



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

**“RELACIÓN DEL POLIMORFISMO DE LAS PROTEÍNAS DESACOPLANTES
MITOCONDRIALES (UCP’S) Y LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA
ADIPONECTINA Y LA LEPTINA CON LOS ÍNDICES DE OBESIDAD EN UNA
POBLACIÓN DE ADOLESCENTES DE LA CIUDAD DE MÉXICO”**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA
ANA KAREN HERNÁNDEZ CABRERA**



CDMX

2019



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: J. ELEAZAR MARTINEZ BARAJAS

VOCAL: MARTHA PATRICIA COELLO COUTIÑO

SECRETARIO: RICARDO GAMBOA AVILA

1er. SUPLENTE: MARISOL HERNANDEZ SALAS

2do. SUPLENTE: FRANCISCA MORAYNA GUTIERREZ LUNA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA "IGNACIO CHÁVEZ"

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA

ASESOR DEL TEMA:

Dr. RICARDO GAMBOA ÁVILA

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dra. CLAUDIA HUESCA GÓMEZ

SUSTENTANTE:

ANA KAREN HERNÁNDEZ CABRERA

"La vida no merece que uno se preocupe tanto."

M. Curie

"Combatirse a sí mismo es la guerra más difícil; vencerse a sí mismo es la victoria más bella."

Friedrich Von Logau

Tabla de Contenido

1.	Abreviaturas	6
2.	Resumen	7
3.	Marco teórico	8
3.1.	Sobrepeso y obesidad	9
3.1.1.	Diagnóstico de sobrepeso u obesidad.....	10
3.1.2.	Clasificación de obesidad.....	11
3.1.3.	Factores de riesgo en obesos	11
3.1.4.	Epidemiología.	12
3.2.	Tejido Adiposo.....	13
3.3.	Actividad enzimática de leptina y adiponectina	15
3.4.	Proteínas Desacoplantes Mitocondriales (UCP'S)	22
3.4.1.	Proteína desacoplante 1 (UCP1)	27
3.4.2.	Proteína desacoplante 2 (UCP2)	28
3.4.3.	Proteína desacoplante 3 (UCP3)	29
4.	Planteamiento del problema	33
5.	Hipótesis.....	33
6.	Objetivos	34
6.1.	Objetivo General	34
6.2.	Objetivos Específicos	34
7.	Diseño experimental	35
7.1.	Población de estudio.....	35
7.2.	Toma de muestra	36
7.3.	Extracción de ADN.....	37
7.4.	Determinación del genotipo	38
7.5.	Análisis estadístico	39
8.	Resultados	41

8.1.	Características clínicas de la población total y por grupo de estudio	41
8.2.	Curvas de amplificación y discriminación alélica	42
8.3.	Frecuencias alélicas y genotípicas de las Proteínas Desacoplantes Mitocondriales (UCP's), divididas por grupo de estudio.	44
8.4.	Comparación de frecuencias alélicas con otras poblaciones previamente reportadas	49
9.	Discusión	50
10.	Conclusión	54
11.	Referencias bibliográficas	56
12.	Apéndice.....	68
12.1	Apéndice A. <i>Consentimiento Informado</i>	68
12.2	Apéndice B. <i>Tablas de valores percentilares de acuerdo a edad, sexo y talla</i>	69
12.3	Apéndice C. <i>Artículo Association between UCP polymorphisms and adipokines with obesity in Mexican adolescents</i>	71
13.	Anexo.....	79
13.1	Anexo A. <i>Técnica de extracción de ADN por el método de expulsión salina</i>	79

1. Abreviaturas

c-HDL	Colesterol de lipoproteínas de alta densidad
c-LDL	Colesterol de lipoproteínas de baja densidad
CT	Colesterol
HDL	Lipoproteínas de alta densidad (<i>High density lipoproteins</i>)
IMC	Índice de Masa Corporal
LDL	Lipoproteínas de baja densidad (<i>Low density lipoproteins</i>)
LRP1	Proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad
MAF	Frecuencia del Alelo mutante
µg	Microgramo
mg	Miligramo
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido (<i>Single-Nucleotide Polymorphism</i>)
TG	Triglicéridos
UCP1	Proteínas desacoplantes tipo 1
UCP2	Proteínas desacoplantes tipo 2
UCP3	Proteínas desacoplantes tipo 3
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad (<i>Very low density lipoproteins</i>)

2. Resumen

La obesidad es un problema mundial, sin distinción de género o clase socioeconómica, de etiología multifactorial, con mediación significativa de factores genéticos y ambientales. Sin embargo, en virtud de la tendencia actual en relación al incremento de esta patología en edades escolares, se le ha atribuido a dos condiciones esenciales: los cambios en la forma de alimentación y la actividad física.

Para hacer el diagnóstico de sobrepeso u obesidad es necesario contar con parámetros clínicos y antropométricos que se asocien con la adiposidad. El Índice de Masa Corporal (IMC) ha resultado útil para la evaluación en el adulto, y en tiempos recientes se ha recomendado para la evaluación de niños y adolescentes. Debido a la alta prevalencia de obesidad en México, es una prioridad investigar la relación entre obesidad y factores involucrados con esta enfermedad. Entre los muchos factores están las Proteínas Desacoplantes Mitocondriales (UCP's), fundamentales para la termorregulación y mantenimiento del metabolismo energético, por lo que se encuentran implicadas en la patogénesis de la obesidad. Por tal relevancia, el estudio de las UCP's es fundamental.

De la misma manera la actividad enzimática de las hormonas leptina y adiponectina involucradas en el desarrollo de los problemas de obesidad. Por ejemplo, se ha observado que la leptina influye en el control de la ingesta y en el gasto energético. Sus concentraciones séricas guardan relación con el contenido de grasa corporal, ya que aumentan con el IMC y el porcentaje grasa y, disminuyen con el ayuno. Por lo que se considera responsable de las señales que se relacionan con el equilibrio energético y saciedad, más que ser un simple inductor de pérdida de peso. De la misma manera, la hormona adiponectina aumenta la sensibilidad a la insulina en diversos tejidos como hígado, músculo esquelético y tejido adiposo. A diferencia de la leptina, la concentración sérica de la adiponectina tiene

una relación inversa con la masa corporal y el grado de resistencia a la insulina.

Debido a la alta prevalencia de sobrepeso u obesidad en adolescentes en la Ciudad de México, se tuvo como objetivo analizar la asociación entre los polimorfismos UCP's, los parámetros clínicos y los niveles plasmáticos de leptina y adiponectina en una población adolescente con sobrepeso u obesidad.

Para ello se analizaron los polimorfismos UCP1-3826 (*rs1800592* C/T), UCP2-55 (*rs660339* A/G), UCP2-866 (*rs659366* C/T) y UCP3-55 (*rs1800849* A/G), la actividad enzimática de adiponectina y leptina en adolescentes con sobrepeso u obesidad con las características clínicas en ambos grupos.

El estudio incluyó a 270 estudiantes de entre 12 y 18 años, categorizados por percentiles de la Ciudad de México. Los niveles séricos de adipocinas se midieron utilizando métodos de inmunoensayo, y los polimorfismos UCP's se determinaron utilizando la Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (PCR) mediante sondas Taqman®.

No se encontraron diferencias significativas en los polimorfismos UCP's en siete modelos de herencia estudiados. Se demostró una relación directa entre las características clínicas y de la UCP2-866 en un modelo recesivo, asociado con niveles altos de leptina y niveles reducidos de adiponectina en una población de adolescentes mexicanos con sobrepeso u obesidad.

3. Marco teórico

En los últimos años se ha observado un incremento de la prevalencia de sobrepeso u obesidad durante la niñez y adolescencia en México, una enfermedad multifactorial de factores genéticos en correlación de determinantes ambientales. No obstante estos factores no pueden ser fácilmente separados para su análisis individual, en años recientes se han identificado tanto en modelos humanos como animales cerca de 200

regiones cromosómicas involucrados en el desarrollo de la obesidad, en diferentes poblaciones (1) a su vez diversos estudios han observado que los factores genéticos tienen una influencia en las variaciones del Índice de Masa Corporal (IMC) de aproximadamente el 40-70%.

3.1. Sobrepeso y obesidad

La obesidad es sin duda una epidemia a nivel mundial que no sólo afecta a los países desarrollados, sino también a aquellos países en vías de desarrollo con escaso potencial económico e industrial que han moldeado sus hábitos por los cambios en la urbanización, uso de tecnología sofisticada y acceso a gran cantidad de alimentos procesados, ricos en grasas saturadas y calóricamente densos, dando como resultado modificaciones al estilo de vida (2). En 1998, la Norma Oficial Mexicana (3) definió a la obesidad como un estado premórbido, una enfermedad crónica caracterizada por el almacenamiento de grasa en exceso en el tejido adiposo del organismo, acompañada de alteraciones metabólicas que deterioran el estado de salud, asociada en la mayoría de los casos a patologías endocrinas, cardiovasculares y ortopédicas principalmente y relacionadas a factores biológicos, socioculturales y psicológicos. Posteriormente, en 2007, la define como una enfermedad crónica no transmisible que se caracteriza por el exceso de tejido adiposo en el organismo, generada cuando el ingreso energético (alimentario) es superior al gasto energético (actividad física) durante un periodo suficientemente largo (3). Por su parte, la Organización Mundial de la Salud (OMS), ha definido a la obesidad como la condición en la cual el exceso de tejido adiposo afecta de manera adversa la salud y el bienestar (4) . Además, el Centro de Control de Enfermedades ("*Centers for Disease Control and Prevention*" ,CDC) de Estados Unidos de Norteamérica, agrega el uso de medidas antropométricas como son: talla, peso, IMC, pliegues cutáneos y la inspección física del paciente; sobre todo en la población

pediátrica y adolescente (5) para la realización del diagnóstico de obesidad en este sector poblacional. Es claro que el diagnóstico de sobrepeso y la obesidad en pediatría debe ser integral, de ahí que los indicadores antropométricos tienen un gran valor en la construcción del diagnóstico. Sin embargo, no hay que perder de vista que estos deben complementarse con indicadores clínicos, y en ocasiones bioquímicos, pues las mediciones antropométricas por sí solas no permiten establecer las causas de la obesidad y establecer un diagnóstico final completo.

El IMC es un indicador simple de la relación entre el peso y la talla que se utiliza frecuentemente para identificar el sobrepeso y la obesidad en los adultos. Además de su uso en adultos, actualmente varios comités de expertos de distintos ámbitos y países (6, 7), incluyendo México (8) han recomendado que para los niños y adolescentes, el IMC es específico con respecto a la edad y el sexo, y con frecuencia se conoce como el IMC por edad. (6)

3.1.1. Diagnóstico de sobrepeso u obesidad

El IMC se calcula dividiendo el peso corporal de una persona en kilogramo sobre el cuadrado de su talla en metro (Kg/m^2), y es probablemente el método no invasivo más útil para definir sobrepeso u obesidad a partir de los dos años de edad y en ausencia de talla baja (13).

Posterior al cálculo el IMC en los niños y adolescentes, se registra en las tablas de crecimiento de los CDC (Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades) para el IMC por edad (niños(a)) para obtener la categoría del percentil. Los percentiles son el indicador que se utiliza con más frecuencia para evaluar el tamaño y los patrones de crecimiento de cada niño. El percentil indica la posición relativa del número de IMC del niño entre niños del mismo sexo y edad.

La OMS establece que:

- Un IMC ≤ 5 percentil corresponde a bajo peso
- Un IMC $\geq 5-84.9$ percentil corresponde a valores de peso normales.
- Un IMC $\geq 85-95$ percentil corresponde a sobrepeso.
- Un IMC ≥ 95 percentil corresponde a obesidad.

Los criterios para definir y clasificar el sobrepeso y la obesidad varían según la edad y el sexo (utilizando gráficas correspondientes a sexo, edad, talla y peso).

3.1.2. Clasificación de obesidad.

Puede clasificarse en dos tipos:

1.- Obesidad exógena (85%) resultante de la combinación de factores ambientales y sociales; y 2.- Obesidad endógena (15%) como consecuencia de algunas condiciones genéticas/endócrinas (7), consideradas nocivas para la salud.

3.1.3. Factores de riesgo en obesos

La obesidad conlleva significativamente el riesgo de comorbilidad, involucrando varios sistemas corporales: cardiovascular, neurológico, respiratorio, músculo-esquelético, gastrointestinal, genitourinario y endocrino.

Entre las comorbilidades que pueden presentarse en los pacientes con diagnóstico de obesidad se puede mencionar resistencia a la insulina, considerado un estado en donde cierta cantidad de insulina produce una actividad biológica subnormal (13), en la patogénesis de la resistencia a la insulina asociada a obesidad están implicados varios factores, entre ellos el aumento de ácidos grasos libres y varias hormonas y citosinas liberadas

por el tejido adiposo. Se caracteriza por un descenso en la habilidad de la insulina para estimular el uso de glucosa por el músculo y el tejido adiposo y por la supresión de la producción y salida de glucosa en el hígado, dando como consecuencia un aumento en la producción de insulina por el páncreas y un estado de hiperinsulinismo (13).

En personas obesas o con diabetes generalmente se observa la aparición de acantosis nigricans, signo cutáneo caracterizado por hiperpigmentación e hipertrofia papilar de distribución simétrica, el color de las manchas es grisácea pardusco o negro y las regiones afectadas pueden ser la cara, cuello, axilas, genitales externos, ingles, cara interna de los muslos, superficie flexora de los codos, rodillas, ombligo y ano. En la resistencia a la insulina la acantosis nigricans es debida a que las altas concentraciones de insulina activan los receptores del factor de crecimiento parecido a la insulina y así mediar la proliferación celular epidérmica (14).

Los niveles de glucosa en ayuno se pueden clasificar en normal (100mg/dL), glucosa alterada en ayuno (100-125mg/dL) y como criterio provisional de diabetes (realizar estudios de confirmación) con valor igual o mayor a 126mg/dL. La situación clínica del paciente y la necesidad de realizar otras pruebas complementarias ha obligado a estandarizar estas variables en nuestra población actual infantil, con la finalidad de establecer un diagnóstico precoz correcto en la población pediátrica en riesgo.

En la hipertensión arterial, en niños y adolescentes el rango normal de presión arterial está determinado por edad y talla. Los estándares están basados en género, edad y talla lo que resulta en una clasificación errónea como paciente hipertenso a los niños con talla baja o alta (Apéndice B).

3.1.4. Epidemiología.

Se considera actualmente a la obesidad como uno de los principales problemas de salud pública mundial, cuya población abarca desde niños hasta adultos en cifras crecientes en los últimos 20 a 30 años (8). En los

Estados Unidos el 15.8% de los niños entre 6 y 11 años y 16,1% de los adolescentes presentan un Índice de Masa Corporal (IMC) en el rango de sobrepeso y obesidad (9). En países europeos se ha observado la misma tendencia, con base al último "Grupo de Trabajo sobre Obesidad" "*International Obesity Task Force (IOTF)*", donde se reporta que 31.8% de los niños que asisten a la escuela presentan sobrepeso y obesidad (10). En México, por ejemplo de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) del 2006, mostraron que una tercera parte de los adolescentes tiene sobrepeso u obesidad, lo que corresponde a 5,757,400 adolescentes en el país, por lo que tres de cada diez niños y adolescentes mexicanos se encontraron arriba de su peso ideal (11). Y en el reporte ENSANUT del 2012 para la población en edad escolar de 5 a 11 años la prevalencia nacional combinada de sobrepeso y obesidad fue de 34.4% mientras en adolescentes la encuesta arrojó un 35% (12). Además, 8 de cada 10 niños obesos llegara a ser adultos obesos (Instituto Nacional de Salud Pública) (12).

3.2. Tejido Adiposo.

El tejido adiposo es un órgano endócrino dinámico, relacionado con el almacenamiento de energía. Este secreta una gran cantidad de proteínas que le permite participar de manera estratégica, en la regulación del apetito, metabolismo, reproducción, coagulación y función cardiovascular. La acción del tejido adiposo, en términos de sus capacidades metabólicas, es múltiple. Se ha observado que existen variaciones en su actividad, dependientes del sitio de depósito, que puede ser subcutáneo en un 80% o visceral el 20%. El tejido adiposo está compuesto por adipocitos (30%-50%), pre-adipocitos, vasos sanguíneos y células inmunes.

En el humano el Tejido Adiposo (TA) se divide en: Tejido Marrón o Pardo (TAP) y Tejido Blanco (TAB), ambos poseen un origen mesenquimático (13) común, encontrándose embriológica e histológicamente relacionados.

Sus principales características son:

a. Tejido Adiposo Pardo o Marrón (TAP). Predomina en recién nacidos; todas sus células grasas, al igual que sus vasos sanguíneos tienen innervación simpática. Su coloración se atribuye a la gran cantidad de mitocondrias, que se distinguen por expresar numerosas proteínas desacoplantes (UCP's) inductoras de una fosforilación oxidativa desacoplada que produce dispersión de energía en forma de calor. Es el responsable de la termogénesis a través de la proteína desacoplante mitocondrial (UCP1). Es poco influyente en el ser humano salvo en el nacimiento donde participa activamente en la generación y mantención de la temperatura corporal. Se distribuye preferentemente en las regiones axilares y perirrenales.

b. Tejido Adiposo Blanco (TAB). Constituye el sitio de almacenamiento de grasas y secreción de citocinas. Regula células localmente y a distancia, a través de un complejo de señales, autocrinas, paracrinas y endocrinas, que influyen en la respuesta de muchos tejidos como el páncreas, hígado, músculo, riñón, endotelio, hipotálamo, y sistema inmune. Presenta varias funciones, tales como la de almacenar energía en forma de triglicéridos en el citosol de las células que lo conforman, los adipocitos. Estas células están rodeadas por un estroma de tejido conectivo que se encuentra extensamente vascularizado e innervado, que además contiene macrófagos, fibroblastos, precursores de adipocitos y otros tipos de células (14).

El TAB tiene diferentes compartimentos, en humanos se encuentran dos: el Tejido Subcutáneo (TAS) y el Tejido Adiposo Visceral (TAV). Este último dividido en dos tipos: el mesentérico y el omental.

El TAV se encuentra disperso entre los órganos, cuya función principal es la de amortiguar y proteger los órganos, asimismo de su capacidad de sintetizar y liberar una variedad de hormonas y citocinas. La grasa visceral es dos o tres veces superior en el varón que en la mujer y esto le confiere mayor riesgo de morbimortalidad cuando están aumentados en forma

anormal. Por otro lado, TAS cumple la función de aislante térmico, mediante una capa de células que se encuentran distribuidas por debajo de la extensión de la piel de todo el organismo.

En el caso de los individuos obesos se produce un notable aumento del TAP debido a hiperplasia e hipertrofia de los adipocitos.

3.3. Actividad enzimática de leptina y adiponectina

Adipocitocinas

En los últimos años, se ha descubierto que el tejido adiposo secreta varias moléculas "bioactivas" produce hormonas que son péptidos fisiológicamente activos que tienen propiedades comunes con las citosinas, por lo que han sido llamadas adipocitocinas y que provienen principalmente del Tejido Adiposo Blanco (TAB).

Entre las adipocitocinas se encuentran la leptina, adiponectina, factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), interleucina 6 (IL-6), factor de crecimiento transformador- β (TGF- β), el activador –inhibidor del plasminógeno 1 (PAI-1), la angiotensina, la adiposina, la resistina y la proteína estimuladora de la acilación (23-25).

De entre las diferentes adipocitocinas producidas en el tejido adiposo, la leptina y adiponectina son las mayormente secretadas por las células adiposas. Además de consideradas sustancias de especial interés en el análisis de la contribución específica que tiene la obesidad en la enfermedad cardiovascular. La adiponectina tiene unas características únicas porque es la única adipocitocina que parece ser sintetizada exclusivamente en el tejido adiposo (15). Por otra parte, la leptina y la adiponectina son las únicas adipocitocinas que proceden de los adipocitos y no de otros tipos celulares no específicos del tejido adiposo (15). Se ha demostrado una correlación positiva de los niveles plasmáticos de

adipocitocinas en relación al volumen de tejido adiposo, con excepción de adiponectina que muestra un comportamiento inverso.

Leptina

La leptina es una proteína de 16kDa que se compone de 167 aminoácidos, homólogo del gen llamado "Obesidad" (Ob) en el ratón, la cual es secretada principalmente en los adipocitos teniendo un papel relevante en la regulación del peso corporal a través de sus efectos centrales, sobre el apetito y periféricos, sobre el gasto energético. Actúa en el cerebro, principalmente en el hipotálamo, uniéndose al receptor de leptina (LepR), y en diferentes tejidos periféricos, entre los que se encuentran el páncreas, el hígado, el tejido adiposo y el sistema inmunitario. Esta hormona ejerce su función al unirse con su receptor (LepR) el cual abunda principalmente en el hipotálamo. Algunos estudios muestran que la mutación de los receptores de leptina cerebrales, conducen al desarrollo de la obesidad. En condiciones normales con animales normales, el LepR se expresa en abundancia al núcleo arqueado del hipotálamo que contiene neuronas sensibles a la leptina, que expresan el neuropeptido Y (NYP), al péptido relacionado con la proteína agouti (AgRP) y a la propiomelanocortina (POMC). Las neuronas que contienen a la POMC promueven el gasto energético y la pérdida de peso mediante su activación por leptina, mientras que las neuronas que expresan al NPY y AgRP promueven la ingestión de alimentos y la ganancia de peso en ausencia de Leptina.

La leptina actúa como una señal periférica para regular el balance de energía y el peso corporal (37). Se ha observado que con deficiencia o niveles reducidos en la secreción de leptina los humanos y roedores desarrollan obesidad severa, hiperfagia, así como defectos en la regulación de la temperatura corporal y problemas de fecundidad (38). Además, de que en individuos obesos existen valores marcadamente elevados de

leptina plasmática, sumados a una resistencia de los receptores a nivel hipotalámico (35,39).

No había sido identificado un gen relacionado con el problema de la obesidad, hasta que se descubrió en ratones el gen Ob. A partir de ese momento, en los últimos años, han sido encontradas tanto en modelos humanos como animales cerca de 200 regiones cromosómicas involucradas en el desarrollo de la obesidad, en diferentes poblaciones. Entre los genes más importantes se encuentran los genes involucrados en la regulación del gasto energético: las Proteínas Desacoplantes Mitocondriales (UCP's), el receptor nuclear proliferador de los peroxisomas gamma (PPAR γ), y el receptor adrenérgico β 3 -AR-, así como los genes de la leptina y su receptor (LepR) (1, 40, 37).

En humanos, los defectos genéticos en la vía de la leptina, y ausencia de su receptor también se asocian a obesidad mórbida de aparición temprana. No obstante, estos defectos genéticos se han visto en muy pocos casos de obesidad humana. Al contrario, lo habitual es que los individuos obesos tengan niveles elevados de leptina circulante debido a su mayor cantidad de tejido adiposo y al desarrollo de resistencia a la misma.

Si hay privación de alimento, la leptina disminuye el gasto metabólico para conservar la energía necesaria para los órganos vitales, lo que permite al individuo sobrevivir en condiciones adversas.

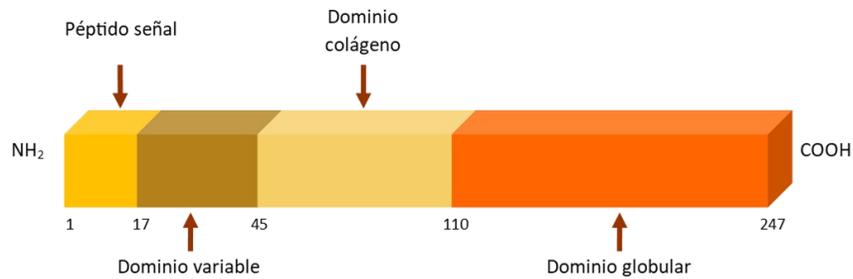
Por otro lado, se ha observado que el sexo presenta influencia en los niveles de leptina sérica, se encuentra en mayor concentración en las mujeres, en comparación con los hombres, con grasa corporal total equivalente (47-51); y aumenta en procesos asociados a inflamación como: infección, diabetes, asma, endometriosis, hepatitis no alcohólica, inflamación pulmonar crónica, y enfermedad de Graves, entre otras.

En fechas recientes han aumentado las investigaciones encaminadas al estudio de las variaciones (polimorfismos de un solo nucleótido: SNPs) que causan susceptibilidad para padecer la enfermedad. Se han encontrado múltiples SNPs tanto del gen de la leptina y de su receptor LepR asociados

a la obesidad. Los SNPs pueden ser una mutación funcional o estar en desequilibrio de vínculo con una variante funcional. Los SNPs son el tipo de variación más abundante en el genoma humano, con esto se disminuye la amplitud de la región objetivo para la búsqueda de genes (16).

Adiponectina

Otra de las hormonas secretadas por los adipocitos que participa en el control de la ingesta es la adiponectina. Es una adipocitocina, específica del tejido adiposo, implicada en la regulación del metabolismo energético del organismo que se identificó por primera vez a mediados de los noventa (17). Es una proteína con un peso molecular de 30kDa (17), constituida de 247 aminoácidos formando 4 dominios: un péptido de señalización, una región variable, un dominio colágeno (cAd) y un dominio globular terminal (gAad) (18) (Figura 1.). En la circulación, su estructura puede constituir tres complejos poliméricos diferentes: un trímero, un hexámero y un multímero de alto peso molecular constituido de 12 a 18 monómeros (19). La mayor parte de la adiponectina intracelular se presenta en forma de multímeros de alto peso molecular, mientras que en la circulación se presenta como oligómeros de bajo peso molecular. Se ha descrito que el multímero de alto peso molecular la forma más activa de la adiponectina, que es responsable de la disminución de la producción de glucosa hepática. (20) Las otras formas poliméricas podrían tener mayor actividad en la vasculatura, el sistema nervioso central y el músculo esquelético (21).



Meier y col., 2004

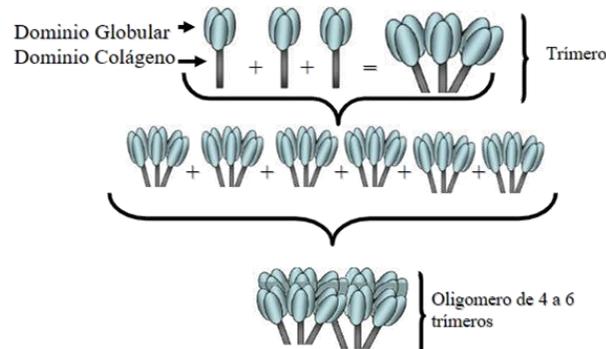


Figura 1. Adiponectina humana formada por una secuencia amino-terminal, seguida de un dominio variable, un dominio colágeno y un dominio globular carboxilo-terminal; y el modelo de la estructura de la adiponectina, tres monómeros que forman un trímero unidos por sus dominios globulares, cuatro a seis trímeros unidos por sus dominios colágenos forman la gran molécula que circula en el plasma.

La adiponectina tiene dos receptores: AdipoR1 y AdipoR2. El primero se expresa de forma generalizada, mientras el segundo se expresa principalmente en el hígado (22,23). Éstos son receptores transmembrana con siete dominios (22,23). AdipoR1 es un receptor para adiponectina globular, mientras que AdipoR2 es un receptor para la forma completa de la adiponectina. La adiponectina ejerce su función al unirse a sus receptores AdipoR1 y AdipoR2 (22).

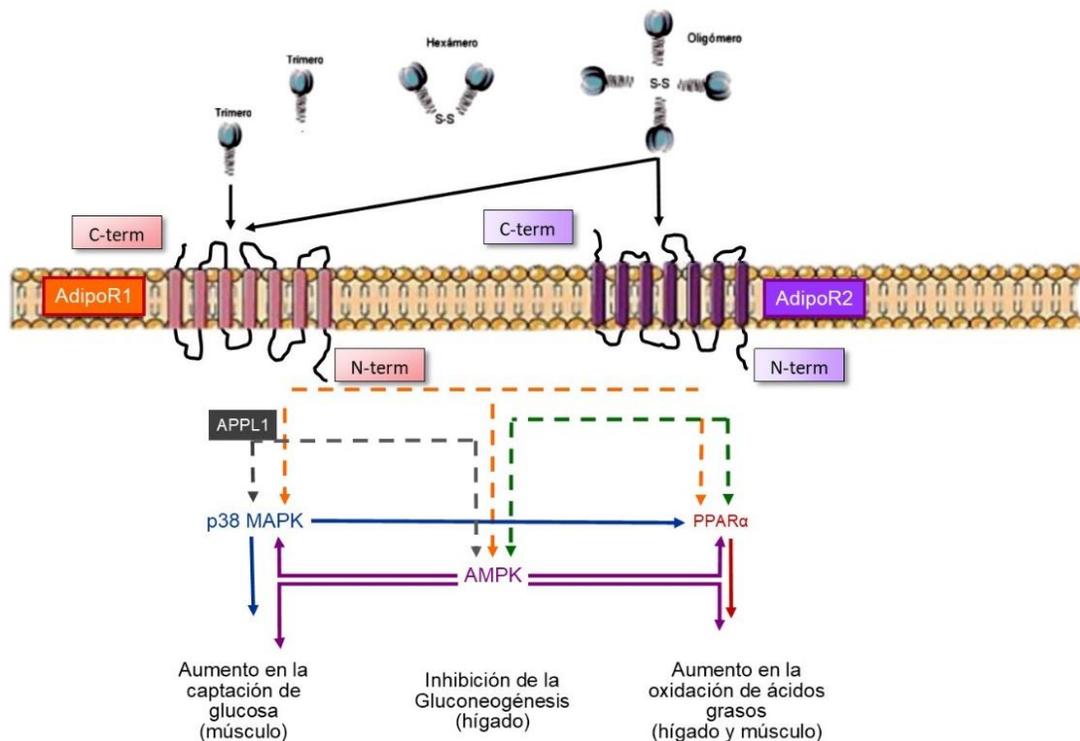


Figura 2. Mecanismo de Acción de la Adiponectina. La adiponectina al unirse sus receptores es capaz de activar a la Proteína Cinasa Activada por AMP (AMPK), la cual favorece la captación de glucosa a nivel muscular, inhibe la gluconeogénesis hepática y aumenta la oxidación de los ácidos grasos, por otro lado, inhibe la vía de la MAPK y además incrementa la actividad del ligando del Receptor Activador del Proliferador de Peroxisomas \pm (PPAR \pm)

AdipoR1: Fundamentalmente en músculo esquelético, se une mejor a la forma globular.
AdipoR2: Predomina en hígado, mayor afinidad por la forma completa.

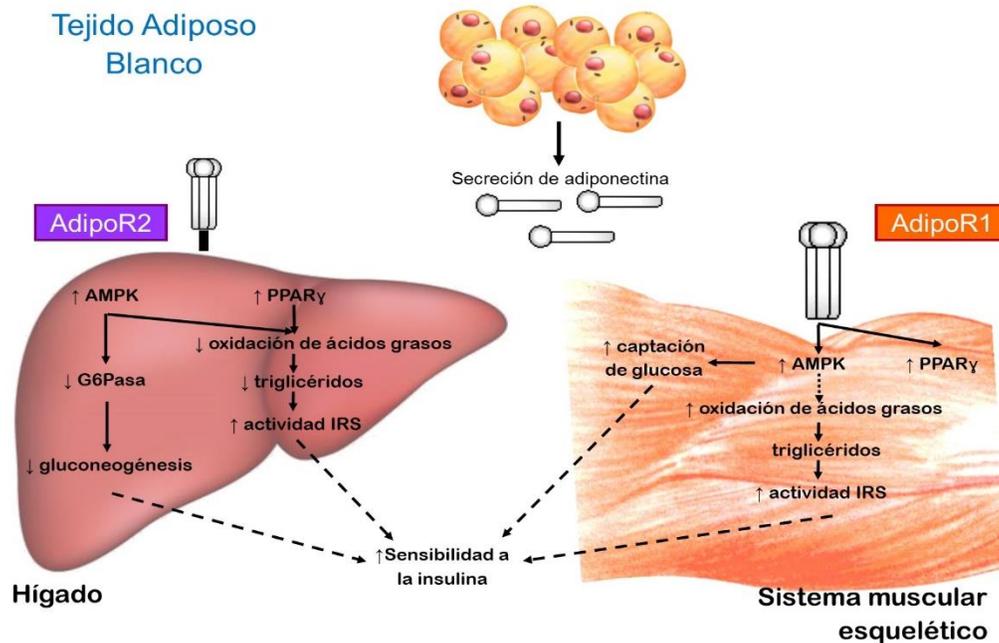
Se ha observado que el nivel de adiponectina se reduce con el aumento del IMC. El gen de expresión de la adiponectina (Acrp30/AdipoQ) y los niveles de esta proteína, son más altos en tejido adiposo subcutáneo que en el intra-abdominal. Los niveles plasmáticos en humano se encuentran entre 5-30 $\mu\text{g/mL}$, lo que contribuye aproximadamente el 0,01% del total de las proteínas plasmáticas humanas (23,25). El nivel de adiponectina en plasma es menor en hombres que en las mujeres y está disminuido en

individuos obesos, con síndrome metabólico o con DM2, en mujeres obesas con síndrome de ovario poliquístico, sobre todo en los que presentan obesidad visceral. Por otro lado, se han encontrado diferencias raciales en los niveles de adiponectina que a su vez podrían explicar las diferencias en la sensibilidad a la insulina. Se describe que a pesar de menor tejido adiposo visceral en jóvenes afroamericanos, los niveles de adiponectina, así como la sensibilidad a la insulina, son menores comparados con los caucásicos (23).

La adiponectina está asociada a múltiples funciones biomoleculares, incluyendo efectos antidiabéticos, antiinflamatorios y antiarterioesclerótico (25,54,55), actuando sobre receptores hepáticos (AdipoR1) y del músculo esquelético (AdipoR2).

Los mecanismos por los cuales la adiponectina ejerce sus acciones son poco conocidas, entre las que se postulan: a) aumento de la oxidación de lípidos, b) mejora la señalización de insulina en el receptor y posterior transducción de señal; incrementando la fosforilación de la tirosina del receptor de la insulina en el músculo esquelético, asociado a un incremento de la sensibilidad a la insulina, activándose el 5'-AMP cinasa, de esta manera estimulando la utilización de la glucosa y oxidación de ácidos grasos en músculos esquelético e hígado; así mismo en el músculo esquelético incrementándose la expresión de los genes codificadores de proteínas involucradas en el transporte y oxidación de ácidos grasos (CD36, acyl-CoA oxidasa), todo esto resultando en un incremento de la combustión de grasas y disipación de energía. c) inhibición de la gluconeogénesis; al mejorar la inhibición de la producción de glucosa inducida por insulina, a través de la reducción de producción de enzimas gluconeogénicas (PEPCK) y glucosa 6 fosfatasa. d) inhibición de la señalización de TNF- α en el tejido adiposo; la adiponectina tiene propiedades potenciales anti-aterogénicas al inhibir la expresión de moléculas de adhesión, inhibición del TNF- α , inhibición de la adhesión de

los monocitos al endotelio celular, inhibición de la proliferación y migración de las células del músculo liso (24).



Med. Clin (Barc). 2005;124:38

Figura 3. Mecanismo de acción de la adiponectina sobre la sensibilidad a la insulina en el hígado y el tejido muscular esquelético. AMPK: 5'-AMP cinasa; G6Pasa: glucosa 6-fosfatasa; IRS: sustrato receptor estimulado por insulina; PPAR: receptores activados del peroxisoma proliferador.

Los estudios transversales de población muestran que concentraciones bajas de adiponectina están relacionadas con un aumento del perfil de riesgo metabólico y cardiovascular.

3.4. Proteínas Desacoplantes Mitocondriales (UCP's)

Las Proteínas Desacoplantes Mitocondriales (UCP's por sus siglas en inglés) son proteínas de aproximadamente 32KDa, son una familia de transportadores de la membrana interna mitocondrial (59,60). Tienen seis cruces transmembranales y su grupo amino y carboxilo terminal está

localizado en el espacio intermembranal (25). Los cruces transmembranales corresponden a α hélices ordenadas en pares, cada par está conectado por un *loop* hidrofóbico localizado del lado de la matriz. La unidad funcional de estas proteínas es un dímero formado por dos subunidades idénticas. Tienen un comportamiento dual tanto de acarreador como de canal; desde el punto de vista estructural se sugiere que hay una translocación hidrofóbica en el centro de la proteína, que se comportaría como un acceso controlado ya descrito en otros canales (26).

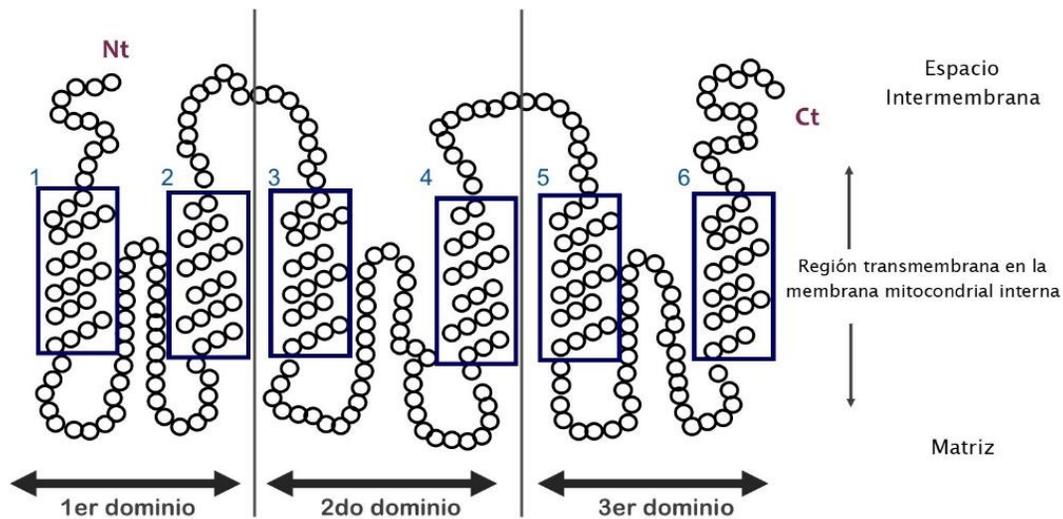


Figura 4. Las UCP's tienen seis cruces transmembranales y su grupo amino y carboxilo terminales están localizados en el espacio intermembranal (25). Los cruces transmembranales corresponden a α hélices ordenadas en pares, cada par está conectado por un asa hidrofóbica localizada del lado de la matriz. La unidad funcional de estas proteínas es un dímero formado por subunidades idénticas tienen un comportamiento dual tanto de acarreador como de canal: desde el punto de vista estructural se sugiere que hay una translocación hidrofóbica en el centro de la proteína (26).

Las UCP's tienen como papel crucial la termorregulación (producción de calor) y mantenimiento del metabolismo energético, por lo que están involucradas en el desarrollo de la obesidad (27). Estas proteínas están involucradas en el desacoplamiento del gradiente electroquímico, formado a través de la membrana interna mitocondrial, es decir, promoviendo la fuga o escape de los protones a través de la membrana interna

mitocondrial sin que estos pasen por la vía encargada de sintetizar ATP, lo que resulta en la producción de calor. Como resultado de este proceso de desacoplamiento, se induce la movilización de los triglicéridos almacenados en el organismo, por lo cual, tiene un papel primordial en el metabolismo de las grasas (62,63).

Se han descrito cinco miembros en esta familia, tres UCP1, UCP2 y UCP3 de los cuales han sido relacionados con la termogénesis, obesidad, diabetes, disminución de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés reactive oxygen species); además se han considerado como genes candidatos de patologías como obesidad y diabetes; mientras que UCP4 y UCP5 son más divergentes.

Termogénesis

El Índice de Masa Corporal (IMC) está regulado por el balance entre la ingesta y el gasto energético, y este último depende del metabolismo basal, del ejercicio y la de termogénesis. Un gasto energético bajo se ha asociado con un incremento en el desarrollo de la obesidad.

La termogénesis es la capacidad de generar calor en el organismo debido a las reacciones metabólicas reguladas por el sistema nervioso simpático, la noradrenalina liberada en las fibras simpáticas que se conectan con el TAP, interacciona con los receptores β -adrenérgicos de la membrana celular, y activa la adenilato ciclasa que sintetiza AMPc, sustrato de una proteína cinasa dependiente de AMPc encargada de activar a la lipasa sensible a hormonas (HSL), quien promueve la liberación de ácidos grasos almacenados en el TAP. Estos ácidos grasos actúan junto con la UCP1, activando el transporte de protones y estimulando la producción de calor, o son transportados como acil-carnitina, a la matriz mitocondrial para ser degradados por la β -oxidación, lo cual significa que los ácidos grasos funcionan como los segundos mensajeros de la noradrenalina (28).

El proceso de termogénesis metabólica contribuye al gasto energético y puede ser clasificado en termogénesis obligatoria y facultativa (29).

Termogénesis obligatoria.

El proceso de ingestión durante la alimentación, digestión, absorción y subsecuente almacenamiento también es un componente obligatorio de la termogénesis (30). Los cambios en la termogénesis obligatoria son usualmente pequeños y controlados primeramente por el sistema hipotalámico. También incluye el gasto de energía por el crecimiento, embarazo, lactancia y por crecimiento tumoral.

Termogénesis facultativa

La termogénesis facultativa es acompañada por procesos metabólicos que pueden ser modificados relativamente rápido por el sistema nervioso. El ejercicio induce termogénesis en el musculo esquelético que está bajo el control del sistema nervioso central. Usualmente no es posible realizar la cuantificación de los componentes individuales tanto de la termogénesis facultativa como de la obligatoria, primero porque los componentes de estas pueden presentarse de manera simultánea y segundo porque la facultativa solo ocurre cuando el sujeto está consciente de ello, por ejemplo, realizar ejercicio. La dieta también es un potente regulador de la termogénesis facultativa. En el ayuno la tasa metabólica puede disminuir en reposo o basal en un 40%.

La termogénesis es un componente que participa en la regulación del peso corporal y el gasto energético. Las Proteínas Desacoplantes Mitocondriales (UCP's) participan en la termorregulación y mantenimiento de la tasa metabólica basal. Estas proteínas participan en el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa y síntesis de ATP y disipan la energía normalmente

usada para estos procesos en forma de calor en vez de almacenar la energía en forma de grasa (31).

Fosforilación oxidativa.

Las mitocondrias son organelos formados por dos membranas, una externa y otra interna; esta última forma una serie de invaginaciones denominadas crestas. Entre ambas membranas se encuentra el espacio intermembranal. El interior de la mitocondria constituye la matriz mitocondrial, donde se lleva a cabo diversos procesos como el ciclo de Krebs, la β -oxidación de ácidos grasos, el ciclo de la urea, oxidación de ciertos aminoácidos, entre otros (32).

La principal característica de las mitocondrias es su especialización en la transducción de energía y la síntesis de adenosín trifosfato (ATP), el compuesto energético de mayor importancia para las células. La producción del ATP en este organelo se lleva a cabo a través de la fosforilación oxidativa (32).

Este fenómeno está determinado por el flujo de protones obtenidos de sustratos reducidos (NADH y en menor medida FADH) derivados del metabolismo de la glucosa y de los ácidos grasos. Los electrones que residen en estas moléculas son transferidos a través de una serie de complejos de proteínas integrales de membrana, llamados en conjunto "cadena respiratoria", hasta el O_2 , el cual se reduce a agua. Este proceso ocurre en la membrana mitocondrial interna (MMI) (33). La cadena respiratoria crea un gradiente electroquímico de protones (H^+) (34). Esto ocurre por el acarreo de electrones a través de una serie de reacciones de óxido-reducción. Una vez generado el gradiente, este es utilizado por la enzima F_1-F_0 -ATP sintasa (ATPasa), la cual es capaz de acoplar el paso de H^+ desde el espacio intermembranal a la matriz mitocondrial con la síntesis de ATP a partir de adenosín difosfato (ADP) y fosfato inorgánico (P_i) (35).

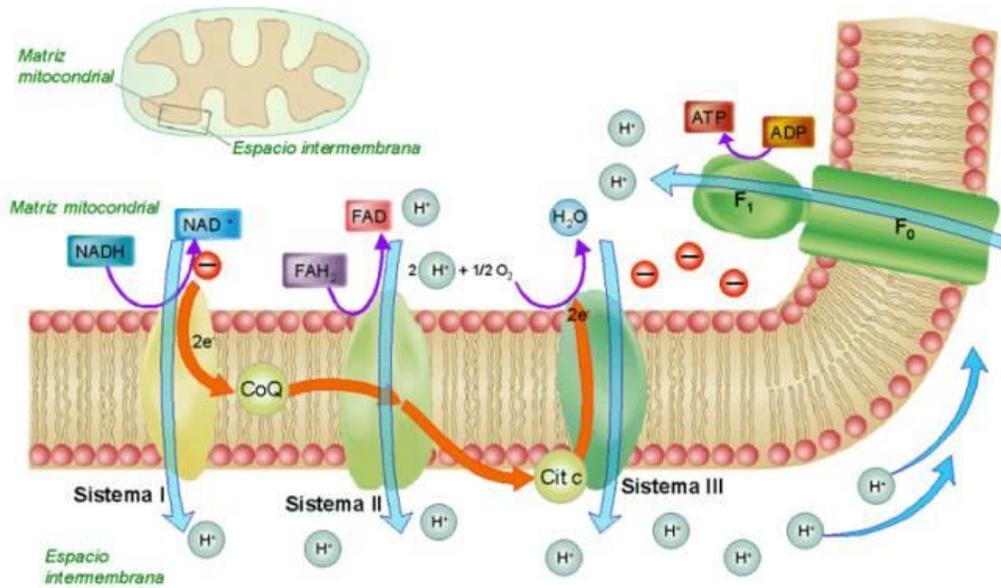


Figura 5. Fosforilación Oxidativa. Se esquematiza la síntesis de ATP a partir de la fosforilación de ADP

3.4.1. Proteína desacoplante mitocondrial 1 (UCP1)

La proteína desacoplante mitocondrial 1 (UCP1) fue la primera proteína desacoplante mitocondrial identificada (36); se expresa principalmente en Tejido Adiposo Pardo (TAP), sin embargo, en el caso de los humanos, el sitio donde se localiza la termogénesis adaptativa no está restringida solo al TAP, ya que los adultos no cuentan con grandes depósitos de TAP (37). La estructura del gen UCP1 está altamente conservada en el humano, rata y ratón, constituida por seis exones que forman la secuencia codificadora, cada exón codifica un dominio transmembranal (38).

La función de UCP1 es permitir el paso de protones del espacio intermembranal a la matriz mitocondrial, provocando la disipación del gradiente electroquímico de protones, generando calor en lugar de ATP, proceso conocido como termogénesis (39).

A pesar que la cantidad de TAP disminuye en adultos humanos, este tejido es responsable del 1-2% del gasto energético previniendo así una ganancia de peso entre 1-2Kg por año, y aunque aparentemente la contribución de

este tejido al gasto energético es pequeña, la ausencia o disminución de esta puede incrementar el riesgo de obesidad y estar relacionado con desórdenes metabólicos cuando la acumulación de energía en forma de grasa ha sido por décadas.

La importancia de la UCP1 en la termogénesis y en la regulación del peso corporal se demostró en animales transgénicos deficientes de esta proteína. Los ratones deficientes de UCP1 no son obesos ni hiperfágicos y son sensibles al frío, por otro lado, cuando esta proteína se sobre expresa en tejido adiposo, los ratones no aumentan de peso cuando consumen una dieta rica en grasa. Cuando se sobre expresa en tejido muscular esquelético resulta en una resistencia al aumento de peso y niveles más bajos de glucosa, insulina y colesterol, además de una tasa metabólica mayor que en el estado basal o durante el ejercicio.

También se ha observado que los niveles de expresión de ARNm de UCP1 en tejido adiposo son significativamente más bajos en sujetos con obesidad que en sujetos delgados lo que hace suponer que está involucrado en la regulación del peso corporal tal como ya se mencionó. Su expresión aumenta con la exposición al frío, varios estudios han demostrado un incremento en el contenido de UCP1 del TAP tras una exposición al frío (36).

3.4.2. Proteína desacoplante 2 (UCP2)

El gen de la UCP2 en humanos se encuentra en el cromosoma 11q1, cerca de una región asociada a obesidad y diabetes (40). Una característica particular del gen es la presencia de varios codones de inicio (ATG) con un marco de lectura abierto para un péptido desconocido de 36 aminoácidos, por lo que podría existir un *splicing* alternativo, aunque aún no está demostrado. La región promotora de UCP2 no tiene caja TATA que es típica en otras regiones promotoras, en vez de esto tiene una región rica en GC, con varios posibles sitios de unión para factores de transcripción como

SP1, AP-1, AP-2, proteínas de elementos de unión de respuesta al AMPc (CREB) y regulador muscular MyoD (41). Todo esto se ha inferido a través del uso de programas informáticos porque no se cuenta con evidencia experimental que lo sustente.

La distribución de esta proteína es mayor que UCP1 ya que se ha encontrado en Tejido Adiposo Blanco (TAB), bazo, corazón, riñones, pulmones, células β -pancreáticas, cerebro, timo, leucocitos, macrófagos, medula ósea, intestino, estómago, testículos, útero, hepatocitos, hipotálamo e hipófisis, entre otros (74,75). Esta UCP se ve aumentada cuando hay una dieta baja en calorías, de acuerdo a lo datos bibliográficos su papel parece estar relacionado con el control de las especies reactivas a oxígeno (ROS por sus siglas en inglés reactive oxygen species), la modulación de células inmunitarias así como la regulación de niveles de glucosa en el cerebro y páncreas (42). La UCP2 desarrolla un papel necesario en la regulación de la termogénesis adaptativa en respuesta al frío y a la dieta.

Los niveles de ARNm de la UCP2 en tejidos intra-abdominales y subcutáneos adiposos son inferiores en sujetos obesos comparados con sujetos delgados.

La UCP2 se encarga de atenuar la secreción de insulina, a través de dos sistemas, el primero es disminuyendo la eficiencia de la fosforilación oxidativa, debido al cambio de la relación ATP/ADP provocando la disminución de la estimulación del canal K_{ATP} disminuyendo la secreción de insulina; y el segundo funciona disminuyendo la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés Reactive Oxygen Species) (43).

3.4.3. Proteína desacoplante 3 (UCP3)

En humanos los genes UCP2 y 3 forman un clúster en el cromosoma 11q13, una región sintética son genes que se encuentran en el mismo

cromosoma y muy próximos, tanto que comparten una región que ha sido ligada a hiperinsulinemia en ratones (44). En humanos este gen se expresa en dos variantes generadas por un *splicing* alternativo, un transcrito codifica para la proteína larga (UCP3L, 316 aminoácidos), mientras que el otro codifica para una proteína corta (UCP3S; 275 aa) deficiente del sexto dominio transmembranal. La variante UCP3S es generada cuando la señal de paro localizada en el último intrón termina el mensaje de elongación prematuramente (45).

La proteína desacoplante mitocondrial 3 (UCP3), es altamente específica del músculo esquelético, corazón y tejido adiposo; además se ha sugerido que es uno de los principales reguladores de la termogénesis adaptativa en el humano (41). La estructura de la UCP3 cuenta con un exón en el extremo 5' no traducidos, lo cual hace que sus genes estén formados por siete exones (38).

Su ausencia no modifica el peso del organismo, pero su sobreexpresión propicia la pérdida del mismo.

La capacidad desacoplante de la UCP3 no está relacionada con el control de consumo de energía, ya que participa en la producción de calor, vía el metabolismo de los lípidos, principalmente a través de oxidación de los ácidos grasos en aquellos tejidos en donde los ácidos grasos son el sustrato principal para la generación de energía vía fosforilación oxidativa, tal como sucede en grasa parda y músculo esquelético (46).

Relación de la UCP's en la obesidad

Diversos estudios relacionan la expresión de las UCP's con una mayor o menor propensión al desarrollo de la obesidad. Los polimorfismos del gen UCP1 han sido asociados con el aumento de peso aún con una dieta baja en calorías. Sin embargo, ésta proteína está relacionada en menor grado a la obesidad en comparación a sus homólogas. Experimentos realizados con ratones deficientes de UCP1 han sugerido que la proteína no ejerce

papel protector contra la obesidad sino que más bien desempeña un papel primordial en la termogénesis inducida a frío (47) .

Estudios previos del papel del SNP de la UCP2 en la región promotora en la obesidad y diabetes han mostrado resultados controversiales en diferentes poblaciones. Se ha relacionado algunas mutaciones del gen de la UCP2, que parecen estar involucradas con desórdenes metabólicos, por ejemplo, el polimorfismo -866 A/G, del gen de UCP2, aumenta su transcripción y disminuye el riesgo de tener desórdenes metabólicos (48). Akami y col, reportaron que ese SNP, en la región -866 está asociada con los niveles de C-HDL en plasma estos sujetos iraníes sanos, encontraron que el genotipo GG contribuye con altos niveles de HDL plasmáticos más que el genotipo AA (49).

De la misma manera se ha observado que una mutación en el aminoácido 55 del exón 4 del gen de la UCP2, que consiste de la sustitución de una Ala por una Val (Ala55Val), parece estar implicada en el desarrollo precoz de la obesidad (50). Otras investigaciones han determinado que pacientes adultos con el genotipo Alanina/Alanina del gen de UCP2 con la mutación Ala55Val, tienen una mayor predisposición en desarrollar obesidad, con respecto a Alanina/Valina o Valina/Valina (51).

Teniendo en cuenta que la función fisiológica de UCP3 está relacionada con la regulación del gasto energético y la oxidación de ácidos grasos, su expresión ha sido sugerida como un factor de riesgo determinante para la padecer obesidad y DM2. Estudios en humanos han demostrado que la expresión de ARNm de UCP3 en músculo esquelético es menor en sujetos obesos en comparación con sujetos sanos, lo cual pone de manifiesto una correlación positiva entre los niveles de UCP3 muscular y las concentraciones de ácidos grasos no esterificados, así como el metabolismo de reposo; en contraparte está relacionada negativamente con el IMC. Esto significa que bajos niveles de UCP3 suponen un bajo consumo energético de reposo y un IMC elevado (52). En un estudio que relaciona el polimorfismo de la UCP3 en la posición -55 con la obesidad y

la diabetes, se observó que el alelo T está relacionado con el aumento de ARNm en el músculo (52) y en un estudio diferente se relacionó a este alelo con altos niveles de gasto energético durante el reposo en comparación con el alelo C (53). De la misma forma un estudio de sujetos con obesidad mórbida se asoció al alelo T con un aumento del IMC y dislipidemia, mientras que en otro se estima que el genotipo -55 C/T tiene menor riesgo de padecer obesidad (54) por otra parte el genotipo C/C se ha asociado con una menor expresión de ARNm, en biopsias de músculo esquelético de indios Pima sugiriendo que el alelo -55 T aumenta su expresión en comparación con el alelo C (52). Por lo que se cree que la UCP3 interviene en la regulación del IMC.

4. Planteamiento del problema

Las Proteínas Desacoplantes Mitocondriales UCP1, UCP2 y UCP3 están asociados con sobrepeso u obesidad, ya que son encargadas de la termorregulación, la utilización de la energía y, por lo tanto, en la regulación del peso corporal. La presencia de estas podría ser un indicativo de predisposición de los adolescentes de la CDMX que en edad adulta tengan sobrepeso u obesidad.

5. Hipótesis

Debido a la alta prevalencia de sobrepeso u obesidad en la CDMX, es una prioridad investigar la relación entre sobrepeso u obesidad y los factores involucrados en el desarrollo de esta enfermedad, las Proteínas Desacoplantes Mitocondriales (UCP's) han sido relacionadas con posibles factores involucrados con problemas de sobrepeso u obesidad en adultos, se espera observar si existen estas asociaciones de variantes genéticas en adolescentes mexicanos.

6. Objetivos

6.1. Objetivo general

Determinar los polimorfismos de las UCP's (UCP1 *rs1800592* C/T, UCP2 *rs660339* A/G, UCP2 *rs659366* C/T, UCP3 *rs1800849* A/G), así como los niveles plasmáticos de adiponectina y leptina y su asociación con el sobrepeso u obesidad en una población de adolescentes mexicanos de la CDMX.

6.2. Objetivos Específicos

1. Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de las Proteínas Desacoplantes Mitocondriales de UCP1 C/T (*rs1800592*), UCP2 A/G (*rs660339*), UCP2 C/T (*rs659366*), UCP3 A/G (*rs1800849*), en sujetos con y sin sobrepeso u obesidad.
2. Comparar los polimorfismos estudiados con las características clínicas de ambos grupos de estudio.
3. Determinar la asociación de UCP1 C/T (*rs1800592*), UCP2 A/G (*rs660339*), UCP2 C/T (*rs659366*), UCP3 A/G (*rs1800849*) con la actividad enzimática de adiponectina y leptina en ambos grupos de estudio.
4. Analizar la relación entre la actividad enzimática de adiponectina y leptina con las características clínicas de ambos grupos de estudio.
5. Comparar las frecuencias alélicas y genotípicas de la población mexicana con otras poblaciones previamente reportadas para identificar diferencias o semejanzas entre estas.

7. Diseño experimental

7.1. Población de estudio

La población de estudio se llevó a cabo al azar en escuelas públicas de la Ciudad de México; se analizaron 270 sujetos al azar entre 12 a 18 años, 145 niños y 125 niñas, 111 de ellos pacientes con sobrepeso u obesidad (IMC > percentil 85) y 159 individuos no obesos como grupo control (IMC < percentil 84.9). Los pacientes con obesidad fueron valorados previamente por estudios e historial clínico. El grupo control fue formado por sujetos que estuvieron en un percentil <84.9 y los pacientes con sobrepeso u obesidad con un percentil ≥ 85 . Se excluyeron individuos que tenían alguna relación familiar. La selección de ambas poblaciones se encuentra pareada por edad y sexo.

Todos los participantes se sometieron a una evaluación antropométrica, realizada por investigadores capacitados utilizando técnicas estándar. Se utilizó una báscula digital (Tanita BWB-700, Tanita Corp., Tokio, Japón) para determinar el peso, la grasa muscular y corporal, y una barra de altura digital (Seca modelo 242, Geschäftsführer Finanzen & Technik Seca GmbH & Co. Kg. Hamburgo, Alemania) para determinar su estatura. Todas las mediciones se realizaron entre las 8 a.m. y las 10 a.m. en las mismas condiciones de ayuno utilizando la técnica de Lohman (55). El IMC se calculó como el peso en kilogramo dividido por la altura al cuadrado en metro (Kg / m^2). Los adolescentes se clasificaron de acuerdo con los percentiles establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2007 como bajo peso (<percentil 15), normal (percentil 15 a 84.9), sobrepeso (percentil 85 a 94.9) u obeso (percentil ≥ 95), se requirió mediante el desarrollo de puntos de corte específicos para la edad y el sexo para el IMC (56). Los sujetos que estaban en el percentil de sobrepeso y obesidad se agruparon para formar el grupo de obesidad. Se

evaluó el índice cintura-cadera (ICC), adicional a la identificación de acantosis nigricans, y la presión arterial diastólica (PAD) y sistólica (PAS).

Aspectos éticos

Se obtuvo el consentimiento informado firmado de cada padre e hijo después de una explicación completa del propósito y la naturaleza de todos los procedimientos utilizados en el estudio de investigación. La investigación fue aprobada por la Comité de Ética Bioseguridad e Investigación del Instituto Nacional de Perinatología.

Criterios de inclusión:

Grupo de control

Niveles de IMC ≤ 24.2 (percentil 84.9)

No estar bajo tratamiento, no padecer ninguna enfermedad crónico-degenerativa, estar informados y de acuerdo con el tipo de estudio a realizar con firma de carta de consentimiento.

Grupo de pacientes con sobrepeso u obesidad (Grupo de estudio)

Niveles de IMC ≥ 24.3 (\geq percentil 85)

No estar bajo tratamiento, no padecer ninguna enfermedad crónico-degenerativa, estar informados y de acuerdo con el tipo de estudio a realizar con firma de carta de consentimiento.

7.2. Toma de muestra

Las muestras de sangre se recogieron mediante venopunción después de un ayuno de 12 h.

A cada sujeto se le tomo una muestra de sangre periférica, se tomaron aproximadamente 8-10 mL de sangre total periférica que fueron colectados en 2 tubos con ácido etilendiaminotetracético (EDTA) (1 mg/mL). De los tubos recolectados inmediatamente se separó el plasma por centrifugación a 3500 r.p.m. durante 5 minutos. Los glóbulos blancos se aislaron para la posterior extracción de ADN.

Los niveles de colesterol total, triglicéridos, lipoproteínas de alta densidad (C-HDL), colesterol de baja densidad (C-LDL) y glucosa se midieron utilizando el sistema fotométrico enzimático Lory 2000 Diasys (Holzheim, Alemania); los niveles séricos de leptina y adiponectina se midieron utilizando la técnica cuantitativa de inmunoensayo de enzimas sándwich (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, EE. UU.). La dosis mínima detectable suele ser inferior a 7,8 pg / mL y una dosis normal con un rango de 0 a 1000 pg / mL para leptina. A la inversa, para la adiponectina, la dosis mínima detectable suele ser inferior a 0.246 pg / mL y un rango normal de 0 a 250 ng / mL.

Se realizó un recuento completo de células sanguíneas utilizando un contador automático de células con un coeficiente de variación del 5% (Coulter Ac-T diff versión 1.03; Beckman Coulter, Miami, FL, EE. UU.).

7.3. Extracción de ADN

El ADN genómico se aisló de las muestras de sangre por medios de la técnica de expulsión salina de Miller (57), La técnica se explica detalladamente en el anexo 1. El ADN se cuantificó mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 260nm. Finalmente, el ADN fue disuelto y rehidratado en solución TE y ajustado a una concentración de 10ng/ μ L.

Los genotipos se determinaron utilizando una Reacción en Cadena de la Polimerasa (en inglés Polymerase Chain Reaction, PCR) mediante el uso de sondas TaqMan®.

7.4. Determinación del genotipo

Los genotipos se determinaron utilizando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) en tiempo real mediante el uso de sondas Taqman® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). La sonda Taqman® presenta en el extremo 5´ una marca fluorescente (reportero) y en el extremo 3´ un apagador (quencher). Cuando estas dos moléculas se encuentran unidas por la sonda, toda la fluorescencia emitida por el reportero, es absorbida por el apagador, por lo que la fluorescencia global observada es igual a cero, a este fenómeno se le conoce como de Förster (o Fluorescent) Resonant Energy Transfer (FRET).

Las sondas TaqMan® tienen una T_m mayor que los primers por lo que, durante la etapa de alineación, la sonda se une a su secuencia blanco específica ANTES que los primers. De esta forma cuando el ADN polimerasa se une al extremo 3´ del primer e inicia la elongación, en su paso se encuentra con la sonda y la degrada dada su actividad exonucleasa 5´→3´. Al ser degradada, libera al reportero del apagador (quencher) lo que suprime el fenómeno FRET y la fluorescencia emitida puede ser determinada por el sistema de detección del instrumento. Dado que la fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de sonda degradada, y esta a su vez es proporcional a la cantidad de templado generado, este sistema permite visualizar el incremento de amplicón a lo largo de la reacción de PCR.

Los *primers* y las sondas que se utilizaron para la discriminación alélica fueron específicas para la identificación de los alelos.

La detección de los polimorfismos se realizó por medio de sondas marcadas con dos fluorocromos (VIC y FAM). Se amplificaron los polimorfismos UCP1-3826 C/T (*rs1800592*), UCP2-55A/G (*rs60339*), UCP2-866 A/G (*rs659366*) y UCP3-55 C/T (*rs1800849*) utilizando las sondas que se enlistan a continuación:

SNP	Fluorocromo	Sondas
rs660339	VIC	CATCACACCGCGGTAAGTGGGGCGCTG [A] CTGTAGCGCGCACTGGCCCCTGACT
	FAM	CATCACACCGCGGTAAGTGGGGCGCTG [G] CTGTAGCGCGCACTGGCCCCTGACT
rs659366	VIC	TGACCCGTCCTGTGGGGGTAAGTGA [C] GCGTGAACAGCCAACAATTGGGCCC
	FAM	TGACCCGTCCTGTGGGGGTAAGTGA [T] GCGTGAACAGCCAACAATTGGGCCC
rs1800849	VIC	GGCTTGGCACTGGTCTTATACACAC [A] GGCTGACCTGAAACCTTATCCTAGA
	FAM	GGCTTGGCACTGGTCTTATACACAC [G] GGCTGACCTGAAACCTTATCCTAGA
rs1800592	VIC	TGTAGAACACATTAACAAATGCACT [C] GATCAAAGTGGTCAATCAGAAAT
	FAM	TGTAGAACACATTAACAAATGCACT [T] GATCAAAGTGGTCAATCAGAAAT

La mezcla de reacción se llevó a cabo en placas de 96 pozos, donde se incluyeron controles negativos y positivos.

Las condiciones de reacción fueron:

- 1 ciclo de 10 min a 95°C
- 45 ciclos a 96°C por 15 segundos
- 1 ciclo de 1 minuto a 60°C

Posteriormente se realizó una lectura en un sistema de detección de secuencias ABI Prism 7000 según las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). Cada Polimorfismo de un solo nucleótido (Single Nucleotide Polymorphism, SNP), genotipo y discriminación de alelos se estudiaron manualmente y automáticamente con el software de discriminación alélica (7300 System SDS Software®, Applied Biosystems). Los datos obtenidos permitieron realizar una discriminación alélica por agrupamiento en forma gráfica (Figura 7).

7.5. Análisis estadístico

Los datos clínicos entre los grupos se compararon mediante la *prueba t de Student* para muestras independientes.

Los niveles de fluorescencia de los productos amplificados de la PCR fueron cuantificados y analizados usando el software propio del equipo utilizado (7300 System SDS Software®, Applied Biosystems).

Las frecuencias de alelos y genotipos de los polimorfismos estudiados en todos los sujetos se obtuvieron por conteo directo. El equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) se calculó utilizando la prueba de ji cuadrado (58). Los resultados se presentan como la media \pm DE (desviación estándar) y el porcentaje. La significación de las diferencias entre los grupos se determinó mediante el análisis de chi-cuadrado (X^2) de Mantel-Haenzel, que se combinó con las tablas de contingencia 2×2 . Se calcularon la razón de momios agrupadas (odds ratios, OR) combinados con intervalos de confianza (IC) del 95%. Para evaluar las asociaciones de los polimorfismos de acuerdo a los diferentes modelos de herencia para los polimorfismos UCP1-3826 A / G, UCP2 -866 G / A, Ala55Val y UCP3 -55 C / T se realizó la siguiente determinación: modelo dominante (CT + CC vs TT para UCP1, UCP2 55 y UCP3 y GG + GA vs AA para UCP2 -866G / A), modelo recesivo (CC vs CT + TT UCP1, UCP2 55 y UCP3 y GG vs GA + AA para UCP2-866G / A), modelo co-dominante 1 (CT vs CC para UCP1, UCP2 55 y UCP3 y GA vs GG para UCP2-866G / A), modelo co-dominante 2 (TT vs CC UCP1, UCP2 55 y UCP3 y AA vs GG para UCP2-866G / A), modelo aditivo (2TT + CT vs CC para UCP1, UCP2 55 y UCP3 y 2AA + GA vs GG para UCP2-866G / A), modelo sobre-aditivo (CT vs CC + TT para UCP1, UCP2 55 y UCP3 y GA vs AA + GG para UCP2-866G / A) y modelo alélico (T vs C para UCP1, UCP2 55 y UCP3 y A vs G para UCP2-866G / A), respectivamente. Estadísticamente la significancia fue definida como $p \leq 0.05$. Se realizaron análisis de regresión logística para evaluar las asociaciones de UCP's con variables clínicas, bioquímicas y hormonales, bajo diferentes modelos de herencia. La prueba U de Mann-Whitney se utilizó para comparar los niveles de adiponectina y leptina entre los grupos. Los resultados están expresados como la media \pm DE. Todas las comparaciones estadísticas fueron realizadas con el software para Windows SPSS versión 20 (Instituto Broad del MIT y Harvard; <https://www.broadinstitute.org/haploview/haploview>).

8. Resultados

8.1. Características clínicas de la población total y por grupo de estudio

Se realizó un estudio transversal a 315 adolescentes resultados al azar solo 270 individuos cumplieron los criterios de inclusión, 145 niños y 125 niñas de entre 12 a 18 años de edad, de los cuales el 53.7% de género masculino y el 46.3% de género femenino; la población se encuentra equilibrada con respecto a sexo y edad. Las características clínicas generales, promedios y diferencias estadísticas de la población se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Características clínicas y antropométricas de la población de estudio.

	Normal	Sobrepeso/ obesidad	Valor de p
	n=159	n=111	
Edad (años)	16.6±1.08	16.7±1.11	0.518
Peso (Kg)	52.91±6.6	69.7±10.6	< 0.001
Estatura (cm)	158±7.2	158.3±8.7	0.711
IMC (Kg/m ²)	21.17±1.96	27.83±3.93	< 0.001
ICC (cm)	71.09±8.07	85.86±13.34	< 0.001
PAS (mmHg)	111.03±12.69	115.16±9.18	0.006
PAD (mmHg)	74.90±9.16	73.38±9.03	0.451
Peso al nacer (Kg)	2.73±1.06	2.68±1.13	0.721
Estatura al nacer (cm)	48.74±4.87	49.27±3.93	0.727
Grasa (%)	28.8±6.32	35.60±6.60	< 0.001
Grasa (Kg)	2.65±2.68	3.22±2.75	0.097
Musculo (Kg)	17.7±4.61	19.27±4.46	0.009
Colesterol total (mg/dL)	154.73±35.2	168.2±31.58	0.0021
Trigliceridos (mg/dL)	94.76±41.41	127.05±62.5	< 0.001
C-HDL (mg/dL)	53.28±8.91	51.29±8.42	0.396
C-LDL (mg/dL)	79.85±31.77	90.06±24.13	0.326
Glucosa (mg/dL)	91.16±11.47	93.68±8.84	0.067
Leptina (ng/dL)	9.7(5.4-15.8)	21.1(12.8-28.8)	< 0.001
Adiponectina (µg/mL)	8.7(6.6-11.1)	7.1(5.0-9.2)	0.173
Acantosis (%)	3%	32.7%	< 0.001

IMC, Índice de Masa Corporal; ICC, Índice Cintura-Cadera; PAS, presión arterial sistólica; PAD, presión arterial diastólica; C-HDL, colesterol de alta densidad; C-LDL, colesterol de baja densidad. Los valores se expresan como media ± DE., excepto leptina y adiponectina expresado como media (p25-p75) utilizando la prueba de Student y la prueba U de Mann-Whitney, respectivamente.

En base a los criterios anteriores se dividió a la población en dos grupos, controles o individuos clínicamente sanos (n=159); y pacientes con sobrepeso u obesidad (casos) (n=111), utilizando los criterios de la OMS, se consideró a los sujetos control aquellos que presentaran un percentil <84.9 y a pacientes con sobrepeso u obesidad aquellos que presentaran un percentil ≥ 85 .

Del grupo control 84 niños y 75 niñas (58% vs 69% respectivamente), 61 niños y 50 niñas con sobrepeso u obesidad (55% vs 45%). Se encontró una diferencia significativa en la frecuencia según el IMC entre niños y niñas en peso normal y con obesidad (p=0,001). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas al comparar por género (p=0.730), se encontró diferencias significativas en Presión Arterial Sistólica (PAS) (p=0.006), porcentaje de grasa (p=0.001), musculo (p=0.009), Colesterol Total (p=0.002), Triglicéridos (p \leq 0.001), Leptina (p \leq 0.001), pero no en peso (p=0.721) y longitud al nacer (p=0.727), C-HDL (p=0.396), C-LDL (p=0.326) o adiponectina (p=0.173).

8.2. Curvas de amplificación y discriminación alélica

Se obtuvieron curvas de amplificación típicas en todos los SNP realizados, y cada muestra fue analizada según sus valores de fluorescencia relativa (*RFU, relative fluorescence units*), número de ciclos (*Ct, cycle time*) y con la semejanza a una curva típica de amplificación, para cada ensayo se utilizaron 4 controles positivos y 4 controles negativos.

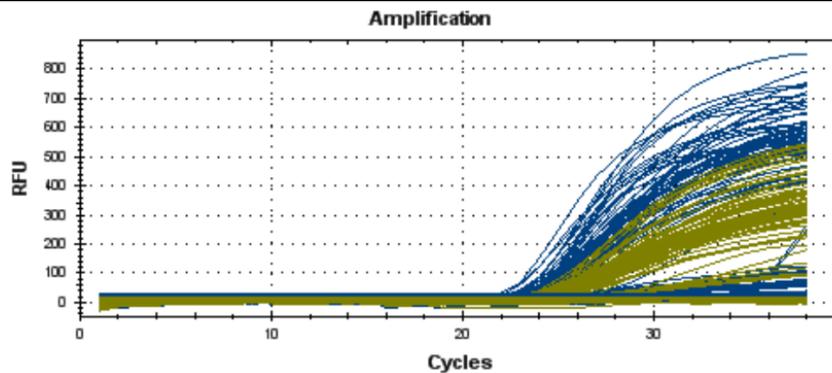


Figura 6. Curvas de amplificación. Mostrada por el software de análisis del aparato de PCR-tiempo real. En color verde se observa la amplificación con el fluorocromo VIC y en azul con FAM.

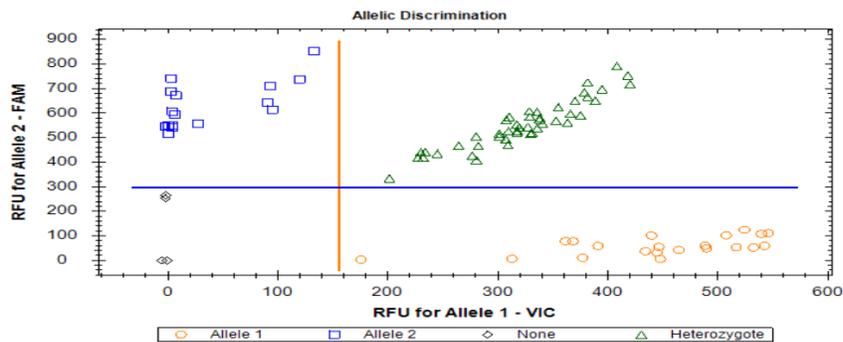


Figura 7. Gráfica de discriminación alélica. Se muestran los genotipos de homocigotos para el alelo marcado con FAM (\square), homocigotos para el alelo marcado con fluorocromo VIC (\circ) y heterocigotos (\triangle). Además también se muestran los controles negativos o las o las muestras que no presentaron amplificación (NTC) (\diamond).

En la Figura 7 se muestra una gráfica con la distribución de genotipos generados de una placa representativa, donde en color azul se observan las muestras que son homocigotos para el alelo marcado con FAM, en color verde las muestras heterocigotas, en color naranja las muestras que son homocigotas para el alelo marcado con fluorocromo VIC, y en color negro los controles negativos o las muestras que no amplificaron (NTC).

8.3. Frecuencias alélicas y genotípicas de las Proteínas Desacoplantes Mitocondriales (UCP's), divididas por grupo de estudio.

Para determinar si la población se encontraba en el equilibrio Hardy Weinberg (HWE) se realizó una prueba de X^2 y el cálculo de las frecuencias genotípicas y alélicas se realizó por conteo directo. Se analizaron las frecuencias alélicas y genotípicas de los 4 polimorfismos estudiados en 7 modelos de herencia y se realizó la comparación entre nuestros sujetos pacientes vs controles.

Las distribuciones de genotipos estaban de acuerdo con las predichas por el HWE, excepto para UCP2-55 en sujetos con sobrepeso / obesidad ($chi^2 = 4.075$, $p = 0.040$) y para UCP2-866 en el grupo de peso normal ($chi^2 = 9.07$, $p = 0.001$). La frecuencia del alelo menor (MAF) se consideraba como una referencia en la construcción de modelos de herencia. La distribución alélica de todos los polimorfismos UCP's no difirió significativamente entre la población de peso normal y de sujetos obesos. Cabe destacar que las frecuencias de estos polimorfismos UCP's tampoco variaron al asumir diferentes modelos de herencia ($p \geq 0.05$) (Tabla 2).

Tabla 2. Frecuencias de los genotipos de las UCP's en diferentes modelos de herencia.

	Frecuencia Genotípica			Modelo	Valor de P	OR (95%CI)
	N (%)					
	C/C	C/T	T/T			
UCP1-3826						
Control	51 (32.1)	81(50.9)	27 (17.0)	Dominante	0.465	1.21 (0.71-2.07)
Obesidad	31 (27.9)	62(55.9)	18 (16.2)	Recesivo	0.842	0.93 (0.48-1.79)
				Co-dominante 1	0.415	1.25 (0.72-3.19)
				Co-dominante 2	0.808	1.09 (0.52-2.31)
				Aditivo	0.500	1.19 (0.71-2.00)
				Sobre-aditivo	0.426	1.21 (0.74-1.98)
				Alélico	0.696	0.93 (0.66-1.31)
UCP2-A55V						
Control	43(27.0)	85(53.5)	31 (19.5)	Dominante	0.080	1.68 (0.92-3.06)
Obesidad	20 (18.0)	66(59.5)	25(22.5)	Recesivo	0.546	1.20 (0.66-2.17)
				Co-dominante 1	0.103	1.66 (0.89-3.10)
				Co-dominante 2	0.147	1.73 (0.82-3.66)
				Aditivo	0.073	1.69 (0.94-3.04)
				Sobre-aditivo	0.328	1.27 (0.78-2.08)
				Alélico	0.168	1.27 (0.92-1.79)
UCP2-866						
	G/G	G/A	A/A			
Control	33(20.8)	99(62.3)	27 (17.0)	Dominante	0.994	1.00 (0.55-1.82)
Obesidad	23(20.7)	63(56.8)	25 (22.5)	Recesivo	0.255	1.42 (0.77-2.61)
				Co-dominante 1	0.733	0.91 (0.49-1.69)
				Co-dominante 2	0.464	1.32 (0.62-2.84)
				Aditivo	0.846	1.05 (0.59-1.90)
				Sobre-aditivo	0.484	0.83 (0.51-1.37)
				Alélico	0.523	1.11 (0.79-1.57)
UCP3-55						
	C/C	C/T	T/T			
Control	114(71.7)	39(24.5)	6 (3.8)	Dominante	0.801	1.07 (0.62-1.82)
Obesidad	79(71.2)	28(25.4)	4 (3.6)	Recesivo	0.606	0.95 (0.26-3.45)
				Co-dominante 1	0.902	1.03 (0.58-1.82)
				Co-dominante 2	0.853	0.96 (0.26-3.52)
				Aditivo	0.943	1.01 (0.60-1.70)
				Sobre-aditivo	0.896	0.89 (0.59-1.81)
				Alélico	0.955	1.01 (0.63-1.61)

Asociación de los polimorfismos UCP's con los parámetros clínicos.

Los análisis de regresión logística se realizaron para evaluar las asociaciones de UCP's y varios factores de riesgo de obesidad metabólica se muestran en la Tabla 3, después de ajustar la edad y el sexo del sujeto

utilizando tres modelos de herencia, co-dominante 1, dominante y recesivo. En todos los polimorfismos UCP's estudiados, el modelo recesivo fue el más asociado.

Tabla 3. Polimorfismos de UCP's y los parámetros clínicos en los modelos co-dominante, dominante y recesivo.

	UCP1-3826			UCP2-A55V			UCP2-866			UCP3-55		
	p1	p2	p3	p1	p2	p3	p1	p2	p3	p1	p2	p3
IMC (kg/cm ²)	0.942	0.995	0.741	0.598	0.326	0.636	0.818	0.936	0.0008	0.486	0.818	0.243
PAS (mmHg)	0.210	0.080	0.829	0.312	0.131	0.938	0.905	0.664	0.894	0.633	0.760	0.202
PAD (mmHg)	0.034	0.011	0.894	0.394	0.183	0.970	0.016	0.437	0.008	0.153	0.393	0.745
Grasa (%)	0.151	0.784	0.002	0.939	0.854	0.185	0.980	0.976	0.146	0.528	0.656	0.958
Músculo (%)	0.161	0.176	0.019	0.716	0.628	0.394	0.498	0.699	0.289	0.242	0.790	0.118
CT (mg/dL)	0.481	0.767	0.210	0.854	0.590	0.977	0.855	0.721	0.679	0.541	0.198	0.084
Tg (mg/dL)	0.620	0.940	0.349	0.965	0.825	0.843	0.195	0.153	0.045	0.325	0.963	0.207
C-HDL (mg/dL)	0.776	0.779	0.484	0.563	0.384	0.693	0.640	0.434	0.056	0.798	-----	0.575
C-LDL (mg/dL)	0.514	0.846	0.271	0.317	0.132	0.977	0.004	0.824	0.003	0.544	-----	0.794
Glucosa (mg/dL)	0.317	0.740	0.102	0.892	0.637	0.853	0.913	0.674	0.625	0.575	0.777	0.171
HiperTg mg/dL	0.583	-----	0.570	0.580	-----	-----	0.037	-----	-----	0.001	-----	0.569
Hipo HDL mg/dL	0.660	0.525	0.920	0.983	0.859	0.859	0.007	0.614	0.670	0.180	-----	0.180
Hiper LDL mg/dL	0.973	0.866	0.913	0.373	0.280	0.548	0.678	0.396	0.771	0.641	-----	0.641
Leptina, ng/mL	0.551	0.719	0.274	0.933	0.724	0.853	0.585	0.486	0.466	0.544	-----	0.549
Adiponectina µg/mL	0.643	0.747	0.448	0.278	0.475	0.153	0.197	0.074	0.071	0.164	-----	0.164

Análisis logístico de regresión, ajustado por edad y género. El número muestra el valor de pC en: p1: modelo co-dominante 1; p2: modelo dominante; p3: modelo recesivo. Los valores significativos están en negrita, IMC: Índice de Masa Corporal; PAS: Presión arterial sistólica; PAD: Presión arterial diastólica; CT: Colesterol Total; Tg: Triglicéridos; C- HDL: Colesterol de lipoproteínas de alta densidad; C-LDL: Colesterol de lipoproteínas de baja densidad; HiperTg >150 mg/dL, Hipo HDL <40 mg/dL, Hiper LDL >130 mg/dL.

La Tabla 4, muestra los parámetros clínicos en un modelo recesivo, en donde, observamos que el polimorfismo UCP1-3826 (*rs1800592*) se asoció con un alto porcentaje de grasa ($p = 0,002$) y músculo ($p = 0.019$) en un modelo recesivo. Alternativamente, el polimorfismo UCP2-866 (*rs659366*) se vinculó con el IMC ($p = 0.0008$), PAD ($p = 0.008$), triglicéridos ($p = 0.045$), C-LDL ($p = 0.003$), bajos niveles de C-HDL ($p = 0.056$). Por último, el polimorfismo UCP3-55 C / T (*rs1800849*) se correlacionó con un aumento en ICC ($p = 0,008$).

Tabla 4. Polimorfismos de UCP's y los parámetros clínicos en un modelo recesivo.

	UCP1-3826 <i>rs1800592</i>			UCP2-866 <i>rs659366</i>			UCP3-55 <i>rs1800849</i>		
	CC	CT+TT	P	GG	GA+AA	P	CC	CT+TT	P
IMC (kg/cm ²)	23.8 ± 4.0	23.6 ± 4.03	0.741	22.5 ± 4.0	23.8 ± 4.0	0.0008	23.6 ± 3.9	24.4 ± 4.4	0.243
ICC (cm)	76.8 ± 10.8	77.1 ± 13.6	0.853	74.5 ± 9.3	77.1 ± 12.9	0.688	75.8 ± 10.7	81.0 ± 17.6	0.008
PAS (mmHg)	113.3 ± 10.6	113.0 ± 8.8	0.829	113.7 ± 13.8	113.1 ± 9.3	0.894	113.5 ± 8.6	111.7 ± 11.3	0.202
PAD (mmHg)	76.0 ± 8.9	75.8 ± 9.3	0.894	70.0 ± 2.4	76.0 ± 9.2	0.008	75.7 ± 9.5	76.2 ± 8.4	0.745
Grasa (%)	2.53 ± 0.75	3.0 ± 0.2	0.002	2.2 ± 0.71	2.9 ± 2.83	0.146	2.90 ± 3.10	2.92 ± 1.5	0.958
Músculo (%)	17.9 ± 3.9	18.5 ± 4.9	0.019	16.0 ± 2.0	18.4 ± 4.5	0.289	18.1 ± 4.3	19.2 ± 4.8	0.118
CT (mg/dL)	165.8 ± 32.7	159.8 ± 35.9	0.210	170.0 ± 18.2	161.5 ± 35.2	0.679	159.4 ± 34.9	168.4 ± 34.8	0.084
TG (mg/dL)	113.3 ± 55.1	106.1 ± 56.4	0.349	76.6 ± 25.1	108.6 ± 76.4	0.045	105.7 ± 50.9	115.8 ± 59.5	0.207
C-HDL (mg/dL)	53.4 ± 9.01	52.2 ± 8.07	0.484	64.5 ± 3.5	52.4 ± 3.7	0.056	52.8 ± 9.3	51.9 ± 7.0	0.575
C-LDL (mg/dL)	86.0 ± 29.3	80.1 ± 32.7	0.271	103.3 ± 2.6	81.6 ± 31.8	0.003	81.5 ± 31.4	83.1 ± 33.1	0.794
Glucosa (mg/dL)	93.6 ± 9.0	91.4 ± 10.9	0.102	92.6 ± 1.5	92.1 ± 10.5	0.625	91.5 ± 10.6	93.7 ± 9.6	0.171

Todas las asociaciones fueron probadas utilizando regresión logística ajustando por edad y género

IMC: Índice de Masa Corporal, ICC: relación cintura-cadera; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; CT: Colesterol Total; C-HDL: lipoproteínas de alta densidad; C-LDL: lipoproteínas de baja densidad, TG: Triglicéridos.

Por último, se compararon los niveles de leptina en diferentes grupos de IMC. La Figura 8 sugiere que a medida que aumenta el IMC en cada grupo de estudio, los niveles de leptina tienden a aumentar. En otras palabras, los niveles más bajos se encuentran en el grupo de bajo peso, mientras que los más altos se encuentran en el grupo de obesidad.

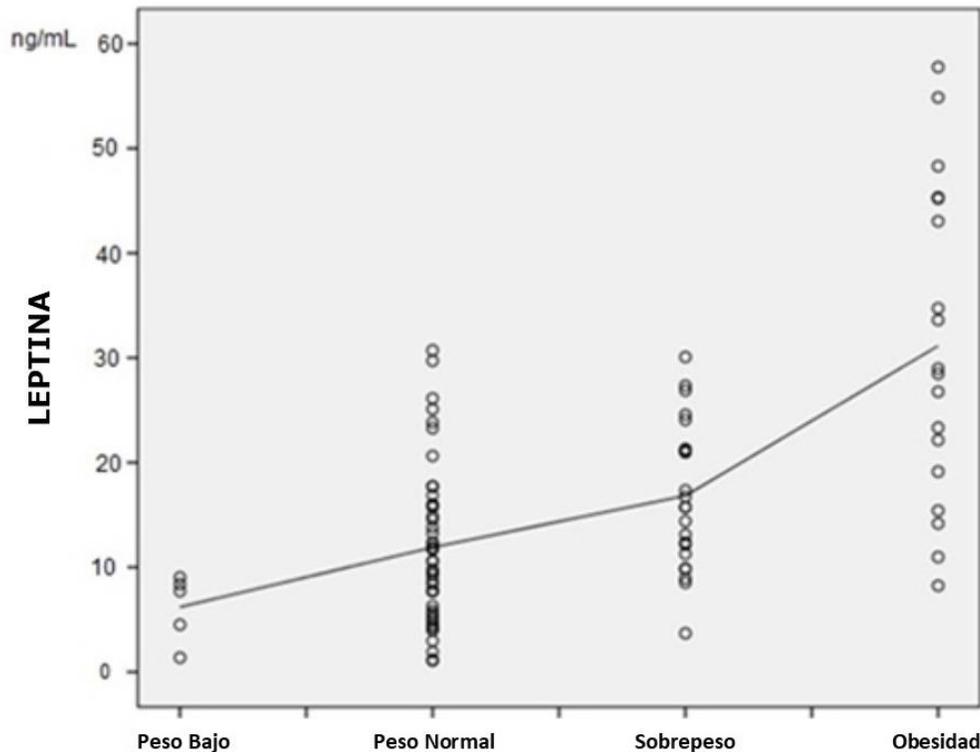


Figura 8. Niveles de leptina divididos por el Índice de Masa Corporal (IMC).

Alternativamente, se analizaron los niveles de leptina y adiponectina en el grupo con sobrepeso / obesidad en un modelo recesivo de dos genotipos de UCP2-866 (*rs659366*). Se encontró que GA + AA tenía mayores niveles de leptina con respecto al genotipo GG, mientras que la tendencia opuesta se muestra en el caso de la adiponectina. Es decir, que los niveles de adiponectina para el genotipo GG fueron mayores con respecto a GA + AA (Figura 9). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre sujetos masculinos y femeninos (datos no presentados).

Del mismo modo, se realizó una comparación entre diferentes variables clínicas con niveles plasmáticos de adipocinas. Se encontró una correlación entre la leptina y el porcentaje de grasa ($r_s = 0,685$) e IMC ($r_s = 0,478$) ($p \leq 0,01$).

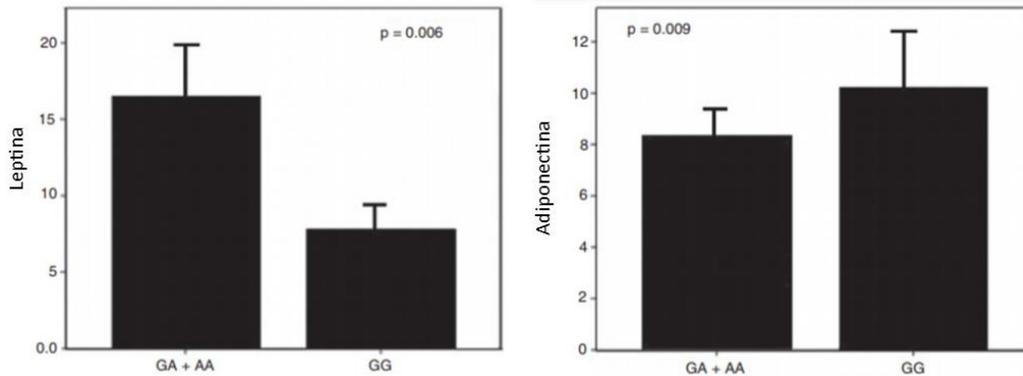


Figura 9. Niveles de leptina y adiponectina en sujetos con sobrepeso u obesidad en un modelo recesivo de UCP2-866. Las unidades de leptina están expresados en unidades de ng/mL, y adiponectina en µg/mL. Los valores se expresan como media \pm DE.

8.4. Comparación de frecuencias alélicas con otras poblaciones previamente reportadas

Con el propósito de comparar la carga genética de nuestra población con respecto a otras poblaciones mundiales, se realizó una comparación mediante la prueba de χ^2 de las frecuencias alélicas y del alelo menos frecuente (MAF) obtenidas del HapMap de los paneles: CEU, CHB, JPT, YRI y MEX, hallados en la literatura (83). Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Frecuencias alélicas correspondientes a los SNP

Población	n	UCP2-55 rs660339			UCP3-55 rs1800849			n	UCP2-866 rs659366			UCP1-3826 rs1800592	
		A	G	P	A	G	P		C	T	P	C	T
Nuestra Población	111	0.48	0.52	0.313	0.84	0.16	0.993	111	0.49	0.51	0.615	0.56	0.44
MEX	100	0.38	0.62	0.090	0.11	0.89	0.934	98	0.61	0.39	0.003+	0.41	0.59
CEU	226	0.42	0.58	0.205	0.24	0.76	0.002	226	0.63	0.37	0.0001++	0.24	0.76
CHB	82	0.55	0.45	0.365	0.34	0.66	0.0001*	82	0.46	0.54	0.523	0.47	0.54
JPT	172	0.54	0.46	0.333	0.29	0.72	0.0001**	172	0.45	0.55	0.545	0.39	0.61
YRI	226	0.48	0.52	0.867	0.09	0.91	0.428	226	0.52	0.48	0.063	0.73	0.27

MEX, población mexicana; CEU, población europea; CHB, población china; JPT, población japonesa, YRI, población africana.

CEU: residentes adultos de Utah originarios de Europa occidental y del norte. CHB: habitantes adultos de Beijín, China. JPT: habitantes adultos de Tokio, Japón. YRI: adultos originarios de la comunidad de Badán, Nigeria. MEX: mexicanos residentes de Los Ángeles, California EUA.

*OR= 0.407 IC95% (0.22-0.73)

**OR= 0.321 IC95% (0.17-0.58)

+ OR= 0.453 IC95% (0.27-0.77)

++ OR= 0.421 IC95% (0.27-0.64)

9. Discusión

En este estudio, se tuvo como objetivo evaluar a adolescentes mexicanos con sobrepeso u obesidad sobre el rol que juegan las variantes de Proteínas Desacoplantes Mitocondriales (UCP's) en siete modelos de herencia en un intento de obtener una conclusión más definitiva sobre la asociación entre polimorfismos UCP's y la obesidad en los niños adolescentes de la Ciudad de México.

Las UCP's son genes candidatos para obesidad por la relación con el balance de energía y producción de calor dado que las UCP's disminuyen el potencial de membrana mitocondrial y median la fuga de protones. Varios estudios han demostrado que las mutaciones reducen la actividad de estas proteínas o expresión de alguna de estas, la cual podría reducir el gasto energético mediante el aumento de acoplamiento de la fosforilación oxidativa o una disminución en la termogénesis y de este modo contribuir a los cambios de IMC y desarrollo de sobrepeso u obesidad (59). A pesar de estudios amplios entre los polimorfismos UCP's y la

relación con la obesidad, los resultados de estas asociaciones aun no son concluyentes, sin embargo se han identificado varios polimorfismos en el gen y su analogía con los fenotipos relacionados con la obesidad (60).

Nuestro estudio se enfocó en cuatro polimorfismos (UCP1-3826 (*rs1800592* C/T), UCP2-55 (*rs660339* A/G), UCP2-866 (*rs659366* C/T) y UCP3-55 (*rs1800849* A/G).

El gen de la proteína desacoplante UCP1 se expresa en el TAP, sin embargo, el sitio en donde se localiza la termogénesis adaptativa no está restringida solo a TAP, el gen de la proteína desacoplante UCP2 en humanos está ampliamente expresado en varios tejidos como el tejido blanco, bazo, corazón, riñones, páncreas, musculo esquelético, hígado, entre otros. El gen de la proteína desacoplante UCP3 es altamente específica del musculo esquelético, corazón y tejido adiposo.

Polimorfismos UCP's

En el presente estudio se muestra que las frecuencias genotípicas y alélicas en UCP1 *rs1800592*, UCP2 *rs659366*, UCP2 *rs660339* y UCP3 *rs1800849* bajo siete modelos de herencia (dominante, recesivo, co-dominante1, co-dominante2, aditivo, sobre-aditivo y alélico) fueron similares entre los niños de peso normal y sobrepeso / obesidad. Nuestros resultados fueron similares a otros estudios reportados previamente en diferentes poblaciones, como Colombia, hispano americanos y nativos Pima de Arizona, EUA (83-86). En contraste con lo reportado de la población de etnia europea (86-88), donde se ha informado una alta asociación entre las variantes de UCP's según el IMC, esto, en las poblaciones europeas. Por lo tanto, nuestros resultados mostraron que nuestro grupo de estudio tiene una base genética diferente.

Polimorfismos UCP's y parámetros clínicos

Por otro lado, en el modelo recesivo, se encontraron correlaciones significativas en varios polimorfismos UCP's con diferentes características clínicas y antropométricas. UCP1 *rs1800592*, se asoció con porcentaje de músculo y grasa, mientras que la UCP3 *rs1800849*, con el índice cintura-cadera. Sin embargo, se encontró que las diferencias más significativas entre los genotipos son en UCP2 *rs659366* en los parámetros clínicos (IMC, CT, C-HDL, C-LDL) y los niveles de leptina y adiponectina.

Es sabido que la capacidad de UCP2 podría inducir la pérdida de protones a través de la membrana mitocondrial interna, y por lo tanto sobre la participación en la regulación del gasto energético, por lo que hace que los genes candidatos para la diabetes tipo 2 y la obesidad (88,89). Los polimorfismos -866 G / A se han estudiado ampliamente por su asociación con la obesidad. Krauss C, et al 2003 (61), se observó que el alelo G se asoció a mejorar la expresión de ARNm de tejido adiposo *in vivo*, reduciendo la actividad transcripcional y aumentando riesgo de obesidad. Otros estudios reportaron también aumento de la prevalencia del alelo A en la obesidad (43) (62), o ninguna asociación con ellos (93-95). En nuestro trabajo en un modelo recesivo se encontró un aumento en el IMC, PAD, colesterol total, triglicéridos, LDL-C, leptina y ligera disminución de C-HDL y adiponectina en el UCP2 *rs659366*. Se sabe que el perfil lipídico se asoció a la obesidad y a otros parámetros como los altos niveles de colesterol total, triglicéridos, C-LDL y la disminución de C-HDL. Todos estos parámetros coinciden con las características clínicas y antropométricas asociadas con UCP2-866 en un modelo recesivo descrito en nuestros resultados.

Aunque se ha informado una correlación moderada asociada con la obesidad en el alelo A -866 los estudios también han podido demostrar una asociación entre estos polimorfismos y características metabólicas

(96,97); sin embargo, en una población pediátrica con sobrepeso u obesidad se ha mostrado que tiene grandes cantidades de tejido adiposo. Estas inconsistencias podrían atribuirse al tamaño pequeño de la muestra, la cobertura incompleta de las variaciones del gen UCP2 o influencias específicas de la población potencial sobre los rasgos metabólicos, grupos étnicos, métodos de determinación genética y / o la edad de los sujetos de estudio.

Adipocinas y polimorfismos de las UCP's

La leptina es sintetizada y secretada por el tejido adiposo, cuya función es suprimir el apetito y estimular el gasto de energía, dando como resultado la reducción del peso corporal y la masa de tejido adiposo. De este modo, los niveles elevados de leptina se han relacionado con la obesidad, y la mayoría de los individuos obesos tienen su acción metabólica "selectiva", disminución del apetito y aumenta el gasto de energía. De hecho, se demostró en nuestro estudio una relación directa entre el IMC con los niveles de leptina. También se encontró una correlación entre el aumento de niveles de leptina y de UCP2-866 GA + GG en sujetos con sobrepeso / obesidad.

Se ha informado de la expresión de UCP2 esta inversamente correlacionada con el IMC, porcentaje de grasa corporal y la leptina plasmática lo que sugiere que una disminución en la expresión podría contribuir a la patogénesis y mantenimiento de la obesidad (63). En el mismo perfil, el alelo G de UCP2-866, se ha asociado a aumentar el riesgo de obesidad. Por lo tanto, la UCP2-866 podría ser la modificación de la expresión de la proteína y, por lo tanto, influir en los niveles de leptina, que podría ser un aumento en el Índice de Masa Corporal y los factores de riesgo del síndrome metabólico; en el caso de la adiponectina se encontraron niveles disminuidos debido al aumento del IMC, tal como lo menciona la literatura.

También es trascendental que estudios adicionales se centren en la influencia de los polimorfismos, en la leptina y su gen receptor, así como la interacción con factores ambientales.

10. Conclusión

Este trabajo permitió evaluar a adolescentes mexicanos de nivel secundaria con sobrepeso u obesidad sobre la relación que tienen las variantes de Proteínas Desacoplantes Mitocondriales (UCP's), y la actividad enzimática de leptina y adiponectina en un intento de lograr asociar las UCP's con la obesidad en los niños adolescentes de la Ciudad de México. Se lograron obtener las frecuencias genotípicas y alélicas de los UCP's seleccionados, así como los 7 modelos de herencia correspondientes a nuestra población mexicana, tanto en pacientes con sobrepeso u obesidad como en sujetos sanos, ambas poblaciones cumplen con los criterios de una selección azarosa y en equilibrio.

Nuestra población de pacientes con sobrepeso u obesidad muestra que hay un porcentaje de sujetos masculinos mayor que femeninos, también se determinó que el genotipo CC modelo recesivo de UCP1-3826C/T se relaciona con niveles de diferencia significativa de porcentaje de grasa y músculo.

Mientras que el genotipo CC del modelo recesivo de UCP3-55 C/T muestra diferencia significativa con el índice de cintura-cadera por lo que este genotipo en nuestra población puede estar asociado con los factores de riesgo que conlleva al desarrollo de obesidad.

Sin embargo, el genotipo que mostro más diferencias estadísticamente significativas es el GG del modelo recesivo de la UCP2-866 G/A se encontró que este genotipo está relacionado con niveles elevados de IMC, PAD, CT, TG, C-LDL y los niveles de leptina, y ligera disminución de C-HDL en comparación con AA y GA. También se pudo observar que hay una asociación entre el alelo G con DM2 y obesidad.

En conclusión, este estudio demostró que existe una relación directa entre las características clínicas y la UCP2 -866 en sujetos con sobrepeso / obesidad en un modelo recesivo, lo que parece estar asociado a altos niveles de leptina y la disminución de los niveles de adiponectina en la población adolescente mexicana con sobrepeso u obesidad.

Las UCP's son blancos potenciales para el tratamiento farmacológico de la obesidad, por lo que es un campo del que se tiene que estar al tanto.

En nuestra población se tienen altos niveles de sobrepeso y obesidad, ya que, a pesar de ser un país en vías de desarrollo, aun se cuenta con una escasa educación alimenticia y una pobre actividad física, lo que conlleva a que los factores de riesgo sean mayores, por lo que la población se encuentra condicionado a sufrir este tipo de padecimientos.

11. Referencias bibliográficas

1. Kagawa Y, Yanagisawa Y, Hasegawa K, Suzuki H, Yasuda K, Kudo H. Single nucleotide polymorphisms of thrifty genes for energy metabolism: evolutionary origins and prospects for intervention to prevent obesity-related diseases. *s.l. : Biochem Biophys Res Commun*, 2002.
2. Olaiz-Fernández G, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Rojas R, Villalpando-Hernández S, Hernández-Ávila M, et al. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública; 2006.
3. NORMA Oficial Mexicana NOM-174-SSA 1998, para el manejo integral de la obesidad. [Online] abril 20, 2014. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/174ssa18.html>.
4. World Health Organization (WHO). Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. Technical Report Series No. 854. Geneva: World Health Organization; 1995.
5. Strauss RS, Pollack HA. Epidemic increase in childhood overweight, 1986-1998. *JAMA*. 2001; 286: 2845-8.
6. [Online] Febrero 11, 2019. www.cdc.gov/healthyweight/spanish/assessing/bmi/childrens_bmi/acerc_a_indice_masa_corporal_niños_adolescentes.html.
7. Perea MA, López PL, Bárcena SE, Greenawalt RS. Propuesta para la atención continua de niños y adolescentes obesos. *Acta Pediatr Mex*. 2009, 30:(1): 54-68.
8. Waters E, de Silva-Sanigorski A, Hall BJ, Brown T, Campbell KJ, Gao Y, et al. interventions for preventing obesity in children. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2011; 12: 1871-8.
9. Hedley AA, Ogden CL, Johnson CL, Carroll MD, Curtin LR, Flegal KM. Prevalence of overweight and obesity among US children, adolescents, and adults, 1999-2002. *Journal of the American Medical Association*. 2004; 291:2847-50.

-
10. Chiarelli F, Loredana M. Insulin resistance and obesity in childhood. *European Journal of Endocrinology* . 2008; 159: S67-S74.
 11. Instituto Nacional de Salud Pública de la Secretaría de Salud. Encuesta Nacional de Salud México D.F. 2006.
 12. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. México; 2012. <http://ensanut.insp.mx> 28/09/15 7:30 pm.
 13. *Obesidad en el adulto* Dr Julio César Montero et al. Editorial D&P 1997.
 14. Rexford SA. Adipose tissue as an endocrine organ. *Obesity* 2006; 14: 242-247.
 15. Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology*. 2004;145:2273-82. .
 16. Bastarrachea RA, Cole SA, Comuzzie AG. Genómica de la regulación del peso corporal: mecanismos moleculares que predisponen a la obesidad. *Barc : Med Clin*, 2004, pp. 123(3); 104-17.
 17. Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem*. 1995;270:26746-9. .
 18. Swarbrick MM, Havel PJ. Physiological, pharmacological, and nutritional regulation of circulating adiponectin concentrations in humans. *Metab Syndr Relat Disord*. 2008 and 6(2):87-102.
 19. Ruan H, Dong LQ. Adiponectin signaling and function in insulin target tissues. *J Mol Cell Biol* 2016;8(2):101-9.
 20. Lim S, Quon MJ, Koh KK. Modulation of adiponectin. Modulation of adiponectin as a potential therapeutic strategy. *Atherosclerosis* 2014 and 233(2):721-8.
 21. . Wang Y, Lam KS, Yau MH, Xu A. Post-translational modifications of adiponectin: mechanisms and functional implications. *Biochem J* 2008; 409:623-33.
 22. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S et al. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 2003; 423:762-9.

-
23. Johan Hoffstedt, Elisabet Arvidsson, Eva Sjölin, Kerstin Wahlén and Peter Arner. Adipose Tissue Adiponectin Production and Adiponectin Serum Concentration in Human Obesity and Insulin Resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004, pp. 89: 1391-1396.
 24. Phillips., Chandran M. Adiponectin: more than just another fat cell hormone? *Diabetes Care.* 2003, pp. 26:2442-2447.
 25. Miroux B. Frossard V. Raimbault S. Ricquier D. Bouillaud F: The topology of the brown adipose tissue mitochondrial uncoupling protein determined with antibodies against its antigenic sites revealed by a library of fusion proteins. *EMBO J* 1993, 12:3739-3745.
 26. Arechaga I. Ledesma A. Rial E. The mitochondrial uncoupling protein UCP1: a gated pore. *IUBMB Life.* 2001, 52:165-173.
 27. Jean Himms-Hagen, Brown Adipose tissue thermogenesis and obesity, *prog. Lipid Res*, Vol 28, pp67-115, 1989.
 28. Rial E, González-Barroso MM. Physiological regulation of the transport activity in the uncoupling proteins UCP1 and UCP2. *Biochim Biophys Acta.* 2001 1504(1):70-81.
 29. Voet D, Voet J. *Bioquímica*, Ed. Médica Panamericana, 2006, pp. 637.
 30. Lowell B, Spiegelman B. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature* (2000) 404:652-660.
 31. Argyropoulos G, Herper ME. Uncoupling proteins and thermoregulation, *Journal Applied Physiology*, 2002;92:2187-98.
 32. Nelson, D.L. y Cox M.M. *Lehninger Principles of Biochemistry*, 3a. Ed, Cap. 19. W. H. Freeman. 2000.
 33. Nicholls, D. G. y Ferguson, S. J. *Bioenergetics*, 3a. Ed, Cap. 5. Academic Press. 2002.
 34. Mitchell, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 1961. 191:144-148.
 35. Hatefi, Y., Haavik, A. G. y Griffiths D. E. Studies on the electron transfer system. XLI. Reduced coenzyme Q (QH₂)-cytochrome c reductase. *J. Biol. Chem.* 1962. 237:1681-1685.

-
36. Ricquier, D. and J. C. Kader (1976). Mitochondrial protein alteration in active brown fat: a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic study. *Biochem Biophys Res Commun.* 73(3): 577- 583.
 37. Schrauwen P and Hesselink M. UCP2 and UCP3 in muscle controlling body metabolism. *Journal of Experimental Biology* 2002; 205:2275-2285.
 38. Vidal-Puig A, Solanes G, Grujic D, Flier JS, Lowell BB. (1997) UCP3: an uncoupling protein homologue expressed preferentially and abundantly in skeletal muscle and brown adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* 235:79-82.
 39. Nicholls, D. G. and E. Rial (1999). A history of the first uncoupling protein, UCP1, *J. Bioenerg Biomembr.* 31(5): 399-406.
 40. Fleury C, Neverova M, Collins S, et al. Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat Genet* 1997;15:269-272.
 41. Ledesma A. García de Lacoba M and Rial E. Protein family review. The mitochondrial uncoupling proteins. *Genome Biology* 2002;3:3015.1-3015.9.
 42. Teshima Y, Akao M, Jones SP, Marbein E. Uncoupling protein-2 over expression inhibits mitochondrial death pathway in cardiomyocytes. *Circ Res.* 2003 93:192-200.
 43. Krauss S., Zhang C. Y., Scorrano L., Dalgaard L. T., St- Pierre J., Grey S. T., Lowell B.B. Superoxide-mediated activation of uncoupling protein 2 causes pancreatic beta cell dysfunction. *J Clin Invest.* 2003 112:1831-1842.
 44. Gong DW, He Y, Reitman ML. Genomic Organization and regulation by dietary fat of the uncoupling protein 2 and 3 genes. *Biochem Biophys Res Commun* (1999) 256;27-32.
 45. Solanes G, Vial Puig, Grujic D, Flier JS, Lowell BB. The human uncoupling protein 3 gene, *Journal Biological Chemistry* (1997) 272:25433-25436.
 46. Hesselink, Matthus K. C. Mensik M. Schrauwen P. Human Uncoupling protein-3 and obesity: an update. *Obesity research.* 2003 11(12):1429-1443.

-
47. Enerback S, Jacobson A, Simpson EM, Guerra C, Yamashita H, Harper ME, Konzak LP. Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold sensitive but not obese. *Nature* 1997. 387:90-94.
48. Shen H, Qi L, Tai ES, Chew SK, Tan CE, Ordovas JM. Uncoupling protein 2 promoter polymorphism -866G/A, central adiposity, and metabolic syndrome in Asians. 2006. 14(4):656-661.
49. Akami SM, Heidari J, Heshmat R, Amiri P, Fakhrzadeh H, Pajouhi M. The common polymorphism of the UCP2 gene in healthy Iranians compared with world populations, *Human Biology* 79 (2007) 1:103-110.
50. Wang TN, Huang MC, Lin HL, Hsiang CH, Ko AM, Chang WT, Ko YC. UCP2 A55V variant is associated with obesity and related phenotypes in an aboriginal community in Taiwan. *Int J Obes (Lond)*. 2007. 31(11):1746-1752.
51. Kosuge K, Soma M, Nakayama T, Aoi N, Sato M, Haketa A, Uwabo J, Izumi Y, Matsumoto K. Human uncoupling protein 2 and 3 genes are associated with obesity in Japanese. *Endocrine*. 2008. 34(1-3):87-95.
52. Schrauwen P, Xia J, Walder K, Snitker S, Ravussin E. A novel polymorphism in the proximal UCP3 promoter region: effect on skeletal muscle UCP3 mRNA expression and obesity in male nondiabetic Pima Indians. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999; 23: 1242-1245.
53. Kimm SY, Glynn W, Aston CE, Damcott CM, Poehlman ET, Daniels SR, Ferrel RE. Racial differences in the relation between uncoupling protein genes and resting energy expenditure. *Am J Clin Nutr* 2002;75:714-719.
54. Alonso A, Martí A, Corbalán MS, Martínez-González MA, Forga L, Martínez JA. Association of UCP3 gene -55>T polymorphism and obesity in a Spanish population. *Ann Nutr Metab*. 2005. 49(3):183-188.
55. Lohman TG, Roche AF, Martorell R. Anthropometric standardization reference manual. Champaign, Ill, USA: Human Kinetics Books, 1988.
56. WHO Multicentre Growth Reference Study Group. WHO Child Growth Standards: length/height-for-age, weight-for-age, weight-for-length, weight-for-height and body mass index-for-age: methods and development. Geneva: World Health Organization, 2007.

-
57. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res* 1998 16:1215.
58. Arnlöv J, Ingelsson E, Sundström J, Lind L. Impact of body mass index and the metabolic syndrome on the risk of cardiovascular disease and death in middle-aged men. *Circulation* 2010 and 121:230–6.
59. Paulik MA, Buckholz RG, Lancaster ME, Dallas WS, Hull-Ryde EA, Weiel JE, Lenhard JM. Development of infrared imaging measure thermogenesis in cell culture: thermogenic effects of uncoupling protein-2 troglitazone and B adrenergic receptor agonist. *Pharmaceutical Research*. 1998, pp. 15(6):944-949.
60. Srivasta N, Prakash J, Lakhan R, Agarwal CG, Pant DC, Nalraj Mittal. A common polymorphism in the promoter of UCP2 is associated with obesity and hypersulinemia in northern Indians. *Mol. Cell Biochem*. 2010. 337:293-298.
61. Lee HJ, Ryu HJ, Shin HD, Park BL, Kim JY, et al. Associations between polymorphisms in the mitochondrial uncoupling proteins (UCP's) with T2DM. *Clin Chim Acta* 2008 and 27-33.
62. Dhamrait SS, Stephens J W, Cooper JA, et al. FT Cardiovascular risk in healthy men and markers of oxidative stress in diabetic men are associated with common variation in the gene for uncoupling protein 2. *Eur Heart J* 2004 and 468–75., 25(6):.
63. Pinkney JH, Boss O, Bray GA, Bulmer K, Coppack SW, Mohamed-Ali V. Physiological relationships of uncoupling protein-2 gene expression in human adipose tissue in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 2000 and 85(6):2312-7.
64. Himes JH, Dietz WH. Guidelines for overweight in adolescent preventive services: Recommendations from an expert committee. The Expert Committee on Clinical Guidelines for Overweight in Adolescent Preventive Services. *Am J Clin Nutr*. 1994; 59: 307-16.
65. Bellizzi MC, Dietz WH. Workshop on childhood obesity: Summary of the discussion. *Am J Clin Nutr*. 1999; 70: I73S-5S.
66. Calzada-León R. *Obesidad en niños y adolescentes*. México: Academia Americana de Pediatría. Editores de Textos Mexicanos; 2003.

-
67. Pietrobelli A, Faith MS, Allison DB, Gallagher D, Chiumello G, Heymsfield SB. Body mass index as a measure of adiposity among children and adolescents. A validation study. *J Pediatr*. 1998; 132: 204-10.
68. Mei Z, Grummer-Strawn LM, Pietrobelli A, Goulding A, Goran MI, Dietz WH. Validity of body mass index compared with other body-composition screening indexes for the assessment of body fatness in children and adolescents. *Am J Clin Nutr*. 2002; 75: 978-85.
69. Dwyer T, Blizzard CL. Defining obesity in childhood by biological endpoint rather than population distribution. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1996; 20: 472-80. .
70. Gibson RS. Principles of nutritional assessment. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press; 2005. .
71. Barlow SE. Expert committee recommendations regarding the prevention, assessment, and treatment of child and adolescent overweight and obesity: summary report. *Pediatrics* 2007; 120 (4): S164-92.
72. Beltowski J. Adiponectin and resistin new hormones of white adipose tissue. *Med Sci Monit* 2003;9:55RA-61. .
73. Chandran M, Phillips SA, Ciaraldi T, Henry RR. Adiponectin: more than just another fat cell hormone? *Diabetes Care* 2003;26:2442-50. .
74. Phillips SA, Ciaraldi TP, Kong AP.S, Bandukwala R, Aroda V, Carter L, et al. Modulation of circulating and adipose tissue adiponectin levels by antidiabetic therapy. *Diabetes* 2003;52:667-74. .
75. Mathieu P., Poirier P., Pibarot P., Lemieux I, Despres J.P. Visceral Obesity the link among inflammation, hypertension and cardiovascular disease. *Hypertension*. 2009;53:577-584.
76. Hajer H., Van-Haefen T., Visseren F.L.J. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes and vascular disease. *European Heart Journal*. 2008; 29:2959-2971. Doi:10.1093/eurheartj/ehn 387.
77. Anfossi G., Russo I., Doronzo G., Romero A., Trovt M. Adipocytokines in atherothrombosis focus on platelets and the vascular smooth muscle cells. *Hidashi Publishing Corporation*. 2010; doi: 10.1155/2010/174341. .
78. Nishimura S, Manabe I, Nagai R. Adipose Tissue Inflammation in Obesity and Metabolic Syndrome. *Discov Med* 2009; 8(41): 55-60.

-
79. Punthakee Z, Delvin EE, O'Loughlin J, Paradis G, Levy E, Platt RW, et al. Adiponectin, adiposity and insulin resistance in children and adolescents. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2006;91:2119-25.
80. Murdolo G, Nowotny B, Celi F, Donati M, Bini V, Falorni A. Inflammatory adipokines, high molecular weight adiponectin, and insulin resistance: a population based survey in prepuberal schoolchildren. *Public Library of Science (PLOS ONE)*. 2011;6(2):1-10.
81. Baratta M. Leptin—from a signal of adiposity to a hormone mediator in peripheral tissues. *Med Sci Monit*. 2002;8:282-92.
82. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*. 1998; 22:763-70.
83. Sharma A, Bartell SM, Baile CA, Chen B, Podolsky RH, McIndoe RA, She JX. Hepatic gene expression profiling reveals key pathways involved in leptin-mediated weight loss in ob/ob mice. *PLoS One* 2010; 5: 12147e.
84. Karmazyn M., Purdham D.M., Rajapurohitam V., Zeidan A. Leptin signaling in the cardiovascular system. *Advance in biochemistry in health*. 2008; 20: 377-395.
85. Christopher D. Morrison, Gregory J Morton, Kevin D Niswender, Richard W. Gelling and Michael W. Schwartz. Leptin inhibits hypothalamic Npy and AgRP gene via mechanism that requires phosphatidylinositol 3-OH-kinase signaling. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005;289:1051-1057.
86. Ashraf T. Soliman, Mohamed Yasin & Ahmed Kassem. Leptin in pediatrics: A hormone from adipocyte that wheels several functions in children. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*. 2012 Dec; 16(3):577-587.
87. Oliveira Jr. SA, Silva MD, Martinez PF. Differential nutritional, endocrine and cardiovascular effects in obesity-prone and obesity-resistant rats fed standard and hypercaloric diet. *MedSci Monit* 2010; 16:208-217.
88. Macho Azcarate T, Marti del Moral A, Martínez Hernández JA. Estudios genéticos de la obesidad en humanos. *Barc : Med Clin*, 2000, pp. 115: 103-10.

-
89. Trayhurn P, Hoggard N, Mercer JG, Rayner DV: Leptin: fundamental aspects. *Int J Obes* 1999;23 (Supl.1):22-8.
90. Raben A, Astrup A: Leptin is influenced both by predisposition to obesity and diet composition. *Int J Obes* 2000; 24 (4):450-9.
91. Du F, Higginbotham DA, White BD: Food intake, energy balance and serum leptin concentrations in rats fed low-protein diets. *J Nutr* 2000; 130 (3): 514-21.
92. Jeanrenaud FR, Jeanrenaud B: Obesity, leptin, and the brain. *N Eng J Med* 1996; 334 (5): 324-5.
93. Hwa JJ, Fawzi AB, Graziano MP y cols.: Leptin increase energy expenditure and selectively promotes fat metabolism in ob/ob mice. *Am J Physiol* 1997; 272 (4 pt2): R1204-R9.
94. Havel PJ: Leptin production and action: relevance to energy balance in humans. *Am J Clin Nutr* 1998; 67 (3): 355-6.
95. Considine RV: Weight regulation, leptin and growth hormone *Horm Res* 1997; 48 (Supl. 5): 116-21.
96. Havel PJ, Kasim-Karakas S, Mueller W, Johnson PR, Gingerich RL, Stern JS. : Relationship of plasma insulin and adiposity in normal weight and over-weight women: effects of dietary fat content and sustained weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81 81 (12): 4406-13.
97. Ho SC, Tai ES, Eng PHK, Ramli A, Tan CE, Fok ACK: A study in the relationships between leptin, insulin, and body fat in Asian subjects. *Int J Obes* 1999; 23 (3): 246-52.
98. Ostlund RE, Yang JW, Klein S, Gingerich R: Relation between plasma leptin concentration and body fat, gender, diet, age, e metabolic covariates. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81(11): 3909-13.
99. Yannakoulia M, Yiannakouris N, Bluher S, Matalas AL, Klimis-Zacas D, Mantzoros CS. : Body fat mass and macronutrient intake in relation to circulating soluble leptin receptor, free leptin index, adiponectin, and resistin concentrations in healthy humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88 (4): 1730-1736.
100. Matsuzawa Y, Funahashi T, Kihara S, Shimomura I. Adiponectin and metabolic syndrome. *Arterioscler thromb Vasc Biol* 2004;24:29-33.

-
101. Guzik TJ, Mangalat D, Korbut R. Adipocitoquines-A novel link between inflammation and vascular function *J Physiol Pharmacol* 2006;57(4), 505-528.
102. Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Matsuzawa Y, Walsh K. Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease. *Curr Opin Lipidol* 2003;14: 561-6. .
103. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;257:79-83.
104. Schrauwen P, Hoeks J and Hesselink MK. Putative function and physiological relevance of the mitochondrial uncoupling protein-3: involvement in fatty acid metabolism *Progress in Lipid Research* 2006. 45: 17-41.
105. Andrews ZB et al. Uncoupling Protein-2 Decrease the Lipogenic Actions of Ghrelin. *Endocrinology* 2010.
106. <http://c.1asphost.com/biologico/clase11.html> 07-11-14 5:14 pm .
107. Boss O, Samec S, Dulloo A, Seydoux J, Muzzin P, Glacobino JP. Tissue-dependent upregulation of rat uncoupling protein- 2 expression in response to fasting or codl. *FEBS Lett* 1997;412:111-114.
108. Moler DE, Flier JS. Insulin-resistance-mechanisms, symaromes and implications. *N. Engl J. Med* 1991; 325:938-48.
109. Bacha F., Saad R. Adiponectin in youth. *Diabetes Care*. 2004, pp. 27:547-552.
110. Walder K, Norman RA, Hanson RL, Schrauwen P, Neverova M, et al. Association between uncoupling protein polymorphisms (UCP2-UCP3) and energy metabolism/obesity in Pima indians. *Hum Mol Genet* 1998 and 7(9):1431-5.
111. Esterbauer H, Schneitler C, Oberkofler H, et al. A common polymorphism in the promoter of UCP2 is associated with decreased risk of obesity in middle-aged humans. *Nature Genetics* 2001 and 28(2):178-83.
112. Mancini FP, Sabatino L, Colantuoni V, Pasanisi F, Finelli C, Contaldo F, Masulli M, Riccardi G, Vaccaro O. Variants of uncoupling protein-2 gene

and obesity: interaction with peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2. *Clin Endocrinol* 2003 and 59.

113. Mottagui-Tabar S, Hoffstedt J, Brookes AJ, Jiao H, Arner P, Dahlman I. Association of ADRB1 and UCP3 gene polymorphisms with insulin sensitivity but not obesity. *Horm Res.* 2008 and 69(1):31-6.

114. Liu J, Li WJ, Wang CM. The role of uncoupling proteins in diabetes mellitus. *J Diabetes Res* 2013 and 1-7.

115. Kring SI, Larsen LH, Holst C, et al. Genotypephenotype associations in obesity dependent on definition of the obesity phenotype. *Obesity Facts* 2008 and 138-45, 1(3):.

116. Dalgaard LT, Andersen G, Larsen LH, et al. Mutational analysis of the UCP2 core promoter and relationships of variants with obesity. *Obesity Research* 2003 and 11:1420-27.

117. Cha MH, Kim IC, Kim KS, Kang BK, Choi SM, Yoon Y. Association of UCP2 and UCP3 gene polymorphisms with serum high-density lipoprotein cholesterol among Korean women. *Metabolism* 2007 and 806-13., 56(6):.

118. Salopuro T, Pulkkinen L, Lindström J, Kolehmainen M, Tolppanen AM, et al. Variation in the UCP2 and UCP3 genes associates with abdominal obesity and serum lipids: the Finnish Diabetes Prevention Study. *BMC Med Genet.* 2009 and 10:94.

119. Pecqueur C, Bui T, Gelly C, et al. Uncoupling protein-2 controls proliferation by promoting fatty acid oxidation and limiting glycolysis-derived pyruvate utilization. *FASEB J* 2008 and 9-18., 22(1):.

120. Pinkney JH, Boss O, Bray GA, Bulmer K, Coppack SW, Mohamed-Ali V. Physiological relationships of uncoupling protein-2 gene expression in human adipose tissue in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 2000 and 85(6):2312-7.

121. Franco-Hincapié L, Duque CE, Parra MV, Gallego N, Villegas A, Ruiz-Linares A, Bedoya G. Association between polymorphisms in uncoupling proteins and type 2 diabetes in a northwestern Colombian population. *Biomedica* 2009, 29 (1): 108-18.

122. Bray MS, Boerwinkle E, Hanis CL. Linkage analysis of candidate obesity genes among the Mexican-American population of Starr County, Texas. *Genet Epidemiol* 1999 and 16(4):397-411.

123. Yamauchi T, Nio Y, Maki T, Kobayashi M, Takazawa T, Iwabu M et al. Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nature Medicine* 2007;13:332-9.

12. Apéndice.**12.1 Apéndice A. Consentimiento Informado**

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA "IGNACIO CHAVEZ"

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Nombre del paciente:
_____Domicilio:

Teléfono casa: _____ cel.: _____

No. expediente/afiliación: _____

Por medio de la doy mi consentimiento para participar de manera voluntaria y sin percepción económica alguna, en el protocolo de investigación titulado "_____".

Por lo cual acepto donar la muestra de sangre que me sea tomada. Entiendo que los datos generados, así como el nombre(s) de lo(s) participante(s) son totalmente confidenciales y anónimos.

Me han explicado la importancia y utilidad de la investigación, así mismo he comprendido las explicaciones las cuales se me han dado de manera clara y sencilla, y que el médico que me ha atendido me ha permitido realizar todas las observaciones y me ha aclarado todas las dudas que he planteado. También comprendo que, en cualquier momento y sin necesidad de dar explicación puedo revocar el consentimiento que ahora presto.

NOMBRE Y FIRMA DEL
RESPONSABLE DEL PROYECTO_____
NOMBRE Y FIRMA DEL PACIENTE_____
NOMBRE Y FIRMA DEL TESTIGO_____
NOMBRE Y FIRMA DEL TESTIGO

CDMX A _____ DEL MES DE _____ DE 201_.

12.2 Apéndice B. Tablas de valores percentilares de acuerdo a edad, sexo y talla

Nivel de PA para niños por edad y percentiles de talla

Edad	Percentil PA	PAS (mmHg)								PAD (mmHg)							
		Percentil de talla								Percentil de talla							
		5th	10th	25th	50th	75th	90th	95th	5th	10th	25th	50th	75th	90th	95th		
1	50th	80	81	83	85	87	88	89	34	35	36	37	38	39	39		
	90th	94	95	97	99	100	102	103	49	50	51	52	53	53	54		
	95th	98	99	101	103	104	106	106	54	54	55	56	57	58	58		
	99th	105	106	108	110	112	113	114	61	62	63	64	65	66	66		
2	50th	84	85	87	88	90	92	92	39	40	41	42	43	44	44		
	90th	97	99	100	102	104	105	106	54	55	56	57	58	58	59		
	95th	101	102	104	106	108	109	110	59	59	60	61	62	63	63		
	99th	109	110	111	113	115	117	117	66	67	68	69	70	71	71		
3	50th	86	87	89	91	93	94	95	44	44	45	46	47	48	48		
	90th	100	101	103	105	107	108	109	59	59	60	61	62	63	63		
	95th	104	105	107	109	110	112	113	63	63	64	65	66	67	67		
	99th	111	112	114	116	118	119	120	71	71	72	73	74	75	75		
4	50th	88	89	91	93	95	96	97	47	48	49	50	51	51	52		
	90th	102	103	105	107	109	110	111	62	63	64	65	66	66	67		
	95th	106	107	109	111	112	114	115	66	67	68	69	70	71	71		
	99th	113	114	116	118	120	121	122	74	75	76	77	78	78	79		
5	50th	90	91	93	95	96	98	98	50	51	52	53	54	55	55		
	90th	104	105	106	108	110	111	112	65	66	67	68	69	69	70		
	95th	108	109	110	112	114	115	116	69	70	71	72	73	74	74		
	99th	115	116	118	120	121	123	123	77	78	79	80	81	81	82		
6	50th	91	92	94	96	98	99	100	53	53	54	55	56	57	57		
	90th	105	106	108	110	111	113	113	68	68	69	70	71	72	72		
	95th	109	110	112	114	115	117	117	72	72	73	74	75	76	76		
	99th	116	117	119	121	123	124	125	80	80	81	82	83	84	84		
7	50th	92	94	95	97	99	100	101	55	55	56	57	58	59	59		
	90th	106	107	109	111	113	114	115	70	70	71	72	73	74	74		
	95th	110	111	113	115	117	118	119	74	74	75	76	77	78	78		
	99th	117	118	120	122	124	125	126	82	82	83	84	85	86	86		
8	50th	94	95	97	99	100	102	102	56	57	58	59	60	60	61		
	90th	107	109	110	112	114	115	116	71	72	72	73	74	75	76		
	95th	111	112	114	116	118	119	120	75	76	77	78	79	79	80		
	99th	119	120	122	123	125	127	127	83	84	85	86	87	87	88		
9	50th	95	96	98	100	102	103	104	57	58	59	60	61	61	62		
	90th	109	110	112	114	115	117	118	72	73	74	75	76	76	77		
	95th	113	114	116	118	119	121	121	76	77	78	79	80	81	81		
	99th	120	121	123	125	127	128	129	84	85	86	87	88	88	89		
10	50th	97	98	100	102	103	105	106	58	59	60	61	61	62	63		
	90th	111	112	114	115	117	119	119	73	73	74	75	76	77	78		
	95th	115	116	117	119	121	122	123	77	78	79	80	81	81	82		
	99th	122	123	125	127	128	130	130	85	86	86	88	88	89	90		
11	50th	99	100	102	104	105	107	107	59	59	60	61	62	63	63		
	90th	113	114	115	117	119	120	121	74	74	75	76	77	78	78		
	95th	117	118	119	121	123	124	125	78	78	79	80	81	82	82		
	99th	124	125	127	129	130	132	132	86	86	87	88	89	90	90		
12	50th	101	102	104	106	108	109	110	59	60	61	62	63	63	64		
	90th	115	116	118	120	121	123	123	74	75	75	76	77	78	79		
	95th	119	120	122	123	125	127	127	78	79	80	81	82	82	83		
	99th	126	127	129	131	133	134	135	86	87	88	89	90	90	91		
13	50th	104	105	106	108	110	111	112	60	60	61	62	63	64	64		
	90th	117	118	120	122	124	125	126	75	75	76	77	78	79	79		
	95th	121	122	124	126	128	129	130	79	79	80	81	82	83	83		
	99th	128	130	131	133	135	136	137	87	87	88	89	90	91	91		
14	50th	106	107	109	111	113	114	115	60	61	62	63	64	65	65		
	90th	120	121	123	125	126	128	128	75	76	77	78	79	79	80		
	95th	124	125	127	128	130	132	132	80	80	81	82	83	84	84		
	99th	131	132	134	136	138	139	140	87	88	89	90	91	92	92		
15	50th	109	110	112	113	115	117	117	61	62	63	64	65	66	66		
	90th	122	124	125	127	129	130	131	76	77	78	79	80	80	81		
	95th	126	127	129	131	133	134	135	81	81	82	83	84	85	85		
	99th	134	135	136	138	140	142	142	88	89	90	91	92	93	93		
16	50th	111	112	114	116	118	119	120	63	63	64	65	66	67	67		
	90th	125	126	128	130	131	133	134	78	78	79	80	81	82	82		
	95th	129	130	132	134	135	137	137	82	83	83	84	85	86	87		
	99th	136	137	139	141	143	144	145	90	90	91	92	93	94	94		
17	50th	114	115	116	118	120	121	122	65	66	66	67	68	69	70		
	90th	127	128	130	132	134	135	136	80	80	81	82	83	84	84		
	95th	131	132	134	136	138	139	140	84	85	86	87	87	88	89		
	99th	139	140	141	143	145	146	147	92	93	93	94	95	96	97		

*The 90th percentile is 1.28 SD, the 95th percentile is 1.645 SD, and the 99th percentile is 2.326 SD over the mean

Tomado de "The Fourth Report on the Diagnosis, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure in Children and Adolescent", *Pediatrics* 2004, 114(2):555-576,

Nivel de PA para niñas por edad y percentiles de talla

Edad	Percentil PA	PAS (mmHg)								PAD (mmHg)					
		Percentil de talla								Percentil de talla					
		5th	10th	25th	50th	75th	90th	95th	5th	10th	25th	50th	75th	90th	95th
1	50th	83	84	85	86	88	89	90	38	39	39	40	41	41	42
	90th	97	97	98	100	101	102	103	52	53	53	54	55	55	56
	95th	100	101	102	104	105	106	107	56	57	57	58	59	59	60
	99th	108	108	109	111	112	113	114	64	64	65	65	66	67	67
2	50th	85	85	87	88	89	91	91	43	44	44	45	46	46	47
	90th	98	99	100	101	103	104	105	57	58	58	59	60	61	61
	95th	102	103	104	105	107	108	109	61	62	62	63	64	65	65
	99th	109	110	111	112	114	115	116	69	69	70	70	71	72	72
3	50th	86	87	88	89	91	92	93	47	48	48	49	50	50	51
	90th	100	100	102	103	104	106	106	61	62	62	63	64	64	65
	95th	104	104	105	107	108	109	110	65	66	66	67	68	68	69
	99th	111	111	113	114	115	116	117	73	73	74	74	75	76	76
4	50th	88	88	90	91	92	94	94	50	50	51	52	52	53	54
	90th	101	102	103	104	106	107	108	64	64	65	66	67	67	68
	95th	105	106	107	108	110	111	112	68	68	69	70	71	71	72
	99th	112	113	114	115	117	118	119	76	76	76	77	78	79	79
5	50th	89	90	91	93	94	95	96	52	53	53	54	55	55	56
	90th	103	103	105	106	107	109	109	66	67	67	68	69	69	70
	95th	107	107	108	110	111	112	113	70	71	71	72	73	73	74
	99th	114	114	116	117	118	120	120	78	78	79	79	80	81	81
6	50th	91	92	93	94	96	97	98	54	54	55	56	56	57	58
	90th	104	105	106	108	109	110	111	68	68	69	70	70	71	72
	95th	108	109	110	111	113	114	115	72	72	73	74	74	75	76
	99th	115	116	117	119	120	121	122	80	80	80	81	82	83	83
7	50th	93	93	95	96	97	99	99	55	56	56	57	58	58	59
	90th	106	107	108	109	111	112	113	69	70	70	71	72	72	73
	95th	110	111	112	113	115	116	116	73	74	74	75	76	76	77
	99th	117	118	119	120	122	123	124	81	81	82	82	83	84	84
8	50th	95	95	96	98	99	100	101	57	57	57	58	59	60	60
	90th	108	109	110	111	113	114	114	71	71	71	72	73	74	74
	95th	112	112	114	115	116	118	118	75	75	75	76	77	78	78
	99th	119	120	121	122	123	125	125	82	82	83	83	84	85	86
9	50th	96	97	98	100	101	102	103	58	58	58	59	60	61	61
	90th	110	110	112	113	114	116	116	72	72	72	73	74	75	75
	95th	114	114	115	117	118	119	120	76	76	76	77	78	79	79
	99th	121	121	123	124	125	127	127	83	83	84	84	85	86	87
10	50th	98	99	100	102	103	104	105	59	59	59	60	61	62	62
	90th	112	112	114	115	116	118	118	73	73	73	74	75	76	76
	95th	116	116	117	119	120	121	122	77	77	77	78	79	80	80
	99th	123	123	125	126	127	129	129	84	84	85	86	86	87	88
11	50th	100	101	102	103	105	106	107	60	60	60	61	62	63	63
	90th	114	114	116	117	118	119	120	74	74	74	75	76	77	77
	95th	118	118	119	121	122	123	124	78	78	78	79	80	81	81
	99th	125	125	126	128	129	130	131	85	85	86	87	87	88	89
12	50th	102	103	104	105	107	108	109	61	61	61	62	63	64	64
	90th	116	116	117	119	120	121	122	75	75	75	76	77	78	78
	95th	119	120	121	123	124	125	126	79	79	79	80	81	82	82
	99th	127	127	128	130	131	132	133	86	86	87	88	88	89	90
13	50th	104	105	106	107	109	110	110	62	62	62	63	64	65	65
	90th	117	118	119	121	122	123	124	76	76	76	77	78	79	79
	95th	121	122	123	124	126	127	128	80	80	80	81	82	83	83
	99th	128	129	130	132	133	134	135	87	87	88	89	89	90	91
14	50th	106	106	107	109	110	111	112	63	63	63	64	65	66	66
	90th	119	120	121	122	124	125	125	77	77	77	78	79	80	80
	95th	123	123	125	126	127	129	129	81	81	81	82	83	84	84
	99th	130	131	132	133	135	136	136	88	88	89	90	90	91	92
15	50th	107	108	109	110	111	113	113	64	64	64	65	66	67	67
	90th	120	121	122	123	125	126	127	78	78	78	79	80	81	81
	95th	124	125	126	127	129	130	131	82	82	82	83	84	85	85
	99th	131	132	133	134	136	137	138	89	89	90	91	91	92	93
16	50th	108	108	110	111	112	114	114	64	64	65	66	66	67	68
	90th	121	122	123	124	126	127	128	78	78	79	80	81	81	82
	95th	125	126	127	128	130	131	132	82	82	83	84	85	85	86
	99th	132	133	134	135	137	138	139	90	90	90	91	92	93	93
17	50th	108	109	110	111	113	114	115	64	65	65	66	67	67	68
	90th	122	122	123	125	126	127	128	78	79	79	80	81	81	82
	95th	125	126	127	129	130	131	132	82	83	83	84	85	85	86
	99th	133	133	134	136	137	138	139	90	90	91	91	92	93	93

*The 90th percentile is 1.28 SD, the 95th percentile is 1.645 SD, and the 99th percentile is 2.326 SD over the mean

Tomado de "The Fourth Report on the Diagnosis, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure in Children and Adolescent", *Pediatrics* 2004, 114(2):555-576,

Reyna Sámano, Claudia Huesca-Gómez, Rebeca López-Marure, Ana-Karen Hernández-Cabrera, Ana Rodríguez-Ventura, Maricruz Tolentino, Rosa María Morales and Ricardo Gamboa*

Association between UCP polymorphisms and adipokines with obesity in Mexican adolescents

<https://doi.org/10.1515/jpem-2017-0262>

Received July 4, 2017; accepted February 5, 2018

Abstract

Background: It has been reported that the uncoupling proteins (UCPs) can contribute to energy metabolism, and are thus involved in the pathogenesis of obesity. The objective of the study was to analyze the association between UCP polymorphisms, clinical parameters and leptin and adiponectin plasma levels in an adolescent population with overweight and obesity.

Methods: We analyzed the *UCP1* -3826 C/T, *UCP2*-866 G/A, Ala55Val and *UCP3* -55 C/T polymorphisms and the levels of adipokines in adolescents with normal weight and with overweight or obesity. The study included 270 students aged between 12 and 18 years categorized according to the percentiles from Mexico City. Adipokines levels were measured by immunoassay methods and the UCP polymorphisms were determined using Taqman real-time polymerase chain reaction (RT-PCR).

Results: No significant differences were found in the UCP polymorphisms in seven inheritance models studied. Most of the significant differences in the clinical parameters were found under a recessive model, the *UCP2* -866 polymorphism was associated with diastolic blood pressure ($p = 0.008$), triglycerides ($p = 0.045$), low-density lipoprotein-cholesterol (LDL-C) ($p = 0.003$), high-density lipoprotein-cholesterol (HDL-C) ($p = 0.050$) and plasma levels of leptin ($p < 0.001$). Also, the obese group was found to have higher leptin levels and lower adiponectin levels in GA + AA vs. GG (recessive model).

Conclusions: This study demonstrated a direct relationship between the clinical characteristics and *UCP2*-866 in a recessive model, associated with high levels of leptin and decreased levels of adiponectin in an obese or overweight Mexican adolescent population.

Keywords: adipokines; genetic polymorphisms; Mexican population; obesity; uncoupling proteins.

Introduction

Obesity is a global problem, regardless of gender or socioeconomic status. As a multifactorial disorder, obesity involves genetic and environmental factors. The etiology, clinical manifestations and treatment cannot be understood by a single approach; however, under the current trend in relation to the increase of this disease in school aged children, there are two essential changes: the kind and quantity of food and lack of physical activity.

Therefore, obesity can be defined as a chronic disease characterized by excess storage of fat in the body with serious comorbidities, such as dyslipidemia, hypertriglyceridemia, prediabetes or diabetes and hypertension [1, 2].

Due to a high prevalence of obesity in Mexico, it is a priority to investigate the relationship between obesity and those factors involved in the development of this disease.

Among the many factors are the mitochondrial uncoupling proteins (UCP1-3) which have a critical role in the thermoregulation of heat production, in energy utilization, and therefore, in the regulation of body weight in animals. Nevertheless, until now it has been demonstrated that the UCPs play a critical role in humans. UCP1 is present in brown adipocytes, and while UCP2 is expressed in almost all tissues, its mRNA levels are significantly lower in obese subjects [3, 4]. UCP3 expression is mostly restricted to skeletal muscle and brown adipose tissue. Furthermore, it is related with the regulation of fatty acid metabolism, redox state and reactive oxygen species (ROS) formation [5, 6].

A number of UCP variants have been identified, and their correlations with obesity-related phenotypes have been evaluated in adult subjects. In particular, *UCP1* -3826 C/T, *UCP2* -866 G/A, Ala 55 Val and -55 C/T variants of

*Corresponding author: Ricardo Gamboa, Department of Physiology, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" Juan Badiano No 1, Col. Sección XVI, C. P. 14080, Mexico City, Mexico, E-mail: rgamboaa_2000@yahoo.com

Reyna Sámano, Ana Rodríguez-Ventura, Maricruz Tolentino and Rosa María Morales: Department of Nutrition and Bioprogramming, Instituto Nacional de Perinatología, Mexico City, Mexico
Claudia Huesca-Gómez, Rebeca López-Marure and Ana-Karen Hernández-Cabrera: Department of Physiology, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" Juan Badiano No 1, Col. Sección XVI, Mexico City, Mexico

UCP3 have been associated with the risk of overweight and obesity [7–9]. These polymorphisms have been reported to be responsible for changes in the mRNA levels of *UCP*.

On another hand, the adiponectin gene (*ADIPOQ*) codes for a human adipose specific protein, which belongs to a family of adipocytokines that include leptin, resistin and visfatin [10]. Adipocytokines are soluble mediators derived from adipocytes, which play an important role in adipose tissue, inflammation and immunity. Further, adiponectin levels have been found to decrease in cases of insulin resistance, diabetes, dyslipidemias, atherosclerosis and coronary artery disease [11]. Also it has been reported that adiponectin stimulates food intake and decreases energy expenditure during fasting through its effects on the central nervous system, meanwhile [12] weight reduction increases serum adiponectin levels in humans [13]. Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase (AMPK) in the hypothalamus and increases food intake [12]. Moreover, adiponectin upregulated acyl-coenzyme A oxidase and *UCP2*, leading to enhanced lipid catabolism [14], whereby some studies have suggested an association between *UCP2* with the concentration of adiponectin in the female population with obesity, which is related to low energy expenditure [15, 16]. Although there have been many studies on *ADIPOQ* genetic variation, they have not been consistent [17].

Studies on leptin, another adipocytokine have indicated its effects on the hypothalamus as a peripheral signal to regulate energy balance and body weight [18, 19]. The brain's leptin flow supports its direct action on the central nervous system [20]. In addition to being an energy regulating hormone, leptin has divergent effects in different brain regions [21]. However, little is known about whether leptin has any effect on mitochondria, the main provider of cellular energy.

In this context, a relationship between the activity of *UCP2* and the activation of agouti-related peptide/neuropeptide Y (*AgRP/NPY*) neurons in arcuate nucleus, those that are inhibited by leptin [22], as well as an action of AMPK (activated by adiponectin) regulating energy expenditure due to its activity in neurons of the ventromedial nucleus of the hypothalamus have been documented [23]. As leptin regulates the expression of key genes in the rat adipocyte, upregulation of the expression of *UCP2* by a mechanism that involves protein kinase activity [24].

Furthermore, leptin functions as an adiposity signal that conveys the status of the body energy storage and availability to the brain. In the hypothalamus, these adiposity signals are integrated and, in consequence, maintain energy homeostasis and body weight by controlling feeding behavior and energy expenditure [25].

Some studies have tried to determine the relationship between *UCP* polymorphisms with metabolic syndrome, obesity or changes dietary habits and exercise. However, the results are not conclusive [26, 27].

Although there is evidence of linkage between *UCPs* and obesity in humans, these genetic variant associations have only been found in adult subjects. In fact, there are few studies in children/adolescents which show discrepancies attributable to population selection, genetic charge and sample size [28]. In this context, the aim of the present work was to analyze the association between *UCP* polymorphisms and body mass index (BMI), clinical, biochemical and hormonal parameters in overweight and obese adolescents from Mexico City.

Subjects and methods

We studied 315 subjects (173 boys and 142 girls, between 12 and 18 years of age) recruited randomly from a public high school in Mexico City. All of the participants underwent an anthropometric evaluation, performed by trained researchers using standard techniques. A digital scale (Tanita BWB-700, Tanita Corp., Tokyo, Japan) was used to determine the weight, muscle and body fat, and a digital height rod (Seca model 242, Geschäftsführer Finanzen & Technik Seca GmbH & Co. Kg. Hamburg, Germany) was used to determine their height. All of the measurements were taken between 8 a.m. and 10 a.m. under the same fasting conditions using Lohman's technique [29]. BMI was calculated as the weight in kilograms divided by the squared height in meters (kg/m^2). Adolescents were categorized according to the percentiles established by the World Health Organization (WHO) 2007 as underweight (<15th percentile), normal (15th–84.9th percentile), overweight (85th–94.9th percentile) or obese (≥ 95 th percentile), was required through the development of age- and sex-specific cut off points for BMI [30]. The subjects who were in the percentile for overweight and obesity were grouped together to form the obesity group. We evaluated the waist-hip ratio (WHR), additional to the identification of acanthosis nigricans, and diastolic (DBP) and systolic (SBP) blood pressure.

Ethical aspects

Signed informed consent from each parent and child was obtained after full explanation of the purpose and nature of all procedures used in the research study. The research was approved by the Ethical, Biosecurity and Investigation Committees of the Instituto Nacional de Perinatología.

Biochemical analysis

Blood samples were collected by venipuncture after a 12-h fasting. Levels of total cholesterol, triglycerides, high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low-density cholesterol (LDL-C) and glucose were measured using the Lory 2000 enzymatic photometric system Diasys

(Holzheim, Germany); serum levels of leptin and adiponectin were measured using the quantitative sandwich enzyme immunoassay technique (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA). The minimum detectable dose (MDD) is typically less than 7.8 pg/mL and a normal range of 0–1000 pg/mL for leptin. Conversely, for adiponectin, MDD is typically less than 0.246 pg/mL and a normal range of 0–250 ng/mL.

A complete blood cell count was performed using an automatic cell counter <5% coefficient of variation (Coulter Ac-T diff version 1.03; Beckman Coulter, Miami, FL, USA).

Genotyping

Genomic DNA was isolated from the blood samples using a commercial kit (Invitrogen Co., Carlsband, CA, USA). Genotypes were determined using a TaqMan® polymerase chain reaction (PCR) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). When allele-specific fluorogenic probes hybridize to the template during PCR, the activity of Taq polymerase can discriminate alleles. Cleavage results in increased emission of a reporter dye that is otherwise quenched by another dye. Each assay requires two unlabeled PCR primers and two allele-specific probes. Each probe is labeled with a reporter dye (VIC and FAM). TaqMan® real-time PCR of the *UCP1 C/T* (*rs:1800592*), *UCP2 55 A/G* (*rs:660339*), *UCP2 -866 A/G* (*rs:659366*) and *UCP3 55 C/T* (*rs:1800849*) polymorphisms was performed on an ABI Prism 7000 Sequence Detection System according to manufacturer's instructions (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Each single nucleotide polymorphism (SNP) genotype and allele discrimination was both manually and automatically studied with the allelic discrimination software (7300 System SDS Software®, Applied Biosystems).

Statistical analysis

Allele and genotype frequencies of the studied polymorphisms in all subjects were obtained by direct counting. The Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was calculated using the chi-squared (χ^2)-test. Results are presented as the mean \pm SD and percentage. The significance of the differences between groups was determined using the Mantel-Haenszel χ^2 analysis, which was combined with the 2 \times 2 contingency tables. Pooled odds ratios (ORs) with 95% confidence intervals (CIs) were calculated to assess the associations of the *UCP1 -3826 A/G*, *UCP2 -866 G/A*, *Ala55Val*, and *UCP3 -55 C/T* polymorphisms with overweight and obesity under dominant (CT+CC vs. TT for *UCP1*, *UCP2 55* and *UCP3* and GG+GA vs. AA for *UCP2 -866G/A*), recessive (CC vs. CT+TT *UCP1*, *UCP2 55* and *UCP3* and GG vs. GA+AA for *-866G/A*), co-dominant 1 (CT vs. CC for *UCP1*, *UCP2 55* and *UCP3* and GA vs. GG for *-866G/A*), co-dominant 2 (TT vs. CC *UCP1*, *UCP2 55* and *UCP3* and AA vs. GG for *-866G/A*), additive (ZTT+CT vs. CC for *UCP1*, *UCP2 55* and *UCP3* and 2AA+ vs. GG for *-866G/A*), over-dominant (CT vs. CC+TT for *UCP1*, *UCP2 55* and *UCP3* and GA vs. AA+GG for *-866G/A*) and allelic (T vs. C for *UCP1*, *UCP2 55* and *UCP3* and A vs. G for *-866G/A*) models, respectively. Statistical significance was defined as $p \leq 0.05$. Logistic regression analyses were performed to assess the associations of UCPs with clinical, biochemical and hormonal variables, under different inheritance models. The Mann-Whitney U-test was used to compare adiponectin and leptin levels between the groups. Statistical analysis was performed using SPSS v20 (Broad Institute of MIT and Harvard; <https://www.broadinstitute.org/haploview/haploview>).

Results

Clinical characteristics of the study population

A cross-sectional study was conducted in 315 adolescents recruited randomly; only 270 met the inclusion criteria, 145 boys and 125 girls. The general clinical characteristics of the population and statistical differences between groups are shown in Table 1. Eighty-four boys and 75 girls with normal weight (58% vs. 69%, respectively), and 61 boys and 50 girls with overweight or obesity were studied. A significant difference in frequency by BMI was found between boys and girls in normal weight and with obesity ($p = 0.006$). However, no differences were found when comparing by gender ($p = 0.730$). Also significant differences were found in SBP ($p = 0.006$), fat percentage ($p = 0.001$), muscle ($p = 0.009$), total cholesterol ($p = 0.002$), triglycerides ($p \leq 0.001$), leptin ($p \leq 0.001$), but not in birth weight and length, HDL-C, LDL-C or adiponectin.

Table 1: Anthropometric and clinical, biochemical and hormonal characteristics of the study population.

	Normal	Obesity	p-Value
	n = 159	n = 111	
Age, years	16.6 \pm 1.0	16.7 \pm 1.1	0.518
Men, %	58%	42%	0.006
Weight, kg	52.9 \pm 6.6	69.7 \pm 10.6	<0.001
Length, cm	158 \pm 7.2	158.3 \pm 8.7	0.711
BMI, kg/m ²	21.1 \pm 1.9	27.8 \pm 3.9	<0.001
WHR, cm	71.0 \pm 8.07	85.8 \pm 13.3	<0.001
SBP, mmHg	111.0 \pm 12.6	115.1 \pm 9.1	0.006
DBP, mmHg	74.9 \pm 9.1	73.3 \pm 9.0	0.451
Birth weight, kg	2.7 \pm 1.0	2.6 \pm 1.1	0.721
Birth length, cm	48.7 \pm 4.8	49.2 \pm 3.9	0.797
Fat, %	28.8 \pm 6.3	35.6 \pm 6.6	<0.001
Fat, kg	2.6 \pm 2.6	3.2 \pm 2.7	0.097
Muscle, kg	17.7 \pm 4.6	19.2 \pm 4.4	0.009
Total cholesterol, mg/dL	154.7 \pm 35.2	168.2 \pm 31.5	0.002
Triglycerides, mg/dL	94.7 \pm 41.4	127.0 \pm 62.5	<0.001
HDL-C, mg/dL	53.2 \pm 8.91	51.2 \pm 8.4	0.396
LDL-C, mg/dL	79.8 \pm 31.7	90.0 \pm 24.1	0.326
Glucose, mg/dL	91.1 \pm 11.4	93.6 \pm 8.8	0.067
Leptin, ng/mL	9.7 (5.4–15.8)	21.1 (12.8–28.8)	<0.001
Adiponectin, μ g/mL	8.7 (6.6–11.1)	7.1 (5.0–9.2)	0.173
Acanthosis, %	3%	32.7%	<0.001

BMI, body mass index; WHR, waist-hip ratio; SPB, systolic pressure blood; DPB, diastolic pressure blood; HDL-C, high-density cholesterol; LDL-C, low-density cholesterol. The values are mean \pm SD, except in leptin and adiponectin expressed as median values (p_{25} – p_{75}) using Student's t-test and the Mann-Whitney U-test, respectively.

Table 2: Frequencies of UCP genotypes and polymorphisms.

UCP1-3826	Genotype frequency			Model	p-Value	OR (95%CI)
	n (%)					
	C/C	C/T	T/T			
Control	51 (32.1)	81 (50.9)	27 (17.0)	Dominant	0.465	1.21 (0.71–2.07)
Obesity	31 (27.9)	62 (55.9)	18 (16.2)	Recessive	0.842	0.93 (0.48–1.79)
				Co-dominant 1	0.415	1.25 (0.72–3.19)
				Co-dominant 2	0.808	1.09 (0.52–2.31)
				Additive	0.500	1.19 (0.71–2.00)
				Over-additive	0.426	1.21 (0.74–1.98)
				Allelic	0.696	0.93 (0.66–1.31)
UCP2 A55V						
Control	43 (27.0)	85 (53.5)	31 (19.5)	Dominant	0.080	1.68 (0.92–3.06)
Obesity	20 (18.0)	66 (59.5)	25 (22.5)	Recessive	0.546	1.20(0.66–2.17)
				Co-dominant 1	0.103	1.66 (0.89–3.10)
				Co-dominant 2	0.147	1.73 (0.82–3.66)
				Additive	0.073	1.69 (0.94–3.04)
				Over-additive	0.328	1.27 (0.78–2.08)
				Allelic	0.168	1.27 (0.92–1.79)
UCP2-866						
	G/G	G/A	A/A			
Control	33 (20.8)	99 (62.3)	27 (17.0)	Dominant	0.994	1.00 (0.55–1.82)
Obesity	23 (20.7)	63 (56.8)	25 (22.5)	Recessive	0.255	1.42 (0.77–2.61)
				Co-dominant 1	0.733	0.91 (0.49–1.69)
				Co-dominant 2	0.464	1.32 (0.62–2.84)
				Additive	0.846	1.05 (0.59–1.90)
				Over-additive	0.484	0.83 (0.51–1.37)
				Allelic	0.523	1.11 (0.79–1.57)
UCP3-55						
	C/C	C/T	T/T			
Control	114 (71.7)	39 (24.5)	6 (3.8)	Dominant	0.801	1.07 (0.62–1.82)
Obesity	79 (71.2)	28 (25.4)	4 (3.6)	Recessive	0.606	0.95 (0.26–3.45)
				Co-dominant 1	0.902	1.03 (0.58–1.82)
				Co-dominant 2	0.853	0.96 (0.26–3.52)
				Additive	0.943	1.01 (0.60–1.70)
				Over-additive	0.896	0.89 (0.59–1.81)
				Allelic	0.955	1.01 (0.63–1.61)

Genotype frequencies

The genotype distributions were in accordance with those predicted by the HWE, except for UCP2 55 in overweight/obese subjects ($\chi^2=4.075$, $p=0.040$) and for UCP2-866 in the normal weight group ($\chi^2=9.07$, $p=0.001$). We analyzed the associations between UCP genotypes in different inheritance models in normal weight and obese group. The minor allele frequency (MAF) was considering as a reference in the construction of inheritance models. The allele distribution of all UCP polymorphisms did not differ significantly between normal weight and obese subject's population. It is noteworthy that the frequencies of these UCP polymorphisms also did not vary when assuming different inheritance models ($p \geq 0.05$) (Table 2).

Association of the UCP polymorphisms with the clinical parameters

Logistic regression analyses were performed to assess the associations of UCPs and several metabolic obesity risk factors is shown in Table 3, after adjusting for the subject's age and sex using three inheritance models, co-dominant 1, dominant and recessive models. In all UCP polymorphisms studied, the recessive model was the most associated. The UCP1-3826 (*rs 1800592*) polymorphism was associated with high percentage of fat ($p=0.002$) and muscle weight ($p=0.019$) in a recessive model. Alternatively, the UCP2-866 (*rs659366*) polymorphism was linked to BMI ($p=0.0008$), DBP ($p=0.008$), triglycerides ($p=0.045$), LDL-C ($p=0.003$), lower levels of HDL-C ($p=0.056$), and

Table 3: Association of the *UCP* polymorphisms with clinical, biochemical and hormonal parameters in co-dominant, dominant and recessive models.

	<i>UCP1-3826</i>			<i>UCP2 A55V</i>			<i>UCP2-866</i>			<i>UCP3-55</i>		
	p1	p2	p3	p1	p2	p3	p1	p2	p3	p1	p2	p3
BMI, kg/m ²	0.942	0.995	0.741	0.598	0.326	0.636	0.818	0.936	0.527	0.486	0.818	0.243
SBP, mmHg	0.210	0.080	0.829	0.312	0.131	0.938	0.905	0.664	0.894	0.633	0.760	0.202
DBP, mmHg	0.034	0.011	0.894	0.394	0.183	0.970	0.016	0.437	0.008	0.153	0.393	0.745
Fat, %	0.151	0.784	0.002	0.939	0.854	0.185	0.980	0.976	0.146	0.528	0.656	0.958
Muscle, %	0.161	0.176	0.019	0.716	0.628	0.394	0.498	0.699	0.289	0.242	0.790	0.118
TC, mg/dL	0.481	0.767	0.210	0.854	0.590	0.977	0.855	0.721	0.679	0.541	0.198	0.084
Tg, mg/dL	0.620	0.940	0.349	0.965	0.825	0.843	0.195	0.153	0.045	0.325	0.963	0.207
HDL-C, mg/dL	0.776	0.779	0.484	0.563	0.384	0.693	0.640	0.434	0.050	0.798	–	0.575
LDL-C, mg/dL	0.514	0.846	0.271	0.317	0.132	0.977	0.004	0.824	0.001	0.544	–	0.794
Glucose, mg/dL	0.317	0.740	0.102	0.892	0.637	0.853	0.913	0.674	0.625	0.575	0.777	0.171
Hyper Tg, mg/dL	0.583	–	0.570	0.580	–	–	0.037	–	–	0.001	–	0.569
Hypo HDL, mg/dL	0.660	0.525	0.920	0.983	0.859	0.859	0.007	0.614	0.670	0.180	–	0.180
Hyper LDL, mg/dL	0.973	0.866	0.913	0.373	0.280	0.548	0.678	0.396	0.771	0.641	–	0.641
Leptin, ng/mL	0.551	0.719	0.274	0.933	0.724	0.853	0.585	0.486	0.466	0.544	–	0.549
Adiponectin, µg/mL	0.643	0.747	0.448	0.278	0.475	0.153	0.197	0.074	0.0710	0.164	–	0.164

Logistic analysis regression test, adjusted for age and gender. The number show the pC value in: p1, model co-dominant 1; p2, model dominant; p3, model recessive. Significant values are in bold. SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; TC, total cholesterol; Tg, triglycerides; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C, low-density lipoprotein-cholesterol.

higher plasma levels of leptin ($p=0.001$). Lastly, the *UCP3-55 C/T* (*rs1800849*) polymorphism was correlated with an increase in WHR ($p=0.008$).

Alternatively, we analyzed the levels of leptin and adiponectin in the overweight/obese group in a recessive model for two genotypes of *UCP2-866* (*rs 659366*). It was found that GA + AA had higher leptin levels with respect to GG genotype, whereas the opposite tendency is displayed in the case of adiponectin (Figure 1). That is to say that the adiponectin levels for GG genotype were higher with respect to GA + AA. No statistically significant differences were found between male and female subjects.

Haplotypes analysis

The analysis of haplotypes revealed one block in linkage disequilibrium with $D'=0.820$ and $r^2=0.473$ composed of two polymorphisms (*UCP2 A55V* and *UCP2-866*). The analyses showed three different possible allele combinations (GC, AT and AC). However, the distribution of these haplotypes was similar in obese patients and healthy controls (data not shown).

Discussion

In this study, we evaluated the role of the uncoupling protein variants in six inheritance models, their association

with clinical parameters and with the serum levels of adipokines in obese Mexican adolescents. *UCPs* are candidate genes for obesity as they are related to the energy balance and heat production. Several studies have demonstrated that mutations reducing the activities of these proteins can reduce energy expenditure by increasing the coupling of oxidative phosphorylation and contributing to BMI changes that lead to overweight or obesity. In spite of the fact that the relation between *UCP* polymorphisms and obesity has been extensively studied, the results of these associations are still inconclusive. Thus, the aim of this work was to obtain a more definitive conclusion about the association between *UCP* polymorphisms and obesity in adolescent children.

UCP polymorphisms

The present study shows that the genotype and allele frequencies of *UCP1 rs 1801592*, *UCP2 rs 659366*, *UCP2 rs 660339* and *UCP3 rs 1800849* under six different inheritance models were similar between normal weight and obese children. Our findings were similar to those in studies with Colombian, American Hispanic and Pima native (AZ, USA) subjects [30–33]; yet, they were different from reports in populations of European ethnicity [34, 35], where a high association has been reported among the *UCP* variants according to BMI, this, in European populations. These results proved, in short, that our study group has a different genetic background.

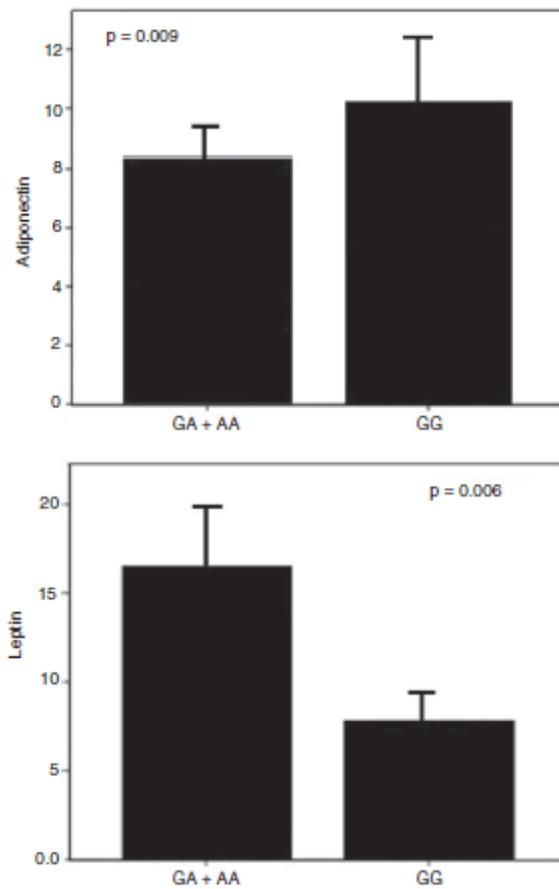


Figure 1: Levels of leptin and adiponectin in subjects with overweight/obese in a recessive model for *UCP2*-866. The leptin units are expressed in ng/mL, and adiponectin in µg/mL. Data are presented as mean ± SD.

UCP polymorphisms and clinical parameters

Indeed, important correlations were found between the *UCP* polymorphisms and different anthropometric and clinical characteristics mainly in a recessive model. *UCP1* *rs 1801592* was associated with fat and muscle percentage, whereas *UCP3* *rs 1800849* was linked to the WHR. Interestingly, the most significant differences between genotypes were found for *UCP2* *rs 659366* in the clinical parameters and in the levels of leptin and adiponectin.

The ability of *UCP2* to induce a proton leak across the inner mitochondrial membrane is well known. Hence, its involvement in the regulation of energy expenditure warrants its choice as a candidate gene for obesity and type 2 diabetes [36, 37]. The -866 G/A polymorphisms have been extensively studied for their association with obesity. In particular, Krauss et al. [38] observed that the G

allele was correlated with enhanced mRNA expression in adipose tissue *in vivo*, reduced transcriptional activity and increased risk of obesity. Other studies have additionally reported either an increased prevalence of the A allele in obesity [39, 40], or no association at all [41, 42]. Our work demonstrates a significant increase in BMI, DBP, total cholesterol, triglycerides, LDL-C, leptin and a slight decrease in HDL-C and adiponectin for *rs659366* in a recessive model. It is known that the lipid profile is associated with obesity and other parameters, such as high levels of total cholesterol, triglycerides, LDL-C and diminished levels of HDL-C. These parameters coincide with the clinical and anthropometric characteristics associated with *UCP2*-866 in a recessive model described in our results.

Although a modest correlation between obesity and the allele A -866 has been reported, studies have also failed to show an association between these polymorphisms and metabolic traits [43]; however, in a pediatric population with obesity has been shown to have large amounts of adipose tissue [28]. These inconsistencies could be attributed to the small sample size, incomplete coverage of the *UCP2* gene variations or potential population-specific influences on metabolic traits, ethnics groups, methods of genetic determination and/or age of study subjects.

Adipokines and *UCP* polymorphisms

Leptin is synthesized and secreted by the adipose tissue. The function of this adipokine is to suppress appetite and stimulate energy expenditure, thus reducing the adipose tissue mass and body weight. As a result of this, elevated levels of leptin have been related to obesity. In fact, most obese individuals have a “selective” resistance to their metabolic action. A direct relation between BMI and leptin levels was indeed demonstrated in our study. We also found a correlation between increased leptin levels and *UCP2*-866 GA + GG in obese subjects.

It has been reported that *UCP2* expression is inversely correlated with BMI, percentage of body fat and plasma leptin, suggesting that a decrease in the levels of this gene could contribute to the pathogenesis and maintenance of obesity [4]. In the same vein, the *UCP2*-866 allele G has been associated with an increase in the risk of obesity and it could be modifying protein expression. If this allele influenced leptin levels, then it could evoke an increase in the BMI and the risk factors for metabolic syndrome.

It is also important that further studies focus on the influence of polymorphisms on leptin levels and its

receptor gene, as well as on the interaction with environmental factors.

In conclusion, this study demonstrated that there is a direct relationship between clinical characteristics and *UCP2-866* in subjects with overweight and obesity in a recessive model, which seem to be associated with high levels of leptin and decreased levels of adiponectin in the studied Mexican adolescent population.

Acknowledgments: The authors thank the participants of this study.

Author contributions: R. Sámano, R. Gamboa and designed the study; R. Sámano, C. Huesca-Gómez, R. López-Marure A. Rodríguez-Ventura, AK. Hernandez-Cabrera and M. Tolentino collected the data; R. Sámano, R. Gamboa, C. Huesca-Gómez and A. Rodríguez-Ventura contributed to data analysis and interpretation; R. Gamboa drafted the manuscript. All the authors have accepted responsibility for the entire content of this submitted manuscript and approved submission.

Research funding: Funding for this study was provided by Instituto Nacional de Perinatología in the public sector, Funder Id: 10.13039/501100007686, registry 212250-49541 and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, project number 179967 CB2012-01.

Employment or leadership: None declared.

Honorarium: None declared.

Competing interests: The funding organization(s) played no role in the study design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the report; or in the decision to submit the report for publication.

References

- Eckel RH, Cornier MA. Update on the NCEP ATP-III emerging cardiometabolic risk factors. *BMC Med* 2014;26:115.
- Arlöv J, Ingelsson E, Sundström J, Lind L. Impact of body mass index and the metabolic syndrome on the risk of cardiovascular disease and death in middle-aged men. *Circulation* 2010;121:230–6.
- Oberkofler H, Liu YM, Esterbauer H, Hell E, Krempler F, et al. Uncoupling protein-2 gene: reduced mRNA expression in intraperitoneal adipose tissue of obese humans. *Diabetologia* 1998;41:940–6.
- Pinkney JH, Boss O, Bray GA, Bulmer K, Coppack SW, et al. Physiological relationships of uncoupling protein-2 gene expression in human adipose tissue in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:2312–7.
- Argilés JM, Busquets S, López-Soriano FJ. The role of uncoupling proteins in pathophysiological states. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;293:1145–52.
- Schrauwen P, Hesselink MK, Vaartjes I, Kornips E, Saris WH, et al. Effect of acute exercise on uncoupling protein 3 is a fat metabolism-mediated effect. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;282:E11–7.
- Jun HS, Kim IK, Lee HJ, Lee HJ, Kang JH, et al. Effects of UCP2 and UCP3 variants on the manifestation of overweight in Korean children. *Obesity* 2009;17:355–62.
- León-Mimila P, Villamil-Ramírez H, Villalobos-Comparán M, Villarreal-Molina T, Romero-Hidalgo S, et al. Contribution of common genetic variants to obesity and obesity-related traits in Mexican children and adults. *PLoS One* 2013;8:e70640.
- Mexitalia M, Yamauchi T, Utari A, Sjarif DR, Subagio HW, et al. The role of uncoupling protein 2 and 3 genes polymorphism and energy expenditure in obese Indonesian children. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2013;26:441–7.
- Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, et al. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun* 2012;425:556–9.
- Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, et al. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:1930–5.
- Kubota N, Yano W, Kubota T, Yamauchi T, Itoh S, et al. Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake. *Cell Metab* 2007;6:55–68.
- Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, et al. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1595–9.
- Lafontan M, Viguerie N. Role of adipokines in the control of energy metabolism: focus on adiponectin. *Curr Opin Pharmacol* 2006;6:580–5.
- Chevillotte E, Giralt M, Miroux B, Ricquier D, Villarroya F. Uncoupling protein-2 controls adiponectin gene expression in adipose tissue through the modulation of reactive oxygen species production. *Diabetes* 2007;56:1042–50.
- Taghadomi Masoumi Z, Eshraghian MR, Hedayati M, Pishva H. Association between uncoupling protein 2, adiponectin and resting energy expenditure in obese women with normal and low resting energy expenditure. *Gynecol Endocrinol* 2018;34:166–70.
- Menzaghi C, Trischitta V, Doria A. Genetic influences of adiponectin on insulin resistance, type 2 diabetes, and cardiovascular disease. *Diabetes* 2007;56:1198–209.
- Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 1998;395:763–70.
- Spiegelman BM, Flier JS. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 2001;104:531–43.
- Esler M, Vaz M, Collier G, Nestel P, Jennings G, et al. Leptin in human plasma is derived in part from the brain, and cleared by the kidneys. *Lancet* 1998;351:879.
- Maratos-Flier E. The long reach of leptin. *Nat Med* 2008;14:604–6.
- Coppola A, Liu ZW, Andrews ZB, Paradis E, Roy MC, et al. A central thermogenic-like mechanism in feeding regulation: an interplay between arcuate nucleus T3 and UCP2. *Cell Metab* 2007;5:21–33.

23. López M, Varela L, Vázquez MJ, Rodríguez-Cuenca S, González CR, et al. Hypothalamic AMPK and fatty acid metabolism mediate thyroid regulation of energy balance. *Nat Med* 2010;16:1001–8.
24. Gonzalez-Yanes C, Sánchez-Margalet V. Pancreastatin, a chromogranin A-derived peptide, inhibits leptin and enhances UCP-2 expression in isolated rat adipocytes. *Cell Mol Life Sci* 2003;60:2749–56.
25. Zhou Y, Rui L. Leptin signaling and leptin resistance. *Front Med* 2013;7:207–22.
26. Labruna G, Pasanisi F, Nardelli C, Tarantino G, Vitale DF, et al. UCP1 -3826 AG + GG genotypes, adiponectin, and leptin/adiponectin ratio in severe obesity. *Endocrinol Invest* 2009;32:525–9.
27. Lim KI, Shin YA. Impact of UCP2 polymorphism on long-term exercise-mediated changes in adipocytokines and markers of metabolic syndrome. *Aging Clin Exp Res* 2014;26:491–6.
28. Zurbano R, Ochoa MC, Moreno-Aliaga MJ, Martínez JA, Martí A. Grupo de Estudio Navarro de la obesidad infantil. Influence of the -866/A polymorphism of the UCP2 gene on an obese. *Nutr Hosp* 2006;21:52–6.
29. Lohman TG, Roche AF, Martorell R. Anthropometric standardization reference manual. Champaign, Ill, USA: Human Kinetics Books, 1988.
30. WHO Multicentre Growth Reference Study Group. WHO Child Growth Standards: length/height-for-age, weight-for-age, weight-for-length, weight-for-height and body mass index-for-age: methods and development. Geneva: World Health Organization, 2007.
31. Franco-Hincapié L, Duque CE, Parra MV, Gallego N, Villegas A, et al. Association between polymorphisms in uncoupling proteins and type 2 diabetes in a northwestern Colombian population. *Biomedica* 2009;29:108–18.
32. Bray MS, Boerwinkle E, Hanis CL. Linkage analysis of candidate obesity genes among the Mexican-American population of Starr County, Texas. *Genet Epidemiol* 1999;16:397–411.
33. Walder K, Norman RA, Hanson RL, Schrauwen P, Neverova M, et al. Association between uncoupling protein polymorphisms (UCP2-UCP3) and energy metabolism/obesity in Pima Indians. *Hum Mol Genet* 1998;7:1431–5.
34. Esterbauer H, Schneitler C, Oberkofler H, Ebenbichler C, Paulweber B, et al. A common polymorphism in the promoter of UCP2 is associated with decreased risk of obesity in middle-aged humans. *Nat Genet* 2001;28:178–83.
35. Brondani LA, Assman TS, De Souza BM, Boucas AP, Canani LH, et al. Meta-analysis reveals the association of common variants in the uncoupling protein (UCP)1-3 genes with body mass index variability. *PLoS One* 2014;9:e96411.
36. Mancini FP, Sabatino L, Colantuoni V, Pasanisi F, Finelli C, et al. Variants of uncoupling protein-2 gene and obesity: interaction with peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2. *Clin Endocrinol* 2003;59:817–22.
37. Mottagui-Tabar S, Hoffstedt J, Brookes AJ, Jiao H, Arner P, et al. Association of ADRB1 and UCP3 gene polymorphisms with insulin sensitivity but not obesity. *Horm Res* 2008;69:31–6.
38. Krauss S, Zhang CY, Scorrano L, Dalgaard LT, St-Pierre J, et al. Superoxide-mediated activation of uncoupling protein 2 causes pancreatic β cell dysfunction. *J Clin Invest* 2003;112:1831–42.
39. Liu J, Li J, Li WJ, Wang CM. The role of uncoupling proteins in diabetes mellitus. *J Diabetes Res* 2013;2013:585897.
40. Lee HJ, Ryu HJ, Shin HD, Park BL, Kim JY, et al. Associations between polymorphisms in the mitochondrial uncoupling proteins (UCPs) with T2DM. *Clin Chim Acta* 2008;398:27–33.
41. Dhamrait SS, Stephens JW, Cooper JA, Acharya J, Mani AR, et al. FT Cardiovascular risk in healthy men and markers of oxidative stress in diabetic men are associated with common variation in the gene for uncoupling protein 2. *Eur Heart J* 2004;25:468–75.
42. Krings SI, Larsen LH, Holst C, Toubro S, Hansen T, et al. Genotype-phenotype associations in obesity dependent on definition of the obesity phenotype. *Obesity Facts* 2008;1:138–45.
43. Salopuro T, Pulkkinen L, Lindström J, Kolehmainen M, Tolppanen AM, et al. Variation in the UCP2 and UCP3 genes associates with abdominal obesity and serum lipids: the Finnish Diabetes Prevention Study. *BMC Med Genet* 2009;10:94.

13. Anexo

13.1 Anexo A. *Técnica de extracción de ADN por el método de expulsión salina*

- Recolectar de 8-10 mL de sangre total periférica con anticoagulante (EDTA)
- En un tubo Falcón de 15 mL, poner 13 mL de solución de lisis (SLR 1X) y toda la sangre. Mezclar vigorosamente la solución (vortex)
- Centrifugar la solución 2500rpm/15min
- Quitar el sobrenadante con una pipeta o con vacío, con mucho cuidado sin tocar el paquete
- Agregar nuevamente SLR 1X hasta los 13 mL. Centrifugar a 2500 rpm/10min
- Retirar nuevamente el sobrenadante, sin tocar el paquete. Repetir lavado hasta que el paquete este limpio (color blanco). En este paso se puede invertir el tubo y dejarlo escurrir (10 min aprox.).
 - ❖ Agregar al tubo Falcón:
 - ❖ 260 µL de agua estéril
 - ❖ 160 µL de Buffer de proteinasa
 - ❖ 40 µL de SDS 20%
 - ❖ 40 µL de proteinasa K
- Resuspender el paquete con la solución y transferirlo a un tubo Eppendorf 1.5 mL previamente rotulado. Mezclar vigorosamente (vortex)
- Incubar a 37°C toda la noche o a 55°C durante 3-4hrs en este caso agregar 20µL más de proteinasa K
- Terminada la incubación agregar 240µL de NaCl 5M. Mezclar vigorosamente. Centrifugar a 14000 rpm/10 min
- Recuperar el sobrenadante en otro Eppendorf previamente rotulado sin tomar el precipitado

-
- Centrifugar nuevamente a 14000 rpm/10 min y recuperar el sobrenadante. Repetir este paso hasta que el sobrenadante no tenga sedimentos
 - Agregar EtOH frío al 95% e invertir el tubo hasta que aparezca un precipitado blanco (ADN). Se recomienda dejarlo en el congelador unos minutos.
 - Centrifugar a 14000 rpm/10min
 - Se elimina el sobrenadante por decantación y se deja escurrir el tubo boca abajo por 5-10 min, agregar EtOH frío al 70% (lavado)
 - Centrifugar 14000 rpm/5min
 - Se elimina el sobrenadante por decantación y se deja escurrir el tubo boca abajo
 - Secar el tubo a 37°C o en el concentrador de ADN
 - Agregar 50µL de solución TE estéril y dejarlo a temperatura ambiente durante 2 horas hasta que se resuspenda el ADN
 - Medir la concentración del ADN a 260nm. La pureza se obtiene de medir ADN 260 nm y las proteínas a 280 nm, la relación entre 260/280 nos da la pureza. Este valor debe corresponder entre 1.7-1.8.