



**Universidad de Salamanca**

**DEPARTAMENTO DE OBSTETRICIA, GINECOLOGÍA Y PEDIATRIA**

**“POLIMORFISMOS GENETICOS IMPLICADOS EN LA  
PREDISPOSICIÓN A OBESIDAD INFANTIL”**

**Fabiana Vilma Quesada**

**2013**

**DEPARTAMENTO DE OBSTETRICIA, GINECOLOGÍA Y PEDIATRÍA**



**HOSPITAL UNIVERSITARIO DE SALAMANCA**

**Universidad de Salamanca**

**“POLIMORFISMOS GENETICOS IMPLICADOS EN LA  
PREDISPOSICIÓN A OBESIDAD INFANTIL”**

Fabiana Vilma Quesada

Para optar al

Grado de Doctora

Directora

María Victoria Rascon Trincado

La **Dra. Dña. MARÍA VICTORIA RASCÓN TRINCADO**, PROFESORA CONTRATADA DOCTOR DEL DEPARTAMENTO DE OBSTETRICIA, GINECOLOGÍA Y PEDIATRÍA

CERTIFICA:

Que el presente trabajo titulado, *“Polimorfismos genéticos implicados en la predisposición a obesidad infantil”* ha sido realizado bajo mi dirección por Fabiana Vilma Quesada en el Departamento de Obstetricia Ginecología y Pediatría de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca y reúne a mi juicio originalidad y contenidos suficientes para que sea presentado ante el comité evaluador correspondiente y pueda optar al título de “Doctora en Medicina” por la Universidad de Salamanca”.

Y para que así conste, y a los efectos oportunos, expido el presente certificado en Salamanca, a 22 de Mayo de 2013.

Prof. Dra. María Victoria Rascón Trincado

## DIFUSION DE RESULTADOS

“Influencia e interacción del IL6 y PPARG en la aparición o no de obesidad infantil”. Quesada F, Prieto Matos P, Rascón Trincado MV, Prieto J. XXXI Congreso de la Sociedad Española de Endocrinología Pediátrica. Alicante, mayo 2009. Comunicación oral.

“Relacion de dos polimorfismos del FTO y MC4R con el aumento del IMC en niños y adolescentes” Quesada F, Prieto Matos P, Rascón Trincado MV, Martín Alonso M, Prieto J. XXXIII Congreso de la Sociedad Española de Endocrinología Pediátrica. Granada, mayo 2012. Comunicación poster.

“MC4R y GNB3: estudio de dos polimorfismos en la aparición de obesidad infantil y su posible interacción”. Quesada F, Prieto Matos P, Rascón Trincado MV, Prieto J. XXXIV Congreso de la Sociedad Española de Endocrinología Pediátrica. Santander, mayo 2012. Comunicación oral.

*“A mi familia”*

*“A Roberto”*

*“En memoria de Eduardo Alvarez”*

## AGRADECIMIENTOS

Deseo recordar en este momento a todas aquellas personas que con poco o con mucho, han sabido ayudarme, guiarme, dar su apoyo o simplemente hacerme la compañía necesaria para seguir adelante. Son muchos a los que debería nombrar de este lado y del otro del océano y espero no olvidar a nadie.

A la Dra. María Victoria Rascón Trincado, Mariví, por su dirección y sin cuya ayuda, respaldo y cariño nunca hubiera llegado hasta aquí. Y principalmente por haber creído en mí.

Al Prof. Dr. Jesús Prieto Veiga por su incondicional apoyo en este proyecto

Al Dr. Pablo Prieto Matos por su inestimable ayuda en la recolección de los datos clínicos de los pacientes y por su preocupación porque todo salga bien.

Al Prof. Dr. Rogelio González Sarmiento por sus consejos e indicaciones en el momento adecuado-

Al Dr. Ángel García Sánchez por su aliento y consejo.

A Helena, Xiana, Mercedes, Paula, Clara sin cuya ayuda nunca hubiera llegado a tiempo.

A Nieves, Esther, Sara, Marta, Manuel, Laura, Laura, Elena y todos los becarios que de una manera u otra se han preocupado por mí en el laboratorio.

A José Luis Villardón por su ayuda estadística.

A todas las enfermeras del Sector de consulta externa del Hospital sin cuya ayuda no hubiera sido posible la recolección de muestras.

A todo mi equipo en Buenos Aires, sin el respaldo de quienes, no podría seguir adelante con este emprendimiento.

A Rubén y Marta por su hospitalidad y amistad.

Y por sobre toda las cosas a mis padres y a mi familia ya que sin su incondicional apoyo y cariño nunca hubiera llegado hasta aquí

Y finalmente a Roberto, mi amor, el que trato de entenderme y acompañarme en el último tramo.

A todos gracias...

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
OBESIDAD	
1.1. DEFINICION	4
1.2. EPIDEMIOLOGÍA	4
1.3. DIAGNÓSTICO	6
1.4. ETIOLOGÍA DE LA OBESIDAD	8
1.5. BASES MOLECULARES DE LA OBESIDAD	12
2. DISEÑO	27
2.1. HIPOTESIS	29
2.2. OBJETIVOS	29
2.3. MATERIAL Y MÉTODO	30
2.4. ANALISIS ESTADÍSTICO	46
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
3.1. RESULTADOS	
3.1.1. ANALISIS POBLACIONAL	48
3.1.2. ANALISIS DEL PERFIL DE LABORATORIO	53
3.1.3. ANALISIS DE GENOTIPOS	55
3.2. DISCUSIÓN	67
3.2.1. GNB3 C825T	67
3.2.2. PPARG Pro12Ala	68

3.2.3. IL-6 -174 G>C	70
3.2.4. ADRB3 Trp64Arg	71
3.2.5. FTO rs9939609	72
3.2.6. MC4R rs17782313	73
3.2.7. INTERACCIONES	74
4. CONCLUSIONES	75
5. ANEXO	79
6. BIBLIOGRAFÍA	107

## ABREVIATURAS

ACTH: Adrenocorticotropina

ADRB3: Gen del receptor beta 3 adrenérgico

AMPK: Quinasa dependiente de AMP cíclico

AMP1: Gen de la adiponectina 1

AgRP: Péptido agouti

DBT: Diabetes

ECV: Enfermedad cardiovascular

FSH: Hormona foliculoestimulante

FTO: Gen asociado a masa grasa y obesidad

GNB3: Gen de la subunidad beta 3 de la proteína G

HDL: Lipoproteína de alta densidad

HTA: Hipertensión arterial

IL6: Gen de la interleuquina 6

IMC: Índice de masa corporal

LDL: Lipoproteína de baja densidad

Lep: Leptina

LH: Hormona luteinizante

MC4R: Gen del receptor 4 de la melanocortina

MSH: Hormona estimulante de melanocortina

NHE1: Gen del intercambiador de sodio e hidrógeno

POMC: Gen de la proopiomelanocortina

PPARG: Gen del receptor gamma para sustancias proliferadoras de peroxisomas

# **INTRODUCCIÓN**



La obesidad es una enfermedad crónica, multifactorial y compleja que desde hace un tiempo representa un importante problema de la salud pública por las dimensiones que está adquiriendo en la mayor parte de los países desarrollados, en los que afecta a proporciones considerables de población.

Distintos estudios poblacionales disponibles apuntan tendencias crecientes de la obesidad y el impacto económico que ejerce sobre el gasto sanitario, tanto por su tratamiento como por el de sus complicaciones.

Es preocupante su aumento entre los niños y adolescentes ya que su presentación tan temprana nos lleva a pensar en futuros adultos obesos y con consecuencias en la salud de los mismos debido a su asociación con síndrome metabólico y la consecuente enfermedad cardiovascular, primera causa de morbilidad en países desarrollados y en vías de desarrollo.

Se sabe que en la obesidad influyen tanto factores genéticos como ambientales y conductuales y que la aparición de la obesidad como fenotipo se debe a la influencia de estos 2 últimos sobre una base genética predisponente que se dispara.

Modificaciones en la calidad de la dieta, alteraciones en las conductas alimentarias, el sedentarismo y el creciente desapego a la realización de deportes entre los niños, debido al aumento de los tiempos frente al televisor, la computadora o las consolas de juego, ha hecho que polimorfismos, presentes en distintos genes, vinculados con la regulación del metabolismo energético y que en algún momento fueron útiles como diferenciación para la supervivencia por el ahorro de energía que suponían, sirvan en la actualidad para aumentar la incidencia de la obesidad.

Se han tipificado gran cantidad de genes y regiones cromosómicas relacionadas con la aparición fenotípica de la obesidad y su asociado directo, el síndrome metabólico.

Con este trabajo queremos tratar de aportar algo de luz a la influencia de distintos polimorfismos genéticos en la aparición de la obesidad en forma tan temprana como es en la niñez y la adolescencia.

# **OBESIDAD**

## **1.1. DEFINICIÓN**

Se define como obesidad a la acumulación excesiva de tejido adiposo en el organismo y en la gran mayoría de los casos, se acompaña de aumento de peso, cuya magnitud y distribución condicionan la morbilidad subsecuente de esta enfermedad <sup>(1)</sup>.

Se trata de una patología crónica, multifactorial y compleja, que se debe a factores genéticos, ambientales y conductuales. En las últimas 3 décadas ha aumentado su incidencia en forma alarmante tanto en la vida adulta como en la adolescencia y la niñez. Por ello supone un gran desafío el hacer un diagnóstico temprano del sobrepeso y el análisis de las conductas erróneas que llevan a la aparición de la obesidad, para poder así tomar las medidas preventivas adecuadas.

## **1.2. EPIDEMIOLOGÍA**

Lamentablemente en los últimos años la epidemia de la obesidad en Europa y USA se ha convertido en una pandemia <sup>(2-6)</sup> y además está aumentando de forma alarmante en los países en desarrollo <sup>(7)</sup>. El aumento de la incidencia de la obesidad se ha observado por igual en ambos sexos y ha alcanzado a todos los grupos raciales, étnicos y socioculturales pero con mayor proporción en los niños nacidos con más de 4000 g y con padres obesos. <sup>(1)</sup>

En España se encontró que el 26,5% de los niños tiene sobrepeso y se considera obeso al 13,9%. Ocurre algo similar en Estados Unidos con una incidencia para la obesidad del 15% y para el sobrepeso de alrededor del 27% <sup>(5, 8,12)</sup>. En Argentina según estadísticas del Ministerio de Salud la incidencia de obesidad es del 11% y los niños con sobrepeso llegan en general aproximadamente al 25%. <sup>(1)</sup>

En asociación directa con el aumento de la aparición de la obesidad se observa un aumento de la incidencia del síndrome metabólico <sup>(13)</sup>, conformando ambos importantes factores de riesgo para la aparición de la enfermedad coronaria y de la aterosclerosis en la vida adulta. Se denomina síndrome metabólico a la asociación de obesidad, hipertensión arterial (HTA), diabetes

mellitus tipo 2, dislipemia, que unidos predisponen a la enfermedad cardiovascular (ECV); aunque en la actualidad se esta redefiniendo y se están estudiando cada uno de sus componentes como factores de riesgo con valor predictivo individuales para la ECV <sup>(14,15)</sup>. De hecho hay una evidencia clara de que la aterosclerosis comienza en la niñez. En el Estudio Cardíaco Bogalusa <sup>(16)</sup>, las autopsias de niños fallecidos durante el mismo mostraron una relación directa entre el número y la severidad de los factores de riesgo, principalmente la obesidad, con aterosclerosis tanto en aorta como en las arterias coronarias. También se comprobó que el 60% de los niños con obesidad entre 5 y 10 años presentaban por lo menos un factor de riesgo para síndrome metabólico, mientras que el 25% presentaba 2 o más factores de riesgo.

A pesar de que el sobrepeso infantil sólo representa el 25% de la obesidad en adultos, el sobrepeso que aparece antes de los 8 años de vida y persiste durante la vida adulta se relaciona con un índice de masa corporal (IMC) de 41 en comparación con el IMC de 35 para la obesidad que se establece en la edad adulta <sup>(9, 17)</sup>.

En el Estudio de prevalencia de obesidad infantil "ALADINO" (ALimentación, Actividad física, Desarrollo INfantil y Obesidad) se incluyeron 7.923 alumnos entre 6 y 9,9 años de octubre de 2010 a mayo de 2011. En este estudio se utilizaron los estándares de crecimiento y desarrollo infantil publicados por la OMS en 2007. Estos estándares facilitan la comparación entre diferentes trabajos, países y tiene en cuenta la diversidad étnica de cada país, para evitar la subestimación que implica establecer comparaciones con poblaciones en las que ya existía obesidad. Por lo tanto pretenden describir cómo deberían crecer los niños en condiciones adecuadas, en lugar de cómo crecieron en un determinado lugar y tiempo. Así se clasifican de la siguiente manera:

- Sobrepeso: IMC > 1 desviación estándar del valor medio para su mismo sexo y edad
- Obesidad: IMC > 2 desviaciones estándar del valor medio para su mismo sexo y edad

Se ha llegado a la conclusión de que se está ante un grave problema de salud pública y que el exceso de peso es un problema de salud muy extendido en la infancia. A pesar de esto parece que el crecimiento de la obesidad infantil se está estabilizando respecto a lo descrito en el estudio enKid<sup>(5)</sup>. También concluyó que la obesidad infantil afecta preferentemente a las clases

sociales más desfavorecidas. Por lo tanto las intervenciones educativas deben dirigirse a las clases sociales con bajo nivel de renta y estudios para reducir las desigualdades en salud. Deben potenciarse las medidas encaminadas a modificar el entorno alimentario, haciéndolo más saludable y facilitar la práctica de actividad física. ([http://www.aesan.msc.es/AESAN/docs/docs/notas\\_prensa/ALADINO\\_presentacion.pdf](http://www.aesan.msc.es/AESAN/docs/docs/notas_prensa/ALADINO_presentacion.pdf))

FIGURA 1. Incremento global en la prevalencia de obesidad infantil. En negritas el incremento de prevalencia para el período especificado. En *italicas* definiciones de sobrepeso y obesidad. Tomado de Ebbeling y col.<sup>8</sup>

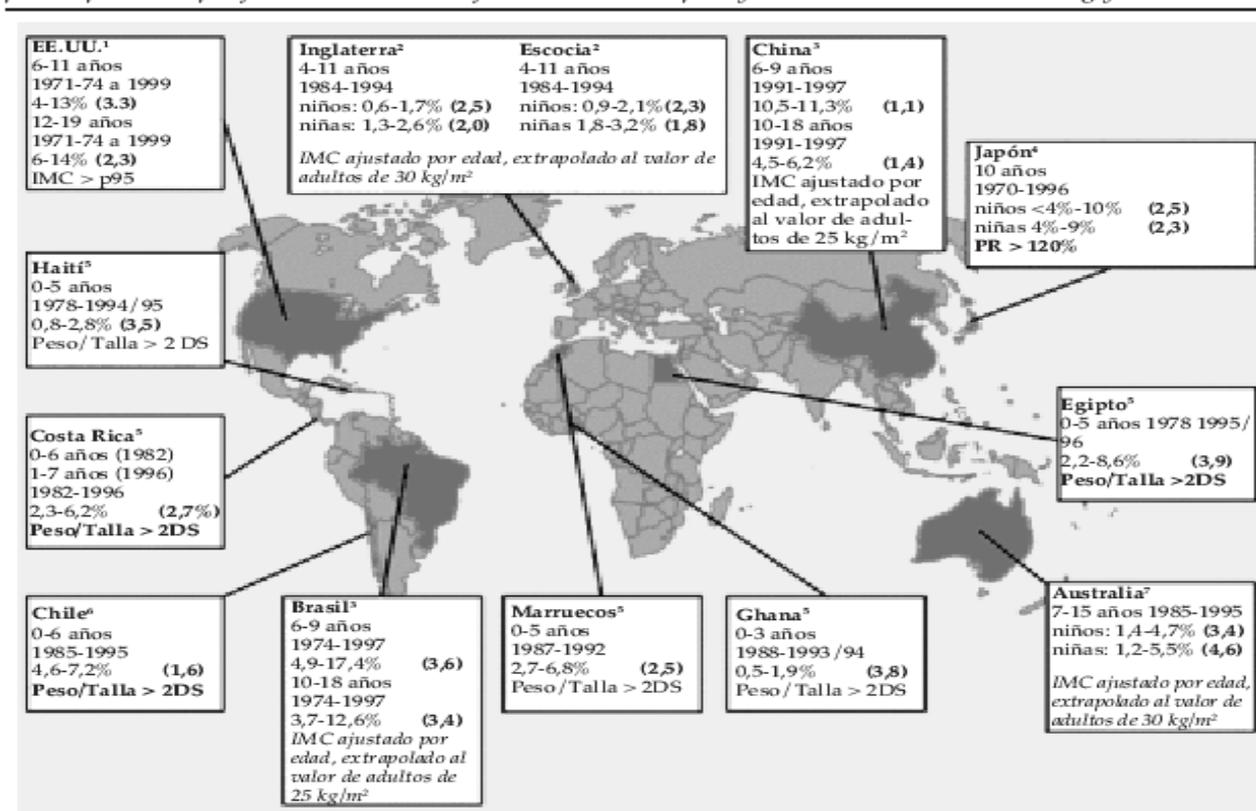


Figura 1: Incremento global de la obesidad infantil en el mundo

### 1.3. DIAGNÓSTICO

El cálculo del Índice de Masa Corporal (IMC) representa el primer paso de la valoración del sobrepeso para su tratamiento. Se utiliza el término de obesidad cuando el IMC está por encima

de 2 desviaciones (Z score) y se habla de “riesgo de obesidad” o sobrepeso en los niños con IMC por encima de 1 desvío.

Cuando se observan niños con percentiles altos para peso y talla se debe valorar el patrón de crecimiento en la familia. Por otro lado hay que controlar a los niños que suben 2 o más desvíos estandar de peso ya que, excepto que hayan sido retrasos del crecimiento intrauterino con una carga genética importante para ser grandes, presentan mayor riesgo de sufrir de sobrepeso.

Es importante tener en cuenta la historia familiar de obesidad y otras patologías relacionadas, así como las conductas familiares de alimentación y actividad física, con el fin de tomar las medidas adecuadas para la prevención. La prevención se basa en una buena educación alimentaria, practica de actividad física, disminución de horas frente a la pantalla (el televisor, el ordenador o la consola de juegos) implicando en todo ello al entorno familiar. <sup>(1)</sup>

Las complicaciones asociadas a la obesidad que pueden afectar al niño con sobrepeso son varias. Así, desde el punto de vista psicológico y social son centro de las bromas en sus grupos de pertenencia, lo que muchas veces los lleva al aislamiento social, a las conductas obsesivas, a la depresión, etc.

Estéticamente son frecuentes la adipomastia, las estrías cutáneas, la acantosis nigricans, etc.

Sin embargo las complicaciones de mayor gravedad son la diabetes tipo 2, HTA, aterosclerosis, dislipemias, apneas, asma, esterilidad, cáncer.

Por todo esto es importante realizar en estos niños controles periódicos que desde el punto de vista analítico incluya un perfil hormonal (hormonas tiroideas, hormonas androgénicas, cortisol, estradiol, FSH y LH), un perfil lipídico (colesterol total, triglicéridos, HDL, LDL), glucemia, insulinemia, uremia, creatininemia, ionograma, perfil hepático, proteínograma, hemograma, estudio de la coagulación, proteína C reactiva y puede realizarse la cuantificación de la leptina.

También deben hacerse distintas mediciones seriadas de talla, peso, circunferencia de cintura y cadera, tensión arterial, entre otras.

Todos estos parámetros se controlaran regularmente para poder evaluar la aparición del síndrome metabólico según una serie de criterios no unificados entre los que se encuentra la resistencia a la insulina por HOMA, la relación cintura/cadera, valores séricos de triglicéridos, HTA, etc. <sup>(1)</sup>

## **1.4. ETIOLOGÍA DE LA OBESIDAD**

### **1.4.1. El tejido adiposo como modelo estático de balance energético:**

Durante mucho tiempo se pensó en la obesidad como un desbalance del equilibrio entre la ingesta y el gasto energético, conformando un modelo estático. Pero con el paso del tiempo se vio que esto no era lo único que ocurría y que muchos otros eventos se asociaban a este desbalance en la aparición de la obesidad <sup>(14, 18)</sup>.

### **1.4.2. El tejido adiposo en el adulto depende del número de adipocitos en la infancia**

Spalding et al. (2008) mostraron que el número de adipocitos es un determinante importante de la masa grasa en los adultos. Sin embargo, el número de células de grasa se mantiene constante en la edad adulta en personas delgadas y obesas, incluso después de la pérdida de peso marcada, lo que indica que el número de adipocitos se establece durante la infancia y la adolescencia. Para establecer la dinámica de la población estable de los adipocitos en los adultos, los autores midieron el "turn over" de los adipocitos mediante el análisis de ADN genómico. Los resultados indicaron que aproximadamente el 10% de las células de grasa se renuevan anualmente, en todas las edades y niveles de índice de masa corporal de los adultos. Ni la muerte ni la tasa de generación de adipocitos se modificó en la obesidad de inicio temprano, lo que sugiere una regulación estricta del número de células de grasa en esta condición durante la edad adulta. <sup>(19)</sup>

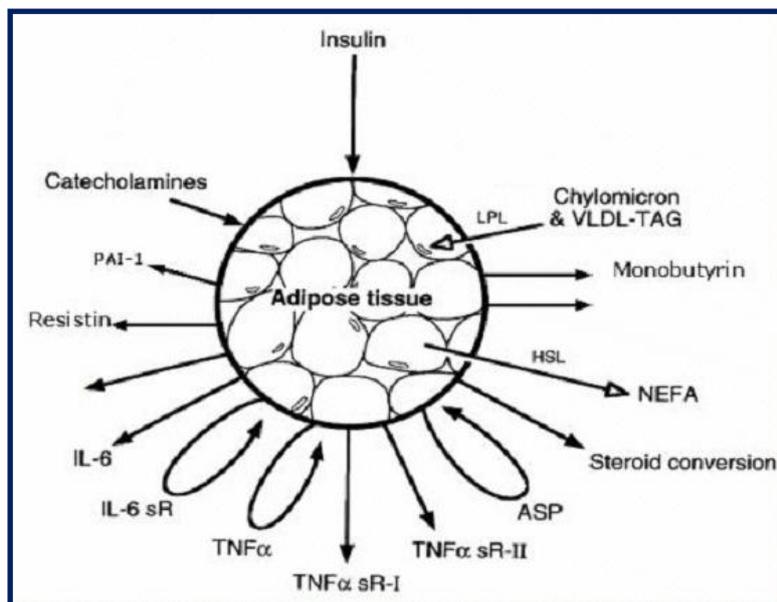
### **1.4.3. El tejido adiposo como órgano endocrino**

En los años 90 y como consecuencia de distintas investigaciones se ha dejado de considerar al tejido adiposo como un mero depósito de energía <sup>(17,20)</sup>. El tejido adiposo es un verdadero órgano con importantes funciones endocrinas y metabólicas. El adipocito, su célula esencial, tanto en su membrana nuclear como celular presenta receptores para hormonas del resto de los ejes

hormonales, catecolaminas y citoquinas. Además de los adipocitos, el resto de los componentes celulares de la matriz estromal secretan péptidos denominados adipocitoquinas, sustancias que actúan tanto sobre hipotálamo y núcleo arcuato como sobre distintos órganos periféricos, ejerciendo su acción como reguladores activos del balance energético del organismo <sup>(21-24)</sup>.

Se podrían clasificar las adipocitoquinas en 2 grupos:

- 1- Adipocitoquinas de acción específica sobre el tejido adiposo.
- 2- Adipocitoquinas no específicas para el tejido adiposo pero secretadas en gran cantidad por el mismo



**Figura 2:** Tejido adiposo como productor de adipocitoquinas

Las principales adipocitoquinas descritas son:

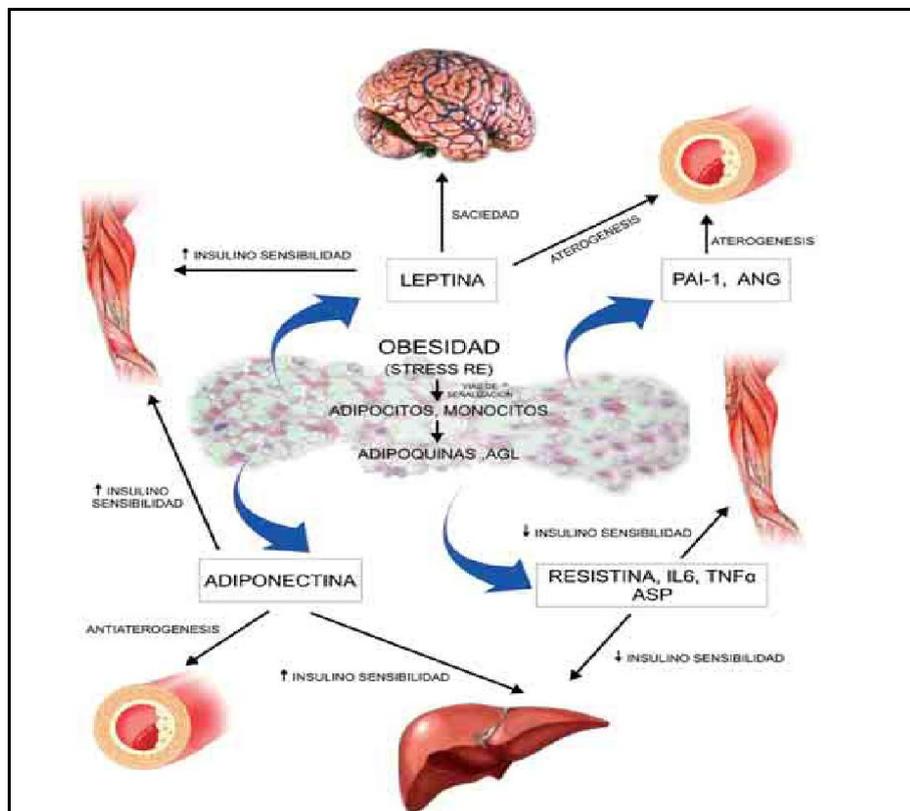
- Leptina: Se trata de una proteína ácida de 167 aminoácidos que no se almacena en el adipocito pero se produce y secreta en el momento. Su producción está regulada por mecanismos transcripcionales y se ha demostrado en diversos estudios que cambios en el gen de la leptina originan cambios en el ritmo de su secreción. Como veremos más

adelante también es importante su interacción con el receptor de leptina y el funcionamiento del mismo.<sup>(23)</sup>

- Adiponectina: Se trata de un péptido cuyo ARNm sólo se expresa en el tejido adiposo, es codificado por el gen APM1 y contiene dos dominios. Es abundante en el plasma circulante (5 a 20 mcg/ml) y se observó que se encuentra muy disminuida en sujetos obesos en especial con obesidad visceral. A su vez es menor aun si dichos individuos padecen de DBT mellitus tipo 2, HTA y/o enfermedad coronaria.<sup>(21,22,24)</sup>
- Resistina: Se trata de una proteína rica en cisteína, encontrada en el momento de la diferenciación del adipocito. Se encuentra en muy bajas concentraciones en el tejido adiposo pero se esta considerando su influencia en la aparición de la arteriosclerosis.
- PAI-1: Se trata de la proteína inhibidora del factor activador del plasminógeno, el cual se encuentra aumentado en los obesos por su alta producción en el tejido adiposo, aumentando a su vez el riesgo de embolismo, por la inhibición del plasminógeno, la hipertrigliceridemia y la resistencia a la insulina, no conociéndose bien el mecanismo de la influencia del PAI-1 en los 2 últimos casos.<sup>(21)</sup>
- Citoquinas inflamatorias:
  1. Factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa): Su gen se expresa en el tejido adiposo y en él se encuentran altas concentraciones de ARNm. Recientemente se ha descubierto que es un importante inhibidor de la producción de adiponectina, por lo que su producción por parte del tejido adiposo abdominal es inversamente proporcional a la producción de la adiponectina.
  2. IL-6: Es secretada en el tejido adiposo y representa el 30% de las citoquinas circulantes. Aumenta su concentración tanto con la obesidad como con la resistencia a la insulina y disminuye con la disminución del tejido adiposo.

- Nuevas adipocitoquinas:

1. **Apelina:** Su secreción se ve estimulada por la insulina y se encuentra aumentada en el momento de la diferenciación de los adipocitos.
2. **Visfatina:** Son escasos los conocimientos que se tienen sobre esta adipocitoquina. Sin embargo se conoce bien su mecanismo de acción de estimulación directa sobre el receptor de insulina, su relación con el volumen del tejido adiposo visceral y la presencia de altas concentraciones en individuos obesos y en especial con DBT mellitus tipo 2. Todo esto la convierte en una buena candidata para nuevos estudios relacionados con obesidad.<sup>(17,21)</sup>
3. **ZAG:** Se trata de la glicoproteína Zinc-alfa2, secretada por el tejido adiposo, es una proteína de interés debido a su capacidad de jugar muchas funciones importantes en el cuerpo humano, incluyendo la fertilización y la movilización de lípidos como intermediaria de la lipólisis. También está asociada a la caquexia tumoral <sup>(17)</sup>



**Figura 3:** Tejido adiposo como sistema endocrino.

## **1.5. BASES MOLECULARES DE LA OBESIDAD**

En las últimas décadas distintos estudios moleculares han derivado en el hallazgo de más de 430 genes, marcadores y zonas cromosómicas relacionadas con la obesidad (11, 25, 26).

A través de los avances realizados en la biología molecular ha sido posible el hallazgo de alteraciones mono y digénicas causantes de obesidad, así como síndromes que asociados a obesidad como rasgo fenotípico se ajustan a modelos mendelianos de herencia.

Por otro lado se comenzaron a realizar estudios de asociación, en los cuales el investigador fundamenta la supuesta importancia del gen en estudio en relación con la homeostasis energética, su localización y funciones, conociéndose a estos genes como “genes candidatos”.(27)

Clasificaremos y describiremos las bases moleculares de la obesidad de la siguiente forma:

### 1. Con patrón de herencia mendeliana:

- Síndromes de herencia autosómica recesiva
  1. Bardet-Biedl
  2. Alstrom-Wolfram
  3. Cohen
  4. Prader-Willi
  5. Osteodistrofia hereditaria de Albright
  
- Síndromes de herencia ligadas al cromosoma X
  1. Wilson-Turner
  2. Börjesson-Forssman-Lehmann

## 2. Mutaciones monogénicas y digénicas:

- Leptina (OMIM 164160): Gen de la leptina humana (Lep): Se trata de un péptido que genera un estímulo anorexígeno a través de su acción sobre el hipotálamo, disminuye en los adipocitos la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos, aumenta la oxidación lipídica e incrementa el gasto energético basal. Se han descrito 2 mutaciones diferentes en 6 pacientes con obesidad extrema que respondieron a la administración de leptina sintética. <sup>(27)</sup>
- Receptor de leptina (OMIM 601007): Es un miembro de la familia de receptores de citoquinas clase I. Este receptor de citoquinas no posee actividad quinasa endógena dentro del dominio intracelular pero en cambio se une a una JAK (Jano quinasa). Cuando la leptina se une al receptor, este activa al JAK el cual fosforila a las tirosinas. Hace lo mismo con los transductores de señal y activador de la transcripción STAT, los cuales se dimerizan y se translocan al núcleo iniciándose la transcripción del gen. Se han descrito diferentes isoformas del receptor en distintas localizaciones (Ob-Ra, Ob-Rb, Ob-Rc, Ob-Rd, Ob-Re, Ob-Rf) que son codificadas por splicing alternativo del mismo gen. Una mutación puntual en el receptor resultó en un receptor truncado que carece de los dominios transmembrana e intracelular, por lo que circula en sangre. Así no sólo hay una disminución de receptores de leptina en la membrana sino que el receptor truncado circulante, se une a la leptina secretada previniendo así su acción. <sup>(27)</sup>
- Proopiomelanocortina (OMIM 176830): Gen POMC: Es un polipéptido producido en el núcleo arcuato precursor de 2 subunidades: la adrenocorticotrofina (ACTH) y la lipotropina beta (LPH), esta última precursora de la endorfina beta y de la lipotropina gamma a su vez precursora de la melanocortina (MSH). Una mutación en este gen produce una disrupción de la vía leptina-melanocortina porque interfiere en la producción de la ACTH, disminuyendo la acción anorexígena de la leptina. <sup>(28)</sup>

- Receptor 4 de la melanocortina (OMIM 155541): Gen MC4R: Es el receptor de la MSH en el cerebro que produce un estímulo anorexígeno a nivel central. Se han comunicado numerosos casos de mutaciones, por lo que constituye la causa monogénica más prevalente de todas las encontradas, describiéndose su presentación como una obesidad de inicio precoz, importante acumulación de grasa, hiperfagia e hiperinsulinismo.<sup>(28)</sup>
- Receptor Gamma para sustancias Proliferadoras de Peroxisomas (OMIM 601487): Gen PPARG: Se trata de un receptor hormonal con función reguladora de la transcripción de diversos genes. Está relacionado con la diferenciación del adipocito y la sensibilidad a la insulina. Se ha descrito una mutación puntual, la Pro115Gly asociada a una mutación en el gen PPP1R3A (subunidad 3, músculo específica de la fosfatasa 1) como la primera causa digénica de obesidad de instalación precoz e insulinoresistencia.<sup>(26)</sup>

### 3. Estudios de asociación

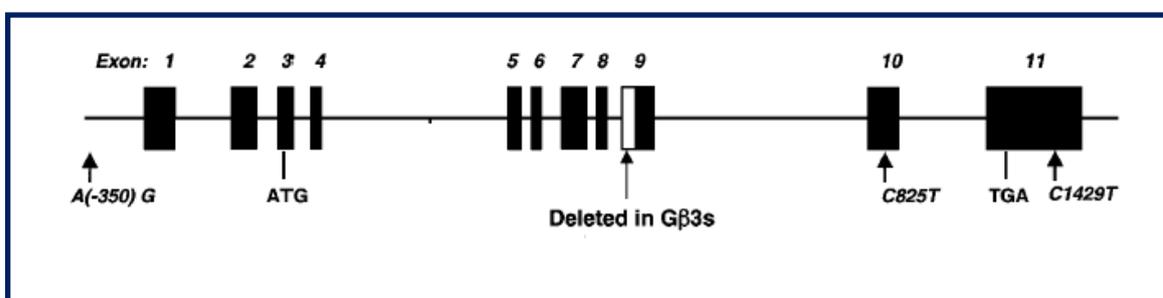
Se han estudiado múltiples genes asociando al rasgo fenotípico de obesidad con distintos genes, de acuerdo a la función de estos últimos. Entre estos genes se encuentran el ADRB3, PPARGCO1, AMP1, UCP. Nos interesa particularmente describir otros tres genes relacionados con obesidad que son los que estudiaremos en el presente trabajo. Ellos son:

- Gen de la subunidad beta 3 de la proteína G (GNB3):

Las proteínas G se expresan en todas las células del organismo y su rol principal es el traducción de señales en la membrana celular a hacia una respuesta celular. Son heterodímeros compuestos por subunidades alfa, beta y gamma. La familia de proteínas G comprende 18 subunidades alfa, 5 subunidades beta y 12 subunidades gamma codificadas por diferentes genes.

En 1995, Siffert et al <sup>(29)</sup> descubrieron el polimorfismo C825T estudiando células B inmortales de individuos normotensos con baja actividad de intercambio de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  y sin historia familiar de HTA y de individuos hipertensos con alta actividad de intercambio de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  y con historia familiar de HTA. En estas células el gen de NHE1 que codifica para el intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  no estaba modificado. En cambio observaron que las proteínas G de las células de los individuos hipertensos presentaban un aumento de su activación. Analizando las distintas subunidades encontraron en la subunidad beta 3 un polimorfismo exónico el C825T. Así en los individuos con al menos un alelo T se observaba aumento de la actividad mientras que en los homocigotos CC se observaba una disminución de la actividad de las proteínas G. <sup>(30)</sup>

El gen GNB3 se localiza en el cromosoma 12p13 y está constituido por 11 exones, encontrándose el polimorfismo C825T en el exón 10 <sup>(31)</sup>.



**Figura 4:** Esquema de los polimorfismos del GNB3 incluyendo una región de splicing alternativo

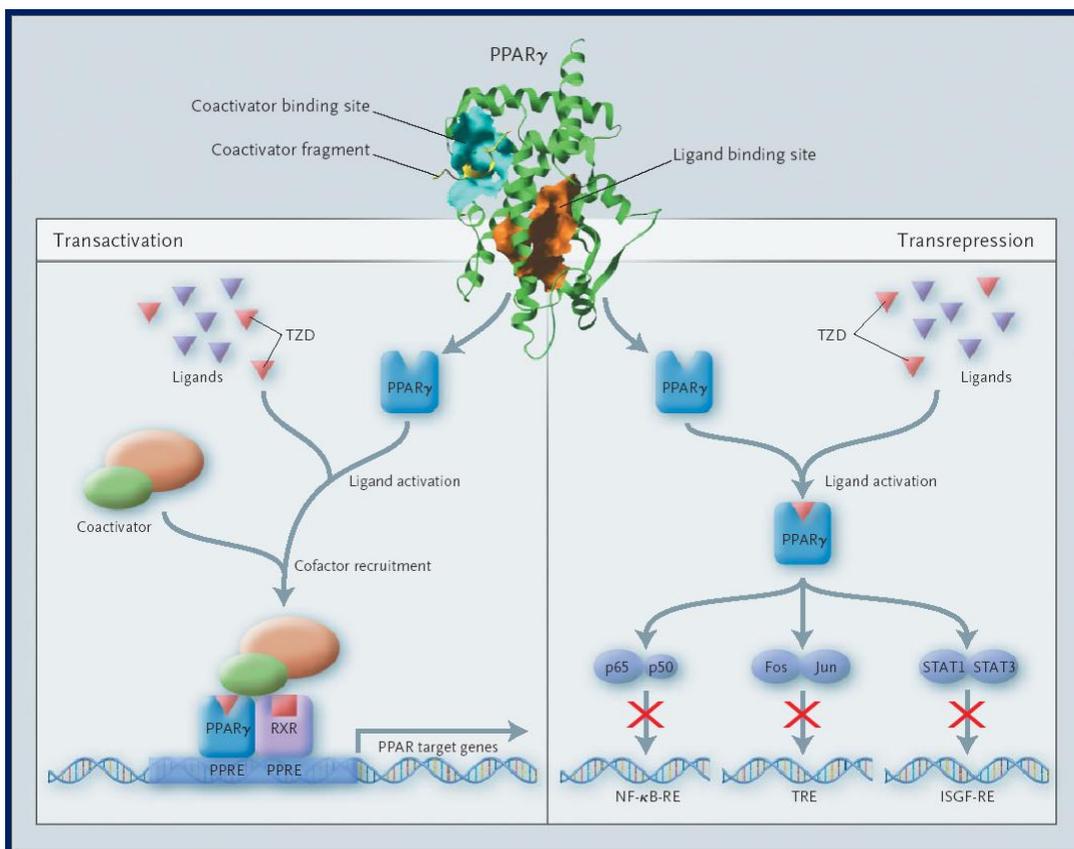
En individuos caucásicos los genotipos del C825T se distribuyen aproximadamente de la siguiente manera: 10% TT, 45% TC y 45% CC, para una incidencia total del alelo T de alrededor de 30%. <sup>(32, 33)</sup>

En varios trabajos realizados desde su hallazgo lo han relacionado con un aumento de la incidencia de hipertensión arterial, obesidad, dislipemias y resistencia a la insulina en presencia del alelo T <sup>(34-36)</sup>. Distintos estudios han sugerido que hombres jóvenes portadores del alelo 825T tienen aumentado el riesgo de padecer obesidad y lo mismo ocurre en las mujeres durante el embarazo <sup>(37)</sup> y en las puerperas. <sup>(38)</sup> Lo contrario ocurre en las mujeres postmenopáusicas, las cuales tienen mayor aumento de peso en presencia de CC. <sup>(39)</sup> Por su parte, Hsiao et al no ha

podido comprobar la relación entre el polimorfismo C825T y obesidad. <sup>(40)</sup> Algunos estudios han buscado la asociación del polimorfismo C825T con la respuesta a diferentes fármacos, pero aun esta relación no se ha podido comprobar <sup>(41,42)</sup>.

- Gen de Receptor Gamma para sustancias Proliferadoras de Peroxisomas PPARG:

El PPARG es miembro de la subfamilia de los receptores activadores del proliferador del peroxisoma miembro de la superfamilia de los 48 receptores de la membrana nuclear, y regula la expresión genética en respuesta al ligando que se une a él. <sup>(43)</sup>

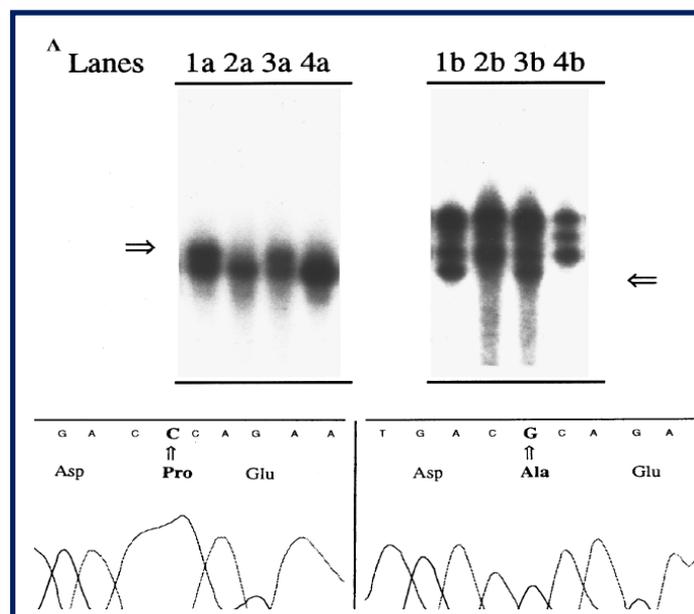


**Figura 5:** Forma de acción de PPARG tanto en transactivación como en transrepresión. <sup>(49)</sup>

Se trata de un factor de transcripción nuclear, implicado en el metabolismo del tejido adiposo, incluyendo la diferenciación del adipocito, la adipogénesis y la patogénesis de la resistencia a la

insulina. Se encuentra altamente expresado en el tejido adiposo, pero también en células beta del páncreas, endotelio vascular y macrófagos <sup>(44)</sup>. Es un receptor hormonal nuclear con función reguladora en la transcripción de diferentes genes. Se heteromeriza con el receptor retinoide X (RXR) y regula la transcripción de genes diana a través de la unión de elementos de respuesta específica a las sustancias proliferadoras de peroxisomas.

Tontonoz et al <sup>(45,46)</sup> describieron en 1994 la presencia y mecanismos del PPARG en tejido adiposo. El polimorfismo Pro12Ala fue publicado por Yen et al en 1997 <sup>(47)</sup>. Se trata de una sustitución G >C del único exón del PPARG2 en el nucleótido 34 que lleva a un cambio de prolina a alanina en el codón 12 de la isoforma PPARG2 <sup>(47)</sup>. Tiene una alta prevalencia en sujetos caucásicos y ha sido estudiado en asociación con obesidad e insulinoresistencia. Algunos trabajos sugirieron que este polimorfismo mejora la sensibilidad de la insulina en especial en los obesos <sup>(43,48)</sup>. Aunque luego no se observó lo mismo en otros estudios, donde el 12Ala se relaciona con el aumento del riesgo de insulino resistencia en diferentes etnias. <sup>(49-51)</sup>



**Figura 6:** SSCP y secuenciación mostrando la mutación Pro12Ala del PPARG2 <sup>(47)</sup>.

Vidal-Puig et al. demostraron en 1997, que la expresión del ARNm del PPARG está aumentada en el adipocito y que su concentración baja en el momento de hacer dietas hipocalóricas hasta en un 25% ante una pérdida de peso de un 10%, volviendo a sus valores predieta después de 4 semanas de dieta de mantenimiento<sup>(44)</sup>. Estos mismos autores encontraron una relación proporcional entre el aumento de la expresión del ARNm en el tejido adiposo y el aumento del IMC. En el estudio realizado por Cecil et al, se considera a la variante 12A1a, como protectora contra la obesidad, la resistencia a la insulina, la diabetes tipo 2, la hipertensión arterial y el infarto agudo de miocardio <sup>(52)</sup>.

- Gen de la interlequina-6 (IL-6):

Es una interleuquina secretada en el tejido adiposo tanto por los adipocitos como por la matriz estromal, y representa alrededor del 30% de la citoquina total circulante. Por esto, su aumento es proporcional al aumento del tejido adiposo y disminuye con la pérdida de peso.

Se supone que su acción de regulador de la termogénesis central, se encuentra mediada a través de la quinasa dependiente de AMPc (AMPK)

El polimorfismo -174 G>C del promotor del gen de la IL6 se describió en 1998 durante el estudio del gen relacionado con artritis reumatoide juvenil <sup>(53)</sup>, pero más tarde se comprobó su asociación con obesidad y resistencia a la insulina <sup>(54)</sup>.

Fernandez-Real et al han encontrado una mayor prevalencia de obesidad en presencia del genotipo CC seguido del GC <sup>(55)</sup>. Aunque otros autores <sup>(56,57)</sup> han observado que el alelo C es protector contra la ganancia de peso y produce IMC menores.

Goyenechea et al y Barbieri et al, confirmaron en sus estudios una relación en el rol regulatorio que comparte la IL-6 con el PPARG en el control del peso corporal, y la existencia una potenciación de la acción protectora del alelo C del -174G>C en presencia de la variante 12A1a del PPARG. Estos trabajos postulan que es importante saber cuales son los haplotipos presentes para poder predecir si el individuo desarrollara obesidad y/o insulinoresistencia <sup>(57, 58)</sup>.

Las investigaciones llevadas a cabo por Barbieri et al, la frecuencia del alelo C es del 25% en la población general, mientras que la distribución genotípica es de 54,6% para el GG, 39,8% para el GC y de 5,6% para el CC. <sup>(58)</sup>

En un estudio llevado adelante por el grupo AVENA (Moreles et al), como resultado de sus estudios sugiere que, los portadores del alelo C, parecen mostrar una actividad física mayor con respecto a los homocigotos GG, pero no encuentran diferencias significativas para la asociación con obesidad o IMC mayores. <sup>(59)</sup>

Recientemente su relación con obesidad y síndrome metabólico y la constatación de que el 30% de la IL-6 circulante proviene del tejido adiposo, han hecho de este gen y su polimorfismo -174 G>C candidatos idóneos para ser estudiados con más profundidad.

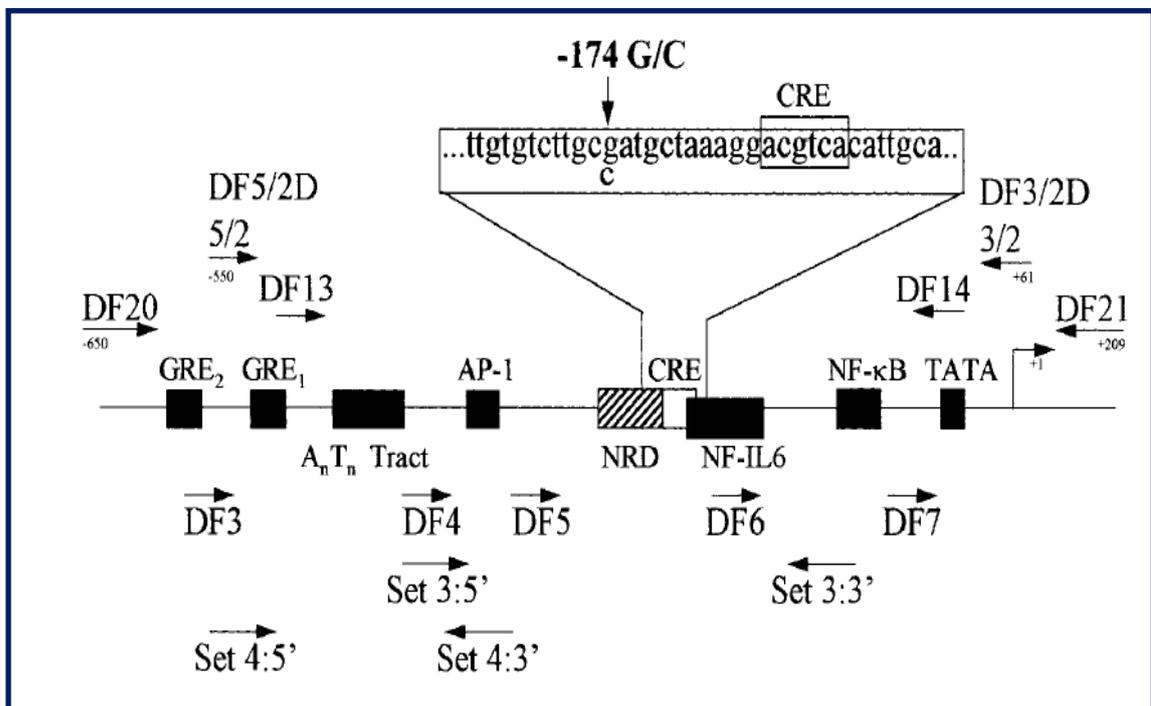
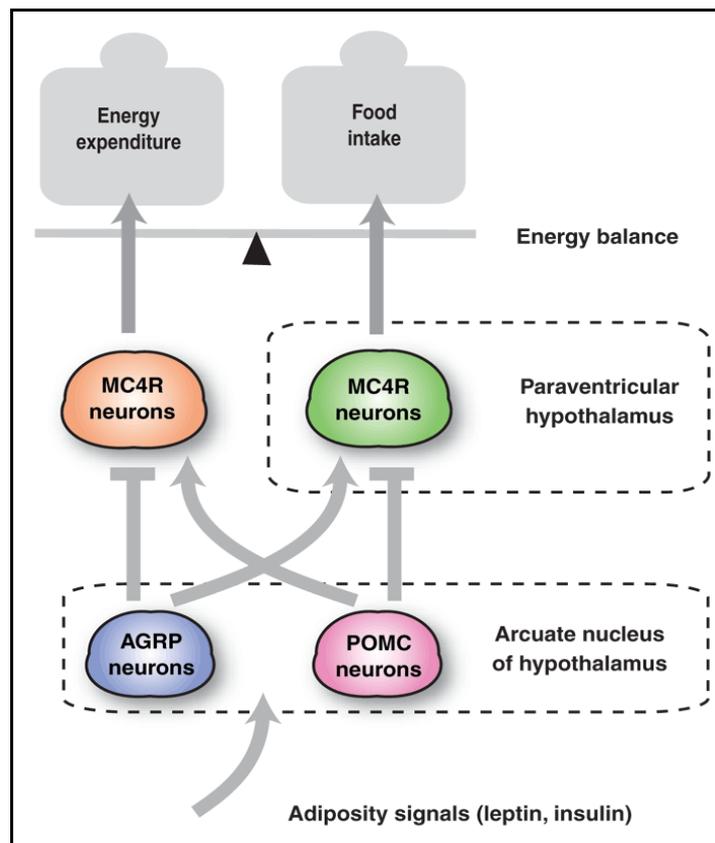


Figura 7: Representación esquemática del Polimorfismo -174G>C del IL6

- Gen del receptor 4 de la melanocortina (MC4R):

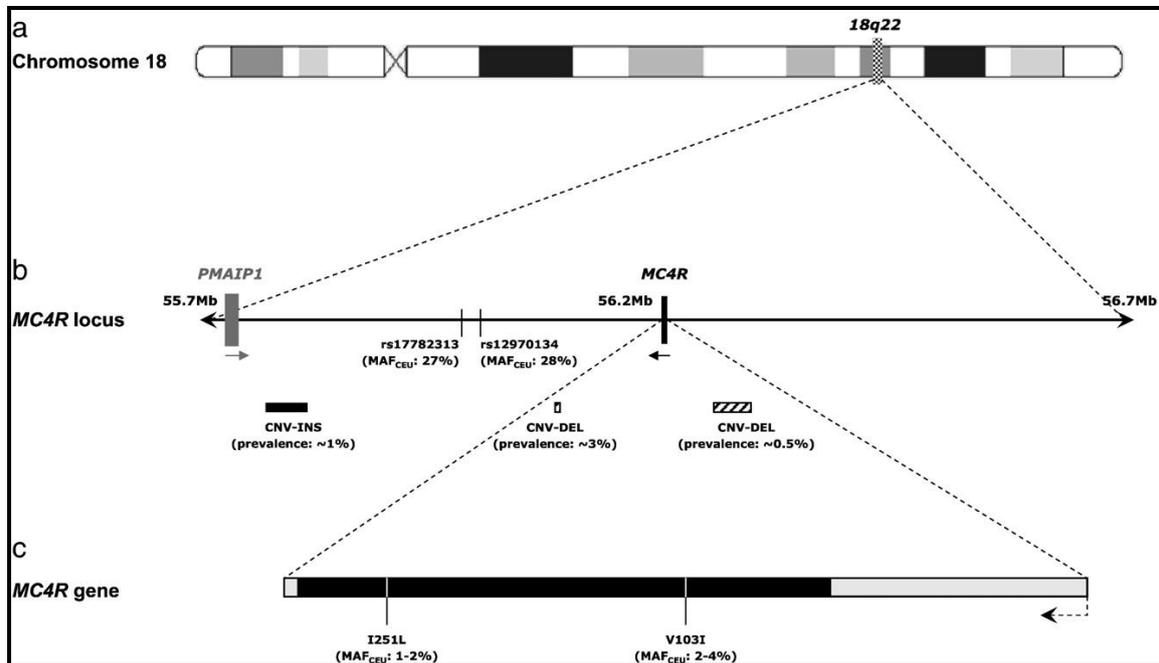
El MC4R es el cuarto miembro de una familia de receptores de la melanocortina de 7 miembros, la cual está compuesta por receptores transmembrana unidos a proteína G. Se trata de un receptor acoplado a proteínas G, activado por MSH y antagonizado por el AgRP (agouti related peptide).



**Figura 8:** Eje de acción del MC4R

Es una proteína compuesta por 332 aminoácidos, codificada por un solo exón localizado en el cromosoma 18q22 y que fue descrita por Gantz et al en 1993<sup>(60)</sup> Se expresa principalmente en el sistema nervioso central: cerebro, núcleo paraventricular del hipotálamo, médula espinal y neuronas simpáticas preganglionares.

En 1997, Huszar et al demostraron su relación con la regulación del control del peso corporal, mediante la disrupción del gen del MC4R en un modelo murino, provocando así hiperfagia, hiperinsulinemia y obesidad en los ratones con la delección. <sup>(61)</sup>



**Figura 9**

- Localización del locus del gen del MC4R
- Gen del MC4R y los polimorfismos cercanos en el locus.
- Gen del MC4R

Entre 1998 y 1999 Yeo et al, Hinney et al y Vaise et al <sup>(62-64)</sup> describieron mutaciones en el MC4R de herencia autosómica recesiva, asociadas a obesidad mórbida en niños. En el 2003, Farooqi et al <sup>(65)</sup> establecieron que la deficiencia del MC4R, es la forma más común de obesidad de origen monogénico. Ellos determinaron que las mutaciones en el gen del MC4R dan lugar a un síndrome de obesidad diferente, que se hereda de forma codominante. Las mutaciones que conducen a la pérdida completa de la función, están asociados con un fenotipo más grave. La correlación entre las propiedades de señalización de estos receptores mutantes y la ingesta de

energía hace hincapié en el papel clave de este receptor en el control de la conducta alimentaria<sup>(65)</sup>. Varios trabajos posteriores encontraron mutaciones relacionadas con obesidad mórbida en niños y adultos. <sup>(66, 67)</sup>

En el 2008 en un meta-análisis realizado por Loos et al <sup>(68)</sup>, se describe un nuevo locus, representado por el polimorfismo rs17782313, el cual se localiza a 188 kb aguas abajo del MC4R. Loos et al en su trabajo analizaron los datos del genoma de 16.876 personas de ascendencia europea para identificar las variantes comunes que influyen en el índice de masa corporal (IMC). A pesar de los datos previamente aportados para el FTO por otros autores, Loos et al descubrieron que una región 188kb aguas abajo del gen del MC4R era de especial relevancia al momento de evaluar el riesgo de obesidad. En este trabajo se confirmó la asociación del aumento del IMC con el rs17782313 en 60.352 adultos y 5.988 niños de 7 a 11 años. En el análisis de casos y controles (n = 10.583), las probabilidades de obesidad infantil severa fueron altas. Además se estudiaron 660 familias en las que se demostró la herencia del polimorfismo rs17782313 asociado al riesgo de obesidad.

Estos autores observaron que la localización del polimorfismo y el patrón de asociación del fenotipo concuerdan con los efectos mediados por la alteración del receptor MC4R. Por lo que concluyeron que las alteraciones de la región cercana al gen del MC4R se asocian a mayor masa grasa, mayor peso y mayor riesgo de obesidad <sup>(68)</sup>.

A pesar que el polimorfismo rs17782313 fue descrito en adultos, posteriormente se observó en gran medida su relación con la aparición de obesidad en forma temprana.

Mientras que Loos et al y Hardy et al, no hallaron relación entre el polimorfismo y el aumento de peso <sup>(68,69)</sup>, trabajos posteriores si lo relacionaron con aumento del IMC, la medida de la cintura y el riesgo de obesidad. <sup>(70-76)</sup>

- Gen asociado a masa grasa y obesidad (FTO):

Recientemente se ha asociado al gen FTO, con el riesgo de obesidad en humanos. Se encuentra en el cromosoma 16q12.2 y tiene 9 exones. <sup>(77)</sup> El RNAm del FTO se expresa en

diferentes tejidos como el adiposo <sup>(78, 79)</sup> y las células beta, pero se encuentra altamente expresado en el cerebro, especialmente en hipotálamo, hipófisis y glándulas adrenales. <sup>(77, 80)</sup>

Las vías biológicas asociadas a la función del FTO son aún desconocidas; aunque la secuencia de aminoácidos de la proteína FTO muestra una alta homología con la enzima AlkB que actúa en la desmetilación oxidativa del ADN. <sup>(80)</sup>

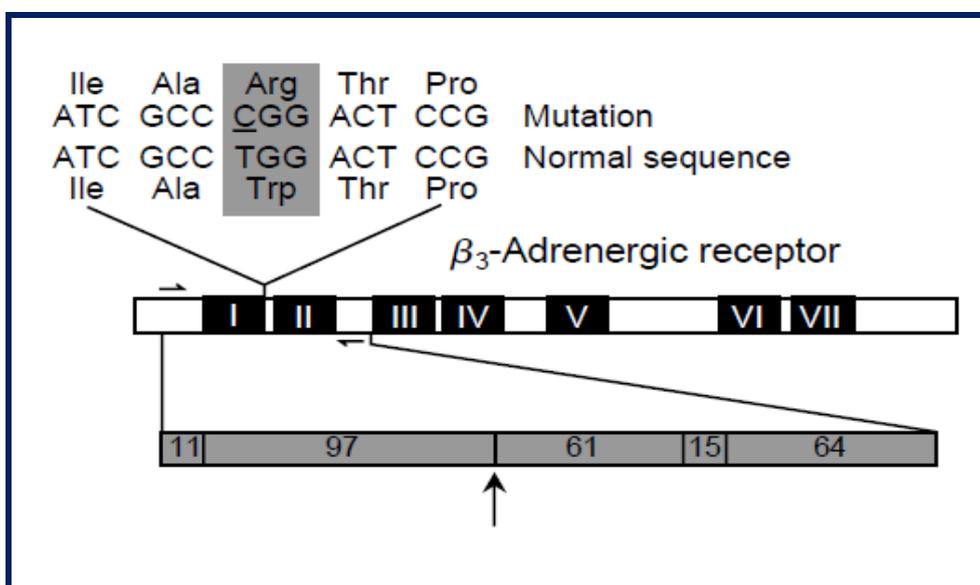
El polimorfismo rs9939609 está localizado en el primer exón. Existen diferentes trabajos en los que se relaciona este polimorfismo con obesidad en niños y en adultos, en especial caucásicos <sup>(77, 81, 82)</sup> y asiáticos <sup>(83-87)</sup>. Sin embargo en estudios realizados en chinos y japoneses no se encontró esta relación <sup>(88, 89)</sup>. Cecil et al, en 2008, concluyeron que el rs9939609 del FTO que confiere una predisposición a la obesidad, no parece estar implicado en la regulación del gasto de energía, pero puede tener un papel en el control de la ingesta de comida y la elección de alimentos. Esto sugiere un vínculo con un fenotipo hiperfágico o con la preferencia por alimentos ricos en energía <sup>(90)</sup>. Algo similar observaron Brunkwall et al: el alelo A del FTO se asociaría con la preferencia de ciertos alimentos, en especial aquellos con alta densidad energética <sup>(91)</sup>. Lauria et al, confirmaron la asociación entre el FTO rs9939609 y el riesgo de sobrepeso u obesidad en niños europeos. El principal hallazgo del estudio es que los portadores del alelo A presentaron mayor incremento de la masa corporal y la adiposidad central en el tiempo y un mayor riesgo de desarrollar sobrepeso u obesidad durante el crecimiento, independientemente de las medidas de intervención. <sup>(92)</sup>.

En distintos trabajos se ha podido corroborar la relación del rs9939609 con obesidad severa y otras comorbilidades. <sup>(93-95)</sup>

- Gen del receptor beta 3 adrenérgico (ADRB3):

En 1989, Emorine et al aislaron el tercer receptor beta adrenérgico. El receptor beta 3 adrenérgico, es el principal receptor implicado en la regulación de la termogénesis y la lipólisis en el tejido adiposo marrón y blanco en los roedores. En seres humanos, el receptor beta 3 adrenérgico se expresa predominantemente en la grasa y los adipocitos que recubren el tracto

gastrointestinal. La función principal del receptor se cree que es la regulación del ritmo del metabolismo basal y la lipólisis. <sup>(96-99)</sup>



**Figura 10:** Gen del ADRB3 y su polimorfismo

En 1993 Van Spronsen et al <sup>(100)</sup> describieron el gen del receptor beta 3 adrenérgico que se localiza en el cromosoma 8p12-p11.2. En 1995, Clement et al describieron el reemplazo de triptófano por arginina en la posición 64 (Trp64Arg), la cual implicaría el cambio de una A por una G <sup>(101)</sup>. En este trabajo se postulo que, el mecanismo de acción de este receptor en el riesgo de la aparición de obesidad, sería a través de la disminución del metabolismo basal y la lipólisis. Por esta razón se interpretó que el Trp64Arg se relaciona con un aumento de la ganancia de peso. Distintos estudios asociaron el polimorfismo Trp64Arg con obesidad y síndrome metabólico <sup>(102,103)</sup>. Sin embargo, para otros autores, no existe relación con obesidad <sup>(104-107)</sup> o con el ejercicio.<sup>(108)</sup> Li et al compararon el riesgo de padecer obesidad en un grupo de individuos obesos y controles; no encontraron pacientes homocigotos para el Arg, pero concluyeron que los heterocigotos no presentaron un riesgo aumentado <sup>(109)</sup>.

Yamakita et al hicieron un seguimiento durante 4 años de un grupo de individuos al que se genotipo para de ADRB3. A los 4 años los participantes en el estudio con el alelo Arg de la ADRB3, aumentaron significativamente su peso corporal mientras que aquellos sin el alelo Arg no cambiaron significativamente sus parámetros. Los resultados de este estudio mostraron que el alelo Arg del ADRB3 se asocia con cambios a largo plazo en el peso corporal en los individuos obesos. <sup>(110)</sup>

Corbalan et al examinaron la asociación entre el riesgo a obesidad y el polimorfismo Trp64Arg del ADRB3 concluyendo que las personas entre 20 y 35 años que presentaban el Arg, tenían un riesgo considerablemente mayor a desarrollar obesidad, independientemente de su sexo o la actividad física <sup>(111)</sup>.



# DISEÑO



## 2.1. HIPOTESIS DE TRABAJO

La obesidad es una enfermedad crónica y multifactorial que se encuentra influenciada por la presencia de determinados polimorfismos genéticos

## 2.2. OBJETIVOS

### 2.2.1. Generales:

- Analizar si existen diferencias genéticas entre niños y adolescentes obesos y con IMC adecuado para su edad.

### 2.2.2. Específicos:

- Analizar la distribución genotípica de los siguientes genes en pacientes con sobrepeso y con IMC adecuado para su edad:
  - gen GNB3
  - gen PPARG
  - gen IL-6
  - gen del MC4R
  - gen del FTO
  - ADRB3
- Evaluar si la existencia de la combinación de la presencia Ala+ (PPARG) y C+ (IL-6) implica IMC menores en sus portadores.
- Analizar la interacción entre el PPARG y el ADRB3
- Comprobar la interacción entre MC4R y FTO en la aparición de obesidad.

## 2.3. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.3.1. Pacientes y controles:

- **Pacientes:** En nuestro estudio se incluyeron 126 pacientes de entre 5 y 15 años con sobrepeso que acudieron a la consulta de Endocrinología Pediátrica del Hospital Universitario de Salamanca entre julio 2005 y junio 2011. Se descartaron aquellos que presentaban enfermedades concomitantes graves como diabetes tipo1, cáncer, síndromes genéticos, hipotiroidismo. Se utilizaron las tablas de Z score para clasificar a los pacientes y a los controles. Se consideraron con sobrepeso a los niños con IMC con Z-score mayor a 1 ( mayor a una desviación estándar) y se consignaron como obesos a aquellos con IMC con Z-score mayor a 2.
- **Controles:** Se emplearon como controles 91 niños de peso adecuado que acudieron por diferentes motivos a la Consulta Externa del mismo hospital entre julio 2005 y junio 2011, descartándose los niños con patología grave concomitante, con Z-score por debajo de 1.
- Se solicitó consentimiento informado (Ver anexo)

### 2.3.2. Antropometría:

Se la antropometría realizó mediante los instrumentos de medición de la consulta:

- Estadiómetro de Harpende
- Balanza
- Tablas de Z-score.

### 2.3.3. Extracción y purificación ADN:

- **Muestras de sangre periférica:** Las muestras de sangre periférica se le extrajeron a cada individuo por venopunción, conservándose hasta su procesamiento a 4 °C.
- **Obtención de linfocitos de sangre periférica:** La obtención de las células mononucleadas de la sangre se realizó mediante centrifugación repetida y lisis eritrocitaria con solución hipotónica (centrifugación de la sangre total en 50mL de ddH<sub>2</sub>O durante 30 minutos, 1500 rpm, a 4°C). Tras la recuperación de la interfase producida y lisis de la fracción eritrocitaria con agua destilada, se lavaron las células mononucleadas en tampón Fornace (0.25M Sacarosa; 50mM Tris-HCl pH 7.5; 25mM KCl; 5mM MgCl<sub>2</sub>) y se precipitaron mediante centrifugación a 580 g durante 20 minutos. El botón de células nucleadas de la sangre se resuspendió en tampón Fornace a una concentración estimada de 5x10<sup>6</sup> células/ml.
- **Aislamiento y purificación de ADN:** A continuación se añadió EDTA (ácido etilendiamino tetraacético) 0,5M pH 8, el cual es un quelante de iones divalentes que dificulta la acción de las endonucleasas; SDS (Dodecil Sulfato Sódico) concentración final 10% que disuelve las membranas celulares; y proteinasa K (Boehringer Mannheim, concentración final 20 µg/ml), que degrada proteínas. Esta mezcla se incubó a 55 °C durante 8 a 16 horas. Tras esta incubación, se procedió a la extracción de ADN con un tratamiento de fenol tamponado y CIAA (cloroformo: alcohol isoamílico 24:1) y se sometió a centrifugación. El DNA, que quedó en la fase acuosa, se limpió de otros residuos resuspendiendo la fracción correspondiente en CIAA y sometiendo a otra centrifugación. Tras este paso, se añadió a la fase acuosa, etanol absoluto frío (-20 °C), lo cual hizo precipitar el ADN. Este se recuperó y lavó con etanol 70% con una centrifugación, se dejó evaporar el etanol residual y, posteriormente, se disolvió el ADN en 100µL de agua bidestilada (ddH<sub>2</sub>O) estéril.

- **Cuantificación de ADN:** La concentración y el grado de contaminación proteica del DNA obtenidos, se calcularon después de medir su absorbancia a 260 y 280 nm, respectivamente, en un espectrofotómetro (GeneQuant, Pharmacia) por medio de la siguiente fórmula:

$$\mu\text{g de DNA/ml} = (\text{D.O.}_{260}) \times (\text{factor de dilución}) \times (50)$$

El multiplicador 50 es un factor de corrección introducido debido a que la unidad de densidad óptica con luz de longitud de onda 260 nm corresponde con el valor de absorbancia que tienen 50  $\mu\text{g}$  de ADN/ml.

Se considera como valores adecuados de cociente  $\text{D.O.}_{260}/\text{D.O.}_{280}$ , los comprendidos entre 1.65 y 2.0, para la medida del grado de contaminación proteica. Valores inferiores a los señalados indican contaminación por proteínas o por solventes orgánicos, realizándose en estos casos una nueva purificación del ADN. Valores superiores parecen indicar un exceso de ARN, el cual se eliminó con un tratamiento de RNAsa y purificación nuevamente según el método antes descrito.

- **Almacenamiento de muestras de ADN:** Las muestras de ADN de concentración aproximada entre 1,000 y 1,500  $\mu\text{g/ml}$ , se almacenaron en tubos Eppendorf® a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , con el fin de evitar tanto la degradación progresiva del ADN como su posible contaminación bacteriana.

#### **2.3.4. Tipificación genotípica:**

Se utilizaron 2 métodos diferentes para el estudio de los polimorfismos de los distintos genes estudiados. Para determinar el polimorfismo -174G<C del gen IL-6 se utilizó PCR-RFLP. Para el polimorfismo C825T del gen GNB3, el Pro12Ala del gen PPARG, el rs17782312 del MC4R, el

rs9939609 del FTO y el Trp64Arg del ADRB3, se empleó discriminación alélica mediante PCR real-time.

## 1- PCR-RFLP:

- **Amplificación de ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR):**

La técnica se basa en la replicación del ADN realizada por la ADN polimerasa. Estas enzimas realizan la síntesis de una cadena complementaria de ADN en el sentido 5' -> 3' usando un molde de cadena sencilla, pero a partir de una región de doble cadena. Para crear esta región doble cadena se usan los denominados iniciadores (primers u oligos). Son una pareja de oligonucleótidos sintetizados de manera que sean complementarios a cada uno de los extremos 3' del fragmento de ADN que se desea amplificar.

Partiendo de este principio, la reacción en Cadena de la Polimerasa se basa en la repetición de un ciclo formado por tres etapas:

- 1 - Desnaturalización del ADN doble cadena.
- 2 - Hibridación de los iniciadores a la zona 3' específica de cada una de las hebras
- 3 - Extensión del cebador por actuación de la ADN polimerasa.

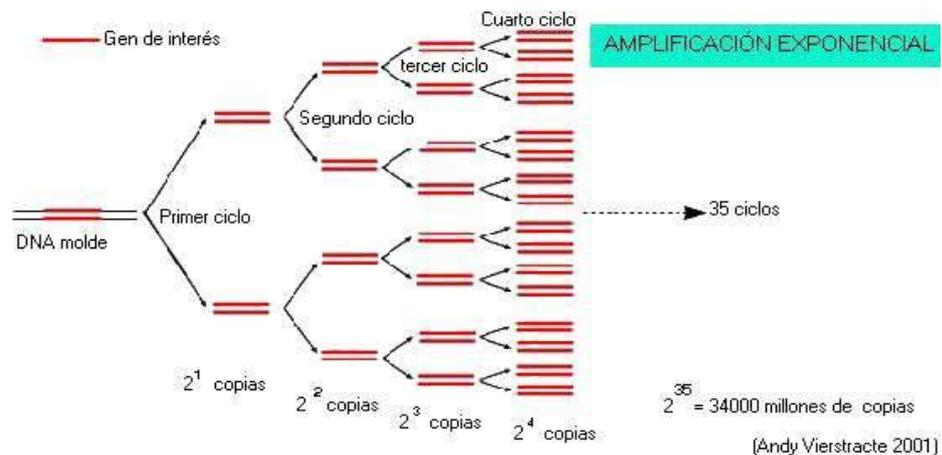


Figura 11: Esquema de amplificación de ADN

En la primera etapa (desnaturalización) la doble hélice de ADN se separa en dos hebras. Para ello se realiza una incubación de la muestra a altas temperaturas (93-97°C). La renaturalización se producirá cuando la temperatura disminuya.

En el segundo paso (hibridación) los cebadores se unen a las zonas 3' complementarias que flanquean el fragmento que queremos amplificar. Se realiza gracias a la bajada de la temperatura (50-65° C)

En la tercera etapa (elongación) se produce la síntesis de una cadena sencilla (produciéndose un fragmento de doble cadena por la complementariedad) en la dirección 5'→ 3' mediante la enzima ADN polimerasa, la cual incorpora los desoxinucleótidos fosfato presentes en el medio siguiendo la cadena molde. Este proceso se lleva a cabo en un equipo llamado termociclador. Este aparato realiza los ciclos en los tiempos y temperaturas programadas de forma exacta. Una vez completado el primer ciclo, disponemos de 2 copias de la muestra original, al final del segundo ciclo tenemos 4, al final del tercero 8...Si los ciclos se producen un número "n" de veces y suponiendo que el número de copias de ADN se duplica en cada ciclo, obtenemos una cantidad de ADN de  $2^n$ , por lo que la amplificación se realiza en forma de progresión geométrica.



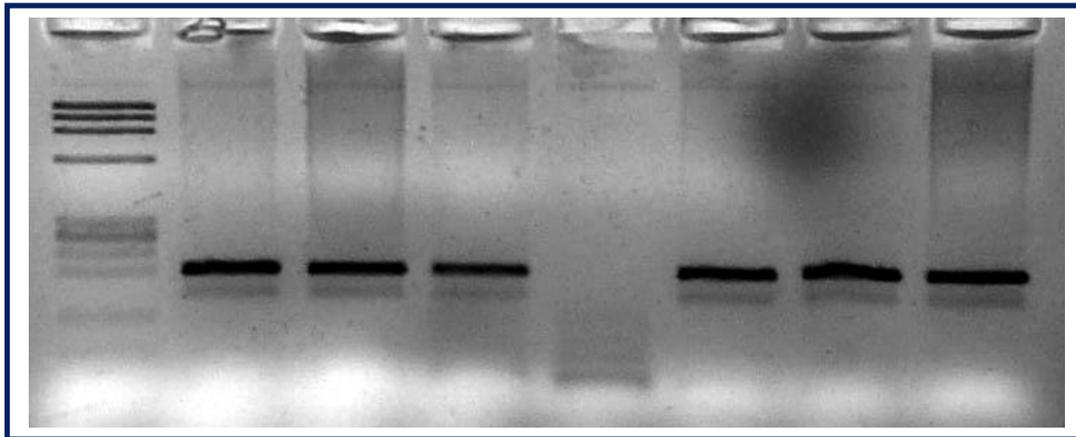
**Figura 12:** Termocicladores

- **Componentes de la PCR:**

Se utiliza una muestra de ADN, primers u oligonucleótidos (iniciadores), desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), ADN polimerasa, buffer, magnesio, agua bidestilada.

- **Detección del producto de la PCR:**

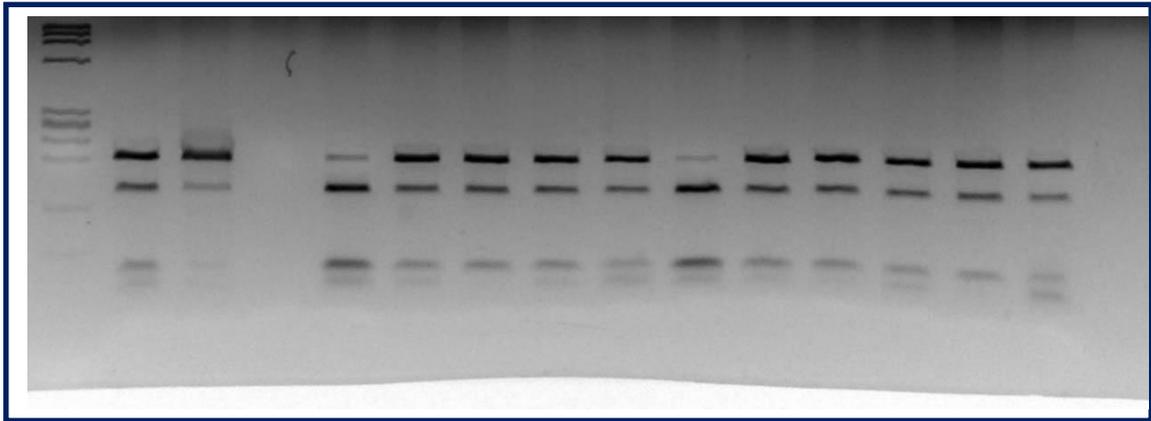
Se realiza normalmente mediante electroforesis dependiendo del tamaño de la amplificación y la resolución que se desea se utilizaran diferentes medios (agarosa, poliacrilamida) a distintas concentraciones. En nuestro caso utilizamos agarosa al 2%. La posterior visualización se realizó con bromuro de etidio (lámpara de luz UV).



**Figura 13:** Gel de agarosa 2% para detección de amplificación de un fragmento de ADN, en este caso del fragmento del gen de IL-6.

- **Digestión con enzimas de restricción:**

Los sitios de restricción son secuencias específicas de una molécula de ADN que son dianas para el corte por una enzima de restricción. El producto de la digestión completa implica dos o más fragmentos que luego se identificarán de acuerdo a su peso molecular (tamaño), con los mismos geles con los cuales se realiza la detección del producto de PCR. Las enzimas que se utilizan en las digestiones, requieren temperaturas y condiciones diferentes para actuar y producir una buena digestión.



**Figura 14:** Gel de agarosa al 3% para detección de los productos de la digestión enzimática. En este caso fragmentos para la búsqueda del polimorfismo -174C/G del gen IL-6

- **Condiciones experimentales:**

Para el gen de IL-6 se siguió el siguiente protocolo:

**PCR**

Para 25 microlitros: M Mix : 12,5 microlitros  
 ddH<sub>2</sub>O : 10,5 microlitros  
 oligo : 1 microlitros  
 ADN : 2 microlitros

**PROGRAMA DEL TERMOCICLADOR**

<b>Desnaturalización:</b>	94°	10 min	
<b>Hibridación:</b>	94°	1 min	
	55°	1 min 35"	
	72°	1 min	<b>x 40 ciclos.</b>
<b>Extensión:</b>	72°	10 min	

## **DIGESTION ENZIMÁTICA**

Producto de PCR	7,5 microlitros
Enzima Lwe I:	0,75 microlitros
Buffer	1,50 microlitros
ddH <sub>2</sub> O	5,25 microlitros

Incubar 12 horas a 37°C.

Para los genes del GNB3, PPARG, ADRB3, FTO y MC4R se utilizó la PCR en tiempo real:

## **2 - DISCRIMINACIÓN ALÉLICA MEDIANTE PCR TIEMPO REAL:**

- **Fundamento de la técnica:**

En la PCR a tiempo real, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior. La detección de la amplificación se realiza por medida de la fluorescencia durante la reacción y, de esta manera, se comprueba la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, puesto que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado. Esta propiedad permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación. Los termocicladores para llevar a cabo la PCR a tiempo real incorporan un lector de fluorescencia y están diseñados para poder medir, en cualquier momento, la fluorescencia emitida en cada uno de los viales donde se realice la amplificación.

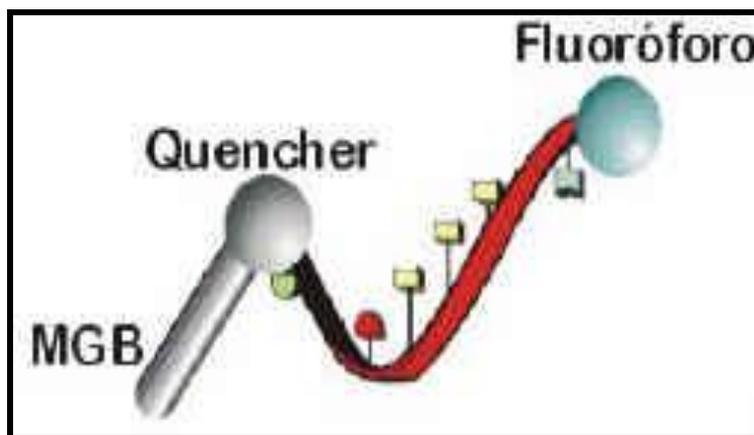
El incremento de ADN en cada ciclo de amplificación se corresponde con un aumento de hibridación de las sondas, lo que conlleva un aumento en la misma proporción de fluorescencia emitida. El empleo de estas sondas garantiza la especificidad de la detección y permite identificar polimorfismos o mutaciones puntuales.

- **Sondas empleadas:**

Para llevar a cabo la discriminación alélica se han empleado sondas *TaqMan MGB*<sup>®</sup>, (figura 10). Estas sondas que hibridan específicamente, son oligonucleótidos marcados con un donador (fluorocromo) en el extremo 5', que absorbe energía y pasa al estado excitado, de manera que al volver al estado inicial emite el exceso de energía en forma de fluorescencia; y un aceptor o *quencher* en el extremo 3', que acepta la energía de la fluorescencia liberada por el donador y la disipa en forma de calor. Para que la fluorescencia no sea emitida permanentemente, las moléculas donadora y aceptora deben estar espacialmente próximas.

Junto al *quencher*, se encuentra una modificación MGB (*minor groove binding*) que permite aumentar la temperatura de los ensayos sin tener que ampliar la longitud de la sonda y, a su vez, mejora considerablemente la unión específica de la sonda aumentando la precisión de la discriminación alélica, (figura 10).

Además, el espectro de emisión del fluorocromo correspondiente se ha de solapar con el espectro de absorción del *quencher*.



**Figura 15:** Estructura de las sondas *TaqMan MGB*<sup>®</sup>.

En los ensayos de discriminación alélica realizados para este estudio, los fluorocromos utilizados para el reconocimiento de cada alelo han sido FAM y VIC, (tabla 1).

Espectros (nm)	Excitación	Emisión
VIC	528	546
FAM	492	515

**Tabla 1:** Espectros de excitación y emisión de los fluorocromos utilizados.

- **Otros Reactivos necesarios para la PCR a Tiempo Real:**

El preparado comercial *TaqMan® Universal PCR Master Mix No AmpErase® UNG* (Applied Biosystems) contiene *AmpliTaq Gold® DNA Polymerasa*, que es una DNapolimerasa termoestable. Esta enzima tiene actividad 5'-3'polimerasa pero ha perdido la actividad 3'-5'exonucleasa. *TaqMan® Universal PCR Master Mix No AmpErase® UNG* es una mezcla concentrada que contiene los reactivos suficientes para llevar a cabo la reacción de PCR y contiene *AmpliTaq Gold® DNA Polymerasa*, dNTPs, y tampón para optimizar las condiciones de los ensayos.

- **Mecanismo de la PCR a Tiempo Real:**

Durante la PCR a Tiempo Real, mientras la sonda conserve su integridad, la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor debido a su proximidad. Sin embargo, durante la amplificación, la sonda hibrida con su cadena complementaria de ADN. La enzima DNapolimerasa termoestable, que posee actividad 5'exonucleasa, al desplazarse a lo largo de la cadena en su capacidad sintética, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, produciéndose la liberación del fluorocromo donador. Como donador

y aceptor se encuentran en este momento en una posición alejada el uno del otro de forma irreversible, la fluorescencia emitida por el primero es captada por el lector (fig. 9).

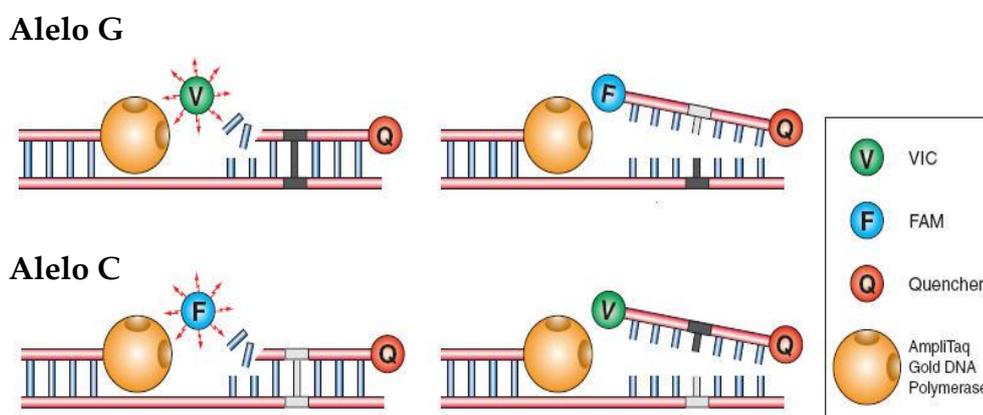


Figura 16: Mecanismo de la PCR a tiempo real.

- **Precauciones y condiciones de trabajo:**

Debido a la alta especificidad de la técnica, podemos apuntar la necesidad de tener unas condiciones de trabajo libres de contaminación. Aún así, los ensayos realizados deben contener controles internos (negativos), cuya emisión de fluorescencia es mínima y se tomará como referencia para la fluorescencia de los viales que entran en el ensayo. Cualquier desviación producida en la fluorescencia de estos registros se supondrá contaminación y por tanto anula el ensayo.

Asimismo, la conservación de los reactivos (sondas y *TaqMan® Universal PCR Master Mix No AmpErase® UNG*) se hará en condiciones de temperatura  $-4$  a  $-15^{\circ}\text{C}$  para prevenir degradaciones de las sondas y de las enzimas. Además hay que señalar la necesidad de protección directa de la luz que requieren los fluorocromos y así evitar su deterioro.

- **Equipo utilizado para PCR a Tiempo Real:**

El equipo empleado para llevar a cabo la PCR a tiempo real es *Abi Prism 7.000 Sequence Detection System* de *Applied Biosystems* (figura 13), que está compuesto por un termociclador y varios canales de lectura de la fluorescencia, que permiten la detección de diferentes fluorocromos a la vez, en cualquier momento de la amplificación.



**Figura 17:** Equipo *Abi Prism 7.000 Sequence Detection System* (*Applied Biosystems*).

- **Condiciones Experimentales:**

Para llevar a cabo el estudio de los polimorfismo C825T del gen GNB3, el Pro12Ala del gen PPARG, el -174G<C del IL-6, el Trp64Arg del gen del ADRB3, rs9939609 del FTO y rs17782313 del MC4R mediante PCR a tiempo real, se han empleado las siguientes condiciones experimentales:

# Referencia del ensayo AB de PCR a tiempo real para el estudio de los polimorfismos:

GNB3: C\_2184734\_10, rs5443

PPARG: C\_1129864\_10, rs1801282

MC4R: C\_32667060\_10, rs17781323

FTO: C\_30090620\_10, rs9939609

ADRB3: C\_2215549\_20, rs4994

# Sondas:

**GNB3**

VIC: 5'-AGAGCATCATCTGCGGCATCACGTC[C]GTGGCCTTCTCCCTCAGTGGCCGC  
C3'

FAM: 5'-AGAGCATCATCTGCGGCATCACGTC[T]GTGGCCTTCTCCCTCAGTGGCCGC  
C- 3'

**PPARG**

VIC: 5'- AACTCTGGGAGATTCTCCTATTGAC[C]CAGAAAGCGATTCTTCACTGAT  
AC- 3'

FAM: 5' - AACTCTGGGAGATTCTCCTATTGAC[G]CAGAAAGCGATTCTTCACTGAT  
AC- 3'

**MC4R**

VIC: 5'- GTTTAAAGCAGGAGAGATTGTATCC[C]GATGGAAATGACAAGAAAAGCT  
TCA- 3'

FAM: 5'- GTTTAAAGCAGGAGAGATTGTATCC[T]GATGGAAATGACAAGAAAAGCT  
TCA- 3'

**FTO**

VIC: 5'-GGTTCCTTGCGACTGCTGTGAATTT[A]GTGATGCACTTGGATAGTCTCTG  
TT- 3'

FAM: 5'-GGTTCCTTGCGACTGCTGTGAATTT[T]GTGATGCACTTGGATAGTCTCTG  
TT- 3'

### ADRB3

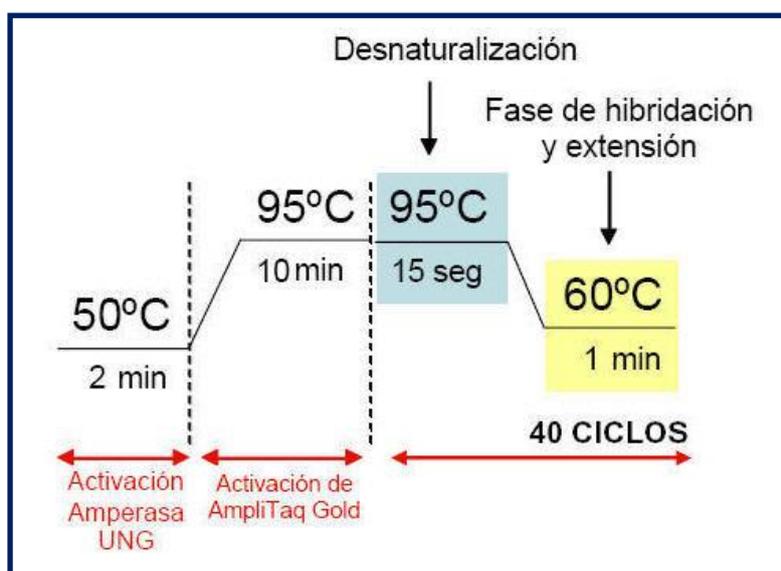
VIC: 5'-GTCATGGTCTGGAGTCTCGGAGTCC[A]GGCGATGGCCACGATGACCAGCA

GG- 3'

FAM: 5'-GTCATGGTCTGGAGTCTCGGAGTCC[G]GGCGATGGCCACGATGACCAGCA

GG 3'

- Programa:



**Figura 18:** Esquema representativo del programa de reacción llevado a cabo por el equipo de PCR a tiempo real de *Applied Biosystems*.

Los resultados obtenidos de la amplificación de DNA y medida de la fluorescencia clasificándose en homocigoto según si se registran valores de fluorescencia solo del VIC o solo del FAM o heterocigota si se registra fluorescencia de ambos. Se han clasificado en:

- ✓ Homocigoto para el alelo G, registrándose valores de fluorescencia producida por el fluorocromo FAM; homocigoto para el alelo C, registrándose valores de fluorescencia del fluorocromo VIC; y heterocigoto, registrándose valores de fluorescencia de ambos fluorocromos al mismo tiempo, en el caso del gen PPARG (tabla 2).
- ✓ Homocigoto para el alelo T, por el fluorocromo FAM; homocigoto para el alelo C, fluorocromo VIC; y heterocigoto, registrándose valores de fluorescencia de ambos fluorocromos al mismo tiempo, en el caso del gen GNB3 (tabla 3).
- ✓ Homocigoto para el alelo T, por el fluorocromo FAM; homocigoto para el alelo C, fluorocromo VIC; y heterocigoto, registrándose valores de fluorescencia de ambos fluorocromos al mismo tiempo, en el caso del gen MC4R (tabla 4).
- ✓ Homocigoto para el alelo T, por el fluorocromo FAM; homocigoto para el alelo A, fluorocromo VIC; y heterocigoto, registrándose valores de fluorescencia de ambos fluorocromos al mismo tiempo, en el caso del gen FTO (tabla 5).
- ✓ Homocigoto para el alelo G, por el fluorocromo FAM; homocigoto para el alelo A, fluorocromo VIC; y heterocigoto, registrándose valores de fluorescencia de ambos fluorocromos al mismo tiempo, en el caso del gen ADRB3 (tabla 6).

Ver gráficas en el apéndice.

Fluorescencia	G	C	G
	G	C	C
VIC		+	+
FAM	+		+

**Tabla 2:** Fluorescencia emitida para determinar la discriminación alélica para PPARG.

Fluorescencia	T	C	T
	T	C	C
VIC		+	+
FAM	+		+

**Tabla 3:** Fluorescencia emitida para determinar la discriminación alélica para GNB3.

Fluorescencia	T	C	T
	T	C	C
VIC		+	+
FAM	+		+

**Tabla 4:** Fluorescencia emitida para determinar la discriminación alélica para MC4R.

Fluorescencia	T	A	T
	T	A	A
VIC		+	+
FAM	+		+

**Tabla 5:** Fluorescencia emitida para determinar la discriminación alélica para FTO.

Fluorescencia	G	A	G
	G	A	A
VIC		+	+
FAM	+		+

**Tabla 6:** Fluorescencia emitida para determinar la discriminación alélica para ADRB3.

#### **2.4. Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó con el programa informático SPSS v.15.0 para windows. Todas las variables estudiadas fueron de tipo cualitativo. Se aplicó el análisis del chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) para determinar las diferencias en la distribución genotípica y alélica entre los distintos grupos con ayuda de tablas.

Los valores  $p < 0,05$  se consideraron estadísticamente significativos, y sobre estos se calculó el estadístico exacto de Pearson, el riesgo u *Odd Ratio* (*O.R.*) y el intervalo de confianza del 95%.

# **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



## RESULTADOS

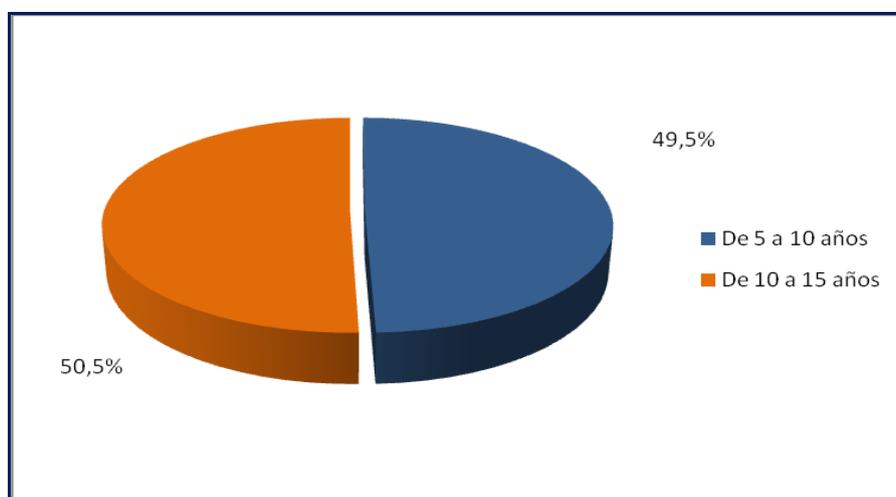
### 3.1. Análisis poblacional:

#### Edad:

Se analizaron 91 niños dentro del grupo control y 126 niños dentro del grupo con sobrepeso al que denominaremos casos.

Se los dividieron en 2 grupos etarios: de 5 a 10 años y de 10 a 15 años.

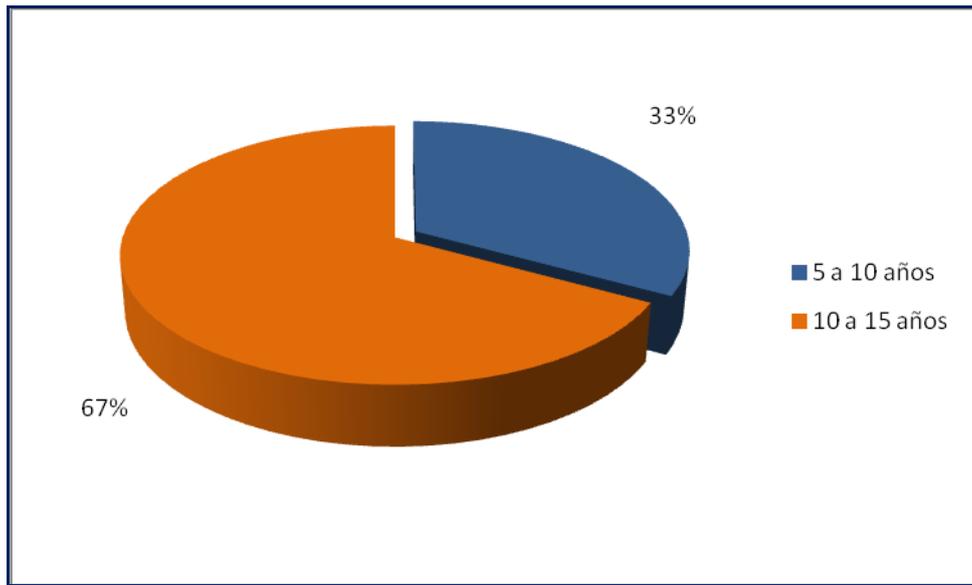
Entre los controles no se observó gran diferencia entre los 2 grupos etarios con porcentajes similares (49,5% vs. 50,5%), mientras que es notorio el alto porcentaje de niños entre 10 y 15 años en el grupo con sobrepeso (33% vs. 67%), lo que nos hace pensar en el establecimiento de la obesidad en las edades más cercanas a la pubertad.



**Figura 19:** Distribución por edad en los controles

EDAD	Frecuencia	Porcentaje
De 5 a 10 años	45	49,5%
De 10 a 15 años	46	50,5%

**Tabla 4:** Distribución por edad en los controles



**Figura 20:** Distribución por edad en los casos

EDAD	Frecuencia	Porcentaje
De 5 a 10 años	42	33%
De 10 a 15 años	84	67%

**Tabla 5:** Distribución por edad en los casos

**Sexo:**

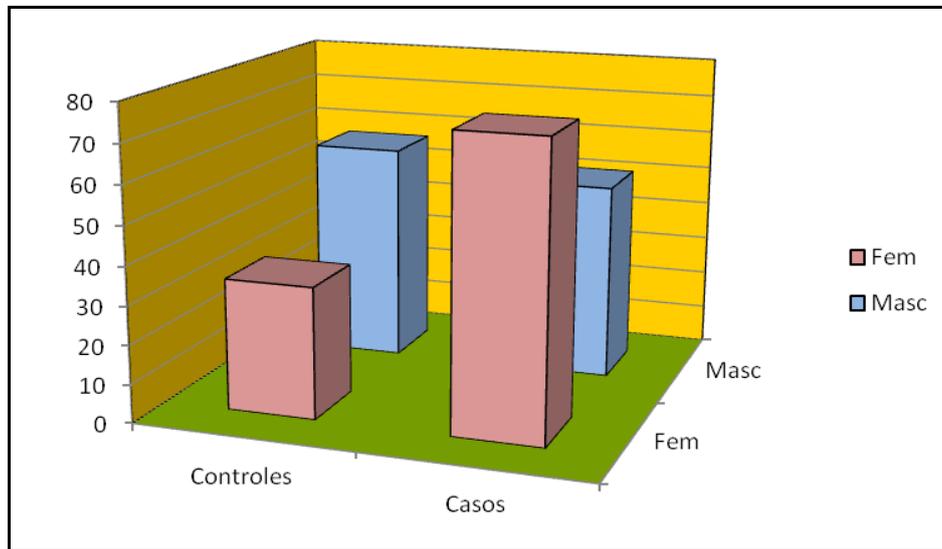
Todos los niños tanto del grupo control como de los casos, fueron incluidos de julio 2005 a junio de 2011.

Sexo	Controles		Pacientes	
	Frec	Porcentaje	Frec	Porcentaje
Fem	34	37%	75	60%
Masc	57	63%	51	40%

**Tabla 6:** Distribución por sexo

Se observa mayor predominio de niñas en los casos con un 57% de niñas vs. un 43% de niños, ocurriendo lo inverso en los controles (42% niñas vs. 58% niños)

Estos resultados se encuentran dentro de lo esperado de acuerdo a los estudios poblacionales publicados en los cuales la obesidad es más frecuente en el sexo femenino. (1-5)



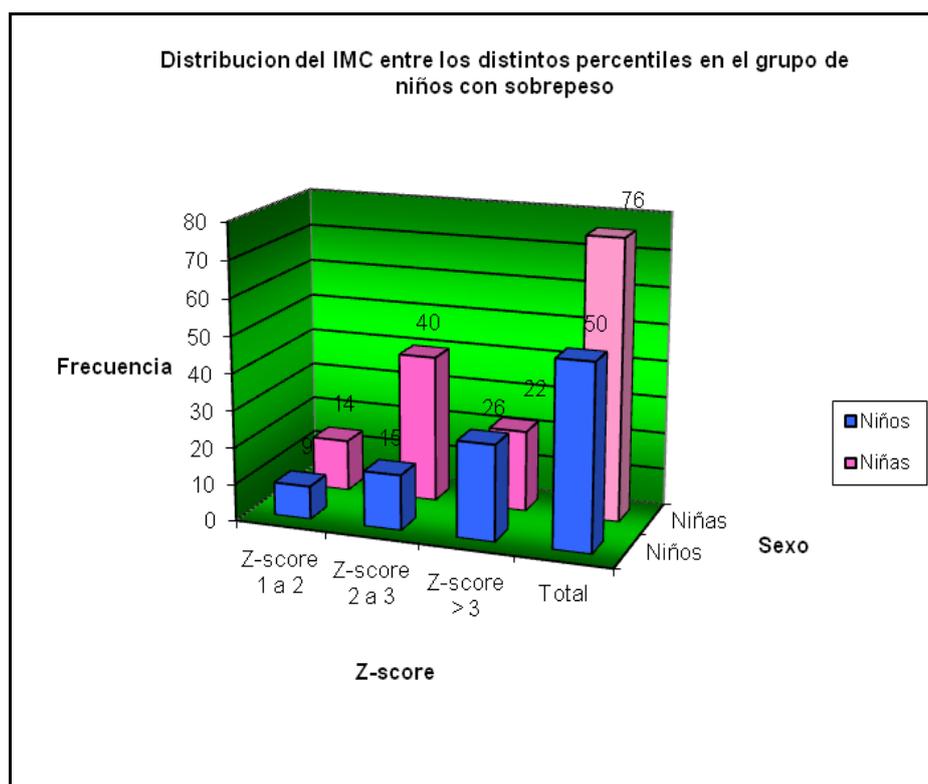
**Figura 21:** Distribución por sexo

**Antropometría:**

Se analizó la distribución de los IMC por Z-score. Se considero controles a los niños con Z-score menor a 1. Se observó que en el caso de los niños y niñas con sobrepeso u obesidad la distribución fue la siguiente, considerando que Z-score entre 1 y 2 se considera sobrepeso y mayor a 2 obesidad:

	Z-score 1 a 2	Z-score 2 a 3	Z-score > 3	Total
Niños	9	15	26	50
Niñas	14	40	22	76

**Tabla 7:** Distribución por IMC en niños y niñas con sobrepeso discriminado por sexo.

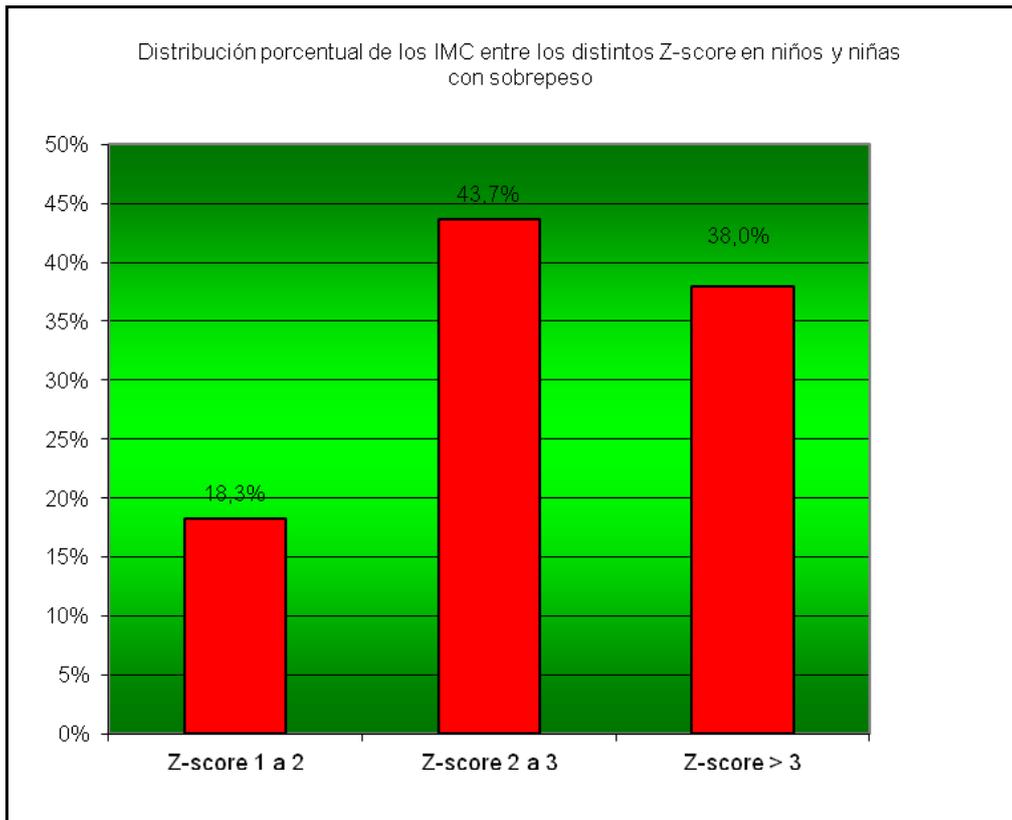


**Figura 22:** Distribución por sexo

Las niñas representan el 60 % del total de los casos, de las cuales el 82% se encontraron en Z-score mayor a 2 para su IMC. En tanto los niños representan el 40% de los casos, y los que presentaron Z-score > a 2 también es el 82%. Se ha observado que en los niños se presentaron IMC de mayor magnitud, pero con una prevalencia mayor de obesidad en las niñas.

	Z-score 1 a 2	Z-score 2 a 3	Z-score > 3
Porcentaje	18,3%	43,7%	38,0%

**Tabla 8:** Distribución porcentual de acuerdo a IMC en los niños y niñas con sobrepeso



**Figura 23:** Distribución del IMC entre los casos

### **3.2. Análisis del perfil de laboratorio de los pacientes**

Se analizaron el metabolismo de hidratos de carbono y lipídico de los niños con sobrepeso. Los resultados se reflejan en la siguiente tabla.

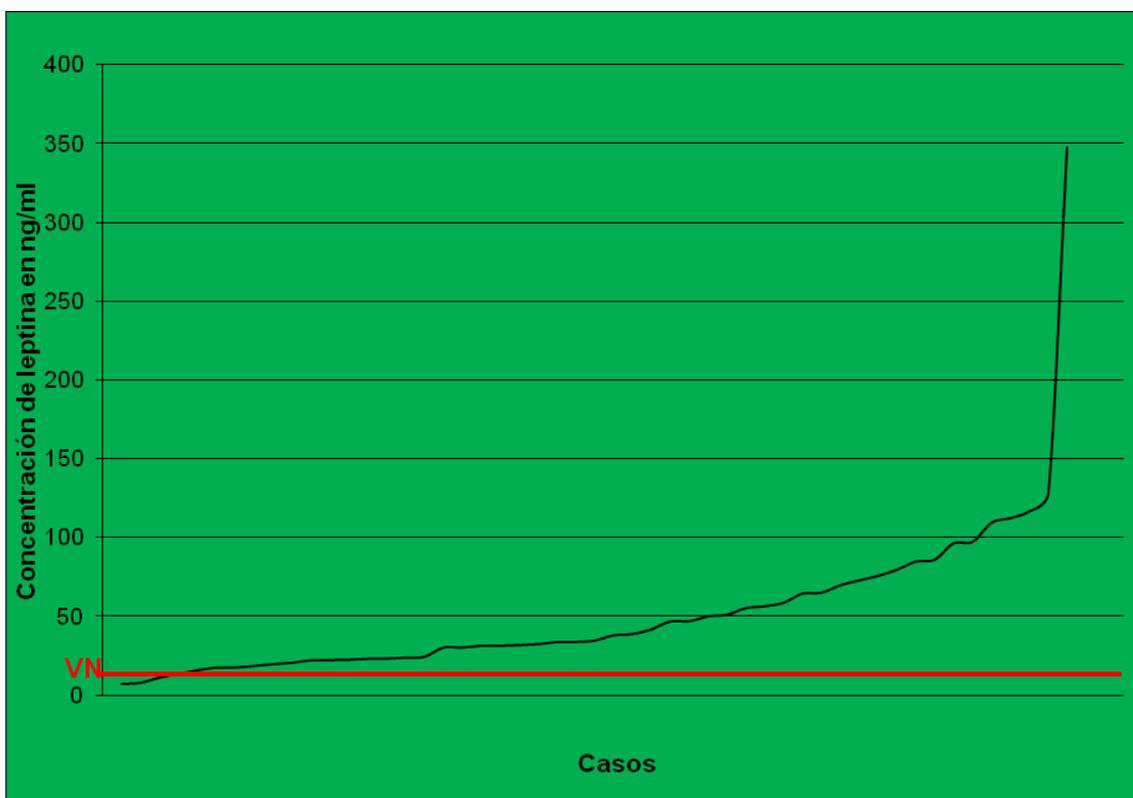
	Mínimo	Máximo
Glucemia	70 mg/dl	104 mg/dl
Colesterol	105mg/dl	238 mg/dl
Triglicéridos	38 mg/dl	206 mg/dl
HDL	30 mg/dl	81 mg/dl
LDL	39 mg/dl	159 mg/dl

**Tabla 9:** Valores máximos y mínimos del metabolismo lipídico y glucemia.

Se observó que 2 niños presentaron glucemias por encima de 100mg/dl.

Desde el punto de vista lipídico el 38% de los niños tenían valores de colesterol superiores a 170 mg/dl. Por otro lado el valor normal de triglicéridos es de 100 mg/dl y se encontró que el 29% de los niños superaban esos valores. El HDL se considera normal con niveles superiores a 50 mg/dl y el 37%, presentaron valores inferiores. En el caso del LDL presentaron valores menores de 100, un 58%. El índice colesterol total / HDLc se mantuvo un valores normales en todos los niños (VN: 0 - 4,5)

Por otro lado en los niños que se había realizado la determinación de leptina se observaron en general valores altos, siendo el valor normal del dosaje de leptina 13 ng/ml. En los niños que se realizó la determinación se observó que, el 90% de ellos tenían la leptina elevada, siendo valor mínimo de 6,8 ng/ml y el máximo de 347,7 ng/ml.



**Figura 24:** Valores de leptina en niños con sobrepeso (VN: valor normal = 13 ng/ml)

### 3.3. Análisis de los genotipos obtenidos

#### Gen GNB3:

A continuación se exponen los resultados obtenidos del análisis genético de los 217 individuos de nuestro grupo de estudio. La distribución alélica y genotípica se encuentra dentro del equilibrio de Hardy-Weinberg ( $>0,05$ ). La distribución es similar a la descrita en caucásicos como veremos en la discusión. No se han obtenido diferencias significativas entre controles y pacientes para la aparición de los diferentes genotipos, con una  $p = 0,980$  ( $>0,05$ ). Se comparó también la distribución del genotipo TT, asociado a obesidad, no observándose valores significativos ( $p = 0,845$ ), con un OR de 1,092 ( $0,419 < >2,844$ ).

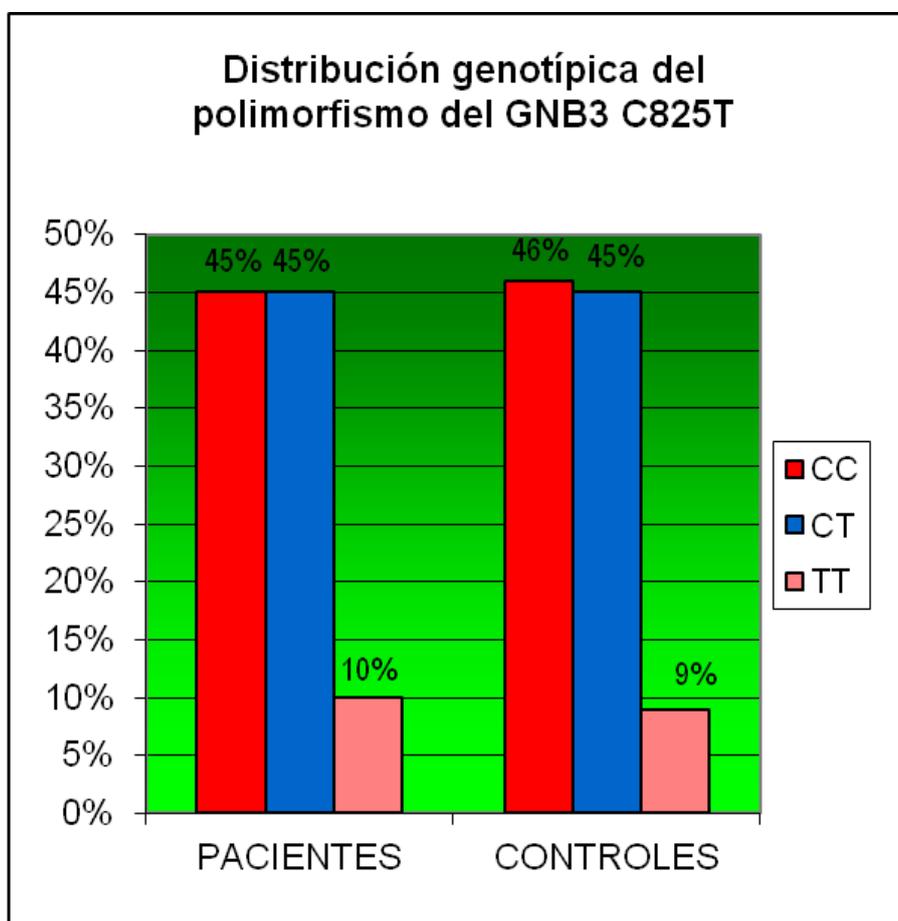
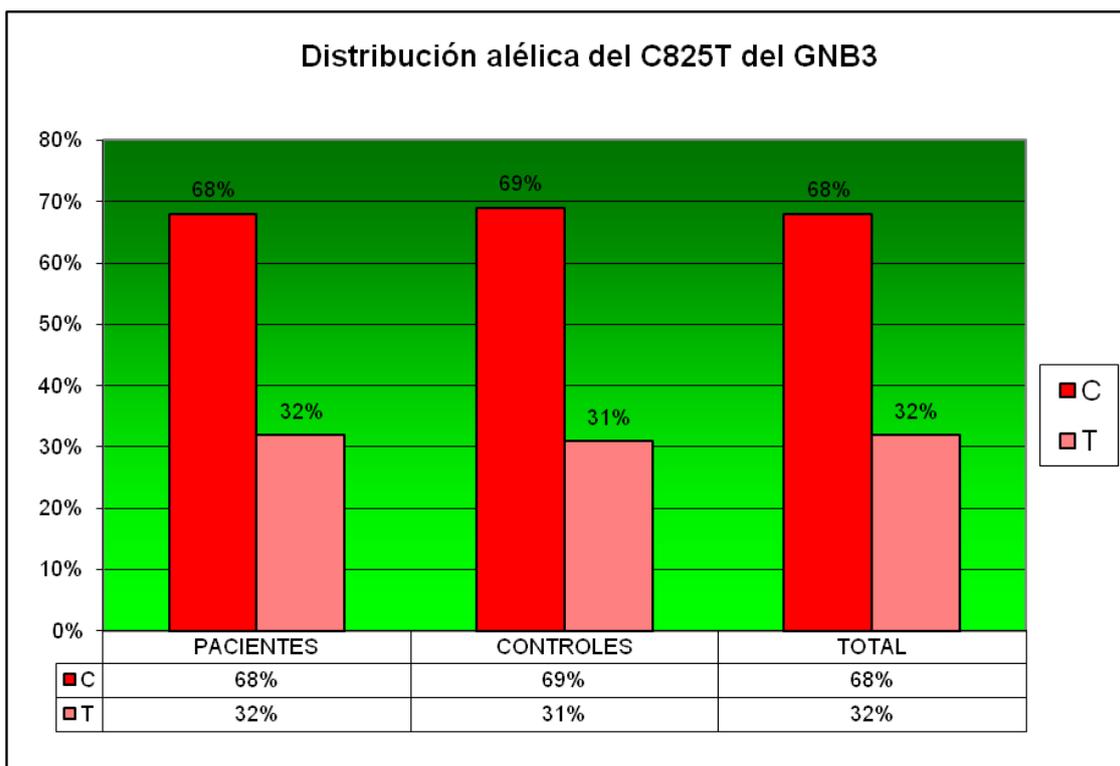


Figura 25: Distribución genotípica de GNB3 C825T

Genotipo		PACIENTES	CONTROLES	TOTAL
CC	Frecuencia	57	42	99
	Porcentaje	45%	46%	45,8%
CT	Frecuencia	57	41	98
	Porcentaje	45%	45%	45%
TT	Frecuencia	12	8	20
	Porcentaje	10%	9%	9,2%
	TOTAL	126	91	217

**Tabla 10:** Distribución genotípica de GNB3 C825T



**Figura 26:** Distribución alélica GNB3 C825T

Alelos	Frecuencia alélica		
	C	T	Total
Pacientes	171	81	296
Controles	125	57	138
			434

**Tabla 11:** Distribución alélica GNB3 C825T

### Gen PPARG:

Los resultados obtenidos a partir de la genotipificación de los 217 individuos de nuestro grupo de estudio, se resumen en las 2 siguientes tablas y figuras. La distribución alélica y genotípica se encuentra dentro del equilibrio de Hardy-Weinberg ( $>0,05$ ). La distribución es similar a la descrita en caucásicos: Pro/Pro 79,7%, Pro/Ala 18,4% y Ala/Ala 1,9%. No se encontraron diferencias significativas en la distribución genotípica entre pacientes y controles, con una  $p = 0,349$ . Por otro lado se observó la incidencia de la presencia del 12Ala como factor protector contra la obesidad no obteniéndose diferencias significativas entre los distintos grupos con un OR 0,744 ( $0,378 < > 1,467$ ) y una  $p = 0,383$ .

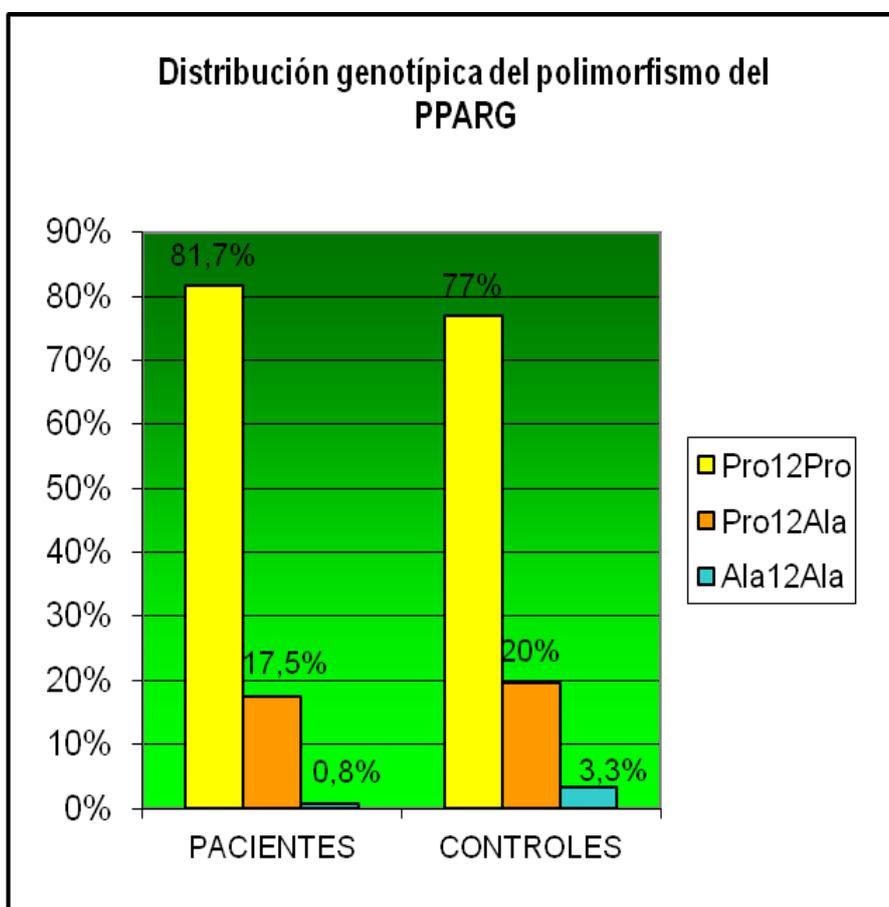
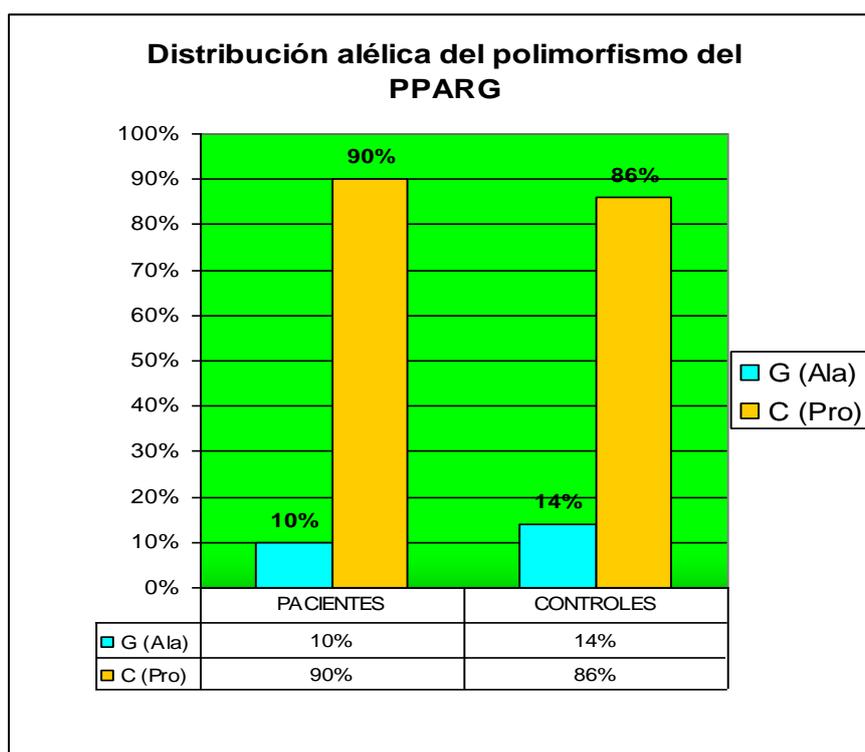


Figura 27: Distribución genotípica de PPARG 2 Pro12Ala.

Genotipo		PACIENTES	CONTROLES	TOTALES
Pro12Pro	Frecuencia	103	70	173
	Porcentaje	81,7%	77%	79,7%
Pro12Ala	Frecuencia	22	18	40
	Porcentaje	17,5%	19,7%	18,4%
Ala12Ala	Frecuencia	1	3	3
	Porcentaje	0,8%	3,3%	1,9%
	TOTAL	126	91	217

**Tabla 12:** Distribución genotípica de PPARG 2 Pro12Ala.



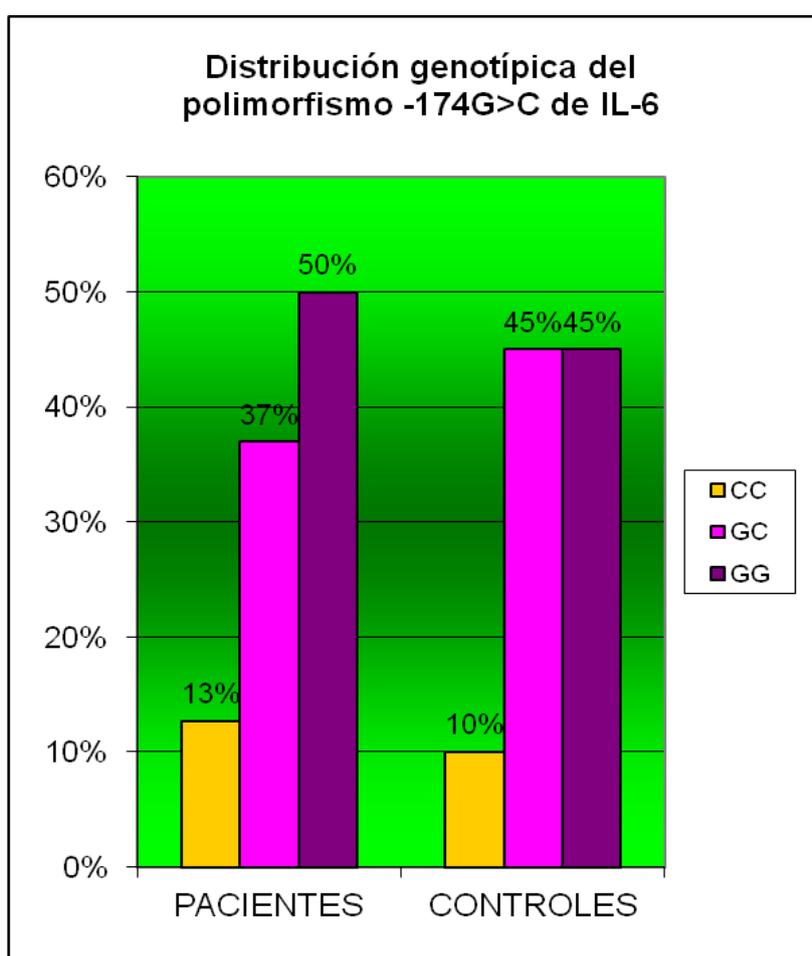
**Figura 28:** Distribución alélica PPARG 2 Pro12Ala

Alelos	Frecuencia alélica		
	G (Ala)	C (Pro)	Total
Pacientes	24	228	252
Controles	24	158	182

**Tabla13:** Distribución alélica PPARG 2 Pro12Ala

### Gen IL-6:

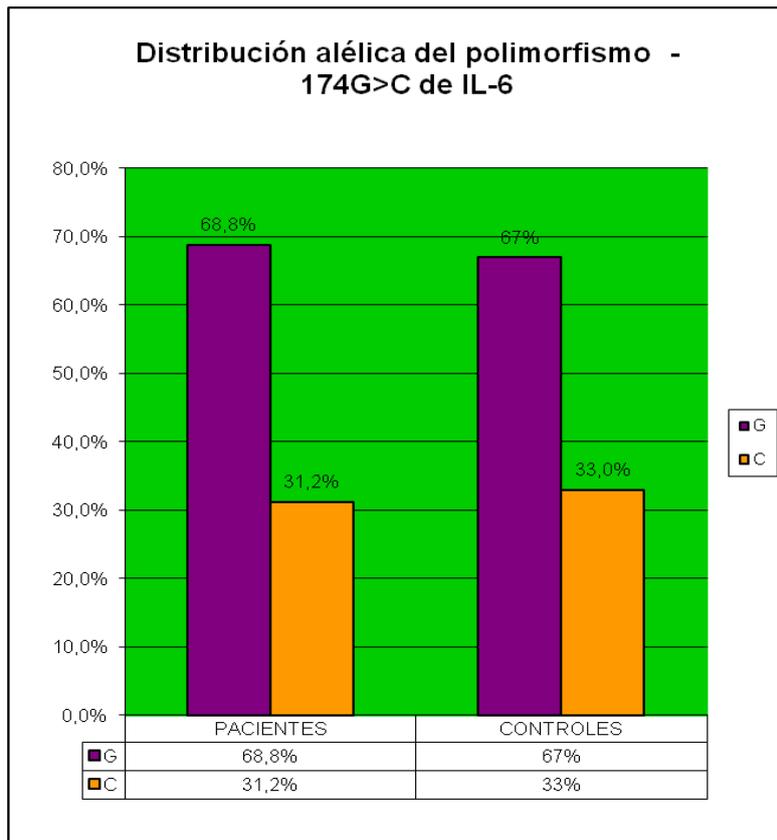
Los resultados obtenidos en los 217 individuos de nuestro grupo de estudio, se resumen en las 2 siguientes tablas y figuras. La distribución alélica y genotípica se encuentra dentro del equilibrio de Hardy-Weinberg ( $>0,05$ ). No hemos obtenidos valores significativos para la distribución genotípica ( $p = 0,555$ ). No hemos encontrado para el genotipo CC, que aumentaría el riesgo para obesidad, valores significativos de OR: 0,282 ( $0,548 < > 3,204$ ). En el caso de la hipótesis de la aparición del alelo C + (CC+GC) como protector contra la obesidad no hemos encontrado diferencias significativas con una  $p = 0,546$  y un OR 1,343 ( $0,682 < > 2,648$ ).



**Figura 29:** Distribución genotípica de IL-6 -174G>C.

Genotipo		PACIENTES	CONTROLES
CC	Frecuencia	16	9
	Porcentaje	12,7%	10%
GC	Frecuencia	47	41
	Porcentaje	37,3%	45%
GG	Frecuencia	63	41
	Porcentaje	50%	45%
	TOTAL	126	91

**Tabla 14:** Distribución genotípica de IL-6 -174G>C.



**Figura 30:** Distribución alélica de IL-6 -174G>C.

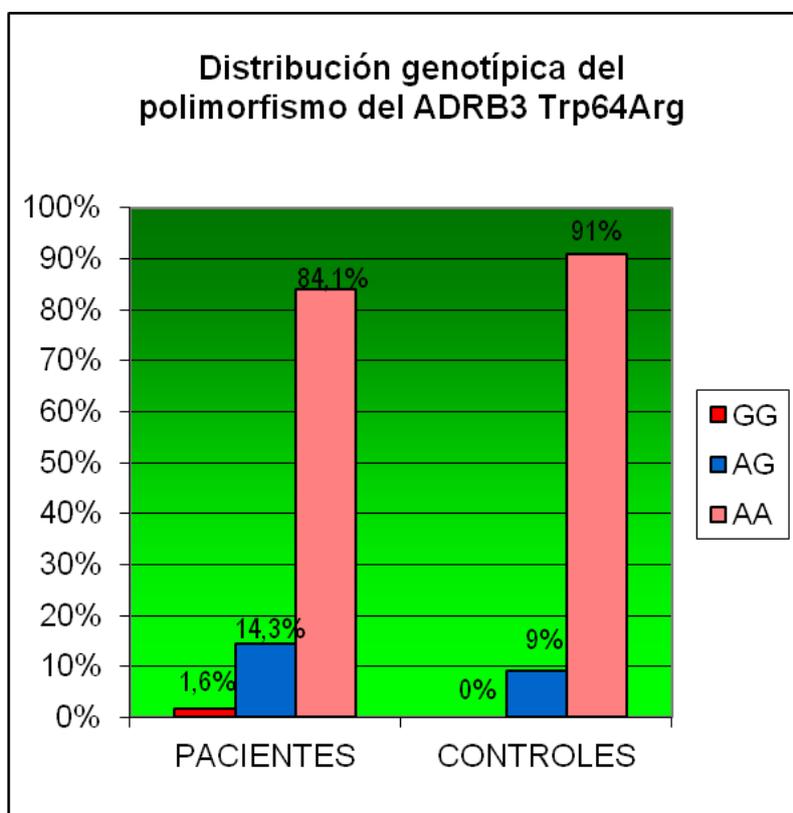
Alelos	Frecuencia alélica		
	G	C	Total
Pacientes	173	79	252
Controles	123	59	182

**Tabla 15:** Distribución alélica de IL-6 -174G>C.

### Gen ADRB3:

Los resultados obtenidos a partir de la genotipificación de los 217 individuos de nuestro grupo de estudio, se resumen en las 2 siguientes tablas y figuras. La distribución alélica y genotípica se encuentra dentro del equilibrio de Hardy-Weinberg ( $>0,05$ ). No se encontraron diferencias significativas en la distribución genotípica entre pacientes y controles, con una  $p = 0,214$ . Por otro lado se observó la incidencia de la presencia del Arg como factor predisponente a la obesidad, no obteniéndose diferencias significativas entre los distintos grupos con un OR 1,958 ( $0,807 < >4,750$ ) y una  $p = 0,125$ .

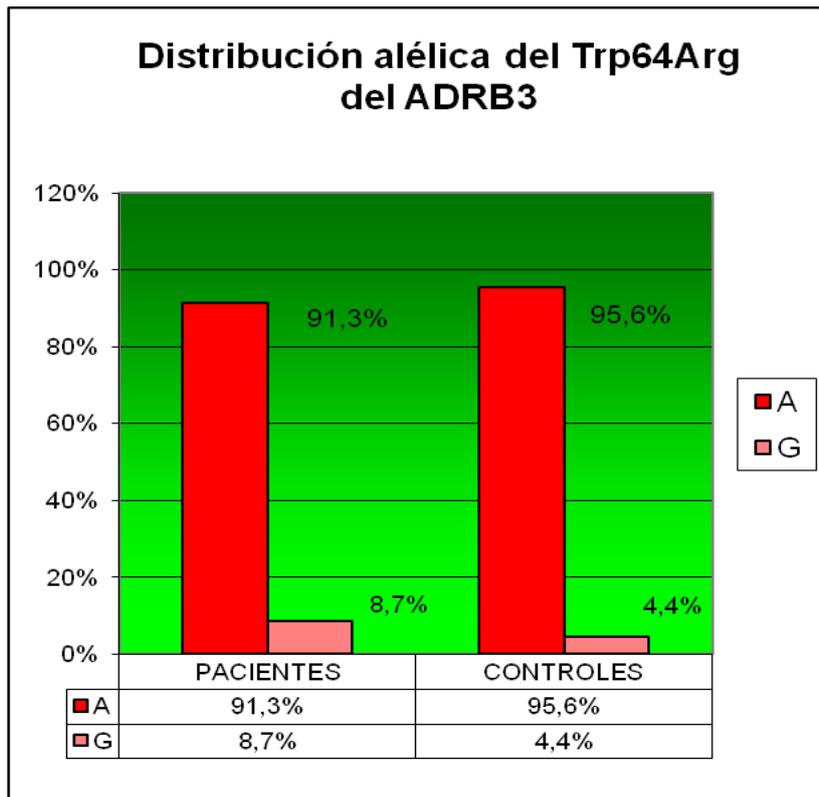
No se ha podido realizar OR para la presencia del Arg/Arg, como ya explicaremos en la discusión, por no haber portadores de este genotipo entre los controles, y la  $p = 0,103$ , tampoco es significativa en nuestro grupo de estudio.



**Figura 31:** Distribución genotípica de ADRB3 Trp64Arg.

Genotipo		PACIENTES	CONTROLES	TOTAL
AA	Frecuencia	106	83	189
	Porcentaje	84,1%	91%	87%
AG	Frecuencia	18	8	26
	Porcentaje	14,3%	9%	12%
GG	Frecuencia	2	0	2
	Porcentaje	1,6%	0%	1%
	TOTAL	117	100	217

**Tabla 16:** Distribución genotípica de ADRB3 Trp64Arg



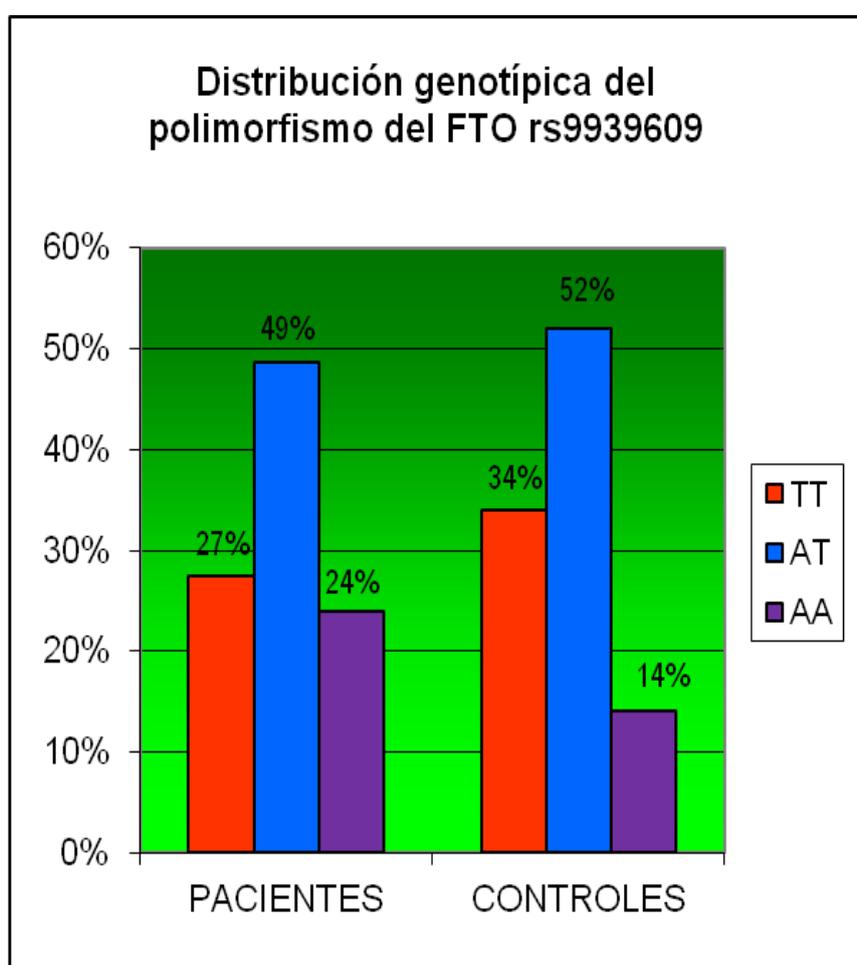
**Figura 32:** Distribución alélica del ADRB3 Trp64Arg

Alelos	Frecuencia alélica		
	A	G	Total
Pacientes	214	20	234
Controles	190	10	200
			434

**Tabla 17:** Distribución alélica de ADRB3 Trp64Arg

### Gen FTO:

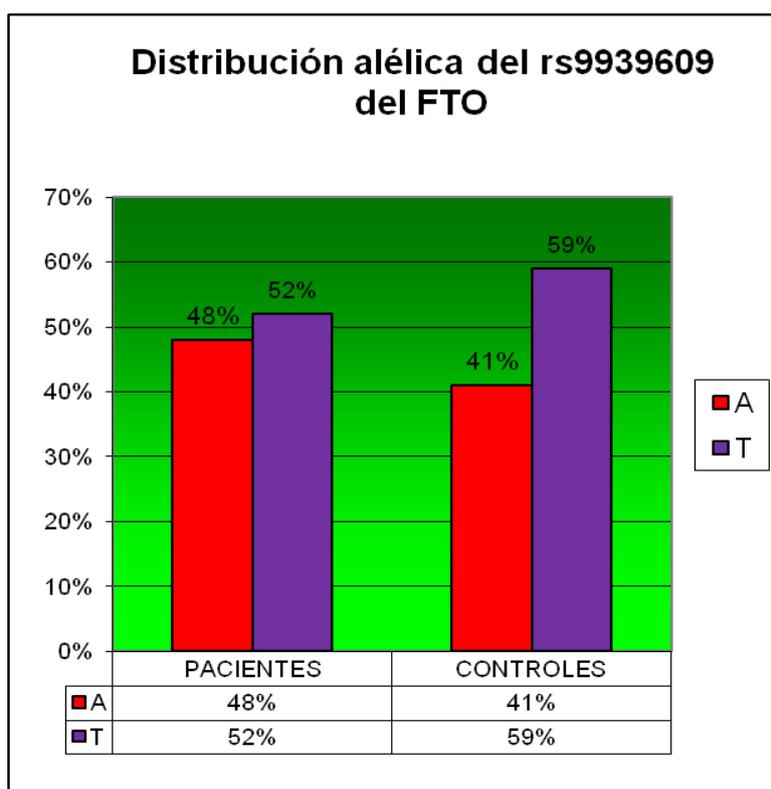
Los resultados obtenidos en nuestro grupo de estudio a partir de la genotipificación de los 217 individuos, se resumen en las 2 siguientes tablas y figuras. La distribución alélica y genotípica se encuentra dentro del equilibrio de Hardy-Weinberg ( $>0,05$ ). No se encontraron diferencias significativas en la distribución genotípica entre pacientes y controles, con una  $p = 0,323$ . Por otro lado se observó la incidencia de la presencia de A en el genotipo como factor predisponente a la obesidad, no obteniéndose diferencias significativas entre los distintos grupos con un OR 1,343 ( $0,741 < >2,435$ ) y una  $p = 0,320$ .



**Figura 33:** Distribución genotípica de FTO rs9939609.

Genotipo		PACIENTES	CONTROLES	TOTAL
AA	Frecuencia	29	14	43
	Porcentaje	23%	15,4%	19,8%
AT	Frecuencia	62	46	108
	Porcentaje	49,2%	50,5%	50%
TT	Frecuencia	35	31	66
	Porcentaje	27,8%	34,1%	30,4%
	TOTAL	126	91	217

**Tabla 18:** Distribución genotípica de FTO rs9939609



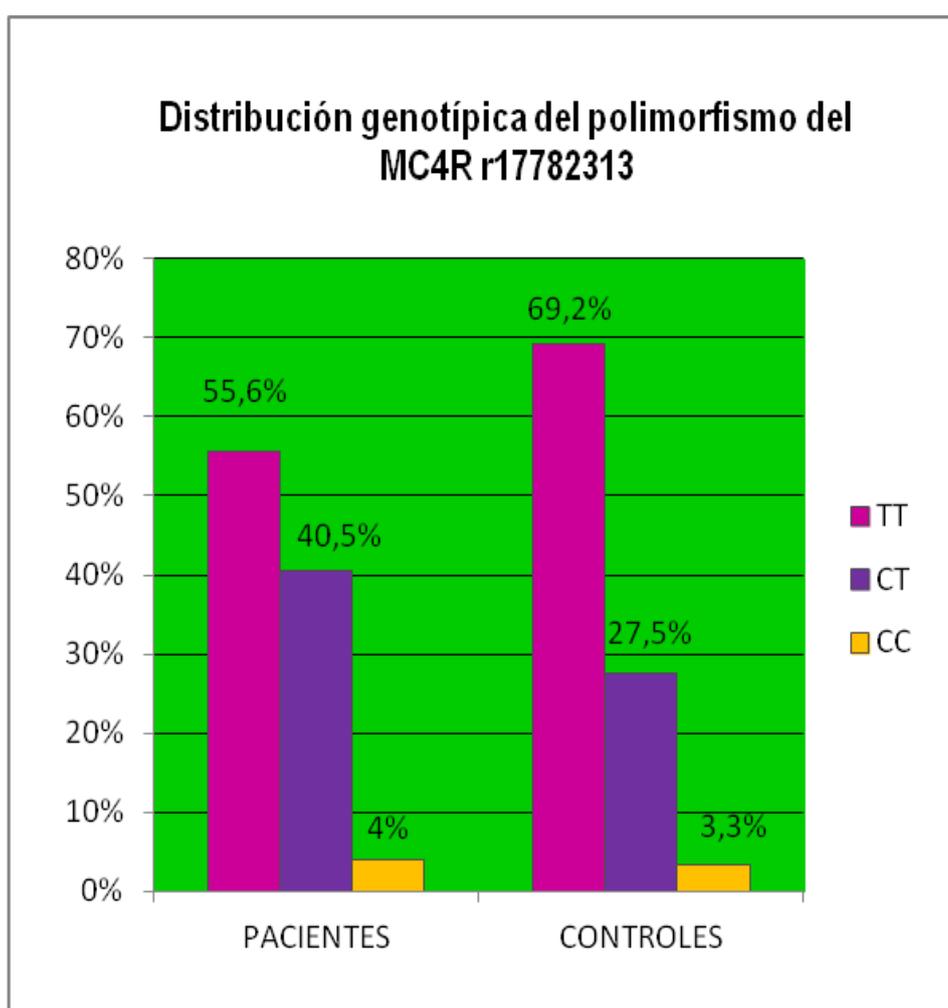
**Figura 34:** Distribución alélica del FTO rs9939609

Alelos	Frecuencia alélica		
	A	T	Total
Pacientes	120	132	252
Controles	74	108	182
			434

**Tabla 19:** Distribución alélica del rs9939609 del FTO

### Gen MC4R:

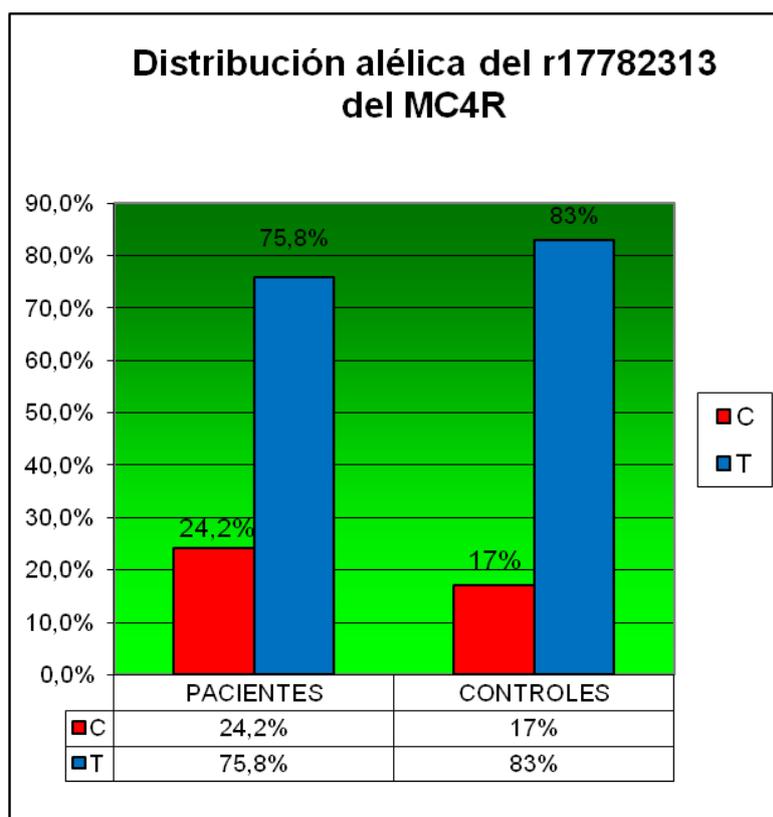
Los resultados obtenidos en los 217 individuos de nuestro grupo de estudio, se resumen en las 2 siguientes tablas y figuras. La distribución alélica y genotípica se encuentra dentro del equilibrio de Hardy-Weinberg ( $>0,05$ ). En el caso de la distribución genotípica no hemos encontrado diferencias significativas con una  $p = 0,121$ . Sin embargo, hemos obtenidos valores significativos para la incidencia del alelo C en relación a la aparición de IMC mayores ( $p = 0,041$ ) con un OR de 1,8 ( $1,009 < >3,211$ ).



**Figura 35:** Distribución genotípica de rs17872313 del MC4R

Genotipo		PACIENTES	CONTROLES	TOTAL
CC	Frecuencia	5	3	8
	Porcentaje	4%	3,3%	3,7%
CT	Frecuencia	51	25	76
	Porcentaje	40,5%	27,5%	35%
TT	Frecuencia	64	70	133
	Porcentaje	55,6%	69,2%	61,3%
	TOTAL	126	91	217

**Tabla 20:** Distribución genotípica de rs17782313



**Figura 36:** Distribución alélica del MC4R rs17782313

Alelos	Frecuencia alélica		
	C	T	Total
Pacientes	61	191	252
Controles	31	151	182
			434

**Tabla 19:** Distribución alélica del rs17782313 del MC4R

## 3.2. DISCUSION

Todos los polimorfismos estudiados en este trabajo, se han asociado de forma inconstante con la aparición de la obesidad o con mayor riesgo de tener una ganancia de peso aumentada. Por el contrario determinados genotipos podrían ser protectores contra la aparición de la obesidad.

### 3.2.1. GNB3 C825T

Varios estudios realizados en hombres jóvenes de distintos orígenes étnicos y en mujeres fértiles y postmenopáusicas, han encontrado una sugerente relación entre la presencia del alelo 825T con un aumento de riesgo de desarrollar obesidad. <sup>(32-35, 112, 113)</sup>

Siffert et al demostraron en un estudio realizado en 1950 individuos en Alemania, China, Sudáfrica y Zimbabwe un significativo aumento de la frecuencia del alelo 825T en hombres jóvenes con índice de masa corporal mayor a 25 kg/m<sup>2</sup>. <sup>(33)</sup>

País	Germany	China	South Africa	Urban Zimbabwe	Rural Zimbabwe
Ciudad	(Essen)	(Wuhan/Jinan)	(Johannesburg)	(Harare)	(Bulawayo)
<i>n</i>	227	960	254	223	236
Genotypes (TT/TC/CC)	28/121/128	215/486/259	178/71/5	148/67/8	159/69/8

**Tabla 20:** Distribución genotípica del C825T de acuerdo a Siffert et al. <sup>(35)</sup>

En la tabla se observa la distribución de los distintos genotipos en los diferentes grupos estudiados, encontrándose una alta incidencia del 825T en africanos y chinos, mientras que en el grupo de alemanes la distribución era similar a la encontrada en caucásicos por otros grupos de estudio.

Por otra parte distintos autores han mostrado una falta de relación entre el alelo 825T y obesidad como es el caso de Snapir et al y Hayakawa et al <sup>(114, 115)</sup>; estos grupos tampoco han podido establecer una relación con hipertensión arterial.

En nuestro trabajo hemos analizado al polimorfismo 825T y el riesgo de aparición de obesidad dado el valor predictivo que se le suele adjudicar.

En relación a los resultados obtenidos de la distribución genotípica de nuestro grupo de estudio, hemos comprobado que dicha distribución es similar a la de la población alemana estudiada por Siffert et al <sup>(33)</sup>, en coincidencia también con lo descrito en otros trabajos en la población caucásica <sup>(32-35, 112, 113)</sup>.

Genotipo		Población alemana <sup>a</sup>	Chinos <sup>b</sup>	Africanos <sup>b</sup>	Nuestro grupo de estudio
CC	Frecuencia	128	259	21	57
	Porcentaje	46%	27%	3%	52%
CT	Frecuencia	121	486	207	45
	Porcentaje	44%	51%	29%	41%
TT	Frecuencia	28	215	485	8
	Porcentaje	10%	22%	68%	7%
	TOTAL	277	960	713	110

<sup>a</sup> De Siffert et al, Essen, Alemania <sup>(33)</sup>

<sup>b</sup> De Siffert et al <sup>(33)</sup>

**Tabla 21:** Comparación de la distribución alélica del GNB3 C825T de distintos grupos étnicos con nuestro grupo de estudio.

Sin embargo no hemos observado valores significativos para la distribución genotípica ( $p = 0,980$ ) ni para la presencia del 825TT como factor predisponente para obesidad con  $p = 0,845$  y un OR de 1,092 ( $0,419 < > 2,844$ ).

### 3.2.2. PPARG Pro12Ala

Es sabido que tanto el PPARG 2 como el PPARG 1 se encuentran relacionados con la adipogénesis y que se encuentran en cantidad en el tejido adiposo. Se han llevado a cabo numerosos trabajos para demostrar su relación tanto con obesidad como con los distintos componentes del síndrome metabólico.

Labayen et al<sup>(116)</sup> analizaron 273 niños y encontraron una incidencia de 229 niños con Pro/Pro (84%) y 44 entre Pro/Ala y Ala/Ala (16%), similar a lo encontrado en nuestro grupo, 79 y 21% respectivamente. Deeb et al y Lohmueller et al, relacionaron la presencia de Ala con protección contra la obesidad al igual que tantos otros. <sup>(117, 118)</sup>

Sin embargo otros grupos asociaron la aparición del Ala con obesidad. Canizales et al <sup>(119)</sup> descubrieron que la presencia del alelo Ala se asociaba a obesidad en un grupo de más de 600 individuos entre mestizos y amerindios estudiados en México. Entre los amerindios la frecuencia del alelo 12Ala es del 17%, era mayor que en cualquier otro grupo étnico estudiado. Yen et al describieron este polimorfismo en 1997<sup>(42)</sup> y señalaron la siguiente frecuencia para el genotipo Pro12 Ala: 12% en caucásicos, 10% en mexicanos, 8% en samoanos, 3% en africanos y 1% en chinos, aunque sucesivos trabajos fueron modificando dicha frecuencia. En nuestro grupo la frecuencia fue del 18,4%.

Genotipos	Ala12Ala	Pro12Ala	Pro12Pro
Caucásicos	1,40%	21,20%	77,40%
Mexicanos	1%	18%	81%
Samoanos	0,60%	14,80%	84,60%
Africanos	0,10%	5,90%	94%
Chinos	0,02%	1,98%	98%
<b>Nuestro grupo de estudio</b>	<b>1,9%</b>	<b>18,4%</b>	<b>79,7%</b>

**Tabla 22:** Comparación de nuestros resultados con la distribución genotípica descrita por Yen et al <sup>(42)</sup>

En los últimos años se han realizado distintos trabajos que consideran a la variante 12Ala o al genotipo Ala12Ala como protectores contra la obesidad, la resistencia a la insulina, la diabetes tipo 2, la hipertensión arterial y el infarto agudo de miocardio.<sup>(48)</sup>

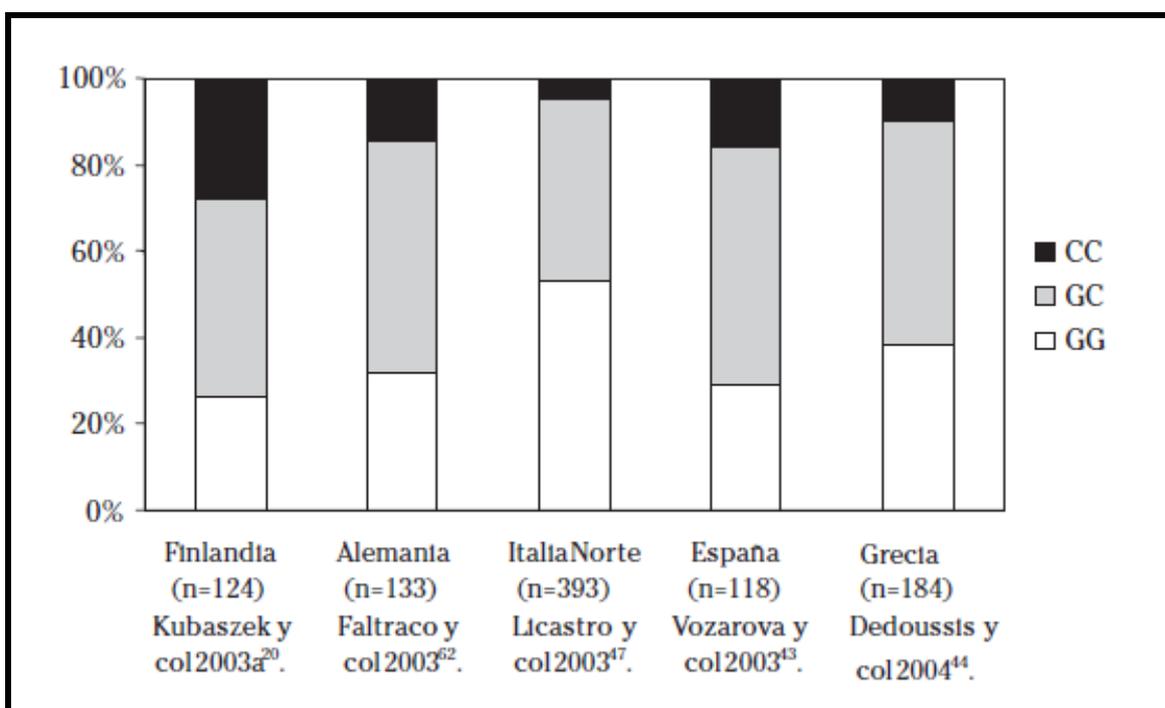
En nuestro estudio sin embargo no ha resultado significativa la aparición del 12Ala como factor protector.

### 3.2.3. IL-6 – 174 G>C

Como ya hemos visto la IL-6 se asocia con el tejido adiposo, ya que el 30% de la citoquina circulante proviene de él, aumentando en proporción con el incremento de peso.

Distintos estudios relacionan a la presencia del alelo C con IMC menores y protección contra la aparición de la obesidad (54, 56, 57)

Según Klipstein-Grobusch et al (56) la distribución genotípica de su cohorte fue de 31% para el GG, 53% para el GC y 16% para el CC. En nuestro grupo de estudio esta distribución fue de 48%, 40,5% y 11,5% respectivamente.



**Figura 37:** Distribución genotípica del polimorfismo -174G>C en distintos países europeos (120)

En la figura 38 vemos la distribución genotípica del polimorfismo -174G>C en distintos países europeos, que muestra que el genotipo GC es el de mayor frecuencia, mientras que el CC, que parece acompañarse de más alteraciones metabólicas, es el que aparece con menor frecuencia

(120). En nuestro estudio también observamos que el genotipo CC es el de menor frecuencia, sin embargo encontramos que el genotipo GG es el de mayor frecuencia.

Basándonos en la protección que ejerce el alelo C contra la obesidad y la ganancia de peso y la presencia de IMC menores, como refieren los trabajos realizados por Klipstein-Grobusch et al y Goyenechea et al (56, 57), nosotros no hemos encontrado diferencias significativas para la distribución genotípica del gen. Tampoco encontramos valores significativos para la presencia del genotipo CC en los individuos con IMC menores.

Se deben hacer estudios con mayor cantidad de individuos para poder comprobar si hay una acción sinérgica entre el alelo C del -174 G>C de IL-6 y el 12Ala del Pro12Ala de PPARG, como protectores contra la obesidad ya que la escasez de nuestra muestra no nos permite confirmarlo.

#### **3.2.4. ADRB3 Trp64Arg**

Se ha postulado que el gen del ADRB3 y su polimorfismo se encuentran asociados al metabolismo basal y la lipólisis, lo que implicaría que podría asociarse a un aumento de la ganancia de peso y por consiguiente a obesidad.

Como ya hemos señalado, al igual que de Luis et al, Dunajska et al, Tafel et al y Vieira-Filho (104-107), no hemos encontrado valores significativos en la distribución genotípica entre pacientes y controles, con una  $p = 0,214$ , ni para la presencia del 64Arg como factor predisponente para obesidad con un OR 1,958 ( $0,807 < > 4,750$ ) y una  $p = 0,125$ .

Endo et al, en el 2000(121) mostraron que la frecuencia del polimorfismo Trp64Arg en pacientes obesos fue significativamente mayor que en los sujetos normales y el IMC mucho mayor en los sujetos con el alelo Arg64 que en los homocigotos para el alelo normal. Sin embargo en otros estudios, Hinney et al (122) y Urhammer et al (123), no hallaron una relación del polimorfismo con la predisposición a IMC mayor al igual que lo que ocurre con nuestro grupo de estudio.

Nosotros no hemos encontrado homocigotos para el genotipo Arg/Arg entre los controles, por lo que no se ha podido realizar el OR para el genotipo Arg/Arg en ese grupo poblacional. Curiosamente Li et al no encontraron homocigotos para el Arg entre el grupo de pacientes. Sin embargo, igual que para nuestra población de estudio, concluyeron que los heterocigotos no

presentaron un riesgo aumentado de padecer obesidad al comparar un grupo de individuos obesos y otro de controles<sup>(109)</sup>.

### 3.2.5. FTO rs9939609

El gen del FTO y su polimorfismo rs9939609 ha sido relacionado con obesidad tanto en niños como en adultos.

Como ya describimos, tanto Cecil et al <sup>(90)</sup> como Hakanen et al <sup>(92)</sup>, han relacionado en sus respectivos estudios, la obesidad con la aparición del alelo A del gen de FTO. En nuestro grupo de estudio no hemos hallado valores significativos en la relación entre obesidad y la aparición del alelo A, con un OR 1,343 (0,741 < >2,435) y una p = 0,320.

Sin embargo, Lauria et al <sup>(123)</sup>, estudiaron 16224 niños entre 2 y 9 años de Bélgica, Chipre, Estonia, Alemania, Hungría, Italia, España y Suecia (estudio IDEFICS). El principal hallazgo del estudio es que los portadores del alelo A presentaron mayor incremento de la masa corporal y la adiposidad central.

En el estudio realizado en Brasil, por da Silva et al <sup>(95)</sup>, la frecuencia alélica de A es del 40% en la población de origen europeo, mientras que en nuestro grupo de análisis, la frecuencia de A es del 45%. Sin embargo al igual que en nuestro trabajo, los estudios realizados por Li H et al y Ohashi et al <sup>(88, 89)</sup>, en chinos y japoneses no se encontró relación con obesidad.

Genotipo	Frecuencia, n (%)	Etnia		P
		Caucasicos	No caucasicos	
T/T	130 (37.4)	59 (42.5)	63 (34.6)	0.273
T/A	161 (46.3)	56 (40.3)	89 (48.9)	
A/A	57 (16.4)	24 (17.3)	30 (16.5)	
Frecuencia alélica A	0.40	0.37	0.41	0.410

**Tabla 23:** Frecuencia genotípica y alélica para el gen FTO rs9939609 para la población brasilera estudiada por da Silva et al. <sup>(95)</sup>

En cuanto al análisis de la frecuencia genotípica el estudio de da Silva et al (95) en Brasil, señala que ésta es del 16,4% para AA, 46,3% para AT y 37,4% para TT, respectivamente. Ellos discriminaron entre la población de origen caucásico y la de origen no caucásico y observaron una prevalencia entre los caucásicos de 17,3% para AA, 40,3% para AT y 42,4% para TT. En nuestra población de estudio fue 19,8% para AA, 49,8% para AT y 30,4% para TT, presentando por tanto una distribución genotípica más semejante a todo el grupo de estudio de da Silva et al, que al grupo de caucásicos incluidos en dicho estudio.

### **3.2.6. MC4R rs17782313**

El gen del MC4R se asocia a obesidad de origen monogénica pero también la región cercana al gen, se asocia a obesidad. Nosotros hemos estudiado la relación de la obesidad con el polimorfismo rs17782313.

Este polimorfismo se describió primero en adultos, pero en la actualidad se observa una evidencia cada vez más contundente de su relación con obesidad de inicio en las primeras etapas de la vida (125).

Loos et al (68) y Hardy et al (69) no pudieron comprobar la asociación de obesidad y rs17782313 en las edades más tempranas, pero sí alrededor de los 7 años. Otros estudios confirmaron la influencia de la región cercana al MC4R sobre el peso, IMC y el riesgo de obesidad en niños y adolescentes europeos (126 – 128).

Den Hoed et al (129), en un meta-análisis que incluyeron 13004 niños y adolescentes observó que la presencia del alelo C del rs17781323 aumenta un 6,7% el DS del IMC. En nuestro estudio encontramos una asociación de la presencia del alelo C y la obesidad con una  $p = 0,041$  ( $< 0,05$ ) con un OR de 1,8 ( $1,009 < > 3,211$ ). Esto concuerda también con lo observado por Hardy et al que asocia la presencia del alelo C con obesidad a los 20 años, en un grupo de 2479 hombres y mujeres.

Sin embargo, mientras los estudios europeos arrojan los mismos resultados que los de nuestro estudio, los trabajos por Wu et al y Ng et al (130,131) realizados en niños chinos no encontraron

una relación consistente con obesidad. Lo mismo ocurre con el estudio hecho por Grant et al <sup>(132)</sup> en niños y adolescentes afroamericanos.

La frecuencia genotípica fue del 3,7% para el CC, del 35% para el CT y del 61,3% para el TT. No hemos encontrado valores significativos para la distribución genotípica del rs17782313 del gen del MC4R con una  $p = 0,121$ .

### **3.2.7. Interacción entre los genes**

Se analizó la interacción entre Ala+ (PPARG) y C+ (IL-6) como protector del riesgo de padecer obesidad, por regresión logística y no se pudo comprobar dicha interacción. Tampoco se observó interacción entre los genes del PPARG y del ADRB3, y ni entre los del MC4R y el FTO, también analizados por regresión logística. No hemos podido comprobar lo sugerido por Barbieri et al <sup>(133)</sup>, Vieira-Filho et al <sup>(107)</sup> y Cauchi et al <sup>(126)</sup>, respectivamente.

Se deben incluir mayor número de pacientes para comprobar estas hipótesis.

# **CONCLUSIONES**



1. No hemos observado valores significativos para la distribución genotípica para en GNB3, ni para la presencia del 825TT como factor predisponente para obesidad.
2. No hemos visto diferencias significativas para la distribución genotípica de Pro12Ala del PPARG. Tampoco comprobamos la acción protectora contra obesidad del 12Ala.
3. No hemos observado valores significativos para la distribución genotípica, ni para la presencia del alelo C del -174 G>C del IL6 como factor predisponente para obesidad.
4. No hemos visto diferencias significativas para la distribución genotípica del Trp64Arg del ADRB3. Tampoco la acción del Arg64 como factor de riesgo para la aparición de obesidad, aunque observamos 2 homocigotos Arg/Arg entre los pacientes y ninguno entre los controles. Será necesario realizar nuevos estudios con un número mayor de individuos.
5. No hemos observado valores significativos para la distribución genotípica, ni para la presencia del alelo A del rs9939609 del gen FTO como factor predisponente para obesidad.
6. Hemos encontrado diferencias significativas en la distribución genotípica del alelo C del rs17782313 del MC4R entre pacientes y controles respecto a la aparición de obesidad. Sin embargo no observamos valores significativos para el genotipo CC y los IMC mayores. No hallamos valores significativos para la distribución genotípica.
7. No hemos comprobado la sinergia entre el alelo C del -174 G>C del IL6 y el 12Ala del. Se necesitará una cohorte mayor para comprobar esta hipótesis.

8. Tampoco se pudo comprobar la sinergia entre en rs17782313 del MC4R y el rs9939609 del FTO
  
9. No se pudo comprobar la interacción entre el Pro12Ala del PPARG y el Trp64Arg del ADRB3. Se requieren grupos de estudio más grandes para comprobar estas hipótesis.

# **ANEXO**



## OBESIDAD

### Polimorfismos implicados en su predisposición genética

La obesidad es una enfermedad en continuo aumento y que afecta a niños cada vez más pequeños. Sabemos que hay factores ambientales (comida, sedentarismo, etc.) y genéticos que predisponen a la misma.

Estamos realizando un estudio acerca de la predisposición genética a la obesidad y sus complicaciones. Necesitamos chequear la ausencia o presencia de esta predisposición genética en niños de peso normal como vuestro hijo/a. Para ello se utilizaría una pequeña cantidad de ADN (que contiene la información que se necesita) de la sangre que se le extraerá a su hijo/a en la analítica solicitada por su medico de cabecera. No será necesario ningún estudio extra o que pueda quitarles tiempo, excepto leer este escrito y firmar la autorización para que su hijo sea incluido de forma anónima en nuestro protocolo.

Desde ya les agradecemos su colaboración y no duden preguntarnos lo que necesiten conocer.

Consentimiento informado

Yo.....DNI.....  
.....

Declaro aceptar la participación de mi hijo/a como control sano en el estudio de polimorfismos genéticos asociados a obesidad. Este contribuirá en tratar de mejorar el conocimiento que se tiene en el origen de la obesidad y sus complicaciones.

## OBESIDAD

### Polimorfismos implicados en su predisposición genética

La obesidad es una enfermedad en continuo aumento y que afecta a niños cada vez más pequeños. Sabemos que hay factores ambientales (comida, sedentarismo, etc.) y genéticos que predisponen a la misma.

Estamos realizando un estudio acerca de la predisposición genética a la obesidad y sus complicaciones. Necesitamos chequear la ausencia o presencia de esta predisposición genética en su hijo/a, el cual se encuentra en control en el Servicio de Endocrinología. Para ello se utilizaría una pequeña cantidad de ADN (que contiene la información que se necesita) de la sangre que se le extraerá a su hijo/a en la analítica solicitada por su medico de cabecera. No será necesario ningún estudio extra o que pueda quitarles tiempo, excepto leer este escrito y firmar la autorización para que su hijo sea incluido de forma anónima en nuestro protocolo.

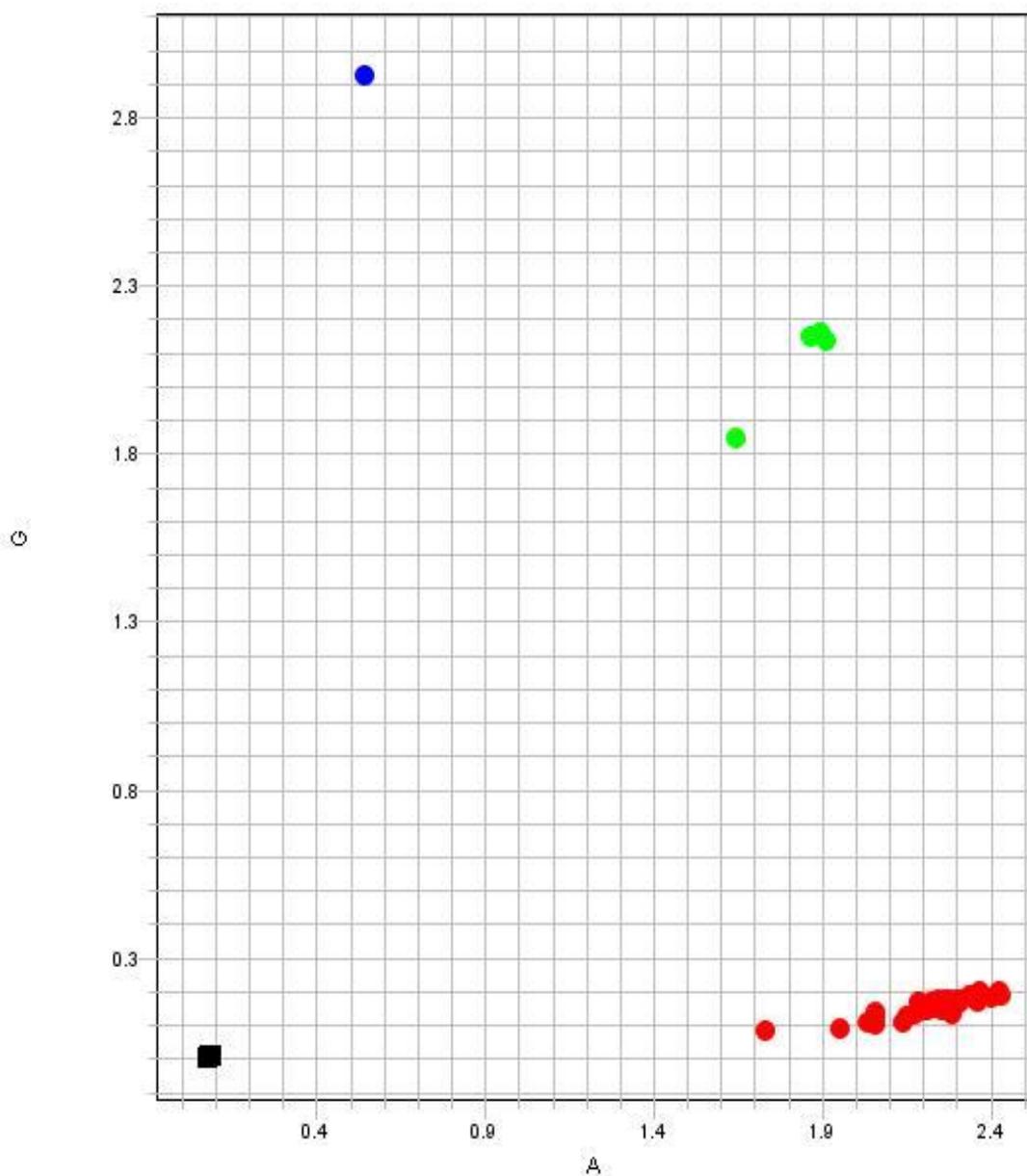
Desde ya les agradecemos su colaboración y no duden preguntarnos lo que necesiten conocer.

Consentimiento informado

Yo.....DNI.....  
.....

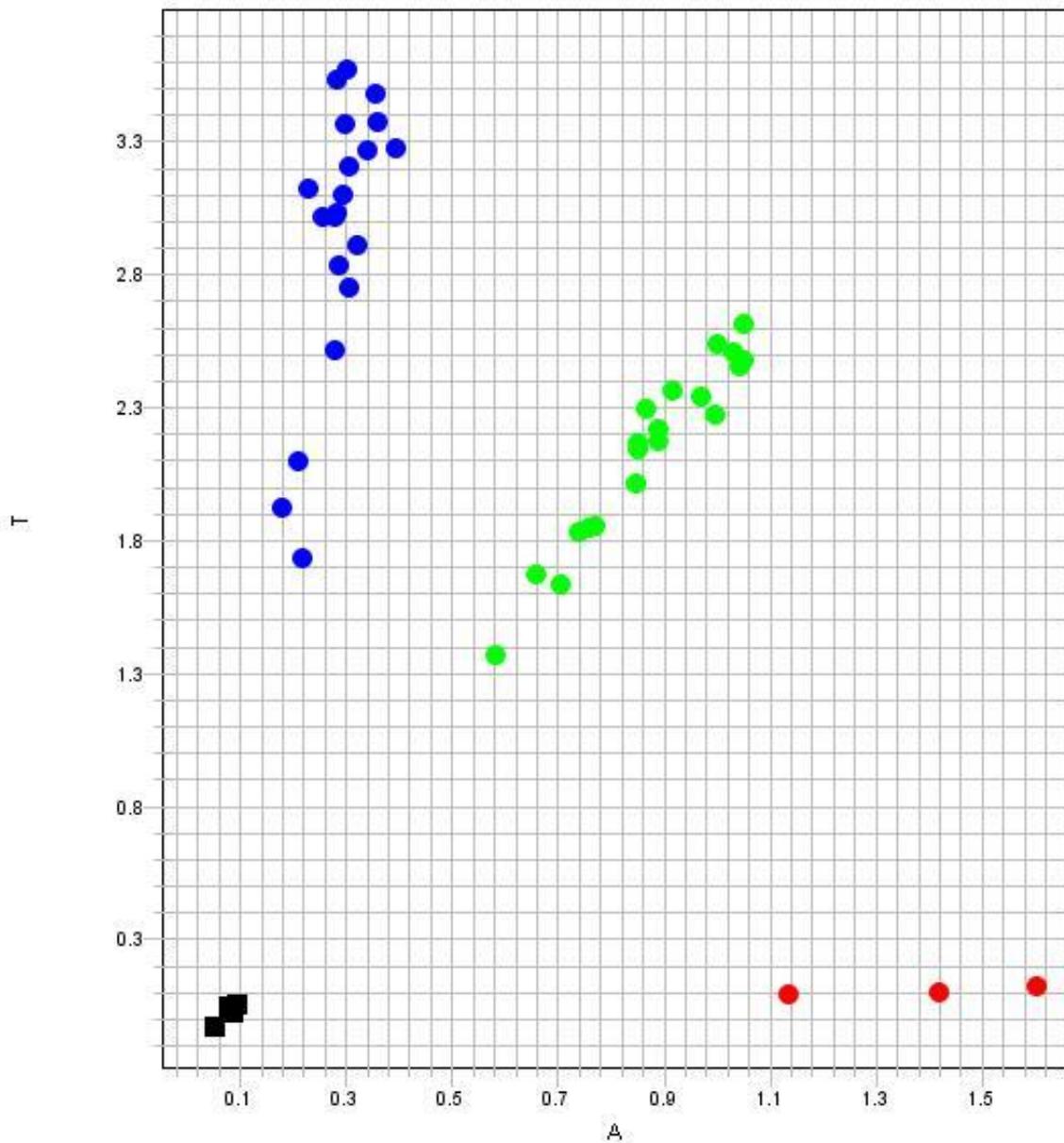
Declaro aceptar la participación de mi hijo/a como control sano en el estudio de polimorfismos genéticos asociados a obesidad. Este contribuirá en tratar de mejorar el conocimiento que se tiene en el origen de la obesidad y sus complicaciones.

### Allelic Discrimination Plot



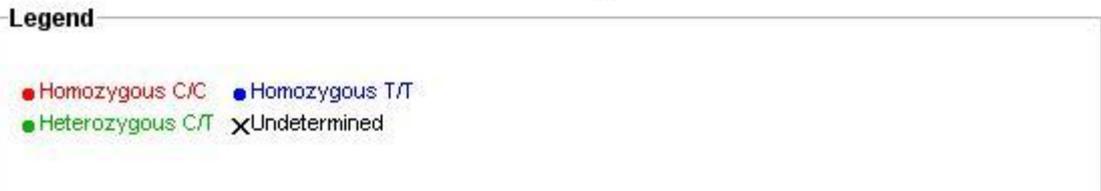
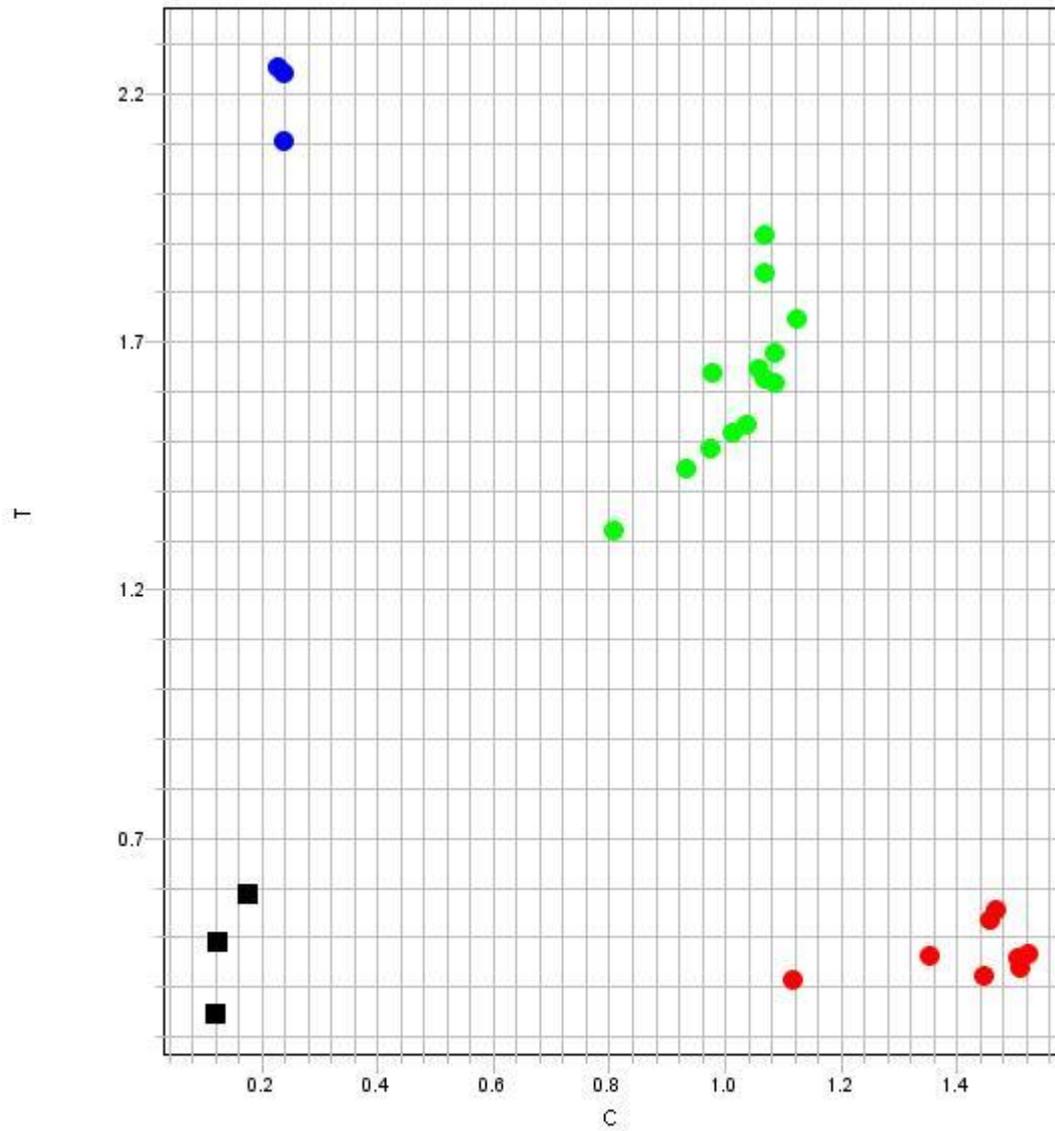
Grafica de ensayo sondas Taqman para el gen ADRB3.

### Allelic Discrimination Plot



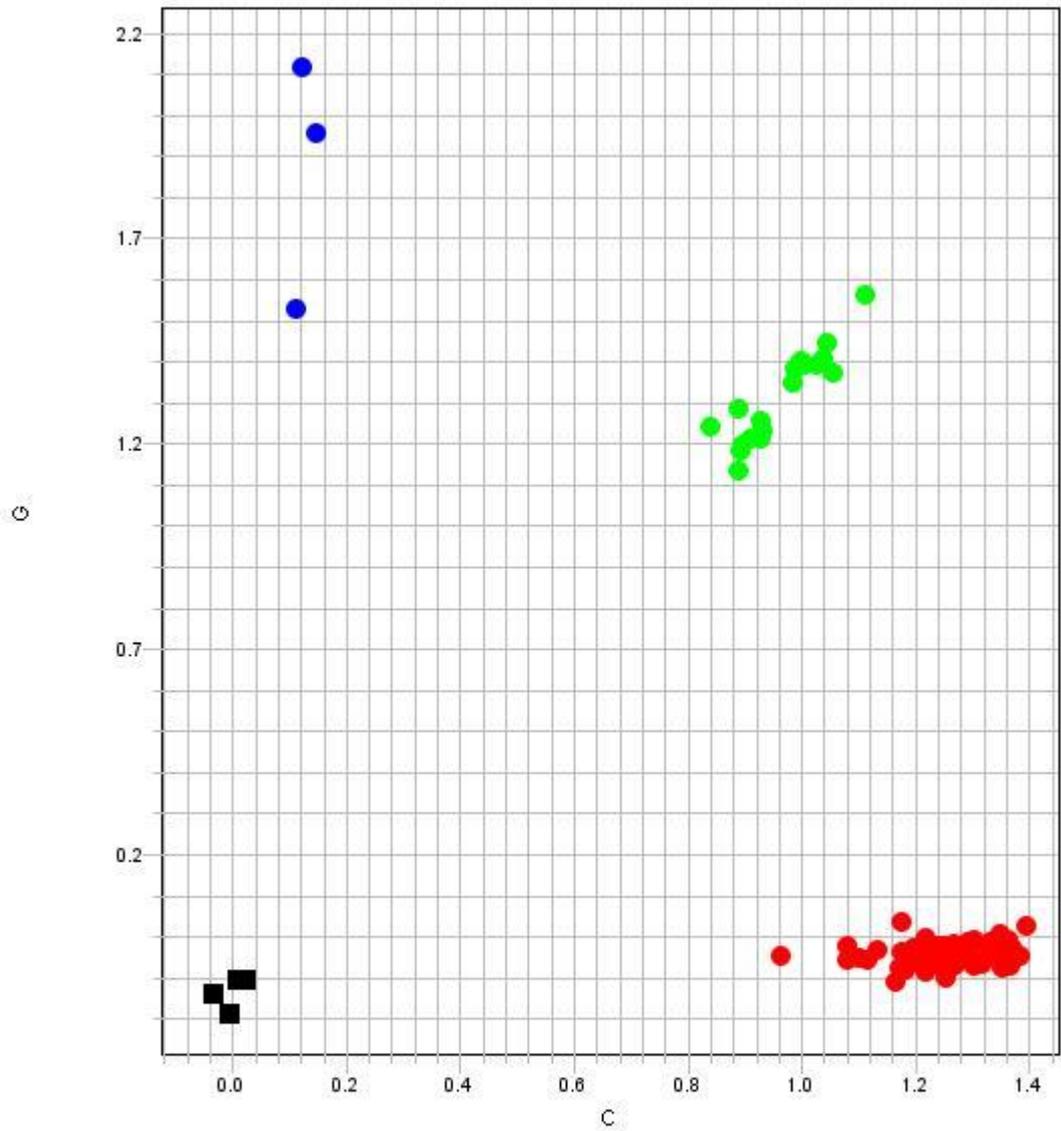
Grafica de ensayo sondas Taqman para gen del FTO

### Allelic Discrimination Plot



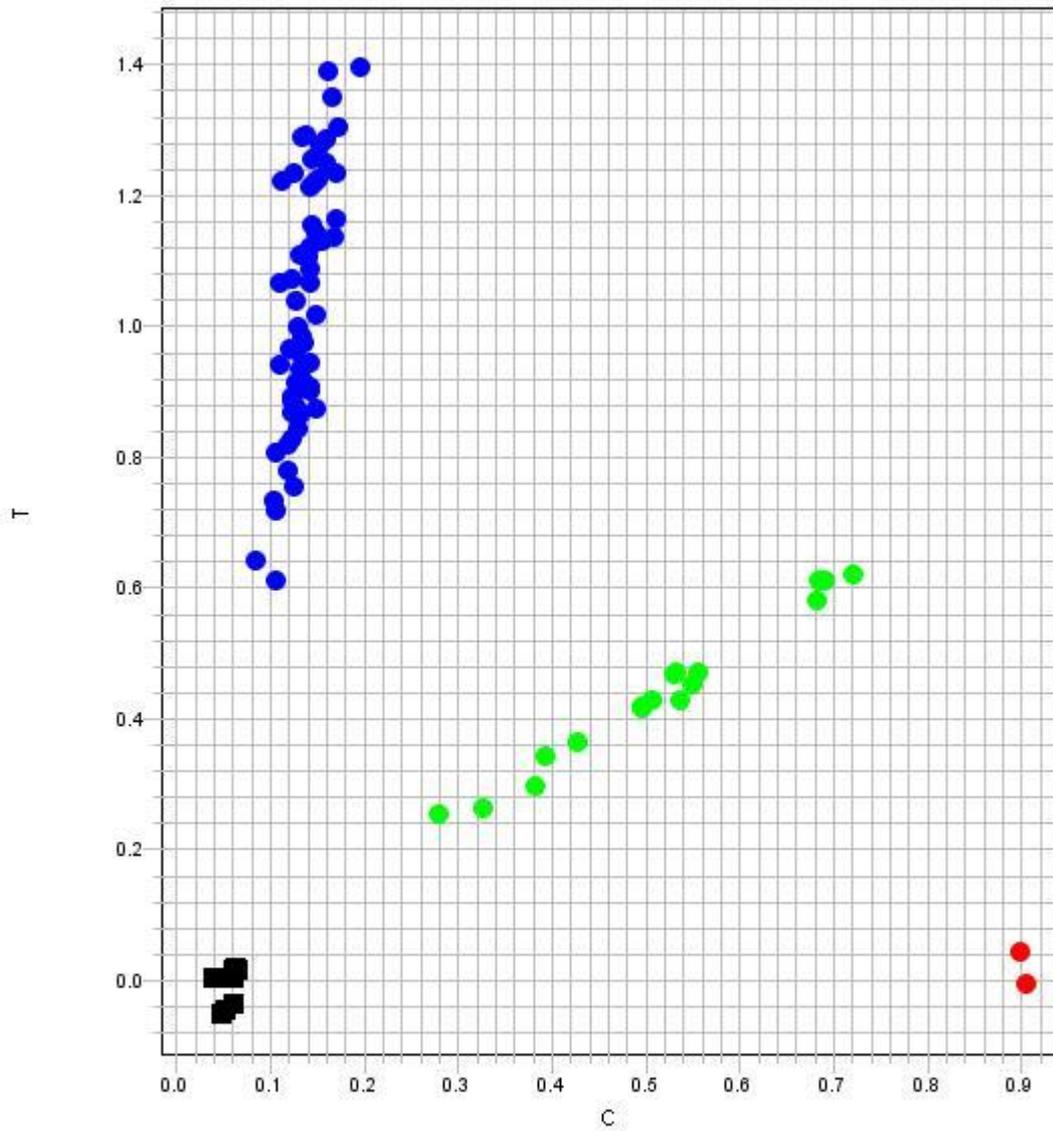
Grafica de ensayo sondas Taqman para el gen del GNB3

### Allelic Discrimination Plot



Grafica de ensayo sondas Taqman para el gen del PPARG

### Allelic Discrimination Plot



Grafica de ensayo sondas Taqman para el gen del MC4R



# **BIBLIOGRAFÍA**



## Referencias:

- 1- Sociedad Argentina de Pediatría. Subcomisión de Epidemiología y Comité de Nutrición. Consenso sobre factores de riesgo de enfermedad cardiovascular en pediatría. Obesidad. Arch.argent.pediatr 2005; 103(3): 262-281.
- 2- World Health Organization 2000 WHO Technical Report Series 894: Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic. A report of a WHO consultation, Geneva Available at: <http://www.who.org/policy.asp> Accessed on 1/7/07
- 3- Caterson ID, Hubbard V, Bray GA, Grunstein R, Hansen BC, Hong Y, Labarthe D, Seidell JC, Smith SCJr 2004 Prevention conference VII: obesity, a worldwide epidemic related to heart disease and stroke: Group III: worldwide comorbidities of obesity. Circulation 110:476–483
- 4- Lissau I, Overpeck MD, Ruan WJ, Due P, Holstein BE, Hediger ML and the Health and overweight in adolescents in 13 European countries, Israel and the United States. Arch Pediatr Adolesc Med 158:27–33
- 5- Majema Serra L, Ribas Barba L, Aranceta Bartrina J, Pérez Rodrigo C, Saavedra Santana P, Peña Quintana L. Obesidad infantil y juvenil en España. Resultados del Estudio enKid (1998-2000). Med Clin (Barc) 2003;121(19):725-32
- 6- Barlow SE, Dietz WH. Obesity evaluation and treatment: Expert Committee recommendations. The Maternal and Child Health Bureau, Health Resources and Services Administration and the Department of Health and Human Services. Pediatrics 1998; 102:E29.
- 7- Martorell R, Khan L, Hughes M, Grummer Strawn LM. Obesity in children from developing countries: a public health problem? En: Martorell R & Hasche F ed.

- Nutrition and growth. Nestlé Nutrition Workshop Series Pediatric. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins, 2001; (49):351-373.
- 8- Hennekens CH, Schneider WR, Barice AJ. Obesity in Childhood: Introduction and General Considerations. *Pediatr Res.* 2007 Jun;61(6):634-5. Review.
  - 9- Dietz WH, Robinson TN. Overweight Children and Adolescents. *N Engl J Med*, 2005 May 19; 352 (20): 2100-2109.
  - 10- Ebbeling C, Pawlak D, Ludwig D. Childhood obesity: public-health crisis, common sense cure. *Lancet* 2002; 360:473-82.
  - 11- Santos JL, Martínez JA, Pérez F, Albala C. Epidemiología genética de la obesidad: estudios familiares. *Rev Méd Chile* 2005; 133: 349-361.
  - 12- Fu WPC, Lee HC, Ng CJ, Tay Y KD, Kau CY, Seow CJ, Siak JK, Hong CY. Screening for childhood National Center for Health Statistics. Prevalence of overweight among children and adolescents: UStates, 1999.
  - 13- Aggoun Y. Obesity, Metabolic Syndrome, and Cardiovascular Disease. *Pediatr Res.* 2007 Jun; 61(6):653-9.
  - 14- Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37:1595–1607
  - 15- Körner A, Kratzsch J, Gausche R, Schaab M, Erbs S, Kiess W. New Predictors of the Metabolic Syndrome in Children-Role of Adipocytokines. *Pediatr Res.* 2007 Jun; 61(6):640-45

- 16- Freedman DS, Khan LK, Dietz WH, Srinivasan SR, Berenson GS 2001 Relationship of childhood overweight to coronary heart disease risk factors in adulthood: The Bogalusa Heart Study. *Pediatrics* 108:712–718.
- 17- Argente J, Martos-Moreno G, Hernández M. El tejido adiposo como glándula endocrina. *BOL PEDIATR* 2006; 46: 269-274
- 18- Reilly JJ, Ness AR, Sherriff A. Epidemiological and Physiological Approaches to Understanding the Etiology of Pediatric Obesity: Finding the Needle in the Haystack. *Pediatr Res.* 2007 Jun; 61(6):646-52.
- 19- Spalding, K. L., Arner, E., Westermark, P. O., Bernard, S., Buchholz, B. A., Bergmann, O., Blomqvist, L., Hoffstedt, J., Naslund, E., Britton, T., Concha, H., Hassan, M., Ryden, M., Frisen, J., Arner, P. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 453: 783-787, 2008.
- 20- Feldman BJ. Is Your Metabolism Determined By (Cell) Fate? *Pediatr Res.* 2007 Jun; 61(6):636-9.
- 21- Perez M. El Adipocito como órgano endocrino. Implicaciones fisiopatológicas y terapéuticas. *Rev. Med;* 15 (2): 225-242, 2007.
- 22- Stiteri PK. Adipose tissue as a source of hormones. *Am J Clin Nutr.* 1997; 5:277-282
- 23- Considine RV. Human Leptin: An Adipocyte Hormone with Weight-Regulatory and Endocrine Functions. *Seminars in Vascular Medicine.*2005; 5(1):15-24.
- 24- Matsuzawa Y. Adipocytokines and metabolic syndrome. *Seminars in Vascular Medicine.*2005; 5(1):34-39.

- 25- Barsh, G. S., Farooqi, I. S., O'Rahilly, S. Genetics of body-weight regulation. *Nature* 404: 644-651, 2000.
- 26- Bell, C. G., Walley, A. J., Froguel, P. The genetics of human obesity. *Nature Rev. Genet.* 6: 221-234, 2005.
- 27- Martos-Moreno G, Argente J. Bases Moleculares de la Obesidad. Ciclo de Conferencias. XXXVII Congreso de la Sociedad de Endocrinología Pediátrica Española, Oviedo 2005.
- 28- Wardlaw, S. L. Obesity as a neuroendocrine disease: lessons to be learned from proopiomelanocortin and melanocortin receptor mutations in mice and men. *J. Clin. Endocr. Metab.* 2001; 86: 1442-1446.
- 29- Roskopf D, Busch S, Manthey I, Siffert W. G protein beta 3 gene: structure, promoter, and additional polymorphisms. *Hypertension.* 2000 Jul; 36(1):33-41.
- 30- Siffert W, Naber C, Walla M, Ritz E. G protein b3 subunit 825T allele and its potential association with obesity in hypertensive individuals. *J Hypertens* 1999; 17:1095-1098.
- 31- Siffert W. Molecular genetics of G proteins and atherosclerosis risk. *Basic Res Cardiol* 2001; 96: 606 – 611
- 32- Roskopf D, Manthey I, Siffert W. Identification and ethnic distribution of major haplotypes in the gene GNB3 encoding the G-protein beta3 subunit. *Pharmacogenetics.* 2002 Apr; 12(3):209-20

- 33- Siffert W, Forster P, Jöckel KH, Mvere DA, Brinkmann B, Naber C, Crookes R, Du P Heyns A, Epplen JT, Fridey J, Freedman BI, Müller N, Stolke D, Sharma AM, Al Moutaery K, Grosse-Wilde H, Buerbaum B, Ehrlich T, Ahmad HR, Horsthemke B, Du Toit ED, Tiilikainen A, Ge J, Wang Y, Roszkopf D, et al. Worldwide ethnic distribution of the G protein beta3 subunit 825T allele and its association with obesity in Caucasian, Chinese, and Black African individuals. *J Am Soc Nephrol.* 1999 Sep; 10(9):1921-30.
- 34- Siffert W. G protein beta 3 subunit 825T allele, hypertension, obesity, and diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 2000 Sep; 15(9):1298-306. Review.
- 35- Siffert W. G protein polymorphisms in hypertension, atherosclerosis, and diabetes. *Annu Rev Med.* 2005; 56:17-28. Review.
- 36- Chang WT, Wang YC, Chen CC, Zhang SK, Liu CH, Chang FH, Hsu LS. The -308G/A of Tumor Necrosis Factor (TNF)- $\alpha$  and 825C/T of Guanidine Nucleotide Binding Protein 3 (GNB3) are Associated with the Onset of Acute Myocardial Infarction and Obesity in Taiwan. *Int J Mol Sci.* 2012;13(2):1846-57.
- 37- Dishy V, Gupta S, Landau R, Xie HG, Kim RB, Smiley RM, Byrne DW, Wood AJ, Stein CM. G-protein beta(3) subunit 825 C/T polymorphism is associated with weight gain during pregnancy.
- 38- Gutersohn A, Naber C, Muller N, Erbel R, Siffert W. G protein beta3 subunit 825 TT genotype and postpregnancy weight retention. *Lancet* 2000; 355:1240–1241.
- 39- Casiglia E, Tikhonoff V, Caffi S, Martini B, Guidotti F, Bolzon M, Bascelli A, D'Este D, Mazza A, Pessina AC. Effects of the C825T polymorphism of the GNB3 gene on body adiposity and blood pressure in fertile and menopausal women: a population-based study. *J Hypertens.* 2008 Feb;26(2):238-43.

- 40- Hsiao TJ, Hwang Y, Liu CH, Chang HM, Lin E. Association of the C825T polymorphism in the GNB3 gene with obesity and metabolic phenotypes in a Taiwanese population. *Genes Nutr.* 2013 Jan;8(1):137-44. 2.
- 41- Klenke S, Kussmann M, Siffert W. The GNB3 C825T polymorphism as a pharmacogenetic marker in the treatment of hypertension, obesity, and depression. *Pharmacogenet Genomics.* 2011 Sep; 21(9):594-606.
- 42- Hsiao DJ, Wu LS, Huang SY, Lin E. Weight loss and body fat reduction under sibutramine therapy in obesity with the C825T polymorphism in the GNB3 gene. *Pharmacogenet Genomics.* 2009 Sep; 19(9):730-3.
- 43- Yki-Järvinen H. Thiazolidinediones. *N Engl J Med,* 2004 Set 9; 351:1106-18.
- 44- Vidal-Puig AJ, Considine RV, Jimenez-Liñan M, Werman A, Pories J, Caro JF, Flier JS. Peroxisome Proliferator-activated Receptor Gene Expression in Human Tissues. *J. Clin. Invest.* 1997 May; 99(10): 2416-2422.
- 45- Tontonoz P., Graves, R. A., Budavari A. I., Erdjument-Bromage H., Lui M., Hu E., Tempst P., Spiegelman B. M. Adipocyte-specific transcription factor ARF6 is a hetero-receptor agonists and antagonists. *J. Biol. Chem.* 1994; 272: 8071- 76.
- 46- Tontonoz, P., Hu, E., and Spiegelman, B. M. (1994) Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR $\gamma$ 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 79, 1147-1156.
- 47- Yen, C.-J.; Beamer, B. A.; Negri, C.; Silver, K.; Brown, K. A.; Yarnall, D. P.; Burns, D. K.; Roth, J.; Shuldiner, A. R. : Molecular scanning of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma (hPPAR-gamma) gene in diabetic Caucasians: identification of a pro12ala PPAR-gamma-2 missense mutation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997; 241: 270-274.

- 48- Buzzetti R, Petrone A, Caiazzo AM, Alemanno I, Zavarella S, Capizzi M, Mein CA, Osborn JA, Vania A, Di Mario U 2005 PPAR-gamma2 Pro12Ala variant is associated with greater insulin sensitivity in childhood obesity. *Pediatr Res* 57:138–140.
- 49- Morini E, Tassi V, Capponi D, Ludovico O, Dallapiccola B, Trischitta V, Prudente S. Interaction between PPARgamma2 variants and gender on the modulation of body weight. *Obesity (Silver Spring)*. 2008 Jun;16(6):1467-70
- 50- Tellechea ML, Aranguren F, Pérez MS, Cerrone GE, Frechtel GD, Taverna MJ. Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene is associated with metabolic syndrome and surrogate measures of insulin resistance in healthy men: interaction with smoking status. *Circ J*. 2009 Nov;73(11):2118-24.
- 51- . Bhatt SP, Misra A, Sharma M, Luthra K, Guleria R, Pandey RM, Vikram NK. Ala/Ala genotype of Pro12Ala polymorphism in the peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ 2 gene is associated with obesity and insulin resistance in Asian Indians *Diabetes Technol Ther*. 2012 Sep;14(9):828-34.
- 52- Cecil JE, Fischer B, Doney SF, Hetherington M, Watt P, Wrieden W, Bolton-Smith C, Palmer C. The Pro12Ala and C-681G variants of the PPARG locus are associated with opposing growth phenotypes in young schoolchildren. *Diabetologia* 2005; 48: 1496-1502.
- 53- Fishman D.; Faulds G.; Jeffery R.; Mohamed-Ali V.; Yudkin J. S.; Humphries S.; Woo P. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J. Clin. Invest.* 102: 1369-1376, 1998.

- 54- Berthier, M.-T.; Paradis, A.-M.; Tchernof, A.; Bergeron, J.; Prud'homme, D.; Despres, J.-P.; Vohl, M.-C. The interleukin 6 -174G/C polymorphism is associated with indices of obesity in men. *J. Hum. Genet.* 2003; 48: 14-19.
- 55- Fernandez-Real JM, Broch M, Vendrell J, Gutierrez C, Casamitjana R, Pugeat M, Richart C, Ricart W. Interleukin-6 gene polymorphism and insulin sensitivity. *Diabetes.* 2000; 49 (3): 517–520.
- 56- Klipstein-Grobusch K, Möhlig M, Spranger J, Hoffmann K, Rodrigues FU, Sharma AM, Klaus S, Pfeiffer AF, Boeing H. Interleukin-6 g.-174G>C promoter polymorphism is associated with obesity in the EPIC-Potsdam Study. *Obesity.* 2006 Jan; 14(1):14-8.
- 57- Goyenechea E, Dolores Parra M, Alfredo Martinez J. Weight regain after slimming induced by an energy-restricted diet depends on interleukin-6 and peroxisome-proliferator-activated-receptor-gamma2 gene polymorphisms. *Br J Nutr .* 2006 Nov; 96(5):965-72.
- 58- Barbieri M, Rizzo MR, Papa M, Acampora R, De Angelis L, Olivieri F, Marchegiani F, Franceschi C, Paolisso G. Role of interaction between variants in the PPARG and interleukin-6 genes on obesity related metabolic risk factors. *Experimental Gerontology* 2005; 40: 599–604.
- 59- Il6 gene promoter polymorphism (-174G/C) influences the association between fat mass and cardiovascular risk factors. Moleres A, Rendo-Urteaga T, Azcona C, Martínez JA, Gómez-Martínez S, Ruiz JR, Moreno LA, Marcos A, Martí A; AVENA group. *J Physiol Biochem.* 2009 Dec; 65(4):405-13.

- 60- Gantz, I., Miwa, H., Konda, Y., Shimoto, Y., Tashiro, T., Watson, S. J., DeValle, J., Yamada, T. Molecular cloning, expression, and gene localization of a fourth melanocortin receptor. *J. Biol. Chem.* 268: 15174-15179, 1993.
- 61- Huszar, D., Lynch, C.A., Fairchild-Huntress, V., Dunmore, J.H., Fang, Q., Berkemeier, L.R., Gu, W., Kesterson, R.A., Boston, B.A., Cone, R.D., Smith, F.J., Campfield, L.A., Burn, P., Lee, F., 1997. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* 88, 131–141.
- 62- Yeo, G. S. H., Farooqi, I. S., Aminian, S., Halsall, D. J., Stanhope, R. G., O'Rahilly, S. A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. *Nature Genet.* 20: 111-112, 1998.
- 63- Vaisse, C., Clement, K., Guy-Grand, B., Froguel, P. A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity. *Nature Genet* 20: 113-114, 1998.
- 64- Hinney, A., Schmidt, A., Nottebom, K., Heibult, O., Becker, I., Ziegler, A., Gerber, G., Sina, M., Gorg, T., Mayer, H., Siegfried, W., Fichter, M., Remschmidt, H., Hebebrand, J. Several mutations in the melanocortin-4 receptor gene including a nonsense and a frameshift mutation associated with dominantly inherited obesity in humans. *J. Clin. Endocr. Metab.* 84: 1483-1486, 1999.
- 65- Farooqi, I. S., Keogh, J. M., Yeo, G. S. H., Lank, E. J., Cheetham, T., O'Rahilly, S. Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene. *New Eng. J. Med.* 348: 1085-1095, 2003.

- 66- Lubrano-Berthelier, C., Dubern, B., Lacorte, J.M., Picard, F., Shapiro, A., Zhang, S., Bertrais, S., Hercberg, S., Basdevant, A., Clement, K., Vaisse, C., 2006. Melanocortin 4 receptor mutations in a large cohort of severely obese adults: prevalence, functional classification, genotype–phenotype relationship, and lack of association with binge eating. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91, 1811–1818.
- 67- MacKenzie, R.G., 2006. Obesity-associated mutations in the human melanocortin-4 receptor gene. *Peptides* 27, 395–403.
- 68- Loos, R. J. F., Lindgren, C. M., Li, S., Wheeler, E., Zhao, J. H., Prokopenko, I., Inouye, M., Freathy, R. M., Attwood, A. P., Beckmann, J. S., Berndt, S. I., Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial, and 96 others. Common variants near MC4R are associated with fat mass, weight and risk of obesity. *Nature Genet.* 40: 768-775, 2008
- 69- Hardy, R., Wills, A.K., Wong, A., Elks, C.E., Wareham, N.J., Loos, R.J.F., Kuh, D., Ong, K.K., 2010. Life course variations in the associations between FTO and MC4R gene variants and body size. *Hum. Mol. Genet.* 19, 545–552.
- 70- Willer et al. Six new loci associated with body mass index highlight a neuronal influence on body weight regulation. 2009. *Nat. Genet.* 41, 25–34.
- 71- Thorleifsson, G., Walters, G.B., Gudbjartsson, D.F., Steinthorsdottir, V., Sulem, P., Helgadóttir, A., Styrkarsdóttir, U., Gretarsdóttir, S., Thorlacius, S., Jonsdóttir, I., Jonsdóttir, T., Olafsdóttir, E.J., Olafsdóttir, G.H., Jonsson, T., Jonsson, F., Borch-Johnsen, K., Hansen, T., Andersen, G., Jorgensen, T., Lauritzen, T., Aben, K.K., Verbeek, A.L., Roeleveld, N., Kampman, E., Yanek, L.R., Becker, L.C., Tryggvadóttir,

- L., Rafnar, T., Becker, D.M., Gulcher, J., Kiemenev, L.A., Pedersen, O., Kong, A., Thorsteinsdottir, U., Stefansson, K., 2009. Genome-wide association yields new sequence variants at seven loci that associate with measures of obesity. *Nat. Genet.* 41, 18–24.
- 72- Lindgren et al, The Wellcome Trust Case Control Consortium, 2009. Genome-wide association scan meta-analysis identifies three loci influencing adiposity and fat distribution. *PLoS Genet.* 5, e1000508.
- 73- Heard-Costa, N.L., et al, 2009. NRXN3 is a novel locus for waist circumference: a genome-wide association study from the CHARGE Consortium. *PLoS Genet.* 5, e1000539.
- 74- Meyre, D., Delplanque, J., Chevre, J.C., Lecoq, C., Lobbens, S., Gallina, S., Durand, E., Vatin, V., Degraeve, F., Proenca, C., Gaget, S., Korner, A., Kovacs, P., Kiess, W., Tichet, J., Marre, M., Hartikainen, A.L., Horber, F., Potoczna, N., Hercberg, S., Levy-Marchal, C., Pattou, F., Heude, B., Tauber, M., McCarthy, M.I., Blakemore, A.I.F., Montpetit, A., Polychronakos, C., Weill, J., Coin, L.J.M., Asher, J., Elliott, P., Jarvelin, M.R., Visvikis-Siest, S., Balkau, B., Sladek, R., Balding, D., Walley, A., Dina, C., Froguel, P., 2009. Genome-wide association study for early-onset and morbid adult obesity identifies three new risk loci in European populations. *Nat. Genet.* 41, 157–159.
- 75- Scherag, A., Dina, C., Hinney, A., Vatin, V., Scherag, S., Vogel, C.I.G., Muller, T.D., Grallert, H., Wichmann, H.E., Balkau, B., Heude, B., Jarvelin, M.R., Hartikainen, A.L., Levy-Marchal, C., Weill, J., Delplanque, J., Korner, A., Kiess, W., Kovacs, P., Rayner, N.W., Prokopenko, I., McCarthy, M.I., Schafer, H., Jarick, I., Boeing, H., Fisher, E., Reinehr, T., Heinrich, J., Rzehak, P., Berdel, D., Borte, M., Biebermann, H., Krude, H.,

- Roskopf, D., Rimbach, C., Rief, W., Fromme, T., Klingenspor, M., Schurmann, A., Schulz, N., Nothen, M.M., Muhleisen, T.W., Erbel, R., Jockel, K.H., Moebus, S., Boes, T., Illig, T., Froguel, P., Hebebrand, J., Meyre, D., 2010. Two new loci for body-weight regulation identified in a joint analysis of genome-wide association studies for early-onset extreme obesity in French and German study groups. *PLoS Genet.* 6, e1000916.
- 76- Liu G, Zhu H, Lagou V, Gutin B, Barbeau P, Treiber FA, Dong Y, Snieder H. Common variants near melanocortin 4 receptor are associated with general and visceral adiposity in European- and African-American youth. *J Pediatr.* 2010 Apr;156(4):598-605.e1
- 77- Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, et al. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science* 2007;316:889–94.
- 78- Wåhlén K, Sjölin E, Hoffstedt J. The common rs9939609 gene variant of the fat mass- and obesity-associated gene FTO is related to fat cell lipolysis. *J Lipid Res.* 2008;49:607–11.
- 79- Klötting N, Schleinitz D, Ruschke K, et al. Inverse relationship between obesity and FTO gene expression in visceral adipose tissue in humans. *Diabetologia.* 2008;51:641–7.
- 80- Gerken T, Girard CA, Tung YC, et al. The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. *Science* 2007;318:1469–72.
- 81- Dina C, Meyre D, Gallina S, et al. Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nat Genet.* 2007;39:724–6.

- 82- Scuteri A, Sanna S, Chen WM, et al. Genome-Wide Association Scan Shows Genetic Variants in the FTO Gene Are Associated with Obesity-Related Traits. *PLoS Genet.* 2007; 3: e115.
- 83- Cha SW, Choi SM, Kim KS, Park BL, Kim JR, Kim JY, et al. Replication of genetic effects of FTO polymorphisms on BMI in a Korean population. *Obesity* 2008; 16:2187–9.
- 84- Hotta K, Nakata Y, Matsuo T, Kamohara S, Kotani K, Komatsu R, et al. Variations in the FTO gene are associated with severe obesity in the Japanese. *J Hum Genet* 2008;53:546–53.
- 85- Ng MC, Park KS, Oh B, Tam CH, Cho YM, Shin HD, et al. Implication of genetic variants near TCF7L2, SLC30A8, HHEX, CDKAL1, CDKN2A/B, IGF2BP2, and FTO in type 2 diabetes and obesity in 6,719 Asians. *Diabetes* 2008;57:2226–33.
- 86- Chang YC, Liu PH, Lee WJ, Chang TJ, Jiang YD, Li HY, et al. Common variation in the fat mass and obesity-associated (FTO) gene confers risk of obesity and modulates BMI in the Chinese population. *Diabetes* 2008;57:2245–52.
- 87- Tan JT, Dorajoo R, Seielstad M, Sim XL, Ong RT, Chia KS, et al. FTO variants are associated with obesity in the Chinese and Malay populations in Singapore. *Diabetes* 2008;57:2851–7.
- 88- Li H, Wu Y, Loos RJ, et al. Variants in the fat mass-and obesity-associated (FTO) gene are not associated with obesity in a Chinese Han population. *Diabetes* 2008;57:264–8.
- 89- Ohashi J, Naka I, Kimura R, et al. FTO polymorphisms in oceanic populations. *J Hum Genet.* 2007;52:1031–5.

- 90- Cecil JE, Tavendale R, Watt P, Hetherington MM, Palmer CN. An obesity associated FTO gene variant and increased energy intake in children. *N Engl J Med*. 2008 Dec 11; 359(24): 2558-66.
- 91- Brunkwall L, Ericson U, Hellstrand S, Gullberg B, Orho-Melander M, Sonestedt E. Genetic variation in the fat mass and obesity-associated gene (FTO) in association with food preferences in healthy adults. *Food Nutr Res*. 2013 Apr 12;57.
- 92- Hakanen M, Raitakari OT, Lehtimäki T, Peltonen N, Pahkala K, Sillanmaki L, et al. FTO genotype is associated with body mass index after the age of seven years but not with energy intake or leisure-time physical activity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94:1281–7.
- 93- Den Hoed M, Westerterp-Plantenga MS, Bouwman FG, Mariman EC, Westerterp KR. Postprandial responses in hunger and satiety are associated with the rs9939609 single nucleotide polymorphism in FTO. *Am J Clin Nutr*. 2009;90:1426–32.
- 94- Hardy R, Wills AK, Wong A, Elks CE, Wareham NJ, Loos RJF, et al. Life course variations in the associations between FTO and MC4R variants and body size. *Hum Mol Genet*. 2010;19:545–52.
- 95- da Silva CF, Zandoná MR, Vitolo MR, Campagnolo PD, Rotta LN, Almeida S, Mattevi VS. Association between a frequent variant of the FTO gene and anthropometric phenotypes in Brazilian children. *BMC Med Genet*. 2013 Mar 13;14(1):34
- 96- Emorine LJ, Marullo S, Briand-Sutren M-M, et al. Molecular characterization of the human *beta* 3-adrenergic receptor. *Science* 1989;245:1118-21.

- 97- Arch JRS, Kaumann AJ.  $\beta_3$  and atypical  $\beta$ -adrenoceptors. Med Res Rev 1993; 13:663-729.
- 98- Krief S, Lönnqvist F, Raimbault S, et al. Tissue distribution of  $\beta_3$ -adrenergic receptor mRNA in man. J Clin Invest 1993; 91:344-9.
- 99- Emorine L, Blin N, Strosberg AD. The human  $\beta_3$ -adrenoceptor: the search for a physiological function. Trends Pharmacol Sci 1994; 15:3-7.
- 100- Van Sprosen A, Nahmias C, Krief S, Briend-Sufren M, Strosberg A, Emorine LJ. The promoter and intron/exon structure of the human and mouse beta-3-adrenergic-receptor genes. Europ. J. Biochem. 213: 1117-1124, 1993.
- 101- Clement K, Vaisse C, Manning B, Basdevant A, Guy-Grant B, Ruiz J, Silver K, Shuldiner AR, Froguel P, Strosberg A. Genetic variation in the beta-3-adrenergic-receptor and an increased capacity to gain weight in patients with morbid obesity. New Eng. J. Med. 333: 352-354, 1995.
- 102- Bracale R, Pasanisi F, Labruna G, Finelli C, Nardelli C, Buono P, Salvatori G, Sacchetti L, Contaldo F, Oriani G. Metabolic syndrome and ADRB3 gene polymorphism in severely obese patients from South Italy. Eur J Clin Nutr. 2007 Oct;61(10):1213-9. Epub 2007 Feb 14.
- 103- Lima JJ, Feng H, Duckworth L, Wang J, Sylvester JE, Kisson N, Garg H. Association analyses of adrenergic receptor polymorphisms with obesity and metabolic alterations. Metabolism. 2007 Jun;56(6):757-65.

- 104- de Luis DA, Aller R, Izaola O, Gonzalez Sagrado M, Conde R. Relation of Trp64Arg polymorphism of beta 3-adrenergic receptor gene to adipocytokines and fat distribution in obese patients. *Ann Nutr Metab.* 2008;52(4):267-71.
- 105- Dunajska K, Lwow F, Milewicz A, Jedrzejuk D, Laczanski L, Belowska-Bien K, Urban J, Szuba A. beta(3)-adrenergic receptor polymorphism and metabolic syndrome in postmenopausal women. *Gynecol Endocrinol.* 2008 Mar;24(3):133-8
- 106- Tafel J, Branscheid I, Skwarna B, Schlimme M, Morcos M, Algenstaedt P, Hinney A, Hebebrand J, Nawroth P, Hamann A. Variants in the human beta 1-, beta 2-, and beta 3-adrenergic receptor genes are not associated with morbid obesity in children and adolescents. *Diabetes Obes Metab.* 2004 Nov;6(6):452-5.
- 107- Vieira-Filho JP, Reis AF, Kasamatsu TS, Tavares EF, Franco LJ, Matioli SR, Moisés RS. Influence of the polymorphisms Trp64Arg in the beta 3-adrenergic receptor gene and Pro12Ala in the PPAR gamma 2 gene on metabolic syndrome-related phenotypes in an indigenous population of the Brazilian Amazon. *Diabetes Care.* 2004 Feb;27(2):621-2
- 108- Nakashima H, Omae K, Nomiya T, Yamano Y, Takebayashi T, Sakurai Y. Beta-3-adrenergic receptor Trp64Arg polymorphism: does it modulate the relationship between exercise and percentage of body fat in young adult Japanese males? *Environ Health Prev Med.* 2013 Jan 6.
- 109- Li LS, Lönnqvist F, Luthman H, Arner P. Phenotypic characterization of the Trp64Arg polymorphism in the beta 3-adrenergic receptor gene in normal weight and obese subjects. *Diabetologia.* 1996 Jul;39(7):857-60.

- 110- Yamakita M, Ando D, Tang S, Yamagata Z. The Trp64Arg polymorphism of the beta3-adrenergic receptor gene is associated with weight changes in obese Japanese men: a 4-year follow-up study. *J Physiol Anthropol.* 2010;29(4):133-9.
- 111- Corbalán MS, Marti A, Forga L, Martínez-Gonzalez MA, Martínez JA. The risk of obesity and the Trp64Arg polymorphism of the beta(3)-adrenergic receptor: effect modification by age. *Ann Nutr Metab.* 2002;46(3-4):152-8.
- 112- Dishy V, Gupta S, Landau R, Xie HG, Kim RB, Smiley RM, Byrne DW, Wood AJ, Stein CM. G-protein beta(3) subunit 825 C/T polymorphism is associated with weight gain during pregnancy.
- 113- Casiglia E, Tikhonoff V, Caffi S, Martini B, Guidotti F, Bolzon M, Bascelli A, D'Este D, Mazza A, Pessina AC. Effects of the C825T polymorphism of the GNB3 gene on body adiposity and blood pressure in fertile and menopausal women: a population-based study. *J Hypertens.* 2008 Feb;26(2):238-43.
- 114- Hayakawa T, Takamura T, Abe T, Kaneko S. Association of the C825T polymorphism of the G-protein b3 subunit gene with hypertension, obesity, hyperlipidemia, insulin resistance, diabetes, diabetic complications, and diabetic therapies among Japanese. *Metabolism* 2007; 56:44–48.
- 115- Snapir A, Heinonen P, Tomi-Pekka Tuomainen, Lakka TA, Kauhanen J, Salonen JT, Scheinin M. G-protein beta3 subunit C825T polymorphism: no association with risk for hypertension and obesity. *Journal of Hypertension* 2001, Vol 19 No 12: 2149-55.
- 116- Labayen I, Moreno LA, Marti A, Gonzalez-Lamuño D, Wärnberg J, Ortega FB, Bueno G, Nova E, Ruiz JR, Garagorri JM, Martínez JA, García Fuentes M, Bueno M,

AVENA Study Group. Effect of the Ala12 Allele in the PPAR<sub>-2</sub> Gene on the Relationship Between Birth Weight and Body Composition in Adolescents: The AVENA Study *Pediatr Res.* 2007 Nov; 62(5):615-9.

- 117- Deeb SS, Fajas L, Nemoto M, Pihlajamaki J, Mykkanen L., Kuusisto J, Laakso M, Fujimoto W, Auwerx J. A Pro12Ala substitution in PPARG2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nat. Genet.* 1998; 20 (3), 284–287.
- 118- Lohmueller, K. E.; Pearce, C. L.; Pike, M.; Lander, E. S.; Hirschhorn, J. N.: Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. *Nature Genet.* 33: 177-182, 2003.
- 119- Canizales-Quinteros S. Aguilar-Salinas CA. Ortiz-Lopez MG. Rodriguez-Cruz M. Villarreal-Molina MT. Coral-Vazquez R. Huertas-Vazquez A. Hernandez-Caballero A. Lopez-Alarcon M. Brito-Zurita OR. Dominguez-Banda A. Martinez-Sanchez LR. Canto-de Cetina T. Vilchis-Dorantes G. Rosas-Vargas H. Granados-Silvestre MA. Medeiros-Domingo A. Menjivar M. Tusie-Luna MT. Association of PPARG2 Pro12Ala variant with larger body mass index in Mestizo and Amerindian populations of Mexico. *Human Biology.* 2007 Feb. 79(1):111-9.
- 120- Goyenechea E, Parra Dolores M, Martinez Alfredo. Implicación de la IL-6 y su polimorfismo -174g>C en el control del peso corporal y en las complicaciones metabólicas asociadas a la obesidad. *An. Sist. Sanit. Navar.* 2005, Vol. 28, N°2, mayo-agosto.
- 121- Endo K, Yanagi H, Hiramio C, Hamaguchi H, Tsuchya S & Tomura S: Association of Trp64Arg polymorphism of the b3-adrenergic receptor gene and no association of

- Gln223Arg polymorphism of the leptin receptor gene in Japanese schoolchildren with obesity. *Int. J. Obes.* (2000) 24, 443–449.
- 122- Hinney A, Lentjes KU, Rosenkranz K, Barth N, Roth H, Ziegler A, Henninghausen K, Coners H, Wurmser H, Jacob K, Römer G, Winnikes U, Mayer H, Herzog W, Lehmkuhl G, Poustka F, Schmidt MH, Blum WF, Pirke KM, Schäfer H, Grzeschik KH, Remschmidt H & Hebebrand J (1997):  $\beta$ 3-Adrenergic-receptor allele distributions in children, adolescents and young adults with obesity, underweight and anorexia nervosa. *Int. J. Obes.* 21, 224–230.
- 123- Urhammer SA, Hansen T, Borch-Johnsen K & Pedersen O: Studies of the synergistic effect of the Trp64Arg polymorphism of the  $\beta$ 3-adrenergic receptor gene and the –3826 A G variant of the uncoupling protein-1 gene on features of obesity and insulin resistance in a population-based sample of 379 young Danish subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* (2000)85, 3151–3154.
- 124- Lauria F, Siani A, Bammann K, Foraita R, Huybrechts I, Iacoviello L, Koni AC, Kourides Y, Marild S, Molnar D, Moreno LA, Pigeot I, Pitsiladis YP, Veidebaum T, Russo P; IDEFICS Consortium. Prospective analysis of the association of a common variant of FTO (rs9939609) with adiposity in children: results of the IDEFICS study. *PLoS One.* 2012;7(11):e48876.
- 125- Loos RJ. The genetic epidemiology of melanocortin 4 receptor variants. *Eur J Pharmacol.* 2011 Jun 11;660(1):156-64
- 126- Cauchi, S., Stutzmann, F., Cavalcanti-Proena, C., Durand, E., Pouta, A., Hartikainen, A.L., Marre, M., Vol, S., Tammelin, T., Laitinen, J., Gonzalez-Izquierdo, A., Blakemore, A., Elliott, P., Meyre, D., Balkau, B., Jarvelin, M.R., Froguel, P., 2009.

Combined effects of MC4R and FTO common genetic variants on obesity in European general populations. *J. Mol. Med.* 87, 537–546.

- 127- Liem, E.T., Vonk, J.M., Sauer, P.J., van der Steege, G., Oosterom, E., Stolk, R.P., Snieder, H., 2010. Influence of common variants near INSIG2, in FTO, and near MC4R genes on overweight and the metabolic profile in adolescence: the TRAILS (Tracking Adolescents' Individual Lives Survey) Study. *Am. J. Clin. Nutr.* 91, 321–328.
- 128- Zhao, J., Bradfield, J.P., Li, M., Wang, K., Zhang, H., Kim, C.E., Annaiah, K., Glessner, J.T., Thomas, K., Garris, M., Frackelton, E.C., Otieno, F.G., Shaner, J.L., Smith, R.M., Chiavacci, R.M., Berkowitz, R.I., Hakonarson, H., Grant, S.F.A., 2009. The role of obesity-associated loci identified in genome-wide association studies in the determination of pediatric BMI. *Obesity Res.* 17, 2254–2257.
- 129- den Hoed, M., Ekelund, U., Brage, S., Grontved, A., Zhao, J.H., Sharp, S.J., Ong, K.K., Wareham, N.J., Loos, R.J., 2010. Genetic susceptibility to obesity and related traits in childhood and adolescence; influence of loci identified by genome-wide association studies. *Diabetes* 59, 2980–2988.
- 130- Wu, L., Xi, B., Zhang, M., Shen, Y., Zhao, X., Cheng, H., Hou, D., Sun, D., Ott, J., Wang, X., Mi, J., 2010. Associations of six single nucleotide polymorphisms in obesity-related genes with body mass index and risk of obesity in the Chinese children. *Diabetes* 59, 3085–3089.
- 131- Ng, M.C.Y., Tam, C.H.T., So, W.Y., Ho, J.S.K., Chan, A.W., Lee, H.M., Wang, Y., Lam, V.K.L., Chan, J.C.N., Ma, R.C.W., 2010. Implication of genetic variants near NEGR1, SEC16B, TMEM18, ETV5/DGKG, GNPDA2, LIN7C/BDNF, MTCH2, BCDIN3D/FAIM2, SH2B1, FTO, MC4R, and KCTD15 with obesity and type 2 diabetes in 7705 Chinese. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95, 2418–2425.

- 132- Grant, S.F.A., Bradfield, J.P., Zhang, H., Wang, K., Kim, C.E., Annaiah, K., Santa, E., Glessner, J.T., Thomas, K., Garris, M., Frackelton, E.C., Otieno, F.G., Shaner, J.L., Smith, R.M., Imielinski, M., Chiavacci, R.M., Li, M., Berkowitz, R.I., Hakonarson, H., 2009. Investigation of the locus near MC4R with childhood obesity in Americans of European and African ancestry. *Obesity Res.* 17, 1461–1465.
- 133- Barbieri M, Rizzo MR, Papa M, Acampora R, De Angelis L, Olivieri F, Marchegiani F, Franceschi C, Paolisso G. Role of interaction between variants in the PPARG and interleukin-6 genes on obesity related metabolic risk factors. *Exp Gerontol.* 2005 Jul; 40(7) :599-604.