un 3.8% más alto que el 34.4% reportado a nivel nacional por la ENSANUT en el 2012.

Se sabe que, en la mayoría de los individuos, el percentil de BMI correlaciona con la adiposidad, indicada por el porcentaje de grasa y que a partir del percentil 75 del porcentaje de grasa se podría considerar como alta adiposidad (Flegal, et. al., 2010). Como era de esperarse, la mayoría de los niños con sobrepeso y obesidad también presentaron alta adiposidad. La diferencia en la composición corporal entre niños y niñas es evidente desde antes de la edad puberal (Taylor, et. al., 1997). Este efecto se corroboró al observar que las niñas presentaron mayores porcentajes de grasa corporal que los niños.

B. Complicaciones metabólicas

El sobrepeso y la obesidad aumentan el riesgo de desarrollar complicaciones metabólicas, entre las que se encuentra alteraciones en la homeostasis de glucosa, el metabolismo de lípidos, los niveles de ácido úrico y los procesos inflamatorios.

Homeostasis de glucosa

En nuestra población de estudio, más de un 75% de niños con sobrepeso y obesidad tuvieron niveles glucémicos normales, esto es, por debajo de los 100 mg/dL indicados para pre-diabetes (Alberti, et. al., 1998). Sin embargo, muchos de estos niños tuvieron mayores niveles de insulina que sus contrapartes normopeso. Además, el HOMA-IR mostró que al menos un 25% de niños con sobrepeso y un 50% con obesidad eran resistentes a insulina, tomando como referencia un punto de corte de 2.5 para HOMA-

IR (Ascaso, et. al., 2003). Comúnmente, antes de que ocurran anormalidades en los niveles de glucosa, se da un estado de resistencia a la insulina (Shulman, et. al., 2000).

Metabolismo lipídico

Las alteraciones en el metabolismo de lípidos se evidencian con niveles séricos anormales de triglicéridos y colesterol, principalmente. En este estudio, el 50% de los niños con sobrepeso y obesidad presentaron hipertrigliceridemia, tomando en cuenta un valor de corte de 100 mg/dL (De Ferranti, et. al., 2004). Además, al menos un 25% de estos niños estaban por debajo del límite propuesto para niveles de HDL en adolescentes (40mg/dL) (Cook, et. al., 2003) y un 50% tenían niveles de colesterol por arriba de los 170 mg/dL, previamente reportado en niños mexicanos (Arenas-Berumen, et. al., 2015).

De manera muy interesante, una cuarta parte de los niños normopeso presentaron hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia, además de tener valores por arriba de los valores de C-LDL reportados previamente en niños mexicanos (Juárez-Muñoz, et. al., 2006). Esto parece respaldar la hipótesis que, además del sobrepeso y la obesidad, se requieren de otros factores para el desarrollo de anormalidades metabólicas.

La apolipoproteína (ApoB), que participa en el metabolismo de colesterol y cuyos altos niveles se han vinculado con el desarrollo de resistencia a la insulina en el hígado (Su, et. al., 2009), estuvo elevada en niños obesos en comparación con los normopeso. No obstante, tanto niños normopeso como obesos estuvieron por arriba del promedio reportado en niños con obesidad (Arrobas, et. al., 2014). Esto sugiere la posibilidad de que las dislipidemias sean cada vez más frecuentes en niños mexicanos incluso en niños normopeso.

Hiperuricemia y procesos inflamatorios

Altos niveles de ácido úrico se han asociado con resistencia a la insulina y aparición del síndrome metabólico (Yu, et. al., 2016). Empleando un valor de 5.1 mg/dL como valor

de corte para identificar hiperuricemia en niños (Wilcox, et. al., 1996), se encontró que cerca de la mitad de niños con sobrepeso y obesidad presentaron hiperuricemia y al menos una cuarta parte de los niños normopeso también. Es interesante notar que la prevalencia de hiperuricemia en niños con sobrepeso y obesidad coincide con la prevalencia de resistencia a la insulina (de acuerdo al HOMA-IR). Sin embargo, en los niños normopeso la presencia de hiperuricemia no necesariamente se acompaña de resistencia a la insulina. Esto nos permite especular que los niveles de ácido úrico podrían elevarse antes del desarrollo de resistencia a la insulina.

Se sabe que en sobrepeso y obesidad existe un estado de inflamación crónica en el organismo (Esser, et. al., 2014) y que incluso podría preceder a estadios de resistencia a la insulina y síndrome metabólico (Singla, et. al., 2010). Esto podría explicar que en este estudio los niños con sobrepeso y obesidad tuvieran mayores niveles de la proteína C reactiva (pCr), indicadora de inflamación.

Consistentemente con lo reportado en otras poblaciones infantiles, los parámetros antropométricos y bioquímicos de nuestra población de estudio sugieren que ciertos indicadores de riesgo metabólico como porcentaje de grasa, índice HOMA, niveles séricos de triglicéridos, colesterol y ácido úrico aumentan conforme aumenta el percentil índice de masa corporal. Es interesante notar que, aunque los parámetros de riesgo aumentaron de manera proporcional al estado nutricional, no todos los niños con sobrepeso u obesidad desarrollaron resistencia a la insulina, hipertrigliceridemia o alguna otra complicación metabólica. En cambio, un número considerable de niños normopeso sí presentaron alguna alteración metabólica, por lo cual se procedió a la búsqueda de factores involucrados en el desarrollo de complicaciones metabólicas.

C. Aminoácidos, acilcarnitinas y complicaciones metabólicas

De acuerdo al objetivo principal del trabajo, se analizó si existía asociación de los aminoácidos y las acilcarnitinas en suero con rasgos metabólicos relacionados a complicaciones metabólicas.

BCAA y AA

Los aminoácidos cuyos niveles aumentaron en mayor medida en niños con sobrepeso y obesidad en comparación con los normopeso fueron leucina y valina (BCAA) y fenilalanina y tirosina (AA).

Algunas explicaciones para el aumento en la concentración de los BCAA en sobrepeso y obesidad son que: existiera una disminución en su catabolismo (principalmente en tejido adiposo), tal como ha sido reportado para obesidad o por el aumento en la proteólisis, causada por la pérdida de sensibilidad a la insulina (Lu, et. al., 2013).

Frecuentemente, el aumento de los niveles de los AA se ha observado que sucede en conjunto con el de los BCAA, aunque no se conoce por qué mecanismo ocurre esto. Una probable explicación es que, debido a que los BCAA y los AA comparten un transportador de aminoácidos hacia los tejidos (LAT1), al aumentar la concentración sérica de los BCAA se sature el transportador, ocasionando que también aumente la concentración de los AA (McCormack, et. al., 2012).

Tanto los BCAA como los AA se han relacionado con la obesidad infantil (Butte, et. al., 2015). En nuestro estudio, los BCAA y los AA se asociaron no solo con el percentil de BMI, sino también con la circunferencia de cintura y el porcentaje de grasa, sugiriendo que podrían ser indicadores del índice de adiposidad, un parámetro altamente relacionado con el síndrome metabólico (Elks, et. al., 2010). Conocer el índice de adiposidad en niños resultaría utilidad puesto que algunos niños clasificados como normopeso podrían tener elevados índices de adiposidad y estar propensos al desarrollo de complicaciones metabólicas.

Los BCAA y los AA también se han asociado con el desarrollo de resistencia a la insulina y, recientemente, con el riesgo de padecer hipertrigliceridemia (McCormack, et. al., 2012; Wiklund, et. al., 2016). Por ello, se ha evaluado su utilidad como posibles marcadores de riesgo de estas alteraciones metabólicas. En el presente estudio, la

asociación encontrada de los BCAA y los AA con el índice HOMA y los niveles de triglicéridos indica su íntima relación con la resistencia a la insulina e hipertrigliceridemia. Esto parece colocar a estos aminoácidos como posibles participantes en el desarrollo de estas alteraciones metabólicas. Cabe resaltar que son necesarios más estudios para corroborar esta hipótesis.

Se sabe que la elevación de los niveles de los BCAA puede influir en la cascada de activación de mTOR, lo cual resulta en un desacoplamiento en la señalización de insulina y produce, de esta manera, resistencia a la insulina en músculo y tejido adiposo (Lynch, et. al., 2014). Asimismo, se ha postulado que cuando aumentan las concentraciones sistémicas de los BCAA, aumenta su ingreso al hígado y se convierten en sustratos para la lipogénesis hepática *de novo*, promoviendo así el aumento en los niveles de triglicéridos y lipoproteínas de baja densidad en sangre (Lu, et. al., 2013).

Aun cuando los AA parecen no compartir el mecanismo de acción de los BCAA, un estudio en roedores planteó la posibilidad de que el aumento en los niveles sistémicos de aminoácidos en general puede favorecer su ingreso al hígado y, a través de la señalización por mTOR y el nervio vago, promover la disminución de la expresión de la lipoproteína lipasa en tejido adiposo, causando de esta manera que los triglicéridos no se hidrolicen y aumenten su concentración en circulación (Uno, et. al., 2015).

Aunque resistencia a la insulina e hipertrigliceridemia son las complicaciones metabólicas que se han asociado con mayor frecuencia con los BCAA y los AA, estos aminoácidos también mostraron relación con otros rasgos de alteraciones metabólicas como colesterol total, C-LDL, ácido úrico y proteína C reactiva.

Previamente, se había planteado que los BCAA podrían estar participando en el desarrollo de enfermedades ateroscleróticas y cardiovasculares, debido a su asociación con parámetros de riesgo cardiovascular (Mangge, et. al., 2016). Nuestros resultados mostraron una asociación de los BCAA y de fenilalanina con los niveles de colesterol total y valina y leucina con C-LDL. Aunque, debido al diseño transversal de este

estudio, no se puede establecer si esta asociación es causa o consecuencia, estos resultados abren la posibilidad de que estos aminoácidos en efecto se relacionen con rasgos de riesgo cardiovascular.

Un hallazgo novedoso es que solo los AA se asociaron con los niveles séricos de ácido úrico y proteína C reactiva (pCr). La hiperuricemia se ha relacionado con resistencia a la insulina y el síndrome metabólico (Yu, et. al., 2016). Por su parte, la pCr es un indicador de inflamación y comúnmente se ha observado elevada en obesidad (Mohorko, et. al., 2015). Es interesante notar que el ácido úrico también se ha vinculado con procesos inflamatorios y como indicador de riesgo cardiovascular (Ruggiero, et. al., 2006), lo cual podría asociar a los AA con procesos inflamatorios que podrían estar contribuyendo al desarrollo de enfermedades cardiovasculares, incluso, independientemente del estado nutricional.

Otros aminoácidos

Se ha observado que alanina, un aminoácido que forma parte del catabolismo de los BCAA, se eleva de manera conjunta con estos (Butte, et. al., 2015; Lu, et. al., 2013). En nuestro estudio, mayores niveles séricos de alanina se asociaron con mayores porcentajes de grasa, índice HOMA y triglicéridos, lo cual sustenta la íntima relación de alanina no solo con los BCAA sino con la prevalencia de sobrepeso, obesidad y alteraciones metabólicas.

Los niños con sobrepeso y obesidad mostraron mayores niveles de arginina en comparación con los niños normopeso. Estos niveles tuvieron relación con mayores niveles de insulina, HOMA-IR, porcentaje de grasa y triglicéridos. Se sabe que la arginina es un secretagogo de insulina (McGarry, et. al., 2002); por ello, a mayores concentraciones en suero de arginina, se espera que existan mayores niveles de insulina. Incluso, arginina ya había sido previamente asociada con el riesgo de hipertrigliceridemia en obesidad (Mook-Kanamori, et. al., 2014).

En niños, se ha observado que los niveles de prolina disminuyen en obesidad (Wahl, et. al., 2012). Sin embargo, nuestros resultados mostraron que prolina, además de estar elevada en niños con obesidad, correlacionó positivamente con el HOMA-IR y triglicéridos séricos. Esto parece sugerir que, contrario a la hipótesis de que prolina es una 'factor protector' contra la obesidad en niños, en nuestra población de estudio resultó estar asociado con sobrepeso, obesidad y resistencia a la insulina e hipertrigliceridemia.

Dentro de las mediciones de metabolómica también se encontraba disponible la medición de ornitina un aminoácido dibásico. En modelos murinos de obesidad, los niveles de ornitina aumentan conjuntamente con la obesidad y parecen formar parte de una 'firma metabólica' presente en el desarrollo de diabetes (Sailer, et. al., 2013). El hecho de que este aminoácido haya estado elevado en niños con obesidad y que, además, se haya asociado con triglicéridos séricos, colesterol y ácido úrico, parece sustentar esta hipótesis.

Los niveles séricos de glicina, metionina y citrulina no variaron en niños con sobrepeso y obesidad en comparación con los niños normopeso, aun cuando se ha reportado que hay un incremento en los niveles de metionina en sujetos obesos y/o con DMT2 (Fiehn 2010), que glicina se eleva en sujetos con obesidad (Morris, et. al., 2012) y que citrulina, un aminoácido no proteinogénico del ciclo de la urea, se ha visto elevado en modelos murinos de obesidad (Sailer, et. al., 2013).

Acilcarnitinas

Las acilcarnitinas son metabolitos intermediarios de la oxidación de lípidos, que resultan de la unión de una carnitina libre y un grupo acetil (McCoin, et. al., 2015). Algunas son productos del metabolismo de los aminoácidos, tales como las C3 y C5 (Newgard, 2012).

En este estudio se encontró que los niños con sobrepeso y obesidad tuvieron mayores niveles de las acilcarnitinas C3 y C5 que sus contrapartes normopeso. Sin embargo, no se asociaron con ningún parámetro antropométrico o bioquímico, excepto la C3 con el porcentaje de grasa. Esto nos permite especular que las C3 y C5 estarían involucrada en el desarrollo de adiposidad pero no resistencia a la insulina u otra anomalía metabólica asociada con los BCAA.

Las acilcarnitinas de cadena media y cadena larga reflejan la tasa de oxidación lipídica en la mitocondria (Mook-Kanamori, et. al., 2014) y se han visto relacionadas con el desarrollo de isquemias cardiacas, resistencia a la insulina e inflamación (McCoin, et. al., 2015). De estas acilcarnitinas, solo la C8:1 y la C18:1 tuvieron niveles séricos mayores en niños con sobrepeso y obesidad que en niños normopeso. No obstante, ninguna de estas se asoció con porcentaje de grasa, índice HOMA ni triglicéridos. Esto parece sugerir que, en edades tempranas como la infancia, no existe aún una disfunción clara en la función mitocondrial que pueda llevar al desarrollo de complicaciones metabólicas asociadas a la obesidad.

Un resultado interesante fue que la carnitina libre (C0) estuvo elevada en niños con sobrepeso y obesidad en comparación con los normopeso, a pesar de que su consumo se ha asociado con una mejora en sensibilidad a la insulina y disminución de niveles de glucosa en ayuno (Mingrone, et. al., 2004; Galloway, et. al., 2011).

Los resultados obtenidos parecen indicar que, en comparación con las acilcarnitinas, los aminoácidos parecen tener asociaciones más fuertes con el sobrepeso y la obesidad en niños, y podrían ser mejores indicadores de la prevalencia de alteraciones metabólicas.

D. BCAA, AA y el estado metabólico

De las alteraciones metabólicas que se presentan en niños mexicanos, la resistencia a la insulina y la hipertrigliceridemia son las más frecuentes (Aradillas, et. al., 2007;

Bibiloni, et. al., 2015). Debido a esto, es de suma importancia la identificación de factores asociados al desarrollo de estas alteraciones, tanto con fines de diagnóstico como de prevención y tratamiento.

Uno de los resultados más interesantes de nuestro estudio fue que los niños “metabólicamente comprometidos” (con resistencia a la insulina e hipertrigliceridemia) tuvieron niveles mayores de BCAA y AA que los niños “metabólicamente sanos” y este comportamiento se observó en todos los estados nutricionales, excepto en los niños de bajo peso que ninguno fue “metabólicamente comprometido”.

Sorpresivamente, los niños normopeso “metabólicamente comprometidos” tuvieron mayores niveles de BCAA y AA que los niños con sobrepeso “metabólicamente sanos” y, a su vez, los niños con sobrepeso “metabólicamente comprometidos” tuvieron mayores niveles de BCAA y AA que los obesos “metabólicamente sanos”. De manera interesante, al analizar la cantidad de masa de grasa se observó que los niños con sobrepeso y obesidad “metabólicamente sanos” tenían mayores cantidades de grasa que sus contrapartes normopeso y con sobrepeso “metabólicamente comprometidos”, respectivamente. Esto abre la posibilidad de que la cantidad de grasa pueda ser un factor “protector” en los niños sin alteraciones metabólicas.

Los BCAA se metabolizan principalmente en el músculo esquelético y el tejido adiposo (Brosnan, et. al., 2006). Se sabe que en obesidad hay un malfuncionamiento en su catabolismo que hace que estos se acumulen en tejido adiposo y se eleven en circulación (Lynch, et. al., 2014), lo cual a su vez puede inducir el desarrollo de alteraciones metabólicas como resistencia a la insulina e hipertrigliceridemia. Por lo tanto, se puede especular que los niños con mayores cantidades de tejido adiposo tienen un mayor metabolismo de estos aminoácidos simplemente por la razón de tener más sitios donde metabolizarlos. Es decir, aun cuando su catabolismo se encuentre reducido, a mayor cantidad de tejido adiposo, mayor cantidad de sitios donde estos pueden metabolizarse y, de esta manera, evitar su acumulación y liberación al torrente

sanguíneo. Por lo tanto, sería interesante realizar más estudios para analizar si este efecto realmente sucede en los individuos con mayores cantidades de grasa.

La resistencia a la insulina e hipertrigliceridemia ocurren con mayor frecuencia en los niños con sobrepeso y obesidad; sin embargo, es interesante notar que una gran cantidad de niños con normopeso también pueden presentar una de las dos y en algunos niños se pueden presentar incluso ambas alteraciones. Por ello, saber que los BCAA y los AA pueden diferenciar a los niños “metabólicamente sanos” de los niños “metabólicamente comprometidos” permite una nueva aproximación al estudio de las alteraciones metabólicas que se presentan en los niños, incluso en los que no presentan sobrepeso y obesidad. Aunque la naturaleza del estudio no permite establecer su uso como biomarcadores, nuestros resultados abren la posibilidad de evaluar los BCAA y los AA en estudio longitudinales como predictores de la presencia de complicaciones metabólicas.

VIII. CONCLUSIONES

En el estudio del sobrepeso y la obesidad, la metabolómica resultó ser una herramienta útil para la identificación de algunos aminoácidos y acilcarnitinas cuya concentración aumentó en presencia de sobrepeso y obesidad. Conforme a nuestra hipótesis, entre estos aminoácidos destacaron los de cadena ramificada, leucina y valina, y los aromáticos, fenilalanina y tirosina. Además, estos también parecen estar relacionados con la prevalencia de alteraciones metabólicas que se relacionan con la obesidad, particularmente con resistencia a la insulina, lo cual los señala como posibles participantes en la fisiopatología de estas comorbilidades.

Algo importante de mencionar es que, aunque el sobrepeso y la obesidad son factores de riesgo para el desarrollo de resistencia a la insulina e hipertrigliceridemia, entre otras, puede haber niños que sean normopeso y aun así presentar estas alteraciones. Por ello, la identificación de niveles anormales aminoácidos en suero podría dar un indicio de aquellos niños con riesgo de desarrollar comorbilidades metabólicas, independientemente del estado nutricional del niño.

Aun cuando el diseño de este estudio fue transversal, se abre el campo para realizar más estudios con el fin de evaluar si estos aminoácidos podrían ser biomarcadores de riesgo del desarrollo de alteraciones metabólicas que podrían conducir a enfermedades como DMT2 y enfermedades cardiovasculares.

IX. REFERENCIAS

- ◆ Adams, S. Emerging Perspectives on Essential Amino Acid Metabolism in Obesity and the Insulin-Resistant State. American Society for Nutrition. Adv. Nutr. 2: 445–456, et. al., 2011.
- ◆ Alberti K, Zimmet P. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO consultation. Diabet Med 1998;15:539–53.
- ◆ Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, Fruchart JC, James WP, Loria CM, Smith SC Jr. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. Circulation. 2009 Oct 20;120(16):1640-5
- ◆ Aradillas C, De la Cruz E, Hernández H, Calderón J, Quibrera R. Presence of insulin resistance syndrome in mexican children of San Luis Potosi (México). Vol 8, No. 4. 2007. Salud Pública y Nutrición,
- ◆ Arenas-Berumen E, Gómez-Miranda LM, Torres-Balcázar E, Padilla-Alvarado VH, Rentería I. Valores de referencia de colesterol, triglicéridos y glucosa en niños hispanos, de entre 6 a 11 años, en estados de la frontera norte de México y Estados Unidos de América. Nutr Hosp. 2015;31(2):704-709
- ◆ Arrobas Velillas T, Melguizo Madrid E, Pérez Quinteros J. c-LDL/ApoB-100 en niños obesos resistentes a la insulina como herramienta clínica para valorar el riesgo cardiovascular. Acta Bioquím Clín Latinoam 2014; 48 (1): 13-21
- ◆ Ascaso JF, Pardo S, Real JT, Lorente RI, Priego A, Carmena R. Diagnosing insulin resistance by simple quantitative methods in subjects with normal glucose metabolism. Diabetes Care 2003;26:3320–5.
- ◆ Bacha F, Saad R, Gungor N, Janosky J, Arslanian SA: Obesity, regional fat distribution, and syndrome X in obese black versus white adolescents: race

- differential in diabetogenic and atherogenic risk factors. *J Clin Endocrinol Metab* 88:2534– 2540, 2003.
- ◆ Batch BC, Shah SH, Newgard CB, Turer CB, Haynes C, Bain JR, Muehlbauer M, Patel MJ, Stevens RD, Appel LJ, Newby LK, Svetkey LP. Branched chain amino acids are novel biomarkers for discrimination of metabolic wellness. *Metabolism*. 2013 Jul;62(7):961-9.
 - ◆ Bibiloni MDM, Salas R, Novelo HI, Villarreal JZ, Sureda A, Tur JA. Serum lipid levels and dyslipidaemia prevalence among 2-10 year-old northern mexican children. *PLoS One* 2015;10(3):1–14.
 - ◆ Brosnan JT, Brosnan ME. Branched-chain amino acids: enzyme and substrate regulation. *J Nutr*. 2006 Jan;136(1 Suppl):207S-11S.
 - ◆ Butte NF, Liu Y, Zakeri IF, Mohny RP, Mehta N, Voruganti VS, Göring H, Cole SA, Comuzzie AG. Global metabolomic profiling targeting childhood obesity in the Hispanic population. *Am J Clin Nutr*. 2015 Aug;102(2):256-67
 - ◆ Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2003 Jan;52(1):102-10
 - ◆ Centers for Disease Control and Prevention. BMI for children and teens. http://www.cdc.gov/healthyweight/assessing/bmi/childrens_bmi/about_childrens_bmi.html
 - ◆ Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults - The Evidence Report. National Institutes of Health. *Obes Res*. 1998 Sep;6 Suppl 2:51S-209S.
 - ◆ Cook S, Weitzman M, Auinger P, Nguyen M, Dietz WH, et al.: Prevalence of a metabolic syndrome phenotype in adolescents: findings from NHANES-III, 1988-1994. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2003, 157:821-7.
 - ◆ Dann SG, Selvaraj A, Thomas G. mTOR Complex1-S6K1 signaling: at the crossroads of obesity, diabetes and cancer. *Trends Mol Med*. 2007 Jun;13(6):252-9
 - ◆ De Ferranti S, Gauvreau K, Ludwig D, Neufeld EJ, Newburger JW, Rifai N: Prevalence of the metabolic syndrome in American adolescents. *Circulation* 2004, 110:2494-7.

- ◆ Elks CM, Francis J. Central adiposity, systemic inflammation, and the metabolic syndrome. *Curr Hypertens Rep.* 2010 Apr;12(2):99-104
- ◆ Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. 2012. Instituto Nacional de Salud Pública. Secretaria de Salud.
- ◆ Esser N, Legrand-Poels S, Piette J, Scheen AJ, Paquot N. *Diabetes Res Clin Pract.* 2014 Aug;105(2):141-50
- ◆ Faienza MF, Wang DQ, Frühbeck G, Garruti G, Portincasa, P. The dangerous link between childhood and adulthood predictors of obesity and metabolic syndrome. *Intern Emerg Med* (2016) 11:175–182.
- ◆ Fiehn O, Garvey WT, Newman JW, Lok KH, Hoppel CL, Adams SH. Plasma metabolomic profiles reflective of glucose homeostasis in non-diabetic and type 2 diabetic obese African-American women. *PLoS One.* 2010 Dec 10;5(12)
- ◆ Flegal KM, Ogden CL, Yanovski JA, Freedman DS, Shepherd JA, Graubard BI, Borrud LG. High adiposity and high body mass index-for-age in US children and adolescents overall and by race-ethnic group. *Am J Clin Nutr.* 2010 Apr;91(4):1020-6
- ◆ Friedewald, William T., Robert I. Levy, and Donald S. Fredrickson. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical chemistry* 18.6 (1972): 499-502.
- ◆ Ghoorah K, Campbell P, Kent A, Maznyczka A, Kunadian V Obesity and cardiovascular outcomes: a review. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care.* 2016 Feb;5(1):77-85.
- ◆ Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, Gordon DJ, Krauss RM, Savage PJ, Smith SC Jr, Spertus JA, Costa F. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation.* 2005 Oct 25;112(17):2735-52.
- ◆ Grundy SM. Small LDL, atherogenic dyslipidemia and the metabolic syndrome. *Circulation* 95, 1–4 (1997).
- ◆ Halban PA, Polonsky KS, Bowden DW, Hawkins MA, Ling C, Mather KJ, Powers AC, Rhodes CJ, Sussel L, Weir G. β -Cell Failure in Type 2 Diabetes: Postulated

Mechanisms and Prospects for Prevention and Treatment. *Diabetes Care* 2014 Jun; 37(6): 1751-1758.

- ◆ Hellmuth C, Kirchberg FF, Lass N, Harder U, Peissner W, Koletzko B, Reinehr T. Tyrosine Is Associated with Insulin Resistance in Longitudinal Metabolomic Profiling of Obese Children. *J Diabetes Res.* 2016;2016:2108909.
- ◆ Ho M, Garnett SP, Baur LA. Childhood obesity and insulin resistance: how should it be managed? *Curr Treat Options Cardiovasc Med.* 2014 Dec;16(12):351
- ◆ Huffman, K.M., Shah, S.H., Stevens, R.D., Bain, J.R., Muehlbauer, M., Slentz, C.A., Tanner, C.J., Kuchibhatla, M., Houmard, J.A., Newgard, C.B., and Kraus, W.E. (2009). Relationships between circulating metabolic intermediates and insulin action in overweight to obese, inactive men and women. *Diabetes Care* 32, 1678–1683.
- ◆ Janesick AS, Blumberg B, *Obesogens: an emerging threat to public health, American Journal of Obstetrics and Gynecology* (2016).
- ◆ Juárez- Muñoz, I Anaya-Flores M, Mejía-Arangure, J, Games-Eternod, J. Niveles séricos de colesterol y lipoproteínas y frecuencia de hipercolesterolemia en un grupo de adolescentes de la Ciudad de México. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* 63:3. México. 2006
- ◆ Kiess, W., Reich, A., Müller, G., Meyer, A., Galler, J., Benneck, J., Kratzsch, J. Clinical aspects of obesity in childhood and adolescence—diagnosis, treatment and prevention. *International Journal of Obesity* (2001) 25, Suppl 1, S75–S79
- ◆ Lee A, Jang HB, Ra M, Choi Y, Lee HJ, Park JY, Kang JH, Park KH, Park SI, Song J. Prediction of future risk of insulin resistance and metabolic syndrome based on Korean boy's metabolite profiling. *Obes Res Clin Pract.* 2015 Jul-Aug;9(4):336-45.
- ◆ Lu J, Xie G, Jia W, Jia W. Insulin resistance and the metabolism of branched-chain amino acids. *Front Med.* 2013 Mar;7(1):53-9
- ◆ Lynch, C. J. & Adams, S. H. Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance *Nat. Rev. Endocrinol.* 2014 Dec. 10, 723–736.
- ◆ Mangge H, Zelzer S, Prüller F, Schnedl WJ, Weghuber D, Enko D, Bergsten P, Haybaeck J, Meinitzer A. Branched-chain amino acids are associated with cardiometabolic risk profiles found already in lean, overweight and obese Young. *J Nutr Biochem.* 2016 Jun;32:123-7

- ◆ Mathews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. 1985. *Diabetologia* 28:412-419.
- ◆ McCoin CS, Knotts TA, Adams SH. Acylcarnitines--old actors auditioning for new roles in metabolic physiology. *Nat Rev Endocrinol.* 2015 Oct;11(10):617-25
- ◆ McCormack SE, Shaham O, McCarthy MA, Deik AA, Wang TJ, Gerszten RE, Clish CB, Mootha VK, Grinspoon SK, Fleischman A. Circulating branched-chain amino acid concentrations are associated with obesity and future insulin resistance in children and adolescents. *Pediatr Obes.* 2012 Feb;8(1):52-61.
- ◆ McGarry D. Dysregulation of Fatty Acid Metabolism in the Etiology of Type 2 Diabetes. *Diabetes*, vol. 51. Jan 2002
- ◆ McKinney, Leigh. *Diagnosis And Management Of Obesity.* American Academy Of Family Physicians. 2013.
- ◆ Menge B, Schrader H, Ritter P. Selective amino acid deficiency in patients with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Regulatory Peptides*, 160 (1-3):75-80. 2010.
- ◆ Meyburg J, Schulze A, Kohlmüller D, Linderkamp O, Mayatepek E. Postnatal changes in neonatal acylcarnitine profile. *Pediatr Res.* 2001 Jan;49(1):125-9.
- ◆ Miccoli, R., Bianchi, C., Penno G., Del Prato, S. Insulin resistance and lipid disorders. *Future Lipidology.* 2008;3(6):651-664
- ◆ Mihalik SJ, Goodpaster BH, Kelley DE, Chace DH, Vockley J, Toledo FGS, DeLany JP: Increased levels of plasma acylcarnitines in obesity and type 2 diabetes and identification of a marker of glucolipotoxicity. *Obesity (Silver Spring)* 2010; 18: 1695–1700.
- ◆ Milburn MV, Lawton KA. Application of metabolomics to diagnosis of insulin resistance. *Annu Rev Med.* 2013;64:291-305.
- ◆ Mingrone G. Carnitine in type 2 diabetes. *Ann NY Acad Sci* 1033:99–107(2004)
- ◆ Mohorko N, Petelin A, Jurdana M, Biolo G, Jenko-Pražnikar Z. Elevated Serum Levels of Cysteine and Tyrosine: Early Biomarkers in Asymptomatic Adults at

Increased Risk of Developing Metabolic Syndrome. *BioMed Research International* (2015). 2015:14.

- ◆ Mongraw-Chaffin ML, Anderson CA, Allison MA, Ouyang P, Szklo M, Vaidya D, Woodward M, Golden SH. Association between sex hormones and adiposity: qualitative differences in women and men in the multi-ethnic study of atherosclerosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015 Apr;100(4):E596-600
- ◆ Mook-Kanamori DO, Römisch-Margl W, Kastenmüller G, Prehn C, Petersen AK, Illig T, Gieger C, Wang-Sattler R, Meisinger C, Peters A, Adamski J, Suhre K. Increased amino acids levels and the risk of developing of hypertriglyceridemia in a 7-year follow-up. *J Endocrinol Invest.* 2014 Apr;37(4):369-74.
- ◆ Morris C. The relationship between BMI and metabolomic profiles: a focus on amino acids. *Proc Nutr Soc.* 2012 Nov;71(4):634-8.
- ◆ Nair KS, Short KR. Hormonal and signaling role of branched-chain amino acids. *J Nutr.* 2005 Jun;135(6 Suppl):1547S-52S.
- ◆ Newbern D, Gumus Balikcioglu P, Balikcioglu M, Bain J, Muehlbauer M, Stevens R, Ilkayeva O, Dolinsky D, Armstrong S, Irizarry K, Freemark M. Sex differences in biomarkers associated with insulin resistance in obese adolescents: metabolomic profiling and principal components analysis. 2014. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 99, no. 12, pp. 4730–4739,
- ◆ Newgard CB, An J, Bain JR, Muehlbauer MJ, Stevens RD, Lien LF, Haqq AM, Shah SH, Arlotto M, Slentz CA, Rochon J, Gallup D, Ilkayeva O, Wenner BR, Yancy WS Jr, Eisenson H, Musante G, Surwit RS, Millington DS, Butler MD, Svetkey LP. A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance. *Cell Metab.* 2009 Apr;9(4):311-26.
- ◆ Newgard, C. Interplay between Lipids and Branched-Chain Amino Acids in Development of Insulin Resistance. *Cell Metab.* 2012 May 2;15(5):606-14
- ◆ Patti GJ, Yanes O, Siuzdak G. Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012 Mar 22;13(4):263-9. *Pediatrics* 2002, 110 (3).
- ◆ Pedersen HK, Gudmundsdottir V, Nielsen HB, Hyotylainen T, Nielsen T, Jensen BA, Forslund K, Hildebrand F, Prifti E, Falony G, Le Chatelier E, Levenez F, Doré J, Mattila I, Plichta DR, Pöhö P, Hellgren LI, Arumugam M, Sunagawa S, Vieira-Silva S,

- Jørgensen T, Holm JB, Trošt K; MetaHIT Consortium, Kristiansen K, Brix S, Raes J, Wang J, Hansen T, Bork P, Brunak S, Oresic M, Ehrlich SD, Pedersen O. Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity. *Nature*. 2016 Jul 21;535(7612):376-81.
- ◆ Perng W, Gillman MW, Fleisch AF, Michalek RD, Watkins SM, Isganaitis E, Patti ME, Oken E. Metabolomic profiles and childhood obesity. *Obesity (Silver Spring)*. 2014 Dec;22(12):2570-8.
 - ◆ Roberts LD, Koulman A, Griffin JL. Towards metabolic biomarkers of insulin resistance and type 2 diabetes: progress from the metabolome. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2014 Jan;2(1):65-75.
 - ◆ Ruggiero C, Cherubini A, Ble A, Bos AJG, Maggio M, Ferrucci L. Uric acid and inflammatory markers. *European heart journal*. 2006;27(10):1174-1181.
 - ◆ Sailer M, Dahlhoff C, Giesbertz P, Eidens MK, de Wit N, Rubio-Aliaga I, Boekschoten MV, Müller M, Daniel H. Increased plasma citrulline in mice marks diet-induced obesity and may predict the development of the metabolic syndrome. *PLoS One*. 2013 May 14;8(5):e63950
 - ◆ Sassi, F. "Obesity Update 2012". Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). 2012.
 - ◆ Shah SH, Sun JL, Stevens RD, Bain JR, Muehlbauer MJ, Pieper KS, Haynes C, Hauser ER, Kraus WE, Granger CB, Newgard CB, Califf RM, Newby LK. Baseline metabolomic profiles predict cardiovascular events in patients at risk for coronary artery disease. *Am Heart J*. 2012 May;163(5):844-850.
 - ◆ Shulman G. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest*. 2000 Jul;106(2):171-6.
 - ◆ Singla P, Bardoloi A, Parkash A. Metabolic effects of obesity: A review. *World J Diabetes*. 2010 Jul 15; 1(3): 76–88. *World J Diabetes*. 2010 Jul 15; 1(3): 76–88.
 - ◆ Su Q, Tsai J, Xu E, Qiu W, Bereczki E, Santha M, Adeli K. Apolipoprotein B100 acts as a molecular link between lipid-induced endoplasmic reticulum stress and hepatic insulin resistance. *Hepatology*. 2009 Jul;50(1):77-84

- ◆ Taylor RW, Gold E, Manning P, Goulding A. Gender differences in body fat content are present well before puberty. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1997 Nov;21(11):1082-4.
- ◆ Tfayli H, Bacha F, Gungor N, Arslanian S. Phenotypic type 2 diabetes in obese youth: insulin sensitivity and secretion in islet cell antibody-negative versus –positive patients. 2009. *Diabetes* 58:738-744
- ◆ Thomas HE, McKenzie MD, Angstetra E, Campbell PD, Kay TW. Beta cell apoptosis in diabetes. *Apoptosis.* 2009 Dec;14(12):1389-404
- ◆ Thoreen CC, Kang SA, Chang JW, Liu Q, Zhang J, Gao Y, Reichling LJ, Sim T, Sabatini DM, Gray NS. An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. *J Biol Chem.* 2009 Mar 20;284(12):8023-32
- ◆ Uno K, Yamada T, Ishigaki Y, Imai J, Hasegawa Y, Sawada S, Kaneko K, Ono H, Asano T, Oka Y, Katagiri H. A hepatic amino acid/mTOR/S6K-dependent signalling pathway modulates systemic lipid metabolism via neuronal signals. *Nat Commun.* 2015 Aug 13;6:7940.
- ◆ Wahl S, Yu Z, Kleber M, Singmann P, Holzapfel C, He Y, Mittelstrass K, Polonikov A, Prehn C, Römisch-Margl W, Adamski J, Suhre K, Grallert H, Illig T, Wang-Sattler R, Reinehr T. Childhood obesity is associated with changes in the serum metabolite profile. *Obes Facts.* 2012;5(5):660-70
- ◆ Wang TJ, Larson MG, Vasan RS, Cheng S, Rhee EP, McCabe E, Lewis GD, Fox CS, Jacques PF, Fernandez C, O'Donnell CJ, Carr SA, Mootha VK, Florez JC, Souza A, Melander O, Clish CB, Gerszten RE. Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. *Nat Med.* 2011 Apr;17(4):448-53.
- ◆ Wang, Y., Lobstein, T. Worldwide trends in childhood overweight and obesity. *International Journal of Pediatric Obesity.* 2006; 1: 11 – 25
- ◆ Weiss R, Dziura J, Burgert TS, Tamborlane WV, Taksali SE, Yeckel CW, Allen K, Lopes M, Maviye M, Morrison J, Sherwin RS, Caprio S: Obesity and the metabolic syndrome in children and adolescents. *N Engl J Med* 2004, 350:2362-74.
- ◆ Weiss R, Kaulman F. Metabolic complications of childhood obesity: identifying and mitigating the risk. *Diabetes Care.* 2008;31 Suppl 2:S310–6.

- ◆ Wiklund P, Zhang X, Tan X, Keinänen-Kiukaanniemi S, Alen M, Cheng S. Serum Amino Acid Profiles in Childhood Predict Triglyceride Level in Adulthood: A 7-Year Longitudinal Study in Girls. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016 May;101(5):2047-55.
- ◆ Wilcox WD. Abnormal serum uric acid levels in children. *J Pediatr.* 1996 Jun;128(6):731-41.
- ◆ Yu TY, Jee JH, Bae JC, Jin SM, Baek JH, Lee MK, Kim JH. Serum uric acid: A strong and independent predictor of metabolic syndrome after adjusting for body composition. *Metabolism.* 2016 Apr;65(4):432-40.
- ◆ Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011 Jan;12(1):21-35.