

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II



**ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS DE GENES ASOCIADOS
AL SÍNDROME METABÓLICO EN NIÑOS OBESOS**

Tesis Doctoral para optar al grado de Doctor por la Universidad de Granada
presentada por:

Josune Olza Meneses

Bajo la dirección de los doctores:

Ángel Gil Hernández

Concepción M. Aguilera García

Mercedes Gil Campos

Granada, 2011.

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Josune Olza Meneses
D.L.: GR 3786-2011
ISBN: 978-84-694-4453-5

D. Ángel Gil Hernández, Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Universidad de Granada.

Dña. Concepción M. Aguilera García, Profesora Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Universidad de Granada.

Dña. Mercedes Gil Campos, Médico Pediatra de la Unidad de Metabolismo e Investigación Pediátrica del Instituto Maimónides de Investigación Biomédica y del Servicio de Pediatría del Hospital Reina Sofía de Córdoba.

Informan:

Que el trabajo titulado “ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS DE GENES ASOCIADOS AL SÍNDROME METABÓLICO EN NIÑOS OBESOS” ha sido realizado por Josune Olza Meneses bajo su dirección, y que reúne todos los requisitos para ser defendido y optar al grado de Doctor.

Y para que conste donde proceda, se firma este certificado en Granada el de
de 2011

Dr. Ángel Gil Hernández

Dra. Concepción M. Aguilera García

Dra. Mercedes Gil Campos

D. Alberto Vargas Morales, Catedrático y Director del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Universidad de Granada.

Certifica:

Que el trabajo titulado “ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS DE GENES ASOCIADOS AL SÍNDROME METABÓLICO EN NIÑOS OBESOS” ha sido realizado por Josune Olza Meneses en las instalaciones del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada, donde están ubicados los laboratorios del grupo de investigación CTS-461 Bioquímica Nutricional: Implicaciones terapéuticas, perteneciente a este Departamento.

Y para que conste donde proceda, se firma este certificado en Granada el de
de 2011

Dr. Alberto Vargas Morales.

ÍNDICE

RESUMEN	1
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	33
INTRODUCCIÓN	37
Obesidad infantil: aspectos generales	37
<i>Concepto y prevalencia</i>	37
<i>Alteraciones estructurales y funcionales del tejido adiposo</i>	41
Síndrome metabólico en la infancia	43
<i>Definición y origen del síndrome metabólico</i>	43
<i>Componentes del Síndrome metabólico</i>	49
<i>Adiposidad</i>	49
<i>Metabolismo glucídico y resistencia a la insulina</i>	50
<i>Hipertensión arterial</i>	52
<i>Dislipemia</i>	53
Genética de la obesidad	54
<i>Tipos de estudios genéticos en obesidad</i>	55
<i>Estudios de ligamiento</i>	55
<i>Estudios de asociación genética</i>	56
<i>Estudios amplios de asociación del genoma</i>	58
<i>Síndromes monogénicos y alteraciones cromosómicas o síndromes mendelianos</i>	59
<i>Alteraciones poligénicas</i>	60
<i>Genes candidatos en la obesidad poligénica</i>	61
<i>Futuro de la investigación en genética</i>	65
Genes asociados con la obesidad estudiados en este trabajo	66
<i>FTO</i>	66
<i>NPY</i>	70
<i>HSD11B1</i>	74
<i>MAP3K4</i>	76
<i>Vías de la MAPK</i>	76
<i>La JNK y p38MAPKs en la obesidad y el síndrome metabólico</i>	77
<i>El gen de la MAP3K4</i>	80
METODOLOGÍA	83
Diseño experimental	83
<i>Criterios de inclusión</i>	84
<i>Criterios de exclusión</i>	84
Métodos	84

<i>Exploración física y antropometría</i>	85
<i>Medida de tensión arterial</i>	85
<i>Toma de muestras</i>	85
<i>Determinaciones analíticas</i>	86
<i>Hematología y recuento leucocitario</i>	86
<i>Análisis bioquímicos generales</i>	86
<i>Determinación de hormonas</i>	87
<i>Determinación de adipocinas, marcadores de inflamación, de daño endotelial y de riesgo de enfermedad cardiovascular</i>	87
<i>Determinación de LDL oxidadas</i>	93
<i>Clasificación de síndrome metabólico</i>	94
<i>Análisis estadístico</i>	94
<i>Genotipado de las muestras</i>	98
<i>Procesamiento de las muestras</i>	98
<i>Selección de polimorfismos</i>	98
<i>Hibridación del array. Análisis de los controles</i>	99
<i>Análisis bioinformático</i>	101
<i>Filtrado inicial</i>	102
<i>Equilibrio de Hardy Weinberg</i>	102
<i>Análisis estadístico</i>	103
RESULTADOS	107
Características generales de la población estudiada	107
Síndrome Metabólico	110
Prevalencia de síndrome metabólico	110
<i>Análisis de Concordancia</i>	110
<i>Análisis de componentes principales de las características asociadas al síndrome metabólico</i>	111
<i>Análisis de regresión logística múltiple de factores de riesgo asociados al SM</i>	114
Análisis de genotipado	114
<i>Características de la población genotipada</i>	114
<i>Análisis de asociación con obesidad</i>	116
<i>Análisis de polimorfismos de los genes más relevantes</i>	120
<i>FTO</i>	120
<i>NPY</i>	139
<i>HSD11B1</i>	147
<i>MAP3K4</i>	153

DISCUSIÓN	161
Síndrome Metabólico	161
<i>FTO</i>	163
<i>NPY</i>	166
<i>HSD11B1</i>	168
<i>MAP3K4</i>	171
CONCLUSIONES	173
BIBLIOGRAFÍA	177
ANEXOS	195
Abreviaturas	197
Anexo 1	201

Summary

Introduction

Childhood obesity is currently a major public health problem, resulting in increased morbidity and mortality, while representing a high economic burden on healthcare systems. The prevalence of obesity has increased at an alarming rate. The problem is global and is steadily affecting not only developed countries but also many low- and middle-income countries, particularly in urban areas. Globally, in 2010 the number of overweight children under the age of five was estimated to be over 42 million. Close to 35 million of these are living in developing countries (WHO 2011).

Childhood obesity is characterized by low-grade inflammation that leads to numerous co-morbidities such as hypertension, insulin resistance, dyslipidemia, diabetes mellitus type 2, steatosis, orthopedic problems and sleep apnea, among others, that may appear in the short or long term. Several studies have demonstrated an association between childhood obesity and the risk of cardiovascular disease in adulthood (Freedman *et al.* 2004), as well as changes in body mass index over time and the prediction of increased concentrations of lipids and lipoproteins in adulthood (Lauer *et al.* 1988).

The association of hypertension, hypertriglyceridemia, low (high-density lipoprotein) HDL cholesterol, and impaired glucose metabolism that tend to cluster in obese subjects is termed metabolic syndrome. Insulin resistance appears to be the key in the development of metabolic syndrome, which in turn is strongly associated with the risk of cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus. The prevalence of metabolic syndrome in children has also increased in recent decades, reaching levels of up to 40 percent in some countries (Tailor *et al.* 2009).

Besides defined as an imbalance between caloric intake and expenditure, it is known that childhood obesity is related to a number of genetic alterations. According to the characteristics of these alterations it may be monogenic obesity due to the alteration of a specific gene, syndromic obesity represented by clearly identified and recognized entities, namely chromosomal alterations as the case of Prader-Willi syndrome, and polygenic obesity because of single nucleotide polymorphisms (SNPs) and other structural genetic variants affecting various genes.

In recent years through the human genome wide association studies (GWAS) several gene variants associated with many complex diseases, as in the case of obesity, have been identified. Within that context some causal alleles have been reported; however, most of them confer a moderate risk as they explain a very low proportion of the etiology of those diseases. There is strong evidence that rare variants play an important role in the etiology of complex diseases and can have major effects than common genetic variants. This has exposed a major limitation of the GWAS, because they have left out a large number of rare variants, and has created the need to seek other alternatives for consideration such as the selection of candidate genes with differential expression, sequencing of the specific regions of each gene or possibly the entire genome, the use of high-resolution GWAS, which include gene variants with allele frequencies below 5 percent or the use of case-control studies applying new technologies. These and other developments open the door to a new generation of genomic studies in the coming years that will bring new insights into the origin of many diseases.

With this background, the aim of the present research was to find potential associations between selected SNPs for a number of genes that had been previously demonstrated to be differentially expressed in omental adipose tissue for obese children, as well as other candidate genes, with childhood obesity and the metabolic syndrome and its phenotypes.

Material and Methods

A total of 995 children aged 5-14 years, 478 obese (213 female; 265 male), all Caucasian, were recruited from primary care centers and schools in three Spanish cities (Cordoba, Santiago de Compostela and Zaragoza). Childhood obesity was defined according to Cole *et al.* (2000). Inclusion criteria were: absence of disease related with nutritional status or endogenous obesity. Exclusion criteria were: the presence of disease or undernutrition and the use of medication that alters blood pressure (BP) or glucose or lipid metabolism. After initial assessments at the school or primary care center, parents of children fulfilling the inclusion criteria were invited to bring them to the Pediatric Endocrinology Unit in the appropriated participating hospital for a clinical examination. Their parents or guardians were informed about the purpose and procedures of the study before written consent was obtained,

and all children gave their assent. The study was approved by the Ethics Committees of all participating institutions and complied with the Declaration of Helsinki (Edinburgh 2000 revised) and following the recommendations of the Good Clinical Practice of the CEE (Document 111/3976/88 July 1990) and the legal in force Spanish regulation that regulates the Clinical Investigation in human beings (RD 223/04 about Clinical Assays).

After a detailed clinical history and a complete examination, arterial BP as well as height, weight and waist circumference were measured. A complete blood count and routine biochemical analyses were done after 12 h overnight fasting. Serum from one EDTA-coated tube was centrifuged 5 minutes at 1750 g and the plasma was frozen at -80°C for future analyses.

Children were classified according to seven different definitions of MS. (Table 1).

Adipokines (Adiponectin, resistin and leptin), inflammatory (IL-6, IL-8, TNF α and MCP-1) and CVD biomarkers (MMP-9, MPO, sE-selectin, sVCAM-1, sICAM-1 and total and active PAI-1) were measured by immunoassay, with a MILLIplex™ kit using the Luminex 200 system. CRP was determined with a turbidimetric immunoassay.

DNA isolation and genotyping

A subsample of 292 (149 male and 143 female) obese children and 242 (135 male and 107 female) normal weight children were selected for genotyping analysis.

Genomic DNA was extracted from buffy coats using QIAamp Blood kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). A total of 52 SNPs in the *fat mass and obesity associated (FTO)* gene, 10 SNPs in the *hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 1 (HSD11B1)* gene, 8 SNPs on the *neuropeptide Y (NPY)* gene and 22 in the *mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4 (MAP3K4)* gene plus 1444 SNPs from different genes were selected from the HapMap and NCBI databases among those with a minor allele frequency (MAF) higher than 0.05 and a minimum pair wise LD of $r^2=0.8$ for Caucasian population.

Genotyping was performed using the Illumina GoldenGate (Illumina, San Diego, CA, USA) protocols on 96-well format Sentrix® arrays. Two hundred and fifty nanograms of DNA sample was used per assay. Typing of the SNPs resulted in genotype success rates >95%, except for the rs846906 (*HSD11B1*), rs16148 (*NPY*) and rs12174748 (*MAP3K4*) that

were excluded from the analysis. Hardy–Weinberg equilibrium for each SNP was examined and we found that rs16479 and rs16139 from *NPY* gene, rs625977 and rs70828 from *MAP3K4* gene, and rs1125337, rs9929152, rs16952649, rs8053966 y rs8054364 from *FTO* gene did not reach the equilibrium in the control group, for this reason were also excluded from the analysis. Finally, the genotyping for the rs2528950 (*MAP3K4*) and rs5574 (*NPY*) failed.

Table 1. Criteria for diagnosis of metabolic syndrome in the pediatric age (all definitions considered a child as having the metabolic syndrome when three or more of the following characteristics were present).

Study	Population (ethnic group, age and sex)	Excess adiposity	Blood Pressure	Lipids	Glucose	Insulin
Cook <i>et al</i> (2003)	White, black and Mexican-American 12-19 yr Male and Female	Waist circumference ≥ 90 th percentile.	Systolic or diastolic blood pressure ≥ 90 th percentile.	Triacylglycerols ≥ 110 mg/dl HDL cholesterol ≤ 40 mg/dl.	≥ 110 mg/dl.	
de Ferranti <i>et al</i> (2004)	Mexican-American, non-Hispanic whites and non-Hispanic blacks 12-19 yr Male and Female	Waist circumference > 75 th percentile.	Systolic blood pressure > 90 th percentile.	Triacylglycerols ≥ 100 mg/dl HDL cholesterol < 50 mg/dl.	≥ 110 mg/dl.	
Weiss <i>et al</i> (2004) ^a	White, black and Hispanic. 4-20 yr Male and Female	BMI > 97 th percentile or <i>z score</i> > 2 .	Systolic blood pressure or diastolic blood pressure > 95 th percentile.	Triacylglycerols > 95 th percentile for age, sex, and race HDL cholesterol < 5 th percentile for age, sex, and race.	IGTT > 140 and < 200 mg/dl, at two hrs.	
Cruz <i>et al</i> (2004) ^a	Hispanic (Mexican-American, Central American, or mixed) 8- 13 yr Male and Female	Waist circumference ≥ 90 th percentile.	Systolic blood pressure or diastolic blood pressure > 90 th percentile.	Triacylglycerols ≥ 90 th percentile for age, sex and race HDL cholesterol ≤ 10 th percentile for age, sex and race.	IGTT: Glucose at 120 min ≥ 140 mg/dl and < 200 mg/dl.	
Viner <i>et al</i> (2005) ^b	White, black, south Asian, and other or mixed ethnicity. 2-18 yr Males and Females	BMI ≥ 95 th percentile.	Systolic blood pressure ≥ 95 th percentile.	Any of the following: high triacylglycerols (≥ 150 mg/dl), low HDL cholesterol (< 35 mg/dl), or high total cholesterol (≥ 95 th percentile).	Any of the following: fasting hyperinsulinemia (prepubertal ≥ 15 mU/l, mid-puberty (stages 2-4) ≥ 30 mU/l and post-pubertal ≥ 20 mU/l), impaired fasting glucose	

					(≥ 110 mg/dl) or impaired glucose tolerance: glucose at 120 min ≥ 140 mg/dl.
Ford <i>et al</i> (2005)	12-17 yr Male and Female	Waist circumference ≥ 90 th percentile.	Systolic blood pressure or diastolic blood pressure ≥ 90 th percentile.	Triacylglycerols ≥ 110 mg/dl HDL cholesterol ≤ 40 mg/dl.	≥ 100 mg/dl.
IDF (2007)	10- <16 yr ^c	Waist circumference ≥ 90 th percentile.	Systolic blood pressure ≥ 130 or diastolic blood pressure ≥ 85 mm Hg.	Triacylglycerols ≥ 150 mg/dl HDL cholesterol < 40 mg/dl.	≥ 100 mg/dl.

^aWeiss *et al* (2002) and Cruz *et al* definitions were modified, because we measure plasma fasting glucose and did not performance the OGTT

^bViner *et al* (2004) defines Insulin Resistance Syndrome, not metabolic syndrome.

^cThis definition considers waist circumference as a *sine qua non* condition for the metabolic syndrome

Statistical analysis

Metabolic syndrome statistical analysis

Data were expressed as means \pm standard error of the mean. Variables with an abnormal distribution according to the Kolmogorov-Smirnov test were log-transformed before analysis. Homogeneity of variances was estimated using the Levene test. A two-way ANOVA was applied to evaluate the effects of weight status (normal weight/ overweight/ obese) and sex in the prepubertal and pubertal children, and a posteriori Bonferroni or Tamhane tests were used depending of the homogeneity of the variances. The chi-square test was applied for proportion comparisons. A principal-component factor analysis was used to investigate the clustering of the metabolic syndrome in prepubertal and pubertal obese children. Extraction of the initial set of uncorrelated components was done by the principal-factor method, and interpretation was facilitated by means of the Varimax orthogonal rotation of components. After eliminating colinearity (systolic and diastolic blood pressure, insulin, and HOMA-IR), six variables related to the metabolic syndrome were included in the factor analysis (BMI or WC *z-scores*, systolic blood pressure, plasma triacylglycerols, HDL cholesterol, fasting glucose, and HOMA-IR). These components were included because they accounted for more of the total variance than any single variable (Eigenvalue >1), based on Scree plot analysis. Factor loading was used to interpret the factor structure. We defined factor loadings from 0.2 through 0.4 as indicating marginal correlation, loadings above 0.4 through 0.6 as moderate correlation, loadings above 0.6 through 0.8 as strong correlation, and loadings above 0.8 as indicating very strong correlation. Statistical significance was considered when $P < 0.05$. SPSS software (version 15.01, SPSS Inc. Chicago, IL, USA) was used for statistical analyses.

Biochemical and Inflammatory Biomarkers and Genotyping statistical analysis

All continuous variables were expressed as mean \pm SD. Normality distribution of clinical parameters data was assessed by the Kolmogorov-Smirnov test. Insulin, HOMA, total cholesterol, MMP-9 and tPAI-1 were logarithmically transformed to approximate normal distributions. Homogeneity of variances was estimated using the Levene test. Mean comparisons between obese and normal-weight children for continuous variables were compared by Student's t-test for unpaired samples. The genotypic relative risk was assessed by comparing the obese group with the control group and calculating the odds ratio (OR) and

the 95% confidence interval (CI), using a logistic regression analysis under the additive model implemented in PLINK after adjusting by age and sex. Linear regressions in the entire population, or separately per case and control group, were performed under the additive model to estimate the associations of each SNP with phenotypic parameters related with obesity and its complications. All statistical analyses were performed with PARTEK, PLINK version 1.07 (available at <http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink>), R package (library SNPassoc) or SPSS (version 15.0.1).

Results

Anthropometric and metabolic characteristics of the entire population

Table 2 shows the anthropometric and metabolic characteristics of the subjects by pubertal stage and sex. In the obese males and females, the BMI *z-score* was >3 in both prepubertal and pubertal children. In the obese prepubertal and pubertal children, WC was significantly higher in males than in females. Systolic and diastolic blood pressure significantly increased with higher BMI in both prepubertal and pubertal children. Triacylglycerols significantly increased and HDL cholesterol significantly decreased with higher BMI in both sexes. BMI, BMI *z score*, HDL cholesterol, and fasting glucose values were higher in males than in females in prepubertal but not in pubertal obese children. Except in prepubertal males, fasting glucose showed no significant differences as a function of BMI status. However, fasting insulin and HOMA-IR showed a significant increase with higher BMI. The percentage of obese children with insulin concentration >15 mU/l was 23.7% for prepubertal females, 19.4% for prepubertal males, 57.8% for pubertal females, and 51.4% for pubertal males.

Presence of the metabolic syndrome

The highest proportion of metabolic syndrome (34.20%) was found using de Ferranti *et al.* and the lowest (8.3%) using Weiss *et al* classifications. The other classifications have: Ford *et al* (20.9 %), Cook *et al* (16.8%), Vinner *et al* (14.2%), Cruz *et al* (10.7%) and IDF (9.2%). The frequency was higher in the pubertal versus prepubertal children only when the de Ferranti *et al* definition was used.

Table 2. Anthropometric and metabolic characteristics of the studied population, according to sex, pubertal status and BMI

	Prepubertal				Pubertal			
	Normal weight (N=222)	Overweight (N=146)	Obese (N=321)	P by weight status	Normal weight (N=67)	Overweight (N=81)	Obese (N=157)	P by weight status
Sex no. (percent)								
Female	99(31.4)	75(23.8)	141(44.8)	0.300	31(17.6) ^a	60(34.1) ^b	85(48.3) ^c	<0.001
Male	123(32.9)	71(19.0)	180(48.1)	0.300	36(27.9) ^a	21(16.3) ^b	72(55.8) ^c	<0.001
P by sex	0.107	0.741	0.029		0.373	<0.001	0.299	
Age (yr)								
Female	9.0 ± 0.1 ^a	8.8 ± 0.2 ^{ab}	8.3 ± 0.2 ^b	0.003	12.8 ± 0.2 ^a	12.9 ± 0.2 ^a	12.2 ± 0.2 ^b	0.016
Male	9.1 ± 0.1	9.4 ± 0.2	9.4 ± 0.1	0.307	12.5 ± 0.2	13.0 ± 0.3	12.8 ± 0.1	0.348
P by sex	0.536	0.023	<0.001		0.412	0.726	0.012	
BMI (kg/m ²)								
Female	16.8 ± 0.2 ^a	20.9 ± 0.2 ^b	26.4 ± 0.3 ^c	<0.001	19.4 ± 0.5 ^a	24.7 ± 0.2 ^b	30.0 ± 0.4 ^c	<0.001
Male	16.7 ± 0.1 ^a	21.3 ± 0.2 ^b	27.6 ± 0.3 ^c	<0.001	19.2 ± 0.4 ^a	24.1 ± 0.4 ^b	30.6 ± 0.4 ^c	<0.001
P by sex	0.768	0.293	0.005		0.749	0.186	0.343	
BMI <i>z score</i>								
Female	-0.19 ± 0.05 ^a	1.11 ± 0.05 ^b	3.05 ± 0.91 ^c	<0.001	-0.03 ± 0.13 ^a	1.48 ± 0.05 ^b	3.11 ± 0.11 ^c	<0.001
Male	-0.17 ± 0.05 ^a	1.43 ± 0.05 ^b	3.80 ± 0.10 ^c	<0.001	0.03 ± 0.10 ^a	1.36 ± 0.94 ^b	3.37 ± 0.15 ^c	<0.001
P by sex	0.772	<0.001	<0.001		0.704	0.257	0.153	
Waist circumference (cm)								
Female	58.8 ± 0.8 ^a	67.6 ± 1.3 ^b	78.7 ± 1.0 ^c	<0.001	69.9 ± 1.2 ^a	78.3 ± 0.9 ^b	86.6 ± 1.2 ^c	<0.001
Male	58.5 ± 0.6 ^a	69.5 ± 1.4 ^b	83.2 ± 0.9 ^c	<0.001	69.6 ± 1.2 ^a	80.8 ± 1.5 ^b	93.8 ± 1.2 ^c	<0.001
P by sex	0.749	0.314	0.001		0.869	0.160	<0.001	
Systolic blood pressure (mm Hg)								
Female	97 ± 1 ^a	101 ± 1 ^a	109 ± 1 ^b	<0.001	101 ± 2 ^a	112 ± 1 ^b	118 ± 1 ^c	<0.001
Male	95 ± 1 ^a	102 ± 2 ^b	110 ± 1 ^c	<0.001	102 ± 2 ^a	111 ± 3 ^b	120 ± 2 ^c	<0.001
P by sex	0.375	0.538	0.381		0.572	0.912	0.229	
Diastolic blood								

pressure (mm Hg)								
Female	59 ± 1 ^a	62 ± 1 ^a	68 ± 1 ^b	<0.001	61 ± 2 ^a	66 ± 1 ^{ab}	70 ± 2 ^b	0.002
Male	57 ± 1 ^a	62 ± 1 ^b	68 ± 1 ^c	<0.001	59 ± 1 ^a	67 ± 2 ^b	71 ± 1 ^b	<0.001
P by sex	0.098	0.791	0.938		0.281	0.695	0.486	
Triacylglycerols (mg/dl)								
Female	59 ± 3 ^a	62 ± 3 ^a	81 ± 3 ^b	<0.001	61 ± 4 ^a	64 ± 3 ^a	81 ± 4 ^b	0.001
Male	53 ± 2 ^a	65 ± 4 ^b	73 ± 3 ^b	<0.001	69 ± 6 ^a	77 ± 9 ^{ab}	93 ± 7 ^b	0.029
P by sex	0.035	0.468	0.097		0.248	0.088	0.149	
HDL cholesterol (mg/dl)								
Female	64 ± 2 ^a	56 ± 1 ^b	50 ± 1 ^c	<0.001	60 ± 2 ^a	52 ± 2 ^b	48 ± 2 ^b	<0.001
Male	66 ± 1 ^a	61 ± 2 ^b	54 ± 1 ^c	<0.001	59 ± 2 ^a	50 ± 3 ^b	47 ± 1 ^b	<0.001
P by sex	0.266	0.012	0.005		0.676	0.482	0.576	
Fasting Glucose (mg/dl)								
Female	84 ± 1	85 ± 1	85 ± 1	0.530	91 ± 1	89 ± 1	89 ± 1	0.300
Male	84 ± 1 ^a	87 ± 1 ^b	87 ± 1 ^b	0.006	93 ± 1	89 ± 1	90 ± 1	0.064
P by sex	0.863	0.186	0.044		0.258	0.966	0.326	
Fasting Insulin (mU/l)								
Female	5.9 ± 0.3 ^a	7.2 ± 0.5 ^a	11.9 ± 0.7 ^b	<0.001	13.3 ± 1.9 ^a	11.8 ± 0.7 ^a	18.5 ± 1.2 ^b	<0.001
Male	5.1 ± 0.2 ^a	7.5 ± 0.4 ^b	10.6 ± 0.6 ^c	<0.001	8.7 ± 0.8 ^a	10.1 ± 1.2 ^a	17.9 ± 1.2 ^b	<0.001
P by sex	0.037	0.649	0.127		0.019	0.221	0.723	
HOMA-IR								
Female	1.26 ± 0.08 ^a	1.55 ± 0.12 ^a	2.57 ± 0.16 ^b	<0.001	3.12 ± 0.56 ^a	2.64 ± 0.17 ^a	4.15 ± 0.28 ^b	<0.001
Male	1.08 ± 0.05 ^a	1.63 ± 0.10 ^b	2.34 ± 0.14 ^c	<0.001	2.02 ± 0.18 ^a	2.24 ± 0.27 ^a	4.04 ± 0.28 ^b	<0.001
P by sex	0.052	0.626	0.269		0.050	0.235	0.789	

BMI: body mass index; HDL: high-density lipoprotein. HOMA-IR: Homeostatic model assessment of insulin resistance calculated as the product of the fasting insulin level (in milliunits per liter) and the fasting plasma glucose level (in millimoles per liter), divided by 22.5. Results are given as mean ± standard error of the mean. To convert the values for glucose to millimoles per liter, multiply by 0.055; to convert the values for insulin to picomoles per liter, multiply by 6; to convert the values for triacylglycerols to millimoles per liter, multiply by 0.01129; to convert the values for cholesterol to millimoles per liter, multiply by 0.02586. Mean values within the same row with unlike superscript letters were significantly different between groups ($p < 0.05$).

Genotyping results

Characteristics of the genotyped subpopulation

Table 3 shows the clinical characteristics of obese and control genotyping subjects. Weight, height, BMI, BMI *z score* and WC were significantly higher in the obese compared with the normal-weight children. Other biomarkers related to metabolic syndrome were different between both groups: systolic and diastolic BP, plasma triacylglycerols, apo-B, insulin, and HOMA-IR, were higher in the obese children, and plasma total cholesterol, HDL-c and Apo-AI were lower with regard to normal-weight children. Fasting plasma glucose and LDL-c concentrations did not differ between groups. Fasting plasma concentrations of resistin and leptin were significantly higher in obese than in normal-weight subjects, by contrast decreased levels of adiponectin and cortisol were found in obese. The liver enzymes concentration gamma glutamyl transpeptidase (GGT) and alanine transaminase (ALT) were significantly higher in obese children; meanwhile levels of aspartate transaminase (AST) were lower.

Table 3. Anthropometric and biochemical parameters of the genotyped children.

	Normal weight	Obese	P
n	242	292	
Sex (M/F)	135/107	149/143	0.273
Age (y)	9.73 ± 0.2	9.43 ± 0.2	0.172
Weight (kg)	32.9 ± 0.7	55.9 ± 1.0	<0.001
Height (m)	1.37 ± 0.01	1.41 ± 0.01	0.001
BMI (kg/m ²)	17.14 ± 0.13	27.56 ± 0.24	<0.001
BMI <i>z-score</i>	-0.17 ± 0.04	3.49 ± 0.08	<0.001
Waist circumference (cm)	60.2 ± 0.5	84.0 ± 0.9	<0.001
Systolic BP (mm Hg)	97 ± 1	111 ± 1	<0.001
Diastolic BP (mm Hg)	60 ± 1	69 ± 1	<0.001
Glucose (mg/dl)	84 ± 0	85 ± 1	0.772
Insulin (mU/l)	5.95 ± 0.23	11.46 ± 0.51	<0.001
HOMA-IR	1.26 ± 0.05	2.43 ± 0.12	<0.001
Triacylglycerols (mg/dl)	55 ± 1	75 ± 2	<0.001
Apo-AI (mg/dl)	150 ± 2	132 ± 1	<0.001
Apo-B (mg/dl)	67 ± 1	71 ± 1	0.008
Cholesterol (mg/dl)	171 ± 2	165 ± 2	0.012
HDL-c (mg/dl)	64 ± 1	51 ± 1	<0.001
LDL-c (mg/dl)	94 ± 2	97 ± 1	0.144
Adiponectin (mg/l)	28.28 ± 0.77	22.57 ± 0.66	<0.001
Resistin (ug/l)	9.65 ± 0.33	11.71 ± 0.34	<0.001

Leptin ($\mu\text{g/l}$)	4.30 ± 0.26	22.91 ± 0.86	<0.001
Cortisol (nmol/l)	362.71 ± 9.75	286.70 ± 9.00	<0.001
Testosterone ($\mu\text{g/l}$)	0.49 ± 0.09	0.37 ± 0.03	0.263
ALT (U/l)	16.76 ± 0.56	20.85 ± 0.50	<0.001
AST (U/l)	23.70 ± 0.48	21.23 ± 0.40	<0.001
GGT (U/l)	8.39 ± 0.27	10.84 ± 0.29	<0.001

M: male; F: female; BMI: body mass index; BP: blood pressure; HOMA-IR: homeostasis model assessment for insulin resistance; Apo: apolipoprotein; HDL-c: high density lipoproteins; LDL-c: low density lipoprotein. ALT: *alanine* transaminase; AST: *aspartate* transaminase; GGT: gamma-glutamyl transpeptidase.

Cardiovascular risk and inflammatory biomarkers were different between groups (table 4). sICAM-1, sE-selectin as well as MPO and total and active PAI-1 were significantly higher in the obese group compared to the normal-weight group. Likewise, plasma levels of CRP, IL-6, IL-8 and TNF- α were also higher in the obese group whereas MCP-1 concentration did not show any difference between groups.

Table 4. Cardiovascular and inflammation biomarkers of the genotyped children.

	Normal weight	Obese	<i>P</i>
C-reactive protein (mg/l)	0.95 ± 0.23	3.87 ± 0.50	<0.001
Interleukin 6 (ng/l)	4.50 ± 0.53	6.95 ± 0.75	0.012
Interleukin 8 (ng/l)	1.57 ± 0.11	2.16 ± 0.15	0.003
Tumor necrosis factor alpha (ng/l)	3.06 ± 0.11	4.01 ± 0.13	<0.001
Monocyte chemotactic protein 1 (ng/l)	110.5 ± 3.67	110.7 ± 3.50	0.965
Matrix metalloproteinase-9 (ug/l)	79.99 ± 3.15	88.42 ± 3.90	0.636
Myeloperoxidase (ug/l)	13.10 ± 1.16	21.51 ± 1.70	<0.001
Soluble endothelial selectin (ug/l)	22.93 ± 0.76	31.26 ± 1.05	<0.001
Soluble intercellular adhesion molecule 1 (mg/l)	0.153 ± 0.004	0.175 ± 0.005	<0.001
Soluble vascular adhesion molecule 1 (mg/l)	1.14 ± 0.02	1.07 ± 0.02	0.024
Active plasminogen activator inhibitor 1 (ug/l)	5.16 ± 0.27	11.96 ± 0.57	<0.001
Total plasminogen activator inhibitor 1 (ug/l)	18.95 ± 0.85	27.23 ± 1.01	<0.001

Table 5 shows the SNPs significantly associated with obesity in the entire analysis.

Table 5. SNPs associated significantly with obesity.

SNP	Gene	Chromosome	<i>P</i>
rs9935401	<i>FTO</i>	16	0.000020
rs9939609	<i>FTO</i>	16	0.000098
rs9928094	<i>FTO</i>	16	0.000099
rs9930333	<i>FTO</i>	16	0.000197
rs8061518	<i>FTO</i>	16	0.000237

SNP	Gene	Chromosome	P
rs10852521	<i>FTO</i>	16	0.001265
rs3753519	<i>HSD11B1</i>	1	0.002729
rs1534020	<i>MAP3K4</i>	6	0.004542
rs3826945	<i>DF</i>	19	0.005970
rs9365248	<i>MAP3K4</i>	6	0.006069
rs16131	<i>NPY</i>	7	0.007242
rs1867283	<i>NTRK2</i>	9	0.007545
rs5755694	<i>MAPK1</i>	22	0.009484
rs1322482	<i>ZA20D2</i>	9	0.009918
rs6496589	<i>PLIN</i>	15	0.009948
rs816050	<i>TNFRSF1B</i>	1	0.010136
rs11804091	<i>LEPR</i>	1	0.011806
rs11177694	<i>FRS2</i>	12	0.012115
rs10487133	<i>PON2</i>	7	0.012255
rs933271	<i>COMT</i>	22	0.013175
rs16135	<i>NPY</i>	7	0.013545
rs11177719	<i>FRS2</i>	12	0.014110
rs16147	<i>NPY</i>	7	0.014119
rs11760945	<i>UBE2H</i>	7	0.014274
rs9430012	<i>HSD11B1</i>	1	0.014711
rs6672256	<i>HSD11B1</i>	1	0.015360
rs10157275	<i>LEPR</i>	1	0.015923
rs11208659	<i>LEPR</i>	1	0.016049
rs17703883	<i>CYP19A1</i>	15	0.017162
rs11265618	<i>IL6R</i>	1	0.017434
rs6919510	<i>MAP3K4</i>	6	0.018085
rs4122269	<i>PIK3R1</i>	5	0.018240
rs6235	<i>PCSK1</i>	5	0.019724
rs2276310	<i>ARRB1</i>	11	0.019914
rs7626560	<i>PPARG</i>	3	0.022306
rs12050772	<i>CYP19A1</i>	15	0.022496
rs1080750	<i>CNTFR</i>	9	0.023213
rs6954044	<i>GHRHR</i>	7	0.024701
rs7858891	<i>SMARCA2</i>	9	0.024784
rs765771	<i>CDH11</i>	16	0.026332
rs17159769	<i>GHRHR</i>	7	0.026748
rs9458113	<i>MAP3K4</i>	6	0.027005
rs4545755	<i>CYP19A1</i>	15	0.028224
rs10773111	<i>SCARB1</i>	12	0.028468
rs3792752	<i>NPR3</i>	5	0.028544
rs17256948	<i>KIAA1128</i>	10	0.029724
rs3779249	<i>GHRHR</i>	7	0.029966
rs858744	<i>CALCRL</i>	2	0.030540
rs4729189	<i>PON2</i>	7	0.031788
rs9347479	<i>MAP3K4</i>	6	0.032310
rs7906260	<i>KIAA1128</i>	10	0.032883
rs4680	<i>COMT</i>	22	0.036062

SNP	Gene	Chromosome	P
rs659366	<i>UCP2</i>	11	0.036983
rs9930786	<i>CDH11</i>	16	0.037151
rs2235543	<i>HSD11B1</i>	1	0.037562
rs7021817	<i>SMARCA2</i>	9	0.039080
rs9436303	<i>LEPR</i>	1	0.039322
rs16953563	<i>MAP2K1</i>	15	0.040706
rs35195	<i>CDH11</i>	16	0.040903
rs17559596	<i>UBE2H</i>	7	0.041002
rs3842748	<i>INS</i>	11	0.041162
rs4911252	<i>COMMD7</i>	20	0.041183
rs1799964	<i>TNF</i>	6	0.041762
rs3756668	<i>PIK3R1</i>	5	0.041764
rs1800630	<i>TNF</i>	6	0.043449
rs1063311	<i>MAPK1</i>	22	0.044359
rs11201017	<i>KIAA1128</i>	10	0.045652
rs1902584	<i>CYP19A1</i>	15	0.045667
rs13283799	<i>SMARCA2</i>	9	0.046556
rs3763613	<i>CNTFR</i>	9	0.047613
rs9355867	<i>MAP3K4</i>	6	0.048565
rs7902	<i>PIG8</i>	11	0.049494

The analysis of the association with obesity of the SNPs corresponding to the 4 selected genes were adjusted by age and sex, and after Bonferroni correction only the SNPs rs9939609, rs9928094, rs993033, rs9935401 and rs8061518 (*FTO*), rs16147 and rs16131 (*NPY*), rs3753519 (*HSD11B1*) and rs1534020 (*MAP3K4*) remained statistically significant.

The following tables 6 to 14 show only the phenotypes associated significantly with each SNP after adjusted by sex and age using an additive model.

For the SNPs in the *FTO* gene, it can be observed that carrying the risk allele for each of the considered SNPs was positively associated with higher BMI except in the case of rs8061518 which was associated negatively. The rs9939609, rs9928094 (tables 6 and 7), were also associated with WC and MMP-9, the rs9930333 (table 8) only with MMP-9, and the rs9935401 (table 9) only with WC. Apart of being negatively associated with BMI, the rs8061518 exhibited a similar association with diastolic BP, insulin, HOMA-IR, leptin and aPAI-1 (table 10).

Table 6. Significant associations of rs9939609 SNP from gene *FTO* with obesity and related phenotypes.

	TT	AT	AA	β (95%CI)	P
n	162	267	102		
Weight (kg)	42.3 ± 1.4	45.6 ± 1.1	50.1 ± 2.2	3.31(1.52~5.10)	<0.001
BMI	21.69 ± 0.48	22.89 ± 0.36	24.51 ± 0.64	1.32(0.59~2.05)	<0.001
BMI z score	1.48 ± 0.16	1.86 ± 0.13	2.32 ± 0.22	0.45(0.19~0.71)	0.001
Waist circumference (cm)	70.58 ± 1.39	72.85 ± 0.99	77.46 ± 1.71	3.35(0.61~6.10)	0.017
MMP-9 (ug/l)	80.39 ± 4.35	83.62 ± 3.70	92.82 ± 6.05	0.03(0.0002~0.07)	0.049

β coefficients represent the change in absolute traits values of each additional risk allele. General linear models were used to examine associations, with adjustment by age and sex, and with the assumption of an additive effect. BMI: body mass index; MMP-9: Matrix metalloproteinase-9.

Table 7. Significant associations of rs9928094 SNP from gene *FTO* with obesity and related phenotypes.

	AA	AG	GG	β (95%CI)	P
n	155	263	115		
Weight (kg)	42.2 ± 1.4	45.9 ± 1.1	48.8 ± 2.0	3.14(1.37~4.91)	0.001
BMI	21.55 ± 0.49	23.02 ± 0.36	24.12 ± 0.61	1.26(0.53~1.98)	0.001
BMI z score	1.43 ± 0.17	1.88 ± 0.13	2.25 ± 0.20	0.44(0.18~0.69)	0.001
Waist circumference (cm)	70.43 ± 1.40	73.16 ± 1.01	76.45 ± 1.61	2.77(0.03~5.51)	0.048
Apo-AI (mg/dl)	143 ± 2	140 ± 2	136 ± 3	-3.41(-6.72~-0.09)	0.044
MMP-9 (ug/l)	82.36 ± 4.57	80.95 ± 3.67	94.46 ± 5.61	0.04(0.003~0.07)	0.034

β coefficients represent the change in absolute traits values of each additional risk allele. General linear models were used to examine associations, with adjustment by age and sex, and with the assumption of an additive effect. BMI: body mass index; MMP-9: Matrix metalloproteinase-9.

Table 8. Significant associations of rs9930333 SNP from gene *FTO* with obesity and related phenotypes.

	TT	TG	GG	β (95%CI)	P
n	154	262	115		
Weight (kg)	42.4 ± 1.4	46.0 ± 1.1	48.5 ± 2.0	3.07(1.31~4.84)	0.001
BMI	21.60 ± 0.49	23.09 ± 0.36	24.03 ± 0.61	1.23(0.52~1.96)	0.001
BMI z score	1.44 ± 0.17	1.90 ± 0.13	2.23 ± 0.20	0.43(0.18~0.69)	0.001
Apo-AI (mg/dl)	143 ± 2	141 ± 2	135 ± 3	-3.59(-6.90~-0.29)	0.033
MMP-9 (ug/l)	81.61 ± 4.54	80.95 ± 3.71	96.34 ± 5.60	0.04(0.006~0.07)	0.021

β coefficients represent the change in absolute traits values of each additional risk allele. General linear models were used to examine associations, with adjustment by age and sex, and with the assumption of an additive effect. BMI: body mass index; MMP-9: Matrix metalloproteinase-9

Table 9. Significant associations of rs9935401 SNP from gene *FTO* with obesity and related phenotypes.

	GG	AG	AA	β (95%IC)	P
n	167	261	102		
Weight (kg)	42.1 ± 1.4	45.9 ± 1.1	50.1 ± 2.2	3.44(1.66~5.22)	<0.001
BMI	21.56 ± 0.47	23.08 ± 0.37	24.51 ± 0.64	1.37(0.65~2.10)	<0.001
BMI z score	1.42 ± 0.16	1.93 ± 0.13	2.32 ± 0.22	0.47(0.22~0.73)	<0.001
Waist circumference (cm)	70.29 ± 1.35	73.35 ± 1.01	77.46 ± 1.71	3.37(0.62~6.14)	0.017

β coefficients represent the change in absolute traits values of each additional risk allele. General linear models were used to examine associations, with adjustment by age and sex, and with the assumption of an additive effect. BMI: body mass index.

Table 10. Significant associations of rs8061518 SNP from gene *FTO* with obesity and related phenotypes.

	AA	AG	GG	β (95%CI)	P
n	254	215	54		
Weight (kg)	46.8 \pm 1.2	44.9 \pm 1.3	42.6 \pm 2.4	-2.44(-4.35~-0.54)	0.012
BMI	23.70 \pm 0.38	22.33 \pm 0.42	21.48 \pm 0.81	-1.27(-2.05~-0.50)	0.001
BMI z score	2.16 \pm 0.14	1.61 \pm 0.14	1.36 \pm 0.30	-0.45(-0.72~-0.17)	0.001
Diastolic BP (mm Hg)	66 \pm 1	64 \pm 1	61 \pm 1	-2.23(-3.80~-0.65)	0.006
Insulin (mU/l)	9.52 \pm 0.48	8.56 \pm 0.48	8.17 \pm 1.13	-0.05(-0.09~-0.02)	0.003
HOMA-IR	2.02 \pm 0.10	1.80 \pm 0.11	1.79 \pm 0.30	-0.05(-0.09~-0.02)	0.003
Leptin (μg/l)	16.98 \pm 1.02	12.57 \pm 0.85	11.21 \pm 1.70	-3.55(-5.43~-1.66)	<0.001
aPAI-1 (μg/l)	9.81 \pm 0.62	8.45 \pm 0.49	6.16 \pm 0.63	-1.71(-2.80~-0.62)	0.002

β coefficients represent the change in absolute traits values of each additional risk allele. General linear models were used to examine associations, with adjustment by age and sex, and with the assumption of an additive effect. BMI: body mass index; BP: blood pressure; HOMA-IR: homeostatic assessment model for insulin resistance; aPAI-1: active plasminogen activator inhibitor-1.

Apart of the association with parameters related to MS, as it can be observed in table 11 and 12, carrying the risk allele of the *NPY* SNP rs16147 was negatively associated with ALT. In addition, carrying the risk allele for rs16131 was positively associated with leptin and MCP-1.

Table 11. Significant associations of rs16147 SNP from *NPY* gene with obesity and related phenotypes.

	GG	AG	AA	β (95%CI)	P
n	139	251	125		
Weight (kg)	45.0 \pm 1.6	44.3 \pm 1.2	48.1 \pm 1.6	2.21(0.43~4.00)	0.016
BMI	22.37 \pm 0.52	22.36 \pm 0.39	24.22 \pm 0.53	1.03(0.30~1.76)	0.006
BMI z score	1.57 \pm 0.18	1.68 \pm 0.13	2.39 \pm 0.20	0.38(0.12~0.64)	0.004
HDL-c (mg/dl)	58 \pm 1	57 \pm 1	54 \pm 1	-2.18(-3.98~-0.37)	0.018
ALT (U/l)	23 \pm 1	23 \pm 0	21 \pm 1	-0.90(-1.70~-0.09)	0.029

β coefficients represent the change in absolute traits values of each additional risk allele. General linear models were used to examine associations, with adjustment by age and sex, and with the assumption of an additive effect. BMI: body mass index; HDL-c: high density lipoprotein cholesterol; ALT: alanine transaminase.

Table 12. Significant associations of rs16131 SNP from *NPY* gene with obesity and related phenotypes.

	AA	AG	GG	β (95%CI)	P
n	399	114	18		
Height (m)	1.39 \pm 0.01	1.38 \pm 0.01	1.40 \pm 0.02	-0.01(-0.01~-0.001)	0.034
Weight (kg)	45.1 \pm 0.9	45.2 \pm 1.7	54.2 \pm 3.0	2.97(0.55~5.40)	0.017
BMI	22.59 \pm 0.30	23.01 \pm 0.60	27.36 \pm 1.01	1.40(0.41~2.39)	0.006
BMI z score	1.73 \pm 0.11	1.90 \pm 0.20	3.59 \pm 0.41	0.47(0.12~0.82)	0.008
Insulin (mU/l)	8.80 \pm 0.36	8.93 \pm 0.76	12.69 \pm 1.38	0.06(0.01~0.10)	0.015
HOMA-IR	1.88 \pm 0.08	1.86 \pm 0.16	2.73 \pm 0.31	0.06(0.01~0.10)	0.018
Triglycerides (mg/dl)	64 \pm 1	72 \pm 4	74 \pm 6	7.09(1.79~12.39)	0.009
HDL-c (mg/dl)	58 \pm 1	55 \pm 1	50 \pm 3	-3.28(-5.73~-0.83)	0.009
Leptin (μg/l)	13.72 \pm 0.74	15.99 \pm 1.34	22.20 \pm 2.28	3.29(0.88~5.70)	0.008
MCP-1 (ng/l)	106.99 \pm 2.91	118.27 \pm 5.54	131.27 \pm 11.89	10(0.49~19.52)	0.040

β coefficients represent the change in absolute traits values of each additional risk allele. General linear models were used to examine associations, with adjustment by age and sex, and with the assumption of an additive effect. BMI: body mass index; HOMA-IR: homeostatic model assessment for insulin resistance; HDL-c: high density lipoprotein cholesterol; MCP-1: Monocyte chemotactic protein 1.

As we can see in the table 13, besides the association with obesity and MS parameters, the risk allele for the rs3753519 SNP from gene *HSD11B1* was also positively associated with GGT and aPAI-1 and negatively with cortisol

Table 13. Significant associations of rs3753519 SNP from *HSD11B1* gene with obesity and related phenotypes.

	GG	GA	AA	β (95%CI)	P
n	449	79	5		
Weight (kg)	44.79 \pm 0.87	48.14 \pm 2.15	59.24 \pm 7.69	5.00(1.93~8.15)	<0.001
BMI	22.49 \pm 0.28	24.27 \pm 0.73	30.67 \pm 2.02	2.39 (1.21~3.65)	<0.001
BMI z score	1.71 \pm 0.10	2.30 \pm 0.24	4.69 \pm 0.87	0.77 (0.32~1.22)	<0.001
Waist circumference (cm)	72.4 \pm 0.8	75.9 \pm 2.0	92.4 \pm 5.1	5.14 (0.37~9.92)	0.035
Cholesterol (mg/dl)	169 \pm 1	162 \pm 3	159 \pm 7	-0.02 (-0.03~-0.00)	0.045
Adiponectin (mg/l)	25.57 \pm 0.56	23.43 \pm 1.30	17.68 \pm 2.36	-2.63 (-5.16~-0.10)	0.042
Cortisol (nmol/l)	326.5 \pm 7.6	292.3 \pm 14.7	279.9 \pm 64.2	-42.88 (-77.24~-8.52)	0.015
GGT (U/l)	10 \pm 0	11 \pm 0	12 \pm 3	1.03 (0.03~2.03)	0.045
aPAI-1 (ug/l)	8.56 \pm 0.38	9.83 \pm 1.03	21.89 \pm 8.48	2.44 (0.65~4.22)	0.008

β coefficients represent the change in absolute traits values of each additional risk allele. General linear models were used to examine associations, with adjustment by age and sex, and with the assumption of an additive effect. BMI: body mass index; GGT: gamma-glutamyl transpeptidase; aPAI-1: active plasminogen activator inhibitor-1.

Carrying the risk allele of the rs1534020 for the gene *MAP3K4* was associated with higher levels of blood pressure, leptin and GGT. This SNP, as those in the case of *HSD11B1* and *NPY* genes, was associated with obesity and MS parameters (table 14).

Table 14. Significant associations of rs1534020 SNP from *MAP3K4* gene with obesity and related phenotypes.

	TT	TG	GG	β (95%CI)	P
n	378	146	9		
Weight (kg)	43.9 \pm 0.9	48.9 \pm 1.6	53.6 \pm 7.1	3.62(1.10~6.13)	0.005
BMI	22.30 \pm 0.31	24.04 \pm 0.52	25.56 \pm 2.09	1.53(0.50~2.55)	0.004
BMI z score	1.69 \pm 0.11	2.17 \pm 0.17	2.40 \pm 0.49	0.50(0.14~0.86)	0.007
Systolic BP (mm Hg)	104 \pm 1	107 \pm 1	115 \pm 4	3.01(0.46~5.56)	0.021
Diastolic BP (mm Hg)	63 \pm 1	66 \pm 1	76 \pm 5	3.23(1.61~5.29)	0.002
Apo-AI (mg/dl)	142 \pm 1	136 \pm 2	133 \pm 9	-5.79(-10.38~-1.01)	0.018
Leptin (μg/l)	13.34 \pm 0.72	17.11 \pm 1.29	20.26 \pm 6.09	3.52(1.01~6.03)	0.006
GGT (U/l)	10 \pm 0	11 \pm 0	11 \pm 1	1.08(0.25~1.92)	0.012

β coefficients represent the change in absolute traits values of each additional risk allele. General linear models were used to examine associations, with adjustment by age and sex, and with the assumption of an additive effect. BMI: body mass index; BP: blood pressure; GGT: gamma-glutamyl transpeptidase.

Discussion and conclusions

The main findings of this study are that obese children, both at prepubertal and pubertal age, have a high proportion on MS. On the other hand, there are variations in the *FTO*, *NPY*, *HSD11B1* and *MAP3K4* gene sequences that are associated with childhood obesity and MS characteristics. The individually discussed findings are detailed below.

Metabolic Syndrome

There is currently a vigorous debate on the diagnosis and phenotypic expression of metabolic syndrome in children, especially before puberty, renewed after publication of the 2007 IDF definition of the metabolic syndrome (Zimmet *et al* 2007). Single cut-off points cannot be used to define body composition or metabolic abnormalities in children, because these change with age, sex, and pubertal stage. Importantly, proper account has not been taken of the impact of puberty on body composition and metabolic features, since definitions to date have considered the age rather than the pubertal status of the child.

Published criteria for childhood metabolic syndrome differ in the parameter chosen to evaluate excess adiposity. Some authors used BMI (Weiss *et al.* 2004; Viner *et al.* 2005), while others selected WC (Cook *et al.* 2003; De Ferranti *et al.* 2004; Cruz *et al.* 2004) because of its strong correlation with visceral adipose tissue. Also, there appeared to be no well-established reference standards for plasma lipids, i.e., triacylglycerols and HDL-cholesterol.

As previously reported, the highest frequency was obtained when the criteria of de Ferranti *et al.* (2004) were applied, likely due to the low WC cut-off selected (75th percentile). A high proportion was also observed using the criteria of Cook *et al.* (2003) and Ford *et al.* (2005). The lowest frequency was found when the definitions of Weiss *et al.* (2004) and the IDF criteria were applied. Weiss *et al.* used the least demanding criteria, and the IDF definition mostly considered adult absolute values.

Our principal-component analysis identified three main factors (glucose metabolism, dyslipidemia, and obesity/blood pressure) that explained a large proportion (72%) of the metabolic syndrome variance using either BMI or WC. Weiss *et al.* (2004) also identified three main factors: obesity/glucose metabolism, dyslipidemia, and blood pressure. Differences with our study might be due to their inclusion of overweight prepubertal children and adolescents; in fact, the cumulative explained variance was only 58% in the Weiss *et al.* (2004) study.

In summary, according to any classification considered in this study, the metabolic syndrome was found not only in pubertal but also in prepubertal children; based on our results and a critical review of the literature, we propose the use of sex- and age-specific international criteria and cut-off points for the features of this syndrome in children.

Associations of genetic variants with obesity and metabolic syndrome

FTO

The *FTO* gene encodes the fat mass and obesity-associated protein also known as alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase. The *FTO* gene is widely expressed in both fetal

and adult tissue; however it has especially high expression in the hypothalamus and pancreatic islets. The exact function of this gene is not known, but has been widely related to obesity.

As we expected, the minor A allele of rs9939609 was associated with higher body weight, BMI, BMI *z score*, and waist circumference in our population, as well as the risk alleles of two other SNPs (rs9928094, rs9935401), also the SNPs rs9930333 was associated with obesity but only with the first three traits. The results of this study are consistent with the findings of previous studies showing an association between *FTO* SNPs and obesity-related traits in different ethnic populations in adults, adolescents, or children (Frayling *et al.* 2007, Rutter *et al.* 2011; Mei *et al.* 2010; Zhao *et al.* 2009; Ruiz *et al.* 2010; Pausova *et al.* 2009). Interestingly, we found a SNP (rs8061518) with a negative association with body weight, BMI, BMI *z score*, leptin and some features of the MS (insulin and diastolic BP), this is very novel finding.

The evidence in mice shows that the loss of *FTO* leads to a significant reduction in adipose tissue and lean body mass but also postnatal growth retardation (Fisher *et al.* 2009), recently, a loss-of-function non-synonymous mutation at position 316 in *FTO* was reported to segregate with an autosomal recessive disease in a large Palestinian Arab consanguineous family (Boissel *et al.* 2009). The syndrome includes post-natal growth retardation, head and face dysmorphism, severe psychomotor delay, functional brain deficits and, in some patients, brain malformations, cardiac defects, genital abnormalities, cleft palate and all the affected siblings died in infancy. But this is not our case, we are reporting a SNP that is associated with lean normal children which is very interesting, because they have not growth retardation, however our sample is small and it needs to be validated in other populations. A recent study has demonstrated that heterozygous, loss-of-function mutations in *FTO* exist and it appears that loss of one functional copy of *FTO* in humans is compatible with being either lean or obese (Meyre *et al.* 2010).

Sequence analysis showed that *FTO* shares features with Fe (II) and 2-oxoglutarate (2OG) oxygenases. These enzymes catalyze oxidative reactions on multiple substrates using non-heme iron as a cofactor and 2OG as a co-substrate (Gerken *et al.* 2007; Sanchez-Pulido *et al.* 2007). *Fto* is indeed a 2OG oxygenase that can catalyze nucleic acid demethylation (Gerken *et al.* 2007). It is conceivable; therefore, that the nucleic acid demethylation activity

of *FTO* might regulate the expression of genes involved in metabolism and that dysregulation of this process might lead to obesity (Fawcett and Barroso 2010).

At present, it remains unclear whether the *FTO* SNPs influence the expression or splicing of the gene and/or whether the unequivocal association with obesity is causally related to alterations in expression or function of *FTO*. If the effect of the SNPs is through *FTO*, it also remains unclear whether the obesity risk SNPs result in a loss or a gain of *FTO* function. It remains possible that the SNPs influence the expression and/or function of neighboring genes and that such an effect might underlie the association with adiposity. The findings made so far are trying to clarify the possible roles of this gene; however, there is much work ahead to understand its function and its role in energy homeostasis.

NPY

The *NPY* gene encodes a neuropeptide that is widely expressed in the central nervous system and influences many physiological processes, including cortical excitability, stress response, food intake, circadian rhythms, and cardiovascular function.

The main finding of the analysis of *NPY* gene was the association of two SNPs (rs16147 y rs16131) with obesity, specifically with body weight and BMI. Additionally, these SNPs showed an association with some features of the MS, both of them with low HDL-c concentration and the rs16131 also with high levels of TAG and insulin.

NPY plays a well-established role in the hypothalamic control of body energy balance. This peptide is a very potent orexigenic, and when chronically administered into the central nervous system, it leads to increased food intake, weight gain, and adiposity in rodents (Stanley 1996; Vettor *et al.* 1994). *NPY*-induced obesity is not only due to hyperphagia; centrally administered *NPY* also promotes white adipose tissue (WAT) lipid storage, inhibits brown adipose tissue thermogenesis, and induces hyperinsulinemia and hypercorticosteronemia (Billington *et al.* 1991; Sainsbury *et al.* 1997).

Despite, there is plenty evidence of the role of *NPY* in the regulation of energy balance in animal studies, in humans the evidence is scarce and is based mainly in the SNP

rs16139 which has been associated with obesity (Ding *et al.* 2005; van Rossum *et al.* 2006), glucose and lipid metabolism alteration and the development of atherosclerosis (Pesonen 2006). In our population this SNP was not in HW equilibrium.

In our study the SNP rs16131 was associated with almost all features of MS. It seems that a common point of the NPY and MS could be the insulin resistance because since they have been implicated in the origin and development, respectively.

An animal study has shown that intercerebroventricular administration of NPY induces disturbances in glucose and lipid metabolism via activation of sympathetic output to the liver (Van den Hoek *et al.* 2008) and, other study showed that overexpression of NPY in SNS and brain noradrenergic neurons causes increased adiposity and liver triglyceride accumulation, which leads to hyperinsulinemia and impaired glucose tolerance with age, without changes in feeding patterns (Ruohonens *et al.* 2008).

The hypothalamus is critically involved in the control of autonomic outflow to various tissues (Strack *et al.* 1989), it contains many neurons expressing NPY receptors in various nuclei (Wolak *et al.* 2003), and these receptors are involved in the control of autonomic activity. However, the extrahypothalamic role of the NPY in energy homeostasis has been poorly studied; nevertheless, studies in stressed animals, relating NPY and obesity have demonstrated that stress has the same effects on NPY and energy balance that those mentioned before causing the same phenotype in rodents.

With all these evidence, we could hypothesize that, carrying the risk allele of the rs16131 probably affect the NPY production and could lead to hyperinsulinemia and impaired lipid metabolism. However, more studies are needed to validate our SNP and to clarify the metabolic ways that are implicated in the role of NPY in the regulation of extrahypothalamic energy homeostasis.

HSD11B1

The protein encoded by the *HSD11B1* gene is a microsomal enzyme 11β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11β -HSD1) that catalyzes the conversion of the stress hormone cortisol to the metabolite cortisone.

We found a strong association of the rs3753519 *HSD11B1* SNP with obesity in Spanish children. The risk of obesity in children carrying the minor allele A was nearly double than in non-carriers. Furthermore, the presence of this variant in our cohort of study was associated with increased BMI, BMI *z score*, weight and waist circumference and decreased plasma fasting adiponectin levels after adjustment by sex and age. These data linking genotype with both disease prevalence and related phenotypes strongly support the role of *HSD11B1* gene in the pathogenesis of obesity.

Regulation of *HSD11B1* expression is highly tissue-specific and involves the usage of two alternative promoters, a distal promoter P1 (predominated in human tumour cell lines) and a proximal promoter P2 (predominated in human liver, lung and subcutaneous adipose tissues) (Bruley *et al.* 2006; Staab *et al.* 2011). The SNP rs3753519 is located in the P2 promoter, so it may affect the transcription rate of the *HSD11B1* gene, although the functional consequences of this SNP should be assessed by additional studies. SNPs in the P2 promoter region (rs846910) and an intronic enhancer (rs12086634) have been found to be associated with type 2 diabetes and/or hypertension in three different populations although not with obesity *per se* (Nair *et al.* 2004, Franks *et al.* 2004, Morales *et al.* 2008). In the present study, the association of rs846910 with diabetes and hypertension-related phenotypes previously reported were not found.

The reason for a lack of evidence of a clear association between 11 β -HSD1 genetic variability and obesity has yet been reported. Despite evidence of its effect in animals and humans, it could be because neither of the SNPs investigated are functional. Considering the strong association of rs3753519 with obesity reported here and owing to its location in the P2 promoter, we dare to hypothesise that this variant could be the functional locus for the regulation of *HSD11B1* expression.

Lower hepatic 11 β -HSD1 activity has been reported in obese children (Wiegand *et al.* 2007) and supported by the finding that the activation of oral cortisone to cortisol is impaired in obesity (Stewart *et al.* 1999). Decreased plasma cortisol concentrations have been found in obese individuals, probably due to subnormal responsiveness in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis to feedback stimulation (Salehi *et al.* 2005). Therefore, the decreased cortisol concentrations found in our obese children could support this hypothesis.

In summary, the association of rs3753519 in the *HSD11B1* SNP with increased concentrations of the liver enzyme GGT, a classical marker of fatty liver disease, together with decreased concentrations of adiponectin, a marker of adipose tissue alteration, and increased concentrations of active PAI as a marker of cardiovascular disease, could imply a possible role of this variant in the aetiology of obesity complications. Thus, we conclude that the variant rs3753519 in the *HSD11B1* gene is associated with susceptibility to paediatric onset obesity and its complications.

MAP3K4

The gene *MAP3K4* encodes the protein MTK1, also known as MEKK4 or MAP3K4, is a MAPKKK that regulates p38 and JNK through the phosphorylation of MKK3/6 and MKK4/7, respectively (Gerwins *et al.* 1997).

We found a strong association of the rs1534020 *MAP3K4* SNP with obesity in Spanish children. The risk of obesity in children carrying the minor allele G was nearly double than in non-carriers. Furthermore, the presence of this variant in our cohort of study was associated with increased BMI, BMI *z score* and weight and increased plasma fasting leptin levels after adjustment by sex and age. These data linking genotype with both disease prevalence and related phenotypes support the role of *MAP3K4* gene in the pathogenesis of obesity.

The association of the presence of G allele with diastolic and systolic blood pressure in children could indicate a possible role of *MAP3K4* in the development of metabolic syndrome. Recently, it has been described an increased of MTK1 activity by pressure overload in mouse hearts and by oxidative stress in isolated cardiomyocytes (Mizote *et al.* 2010). Interestingly, the rs1534020 *MAP3K4* were associated in the obese group with plasma increased oxLDL [P=0.03, β (95% CI) 0.44 (0.03, 0.84)] and decreased vitamin A [P=0.005, β (95% CI) -0.02 (-0.04, -0.006)] with a maintained association with diastolic BP. These results could support the implication of MTK1 on blood pressure and oxidative stress. The variant in the *MAP3K4* gene were not associated with any of the inflammation biomarkers analyzed, that would empathises the activation of the MAPK pathway by oxidative stress stimulus in the metabolic syndrome.

Additionally, the rs1534020 *MAP3K4* SNP were found to be associated with plasma increased GGT in the entire genotyped population. The liver enzyme GGT, a classical marker of fatty liver disease, is also considered a biomarker of cardiovascular disease. Positive associations between both baseline GGT and temporal change in GGT, as well as cardiovascular events and cardiovascular mortality independent of alcohol intake, have been reported in several prospective studies (revised in Ghouri *et al.* 2010). There also appears to be a strong and underrecognized age interaction, with associations between GGT and incident coronary heart disease being strong in young individuals but relatively weak in the elderly (Lee *et al.* 2009). By contrast, ALT appears to be only weakly associated with incident CHD. The expression of GGT has been shown to be upregulated after oxidative stress involving Ras and several downstream signalling pathways such Akt, p38 MAPK and MEK1 (Pandur *et al.* 2007).

In summary, the association of rs1534020 *MAP3K4* SNP with obesity risk and its related traits, elevated blood pressure and increased concentrations of the liver enzyme GGT, together with decreased concentrations of vitamin A and elevated LDLox in the obese group, could imply a possible role of this variant in the aetiology of metabolic syndrome after oxidative stress stimulus.

References

- Billington CJ, Briggs JE, Grace M, Levine AS. Effects of intracerebroventricular injection of neuropeptide Y on energy metabolism. *Am J Physiol* 1991; 260: R321–R327.
- Boissel S, Reish O, Proulx K, Kawagoe-Takaki H, Sedgwick B, Yeo GS, Meyre D, Golzio C, Molinari F, Kadhom N, Etchevers HC, Saudek V, Farooqi IS, Froguel P, Lindahl T, O’Rahilly S, Munnich A, Colleaux L. Loss-of-function mutation in the dioxygenase-encoding FTO gene causes severe growth retardation and multiple malformations. *Am J Hum Genet* 2009; 85: 106–111.
- Bruley C, Lyons V, Worsley AG, Wilde MD, Darlington GD, Morton NM, Seckl JR, Chapman KE. A novel promoter for the 11- hydroxysteroid dehydrogenase type 1 gene is active in lung and is C/EBP independent. *Endocrinology* 2006; 147: 2879–2885.
- Cole TJ, Bellizzi MC, Flegal KM, Dietz WH. Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: International survey. *BMJ* 2000; 320: 1240-1243.
- Cook S, Weitzman M, Auinger P, Nguyen M, Dietz WH. Prevalence of metabolic syndrome phenotype in adolescents: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2003; 157:821-827.
- Cruz ML, Weigensberg MJ, Huang TT, Ball G, Shaibi GQ, Goran MI. The metabolic syndrome in overweight Hispanic youth and the role of insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 108-113.
- De Ferranti SD, Gauvreau K, Ludwig DS, Neufeld EJ, Newburger JW, Rifai N. Prevalence of the metabolic syndrome in American adolescents: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Circulation* 2004; 110: 2494-2497.
- Ding B, Kull B, Liu Z, Mottagui-Tabar S, Thonberg H, Gu HF, Brookes AJ, Grundemar L, Karlsson C, Hamsten A, Arner P, Ostenson CG, Efendic S, Monné M, von Heijne G, Eriksson P, Wahlestedt C. Human neuropeptide Y signal peptide gain-of-function polymorphism is associated with increased body mass index: possible mode of function. *Regul Pept* 2005; 127: 45–53.
- Fawcett KA, Barroso I. The genetics of obesity: FTO leads the way. *Trends Genet* 2010; 26: 266–274.
- Fischer J, Koch L, Emmerling C, Vierkotten J, Peters T, Brüning JC, Rüther U. Inactivation of the Fto gene protects from obesity. *Nature* 2009; 458: 894-898.
- Franks PW, Knowler WC, Nair S, Koska J, Lee YH, Lindsay RS, Walker BR, Looker HC, Permana PA, Tataranni PA, Hanson RL. Interaction between an 11HSD1 gene variant and birth era modifies the risk of hypertension in Pima Indians. *Hypertension* 2004; 44: 681–688.
- Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM, Perry JR, Elliott KS, Lango H, Rayner NW, Shields B, Harries LW, Barrett JC, Ellard S, Groves CJ,

- Knight B, Patch AM, Ness AR, Ebrahim S, Lawlor DA, Ring SM, Ben-Shlomo Y, Jarvelin MR, Sovio U, Bennett AJ, Melzer D, Ferrucci L, Loos RJ, Barroso I, Wareham NJ, Karpe F, Owen KR, Cardon LR, Walker M, Hitman GA, Palmer CN, Doney AS, Morris AD, Smith GD, Hattersley AT, McCarthy MI. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science* 2007; 316: 889–894.
- Freedman DS, Dietz WH, Tang RMensah GA, Bond MG, Urbina EM, Srinivasan S, Berenson GS. The relation of obesity through-out life to carotid intima-media thickness in adulthood: the Bogalusa Heart Study. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004; 28: 159-166.
- Gerken T. The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. *Science* 2007; 318: 1469–1472.
- Gerwins P, Blank JL, Johnson GL. Cloning of a novel mitogen-activated protein kinase kinase kinase, MEKK4, that selectively regulates the c-Jun amino terminal kinase pathway. *J Biol Chem* 1997; 272: 8288–8295.
- Ghouri N, Preiss D, Sattar N. Liver enzymes, nonalcoholic fatty liver disease, and incident cardiovascular disease: a narrative review and clinical perspective of prospective data. *Hepatology* 2010; 52: 1156-61.
- Lauer RM, Lee J, Clarke WR. Factors affecting the relationship between childhood and adult cholesterol levels: the Muscatine Study. *Pediatrics* 1988; 82: 309–318.
- Lee DH, Buijsse B, Steffen L, Holtzman J, Luepker R, Jacobs DR Jr. Association between serum gamma-glutamyltransferase and cardiovascular mortality varies by age: the Minnesota Heart Survey. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2009; 16: 16-20.
- Mei H, Chen W, Srinivasan SR, Jiang F, Schork N, Murray S, Smith E, So JD, Berenson GS. FTO influences on longitudinal BMI over childhood and adulthood and modulation on relationship between birth weight and longitudinal BMI. *Hum Genet* 2010; 128: 589-596.
- Meyre D, Proulx K, Kawagoe-Takaki H, Vatin V, Gutiérrez-Aguilar R, Lyon D, Ma M, Choquet H, Horber F, Van Hul W, Van Gaal L, Balkau B, Visvikis-Siest S, Pattou F, Farooqi IS, Saudek V, O'Rahilly S, Froguel P, Sedgwick B, Yeo GS. Prevalence of loss-of-function FTO mutations in lean and obese individuals. *Diabetes* 2010; 59: 311-318.
- Mizote I, Yamaguchi O, Hikoso S, Takeda T, Taneike M, Oka T, Tamai T, Oyabu J, Matsumura Y, Nishida K, Komuro I, Hori M, Otsu K. Activation of MTK1/MEKK4 induces cardiomyocyte death and heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2010; 48: 302-309.
- Morales MA, Carvajal CA, Ortiz E, Mosso LM, Artigas RA, Owen GI, Fardella CE. Possible pathogenetic role of 11-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11HSD1) gene polymorphisms in arterial hypertension. *Rev Med Chil* 2008; 136: 701–710.
- Nair S, Lee YH, Lindsay RS, Walker BR, Tataranni PA, Bogardus C, Baier LJ, Permana PA. 11-Hydroxysteroid dehydrogenase type 1: genetic polymorphisms are associated with type

- 2 diabetes in Pima Indians independently of obesity and expression in adipocyte and muscle. *Diabetologia* 2004; 47: 1088–1095.
- Pandur S, Pankiv S, Johannessen M, Moens U, Huseby NE. Gamma-glutamyltransferase is upregulated after oxidative stress through the Ras signal transduction pathway in rat colon carcinoma cells. *Free Radic Res* 2007; 41: 1376-1384.
- Pausova Z, Syme C, Abrahamowicz M, Xiao Y, Leonard GT, Perron M, Richer L, Veillette S, Smith GD, Seda O, Tremblay J, Hamet P, Gaudet D, Paus T. A common variant of the FTO gene is associated with not only increased adiposity but also elevated blood pressure in French Canadians. *Circ Cardiovasc Genet* 2009; 2: 260–269.
- Ruiz JR, Labayen I, Ortega FB, Legry V, Moreno LA, Dallongeville J, Martínez-Gómez D, Bokor S, Manios Y, Ciarapica D, Gottrand F, De Henauw S, Molnár D, Sjöström M, Meirhaeghe A; HELENA Study Group. Attenuation of the effect of the FTO rs9939609 polymorphism on total and central body fat by physical activity in adolescents: the HELENA study. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2010; 164: 328-333.
- Rutters F, Nieuwenhuizen AG, Bouwman F, Mariman E, Westerterp-Plantenga MS. Associations between a Single Nucleotide Polymorphism of the FTO Gene (rs9939609) and Obesity-Related Characteristics over Time during Puberty in a Dutch Children Cohort. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011 Mar 16. [Epub ahead of print]
- Sainsbury A, Rohner-Jeanrenaud F, Cusin I, Zakrzewska KE, Halban PA, Gaillard RC, Jeanrenaud B. Chronic central neuropeptide Y infusion in normal rats: status of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis, and vagal mediation of hyperinsulinaemia. *Diabetologia* 1997; 40: 1269 –1277.
- Salehi M, Ferenczi A, Zumoff B. Obesity and Cortisol Status. *Horm Metab Res*. 2005; 37: 193-197.
- Sanchez-Pulido L, Andrade-Navarro M.A. The FTO (fat mass and obesity associated) gene codes for a novel member of the non-heme dioxygenase superfamily. *BMC Biochem* 2007; 8: 23.
- Staab CA, Maser E. 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is an important regulator at the interface of obesity and inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010; 119: 56-72.
- Stanley BG, Kyrkouli SE, Lampert S, Leibowitz SF. Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. *Peptides* 1986; 7: 1189 –1192.
- Stewart PM, Boulton A, Kumar S, Clark PMS, Shackleton CHL. Cortisol metabolism in human obesity: impaired cortisone - cortisol conversion in subjects with central adiposity. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 1022–1027.
- Strack AM, Sawyer WB, Hughes JH, Platt KB, Loewy AD. A general pattern of CNS innervation of the sympathetic outflow demonstrated by transneuronal pseudorabies viral infections. *Brain Res* 1989; 491: 156–162.

- Tailor AM, Peeters PH, Norat T, Vineis P, Romaguera D. An update on the prevalence of the metabolic syndrome in children and adolescents. *Int J Pediatr Obes* 2010; 5: 202-213.
- van den Hoek AM, van Heijningen C, Schröder-van der Elst JP, Ouwens DM, Havekes LM, Romijn JA, Kalsbeek A, Pijl H. Intracerebroventricular administration of neuropeptide Y induces hepatic insulin resistance via sympathetic innervation. *Diabetes* 2008; 57: 2304-2310.
- van Rossum CT, Pijl H, Adan RA, Hoebee B, Seidell JC. Polymorphisms in the NPY and AGRP genes and body fatness in Dutch adults. *Int J Obes (Lond)* 2006; 30: 1522–1528.
- Vettor R, Zarjevski N, Cusin I, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B. Induction and reversibility of an obesity syndrome by intracerebroventricular neuropeptide Y administration to normal rats. *Diabetologia* 1994; 37: 1202–1208.
- Vinner RM, Segal TY, Lichtarowicz-Krynska E, hidmarsh P. Prevalence of the insulin resistance syndrome in obesity. *Arch Dis Child* 2005; 90: 10-14.
- Weiss R, Dziura J, Burgert T, Tanborlane W, Taksali S, Yeckel C, Allen K, Lopes M, Savoye M, Morrison J, Sherwin R, Caprio S. Obesity and metabolic syndrome in children and adolescents. *N Engl J Med* 2004; 350: 2362-2374.
- WHO. Global Strategy on Diet, Physical Activity and Health. Childhood overweight and obesity. <http://www.who.int/dietphysicalactivity/childhood/en/index.html> accessed Feb. 5 de 2011.
- Wiegand S, Richardt A, Remer T, Wudy SA, Tomlinson JW, Hughes B, Grüters A, Stewart PM, Strasburger CJ, Quinkler M. Reduced 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity in obese boys. *Eur J Endocrinol* 2007; 157: 319-324.
- Wolak ML, DeJoseph MR, Cator AD, Mokashi AS, Brownfield MS, Urban JH. Comparative distribution of neuropeptide Y Y1 and Y5 receptors in the rat brain by using immunohistochemistry. *J Comp Neurol* 2003; 464: 285–311.
- Zhao J, Bradfield JP, Li M, Wang K, Zhang H, Kim CE, Annaiah K, Glessner JT, Thomas K, Garris M, Frackelton EC, Otieno FG, Shaner JL, Smith RM, Chiavacci RM, Berkowitz RI, Hakonarson H, Grant SF. The role of obesity-associated loci identified in genome-wide association studies in the determination of pediatric BMI. *Obesity (Silver Spring)* 2009; 17: 2254-2257.
- Zimmet P, Alberti K, Kuafman F, Tajima N, Silink M, Arslanian S, Wong G, Bennett P, Shaw J, Caprio S. The metabolic syndrome in children and adolescents - an IDF consensus report. *Pediatr Diabetes* 2007; 8: 299-306.

Justificación y objetivos

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La obesidad infantil es actualmente uno de los principales problemas de salud pública, que condiciona un aumento de la morbilidad y la mortalidad, a la vez que representa elevadas cargas económicas para los sistemas sanitarios. El problema que en principio afectaba fundamentalmente a los países desarrollados, se presenta actualmente a nivel global, ya que en los últimos años se ha extendido a los países en desarrollo, particularmente a sus áreas urbanas. La prevalencia de la obesidad ha aumentado en una proporción alarmante. Globalmente, en 2010, el número de niños menores de 5 años con sobrepeso se estimó por encima de los 42 millones, de los cuales más de 35 millones viven en países en desarrollo (WHO 2011).

La obesidad infantil, caracterizada por una inflamación de bajo grado, acarrea numerosas comorbilidades como hipertensión arterial, resistencia a la insulina, dislipidemia, diabetes mellitus tipo 2 (DM2), esteatosis, problemas ortopédicos y apnea del sueño entre otras, que pueden presentarse a corto o largo plazo. Diferentes estudios han demostrado la asociación entre la obesidad infantil y el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares (ECV) en la edad adulta (Freedman *et al.* 2004), así como los cambios en el índice de masa corporal (IMC) en el tiempo y la predicción de las concentraciones de lípidos y lipoproteínas (Lauer *et al.* 1988).

De entre todas las complicaciones de la obesidad, existe un grupo [hipertensión arterial, hiperglucemia, hipertrigliceridemia y bajas concentraciones de colesterol en las lipoproteínas de alta densidad (HDL)] que junto a ésta constituyen el síndrome metabólico (SM). La resistencia a la insulina parece ser la clave en el desarrollo del SM, el cual a su vez está fuertemente asociado al riesgo de sufrir ECV y DM2. Los antecedentes de este síndrome, datan de 1760, sin embargo fue a partir de 1988 cuando se comenzó a estudiar ampliamente. La prevalencia del SM en niños ha aumentado en las últimas décadas alcanzando cifras de hasta el 40 por ciento en algunos países.

El aumento de la prevalencia de obesidad y SM ha ido acompañado de cambios en los hábitos de vida, como un aumento de la ingesta calórica y un mayor sedentarismo, entre otros. A pesar de los factores medioambientales determinantes para el desarrollo de la enfermedad, existe un componente genético. A través de estudios en gemelos monozigotos se estima que la heredabilidad del Índice de Masa Corporal (IMC) ronda entre el 30 y el 70 por ciento. La

obesidad infantil tiene su origen en alteraciones génicas; de acuerdo a las características de estas alteraciones la obesidad puede ser monogénica debida a la alteración de un gen específico, poligénica a causa de alteraciones en varios genes y sindrómica, representada por entidades claramente identificadas y reconocidas como es el caso del síndrome de Prader-Willi.

En los últimos años, a través de los estudios amplios de asociación del genoma humano (GWAS), se han identificado diferentes variantes génicas asociadas a numerosas enfermedades complejas como es el caso de la obesidad; la mayoría de éstas confieren un riesgo moderado y se han identificado algunos alelos causales, sin embargo, explican una proporción muy baja de la etiología de dichas enfermedades. Hay pruebas sólidas de que las variantes raras juegan un papel importante en la etiología de las enfermedades complejas y pueden tener mayores efectos genéticos que las variantes comunes. Esto ha puesto al descubierto una de las principales limitaciones de los GWAS, ya que dejan fuera una gran cantidad de variantes raras, y ha creado la necesidad de buscar otras alternativas para su estudio como son la selección de genes candidatos con expresión diferencial, la secuenciación de regiones específicas de cada gen o eventualmente del genoma completo, el uso de GWAS de alta resolución, los cuales incluyen variantes génicas con frecuencias alélicas menores del 5 por ciento o el uso de estudios caso-control aplicando las nuevas tecnologías. Estos y otros avances son los que abren las puertas a una nueva generación en estudios genómicos que en los próximos años aportarán nuevas pistas sobre el origen de muchas enfermedades.

Con estos antecedentes, el objetivo del presente trabajo fue determinar la asociación entre polimorfismos de nucleótido simple (SNP) seleccionados de un número de genes en los cuales se había demostrado que se expresaban diferencialmente en el tejido adiposo omental en niños obesos, así como de otros genes candidatos, con la obesidad infantil, el síndrome metabólico y sus fenotipos.

Introducción

INTRODUCCION

Obesidad infantil: aspectos generales

Concepto y prevalencia

La obesidad es una enfermedad crónica, compleja, de origen multifactorial que se caracteriza por el exceso de grasa corporal y se presenta, fundamentalmente, debido a un desequilibrio entre la ingesta dietética y el gasto energético. Sin embargo, en años recientes se ha demostrado que determinados factores genéticos modulan el impacto ambiental en cada individuo de forma muy acusada (Willer *et al.* 2009), lo cual provoca la alteración de mecanismos moleculares, biológicos y fisiológicos de regulación del peso corporal.

La obesidad se ha convertido en uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial (Figura 1.1). En los últimos 30 años su prevalencia se ha triplicado, alcanzando cifras alarmantes. Según el informe de la Organización Mundial de la Salud del año 2006 la prevalencia infantil de sobrepeso y obesidad en el año 2010 en América del Norte se estimó en más del 40 por ciento, en Europa en 38 por ciento, al oeste del pacífico en 27 por ciento y en el sureste asiático en 22 por ciento (Han *et al.* 2010, WHO 2005). Estos datos están aún por confirmarse, sin embargo, en algunos casos se sospecha que la cifra es superior a la estimada. En España, la prevalencia de obesidad infantil ha aumentado considerablemente en las últimas décadas. En 1984 la prevalencia de obesidad infantil fue de 4.9 por ciento (estudio PAIDOS) en el año 2000 la prevalencia de sobrepeso y obesidad fue de 26,3 por ciento (Estudio enKid) y en el año 2006 fue de 27,6 por ciento (Ministerio de Sanidad y Consumo 2007). En cuanto a las comunidades autónomas según la Encuesta Nacional de Salud de 2006, Canarias es la comunidad autónoma con mayor prevalencia de sobrepeso y obesidad con casi 40 por ciento, seguida por Murcia con 33 por ciento y en tercer lugar se sitúa Andalucía con 32 por ciento, Galicia es la número 13 con 25 por ciento y Aragón la 15 con 24 por ciento; las comunidades con menor prevalencia son País Vasco con 20 por ciento y Castilla y León y Cataluña, ambas con 23 por ciento.

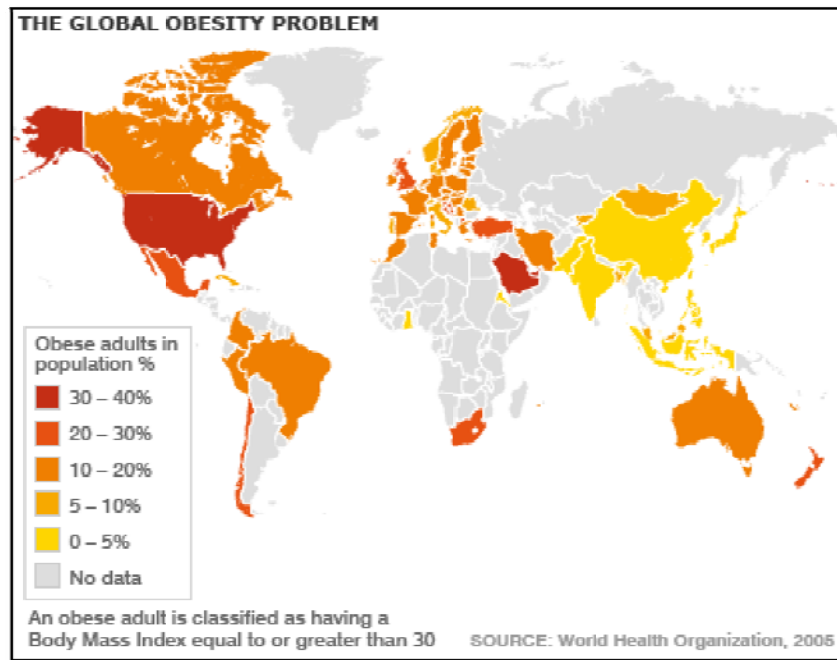


Figura 1.1. Mapa de la obesidad mundial. Tomado de <http://www.who.org/>

La obesidad puede ser exógena o endógena, siendo la primera el resultado de la interacción de un entorno socio-ambiental desfavorable sobre un individuo con una predisposición genética. Se manifiesta como un exceso de grasa corporal a consecuencia de un balance energético positivo, generalmente por un incremento del consumo calórico asociado a una deficiente actividad física, favorecido por un “entorno obesogénico” (Martínez *et al.* 2006). Por su parte, la obesidad endógena, responde a alteraciones monogénicas o no, que pueden ser entidades ampliamente identificadas como el Síndrome de Prader-Willi, el Síndrome de Laurence-Moon-Bield, o enfermedades raras, alteraciones poligénicas, secundaria a fármacos (corticoesteroides, antidepresivos, anticonvulsivantes, etc) o a otras enfermedades de origen endocrino (Síndrome de Cushing, hipotiroidismo, acromegalia, etc.) (Madruga y Fané 2008).

El 95 por ciento de los casos de obesidad son de origen exógeno y solamente el 5 por ciento restante es endógeno o secundario a otras enfermedades o uso de fármacos. La obesidad se clasifica de acuerdo a la distribución de la grasa corporal, en central o androide con predominio de tejido graso en la región intrabdominal, o periférica o ginoide, con predominio graso fundamentalmente en la región fémoro-glútea. Esta distribución varía según el sexo y la raza, siendo en la infancia predominantemente mixta. La diferencia en la distribución de la masa grasa corporal por sexos se explica en parte por las diferencias

hormonales; los andrógenos se relacionan con un incremento del tejido adiposo visceral, asociándose con factores de riesgo cardiovascular, mientras que los estrógenos se relacionan con el tejido adiposo periférico o subcutáneo (Sweeting, 2007). Durante la pubertad, los cambios que ocurren en la distribución de grasa corporal se ven afectados por la leptina, esta adipoquina, induce la secreción de la hormona liberadora de gonadotropina y de gonadotropinas. La concentración sérica de leptina, se incrementa progresivamente en las mujeres durante la pubertad y en el caso de los varones, aumenta desde el inicio de la pubertad hasta el estadio II o III de Tanner, precediendo al incremento de la testosterona, y luego disminuye a medida que la pubertad continúa (Martos-Moreno *et al.* 2010). Se ha demostrado que la leptina se correlaciona positivamente con el IMC y más aún con la masa grasa y que esta correlación es más pronunciada en las mujeres debido a la acumulación de grasa durante el desarrollo (van der Sluis *et al.* 2002). Además, esta diferencia en el contenido graso se observa desde la vida fetal, pero es más evidente durante la pubertad y la vida adulta (Wells 2007).

Alteraciones estructurales y funcionales del tejido adiposo

El tejido adiposo es el principal lugar de almacenamiento de energía. La masa grasa corporal está distribuida en un 20 por ciento de grasa visceral y un 80 por ciento de tejido adiposo subcutáneo. Por otra parte, el 80 por ciento del peso de la masa magra son lípidos, de los cuales, el 90 por ciento son triacilglicérols (TAG). Este tejido está constituido fundamentalmente por adipocitos, además de otras células como leucocitos, macrófagos, células estromales y preadipocitos.

El tejido adiposo de los mamíferos se puede dividir en tejido adiposo blanco y tejido adiposo marrón. El primero es el principal en los humanos y se caracteriza por tener una vascularización limitada con un flujo sanguíneo dependiente del peso corporal y del estado nutricional y, además, tiene diversas funciones como aislamiento térmico, amortiguación y, como ya se mencionó, almacenador de energía. El tejido adiposo marrón es muy importante en la regulación de la temperatura, la termogénesis y se encuentra fundamentalmente en los animales que hibernan. (Schuster, 2009).

Aparte de su papel como almacenador de energía, el tejido adiposo tiene un papel activo en varios procesos homeostáticos como el gasto energético y la regulación del apetito y de la glucosa. Además, es un tejido crítico en la función tiroidea, la respuesta inmunitaria, el

mantenimiento óseo, la reproducción, la coagulación y la secreción de hormonas. Estos procesos están regulados por una variedad de complejas vías hormonales. El tejido adiposo es un inmunomodulador activo y además un órgano endocrino que secreta gran cantidad de factores, adipoquinas relacionadas con la inflamación como leptina, adiponectina, resistina, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleuquina (IL)-1 e IL-6, sustancias procoagulantes como el activador del inhibidor del plasminógeno (PAI-1), sustancias vasoactivas como endotelinas o angiotensinógeno, y moléculas que pueden contribuir a la resistencia a la insulina como ácidos grasos libres (AGL), TNF- α y resistina. Aparte segrega también otras sustancias como la proteína quimiotáctica de los monocitos 1 (MCP-1) que participa en el reclutamiento de macrófagos por parte del tejido adiposo. La interrupción o desequilibrio de estas vías hormonales deriva en efectos dañinos tanto a nivel local, por la citotoxicidad de las adipoquinas, como a nivel sistémico a través de la sobreexpresión de los niveles plasmáticos de citoquinas inflamatorias (Schuster 2009). Estos cambios dan lugar a un incremento del riesgo metabólico y cardiovascular (Trayhurn y Wood 2004; Rabe *et al.* 2008).

A medida que los individuos van aumentando de peso y sus adipocitos crecen, el tejido adiposo sufre alteraciones moleculares y celulares que afectan el metabolismo (Figura 1.2). Este tejido responde reclutando preadipocitos que proliferan e hipertrofiando los adipocitos maduros con el consiguiente crecimiento estromal y vascular ante la hipoxia adipocitaria. La cantidad de macrófagos en el tejido adiposo aumenta con la obesidad y éstos actúan destruyendo los adipocitos apoptóticos. Se ha demostrado que el número de macrófagos presentes en el tejido adiposo se correlaciona positivamente con el tamaño de los adipocitos tanto en humanos como en ratas; y también parece existir una expresión diferencial de factores pro y antiinflamatorios relacionada con el aumento del tamaño de los adipocitos, lo cual provoca un cambio hacia un marcado dominio de factores pro-inflamatorios como resultado de esta hipertrofia de células de gran tamaño (Gil *et al.* 2007). Es bien sabido, que los macrófagos presentes en el tejido adiposo expresan y secretan una gran cantidad de citoquinas, las cuales alcanzan el hígado a través de la circulación portal, estimulando la inflamación del órgano y la producción de proteína C reactiva (PCR), induciendo una respuesta inflamatoria sistémica. Adicionalmente, el balance energético positivo incrementa la concentración de AGL en la circulación sistémica, acumulándose en músculo esquelético e hígado y generando una lipotoxicidad que promueve la resistencia insulínica; lo cual es el

inicio para una serie de consecuencias metabólicas que podrían derivar en dislipidemia, hipertensión arterial, diabetes mellitus tipo 2 o enfermedad hepática grasa no alcohólica (EHGNA) entre otras.

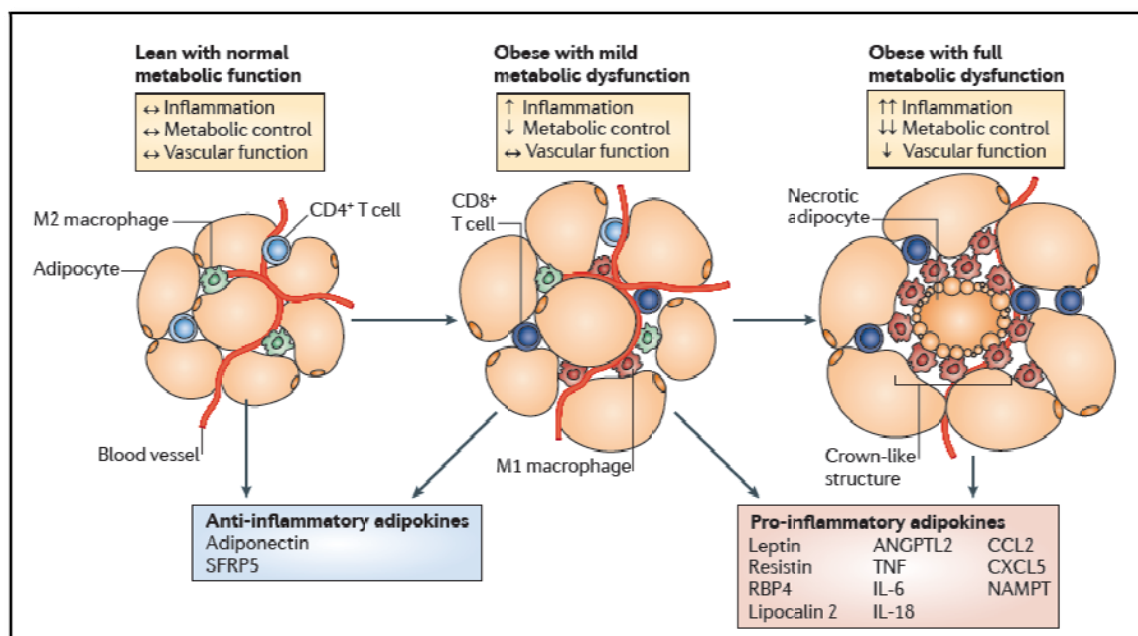


Figura 1.2 Modulación fenotípica del tejido adiposo.

El tejido adiposo puede describirse por al menos tres clasificaciones estructurales y funcionales: delgado con función metabólica normal, obeso con disfunción metabólica leve y obeso con disfunción metabólica completa. Cambios cualitativos en el tejido adiposo en expansión pueden favorecer la transición hacia un fenotipo metabólico disfuncional. El tejido adiposo metabólicamente disfuncional puede estar asociado con un mayor nivel de necrosis de los adipocitos, y los macrófagos M1 se ubican alrededor de estas células muertas formando una estructura similar a una corona. SFRP5: proteínas secretadas relacionadas con el rizado 5; RBP4: proteína enlazadora de retinol 4; ANGPTL2: proteína relacionada con la angiopoietina 2 TNF: factor de necrosis tumoral; IL: interleuquina; CCL2: quimioquina del ligando 2 del motivo C-C; CXCL5: quimioquina CXC 5; NAMPT: nicotinamida fosforibosiltransferasa o Visfatina. Tomado de Ouchi *et al.* 2011.

Síndrome metabólico en la infancia.

Definición y origen del síndrome metabólico

El SM, representa un conjunto de alteraciones antropométricas, fisiológicas y bioquímicas específicas que predisponen a los individuos afectados al desarrollo de ECV y DM2 (Nelson y Bremer 2010), La presencia de hipertensión, hipertrigliceridemia, bajas concentraciones plasmáticas de HDL-c y un metabolismo glucídico alterado es lo que caracteriza este síndrome. La resistencia insulínica parece ser una de las principales causas de las alteraciones clínicas y metabólicas; además, el SM está influenciado por numerosos factores genéticos y ambientales, pero existe una gran evidencia que indica que la obesidad es

el principal factor para el riesgo cardiometabólico, especialmente cuando la adiposidad se acumula en la zona visceral. Los pacientes con SM tienen el doble de riesgo de desarrollar ECV en los próximos 5-10 años que las personas que no padecen dicho síndrome; asimismo el riesgo de desarrollar DM2 es 5 veces superior (Alberti *et al.* 2009). Adicionalmente, se ha reportado que el SM en la infancia predice el SM, la aterosclerosis subclínica y la DM2 en la edad adulta (Magnusen *et al.* 2010)

Los antecedentes del SM, datan de 1760, cuando Morgagni describió la asociación entre obesidad visceral, hipertensión arterial, hiperuricemia, aterosclerosis y el síndrome de apnea obstructiva del sueño. En 1923 Kylin describió la coocurrencia de hipertensión arterial, hiperglucemia e hiperuricemia y años más tarde Marañón juntó la evidencia de la asociación de la hipertensión arterial, la alteración del metabolismo glucídico y la obesidad; sin embargo, fue descrito como SM por primera vez en 1977 por Haller *et al.* En 1980 Vague *et al.* aportaron evidencia de la asociación de la progresión de la obesidad y el desarrollo de la diabetes. En 1988. Reaven introdujo el concepto de Síndrome X, sugiriendo que era la resistencia insulínica con la subsecuente hiperinsulinemia el principal factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares; a partir de ese momento, se comenzó a estudiar la propuesta de Reaven derivando diferentes nombres, lo que a la par fue ampliando el conocimiento sobre el tema (Crepaldi 2005; Hansen *et al.* 2008).

Las alteraciones metabólicas asociadas al SM se inician en la infancia pudiendo manifestarse en la adolescencia o en el principio de la vida adulta (Misra *et al.* 2000), mostrando una tendencia secular de SM en niños obesos (Chen *et al.* 2005; Ford *et al.* 2008).

Desde hace aproximadamente 12 años, ha habido un fuerte debate en cuanto a la definición del síndrome y a los componentes que lo describen. La OMS fue la primera en proponer una definición y de ahí en adelante diferentes organismos internacionales como el Grupo Europeo para el Estudio de la Resistencia a la Insulina, el *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel* (NCEP ATP) y la Federación Internacional de Diabetes (IDF) entre otros siguieron el mismo camino; sin embargo, esta última es la que ha propuesto la clasificación más reciente tanto para adultos como para niños (Tabla 1.1 y 1.2) (Alberti *et al.* 2006; Zimmet *et al.* 2007).

Tabla 1.1 Definición de síndrome metabólico de la Federación Internacional de Diabetes para adultos.

Para el diagnóstico del síndrome metabólico la persona debe tener:

Obesidad Central: circunferencia de cintura ≥ 94 cm para hombres europeos y ≥ 80 cm para mujeres europeas (valores específicos para otras etnias).

y adicionalmente 2 de los siguientes factores:

-
1. Concentraciones elevadas de triacilglicérols: ≥ 150 mg/dl o tratamiento específico para esta anomalía.
 2. Concentraciones reducidas de HDL-c: < 40 mg/dl en varones y < 50 mg/dl en mujeres o tratamiento específico para esta anomalía.
 3. Tensión arterial elevada: tensión arterial sistólica ≥ 130 o tensión arterial diastólica ≥ 85 mm Hg o tratamiento para un diagnóstico previo de hipertensión arterial.
 4. Glucosa en ayunas elevada ≥ 100 mg/dl o diagnóstico previo de diabetes *mellitus* tipo 2. Si la glucosa en ayunas se mantiene elevada, un test oral de glucosa es recomendable, pero no es necesario para definir la presencia del síndrome.
-

HDL-c: colesterol en las lipoproteínas de alta densidad.

La prevalencia del SM aumenta paralelamente con la obesidad. En adultos alcanza el 35 por ciento; en niños y adolescentes los datos de prevalencia de SM son variados y realizados en subgrupos de la población en unos casos representativos de ésta, sin embargo en otros no. Un estudio reciente (Tailor *et al.* 2009) ha descrito la prevalencia en diferentes países, encontrando las más altas en Turquía con un 41,8 por ciento y en Estados Unidos con un 39 por ciento, y las más bajas en China 10,3 por ciento, Francia 10,9 por ciento e Italia 13,9 por ciento. Dentro del resto de los países para los que existen datos, la prevalencia se sitúa entre 17 y 32 por ciento, específicamente para España las cifras indicadas son de 18,6 por ciento de un estudio realizado en Málaga.

Los diferentes datos que se presentan respecto de la prevalencia de SM en niños y adolescentes varía ampliamente dependiendo tanto de la definición usada (esto incluye referencias, tablas y puntos de corte), como de las características del síndrome consideradas. Esto sucede, ya que la mayoría de las definiciones propuestas para la población infantil se han basado y adaptado de las definiciones establecidas para los adultos o usan diferentes tablas y puntos de corte para cada característica, en el primer caso sin tomar en cuenta las características de los prepúberes ni los cambios que van sufriendo los niños a medida que van pasando a través de la pubertad para llegar a la edad adulta y en el segundo por aplicar puntos de corte muy diferentes, por ejemplo un percentil 75 o un percentil 90 para el IMC.

Tabla 1.2. Definición de síndrome metabólico de la Federación Internacional de Diabetes para niños y adolescentes.

Para el diagnóstico del síndrome metabólico la persona debe tener obesidad como condición *sine qua non* y dos criterios más de los descritos a continuación.

El síndrome metabólico no puede ser diagnosticado en niños entre 6 - <10 años, pero estos niños se evaluarán si la circunferencia de cintura \geq percentil 90 y si además tienen historia familiar de síndrome metabólico, diabetes *mellitus* tipo 2, dislipidemia, enfermedad cardiovascular, hipertensión arterial u obesidad.

*Para los niños entre 10 y <16 años:

Obesidad: \geq percentil 90 o el punto de corte de los adultos si es más bajo.

Triacilgliceroles: \geq 150 mg/dl

HDL-c: < 40 mg/dl

Tensión arterial: tensión arterial sistólica \geq 130/ tensión arterial diastólica \geq 85 mm Hg

Glucosa: \geq 100 mg/dl o si tiene diabetes *mellitus* tipo 2 se recomienda la prueba de tolerancia a la glucosa

Para mayores de 16 se usan los criterios establecidos para adultos.

HDL-c: colesterol en las lipoproteínas de alta densidad. *Ver referencia para los detalles Zimmet *et al.* 2007

La etiología del SM no está completamente clara, sin embargo, los diferentes estudios indican que estos tres componentes: resistencia insulínica, inflamación y obesidad, principalmente central o visceral, son los factores que convergen para que se den los cambios metabólicos que originan el SM.

Se han propuesto dos teorías que se complementan para explicar el origen de los cambios “la portal” y “la endocrina”.

La teoría portal propone que la relación entre el tejido adiposo visceral, la resistencia a la insulina y el SM se basa en el efecto directo de los AGL sobre el hígado (Figura 1.3). En la obesidad central, el tejido adiposo visceral es más insulino resistente que el periférico y esta propiedad favorece la lipólisis de los TAG en AGL. A raíz de esto, se produce en el hígado un incremento en la síntesis de TAG y en la formación de apo B, así como en el ensamblaje y en la secreción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Al aumentar los TAG plasmáticos se incrementa la tasa de transferencia de ésteres de colesterol desde las HDL hacia las VLDL, catalizada por la proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP); cuanto más alta es la concentración de VLDL, más alta será la tasa de transferencia y como consecuencia disminuyen los niveles de HDL-c. Así mismo, la lipasa hepática y la lipasa

endotelial están sobre-expresadas, lo que provoca un hipermetabolismo de HDL-c que conlleva a la formación de LDL densas y pequeñas, las cuales atraviesan más fácilmente la pared arterial, se unen más ávidamente a los proteoglicanos y son más susceptibles a la oxidación (Aguilera *et al.* 2008). A nivel muscular, los AGL inhiben la captación de glucosa a través de la proteína quinasa-C (PKC) favoreciendo un estado de hiperglucemia a través de la disminución de la captación de glucosa que a su vez favorece la gluconeogénesis hepática y la inhibición la glucogenolisis, el incremento de la secreción pancreática de insulina, así como un menor aclaramiento hepático de la misma (Misra y Vikram 2003).

El hiperinsulinismo favorece la acumulación de TAG tanto en el hígado como en el músculo esquelético, disminuyendo la translocación del transportador de glucosa-4 (GLUT-4) y favoreciendo la apoptosis de las células β del páncreas (Eyzaguirre y Mericq 2009). Si perduran estas circunstancias, se produce un estado de deficiencia de insulina tanto por el aumento de sus requerimientos, ante el estado crónico de hiperglucemia, como por el efecto tóxico de los AGL sobre las células β del páncreas (Aguilera *et al.* 2008).

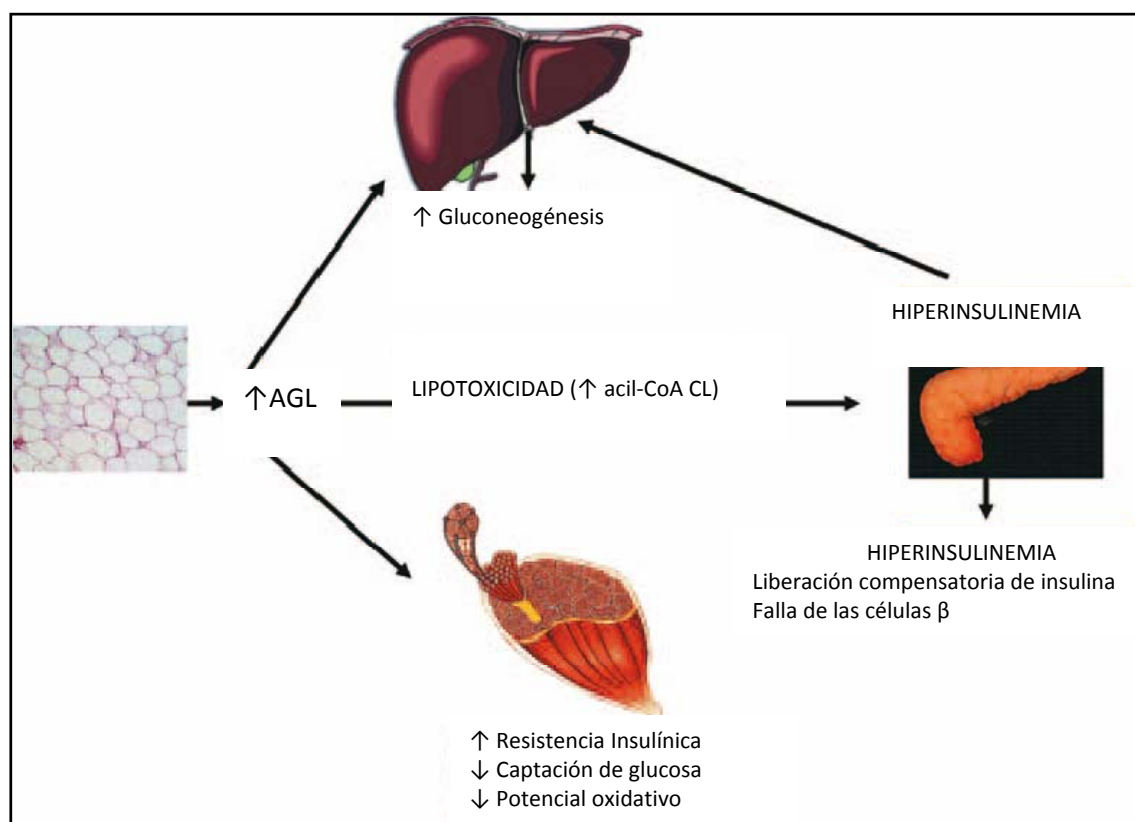


Figura 1.3. Teoría portal de la interrelación entre el incremento de ácidos grasos libres de la obesidad y la resistencia a la insulina. AGL: Ácidos grasos libres; acil-CoA CL: Acil-Coenzima A de cadena larga. Modificado de Aguilera *et al.* 2008

El paradigma endocrino que se desarrolló en paralelo con la hipótesis del síndrome de almacenamiento de grasa ectópico, establece que el tejido adiposo segrega una amplia variedad de hormonas endocrinas y adipoquinas que regulan el metabolismo energético y fundamentalmente el metabolismo lipídico. Según esta propuesta, el tejido adiposo funciona como una glándula endocrina que podría alterar las funciones del sistema nervioso central y de algunos órganos como el músculo esquelético o el hígado. La leptina es la principal adipoquina que se encarga de regular el metabolismo lipídico, así como la insulina el metabolismo glucémico. La leptina promueve la pérdida de peso a través de la regulación del apetito y de la estimulación de la actividad metabólica; a su vez, hace que la grasa acumulada se deposite en el tejido adiposo y no en otros tejidos no grasos. A través de la activación de la AMP-quinasa (AMP-K) inhibe la acetil coenzima-A carboxilasa que es una enzima que participa en la formación de TAG y ácidos grasos. En la obesidad, se produce un estado de resistencia a la leptina con hiperleptinemia, por lo que se tiende a la esteatosis y a la hipertrigliceridemia. Por otra parte, la adiponectina es otra adipoquina segregada principalmente por el tejido adiposo, que al igual que la leptina, evita la esteatosis en los tejidos no grasos y a su vez tiene propiedades de sensibilidad a la insulina, antiaterogénicas y antiinflamatorias. Esta adipoquina disminuye en los estados de obesidad y es actualmente considerada un factor independiente asociado al SM (Liu *et al.* 2006). El PAI-1 es una adipoquina que aumenta en la obesidad y que se correlaciona negativamente con la adiponectina; se sabe que afecta la fibrinólisis y favorece la aterosclerosis, incrementando el riesgo de ECV al que también contribuyen moléculas de adhesión como la molécula de adhesión intracelular soluble 1 (sICAM-1), la molécula de adhesión vascular soluble 1 (sVCAM-1) y la sE-Selectina, que facilitan la progresión de la aterosclerosis al favorecer la migración transendotelial de los leucocitos a los lugares de inflamación del endotelio y transmitir señales intracelulares para desencadenar cascadas que pueden perpetuar la respuesta inflamatoria. Estos cambios en cuanto a las adipoquinas, preceden a cualquier alteración de metabolitos como AGL y glucosa asociados a la resistencia insulínica en la infancia (Cañete *et al.* 2007; Gil-Campos *et al.* 2011).

Componentes del SM

Adiposidad

La adiposidad medida como índice de masa corporal se ha asociado con las complicaciones y con los riesgos de mortalidad de la obesidad, sin embargo, cuando la adiposidad, específicamente la central o visceral, se mide como un aumento en la circunferencia de cintura (CC) se asocia fuertemente con la resistencia insulínica, hipertensión arterial y dislipidemia, lo cual contribuye a altas tasas de morbilidad y mortalidad (Ouchi *et al.* 2011). La IDF en su última clasificación para niños y adolescentes considera la adiposidad central como una condición “*sine qua non*” para el diagnóstico de SM (Zimmet *et al.* 2007) mientras que para otros autores puede o no estar presente ya sea como adiposidad central o como IMC elevado. (Cook *et al.* 2003; Cruz *et al.* 2004; Weiss *et al.* 2004; Vinner *et al.* 2005; Ford *et al.* 2005; Zimmet *et al.* 2007). Si bien es cierto que no todos los pacientes obesos tienen alteraciones metabólicas, tampoco todos los pacientes con enfermedades metabólicas tienen obesidad. Sin embargo, las cifras indican que en los niños y adolescente no obesos la prevalencia de SM va de 0 a 1 por ciento de acuerdo a la clasificación utilizada, mientras que en los obesos la prevalencia varía entre 12 y 44 por ciento (Nelson *et al.* 2010).

Diferentes estudios apuntan en una u otra dirección en el sentido de usar el perímetro de cintura o el IMC para el diagnóstico del SM, cada uno con bases fundamentadas y con poca diferencia en la prevalencia de SM calculada al usar uno u otro criterio. No obstante, es importante para el personal clínico tomar en cuenta diferentes factores como contextura del niño, maduración temprana o tardía, práctica de algún deporte, etnia, etc., ya que pueden afectar el diagnóstico.

El tejido adiposo visceral parece jugar un papel importante, ya que éste crece mediante hiperplasia e hipertrofia celular, mientras que el subcutáneo crece fundamentalmente mediante hiperplasia. Durante la obesidad, parece haber una expresión diferencial de las adipoquinas del tejido adiposo visceral, que propicia una diferenciación anormal de los preadipocitos, aportándoles mayor capacidad de almacenamiento de lípidos y menor sensibilidad insulínica (Smith *et al.* 2007). Además,, la hipertrofia celular observada en el tejido adiposo visceral, resulta en una disfunción celular con consecuencias metabólicas desfavorables (Bays *et al.* 2008) al promover la lipólisis, la liberación de gran cantidad de AGL y la disminución de la oxidación de los mismos. Asimismo, las bajas concentraciones de

adiponectina favorecen la disminución de la β -oxidación de los ácidos grasos (Van Gaal *et al.* 2006). Cuando esto sucede, los ácidos grasos comienzan a acumularse en tejidos periféricos no adiposos induciendo resistencia insulínica, disfunción de las células β y del metabolismo glucídico en general (Unger y Zhou 2001). Los AGL inducen la producción de TNF- α que a su vez estimula otras citoquinas proinflamatorias como la IL-6 que juntas generan una respuesta de fase aguda aumentando la producción hepática de PCR e inhibiendo la GLUT-4, los receptores insulínicos y la liberación de insulina. Los AGL también afectan la función endotelial en parte a través de la disminución de la óxido nítrico sintasa endotelial, lo que conlleva a aumentar el riesgo de padecer ECV.

Metabolismo glucídico y resistencia a la insulina

La insulina juega un papel muy importante en el metabolismo de la glucosa y en la homeostasis energética del organismo. El equilibrio de este metabolismo se basa en una producción y secreción adecuada de insulina por el páncreas y en una sensibilidad tisular normal ante la acción de esta hormona, los cuales se traducen en un aumento de la captación de glucosa y una supresión de la producción hepática de la misma (Nelson 2010). La resistencia a la insulina se define como un estado de respuesta anómala o defectuosa de la insulina en los tejidos periféricos, acarreado un aumento en la producción de la misma (Ten y Maclaren 2004). Se produce por alteraciones en la cascada de señalización insulínica, por defectos en la producción o degradación de la misma o por la inhibición de sus receptores (Chiarelli y Marcovecchio 2008). Otros mecanismos que se postulan para explicar el desarrollo de la resistencia insulínica son la disminución del aclaramiento de insulina, efecto antilipolítico, aumento de ciertas adipoquinas y citoquinas proinflamatorias que afectan la sensibilidad tisular de la insulina, así como el desgaste y agotamiento acelerado de las células β del páncreas.

La resistencia a la insulina tiene un origen complejo, ya que en él intervienen una predisposición genética, factores ambientales como la dieta y la actividad física y hormonales; todos juntos dan como resultado una disminución de la acción de la insulina. El principal factor de riesgo es la obesidad y en menor medida el sedentarismo, la pubertad, la etnia y los antecedentes familiares de DM2 y/o intolerancia a la glucosa (Akinçi *et al.* 2007).

Los mediadores inflamatorios del tejido adiposo pueden ocasionar resistencia insulínica en los adipocitos. En respuesta a nutrientes o a señales inflamatorias, la quinasa c-

Jun N-terminal (JNK) y/o el inhibidor de la k quinasa (IKK) son activados y actúan sobre el receptor de sustrato de la insulina 1 (IRS-1), lo cual inhibe la cascada de señalización del receptor de la insulina. Aparte de la JNK y la IKK, la proteína quinasa R (PKR), la proteína S6 quinasa (S6K), la proteína quinasa C θ (PKC θ), la quinasa reguladora de señales extracelulares (ERK) y el blanco de la rapamicina en los mamíferos (mTOR), pueden también actuar sobre la IRS-1 para inhibir su fosforilación, implicando que la activación de diversas redes pueden antagonizar la señalización de la insulina. Las quinasas inflamatorias no sólo inhiben la acción de la insulina a través de actuar directamente sobre moléculas de la señalización de la insulina, sino que ellas también regulan el flujo de los programas de transcripción a través de factores de transcripción del activador de la proteína 1 (AP-1), del factor nuclear kappa B (NF κ B) y del factor regulador del interferon (IRF), lo cual provoca un aumento en la expresión de citoquinas proinflamatorias. Estas citoquinas participan en la respuesta inflamatoria y aumentan la inhibición de la señalización de vías metabólicas (Gregor y Hotamisligil 2011).

La resistencia a la insulina hepática se asocia con una disminución de la capacidad de la insulina para inhibir la gluconeogénesis y una alteración en el metabolismo lipídico, mientras que en el músculo esquelético la resistencia a la insulina se manifiesta como una disminución de la acción de la insulina para la captación de glucosa y una reducción de la síntesis de glucógeno. Los daños en los receptores de insulina, ya sea por disminución o inhibición de los mismos o en el post receptor, ocasionados principalmente por la inhabilidad de actuar como sustratos para los receptores, contribuyen a la resistencia insulínica. Las alteraciones del metabolismo lipídico como la producción y liberación de adipocitoquinas que inducen la lipogénesis hepática, la activación de la respuesta secretora que involucra mediadores inflamatorios y reactantes de fase aguda y el aumento del proceso inflamatorio en el hígado desemboca en el inicio del hígado graso no alcohólico. Estos factores con todas sus consecuencias contribuyen a la patogénesis de la resistencia a la insulina a través de la limitación de la respuesta de los tejidos a los nutrientes.

La técnica reconocida como el *gold standard* para medir la resistencia insulínica es el clamp euglicémico-hiperinsulinémico, esta técnica mide directamente el efecto de la insulina para promover el uso de glucosa; sin embargo, tiene como desventaja que es invasiva y su uso es difícil en la consulta diaria. Existen otros métodos como el índice de resistencia a la insulina (HOMA-IR) (*Homeostasis Model Assessment of insulin resistance*) o el índice

cuantitativo de sensibilidad a la insulina (QUICKI) (*Quantitative Insulin Sensitivity Check Index*) que determinan la resistencia y sensibilidad periférica a la insulina, respectivamente. El índice HOMA se define como el cociente de insulinemia ($\mu\text{U/ml}$) x glucemia basal (mmol/l)/22.5 (Matthews *et al.* 1985). El índice QUICKI como $1/\log$ insulinemia basal ($\mu\text{U/ml}$) + \log glucemia basal (mg/dl) (Katz *et al.* 2000). Estos dos índices dan una visión bastante real del estado de resistencia insulínica; inclusive el HOMA-IR se ha correlacionado significativamente con el clamp euglicémico-hiperinsulinémico en niños (Ijzerman *et al.* 2009; Gungor *et al.* 2004) y adultos (Lansang *et al.* 2001).

A pesar de ser uno de los principales factores que intervienen en el SM, casi ninguna definición toma en cuenta a la resistencia insulínica como tal, sino que usan como factor la hiperglucemia definida como concentraciones plasmáticas en ayunas, antiguamente > 110 mg/dl y actualmente > 100 mg/dl o realizan el test de tolerancia a la glucosa ≥ 140 mg/dl y < 200 mg/dl a las 2 horas. Las definiciones que usan la resistencia a la insulina, toman en cuenta la hiperinsulinemia en niños prepúberes como $\geq 15,05$ mU/l, en niños entre los estadios 2-4 >30 mU/l y en los post-puberales >20 mU/l (Goran y Gower, 2001; Alberti y Zimmet 1998).

Hipertensión arterial

La obesidad participa en el desarrollo de disfunciones vasculares y cardíacas a través de la activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), de la estimulación del sistema nervioso simpático (SNS), la resistencia insulínica, el aumento de los AGL y leptina, la disminución de adiponectina, y la producción de PAI-1 y moléculas de adhesión vascular entre otros factores.

La secreción de angiotensinógeno y de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) estimulan la síntesis de aldosterona, la cual favorece el aumento del volumen sanguíneo, de la tensión arterial, la disminución de potasio y magnesio, el aumento del PAI-1, de la agregación plaquetaria y de las especies reactivas de oxígeno (Haslam y James 2005). En pacientes obesos se ha observado el incremento de angiotensinógeno y de angiotensina II; esta última, como es bien conocido, tiene muchos efectos sobre el endotelio y la musculatura vascular lisa, incluyendo la vasoconstricción que contribuye a la hipertensión arterial. Además de estos cambios, la activación de este sistema favorece el incremento de la matriz extracelular y la remodelación de los vasos. Una vez iniciado este proceso, disminuye la producción de adiponectina y aumenta la de leptina, y a nivel vascular se secretan diferentes factores como

sVCAM-1, sICAM-1, sE-selectina y MCP-1, que contribuyen a la proliferación endotelial y al proceso inflamatorio vascular (Berg y Scherer 2007), aumentando la hipertensión arterial, acelerando el proceso aterosclerótico y produciendo hipertrofia del ventrículo izquierdo, síndrome coronario agudo o arritmias.

La obesidad estimula el SNS, este a su vez estimula al corazón, al riñón y a los vasos sanguíneos, provocando un aumento del gasto cardíaco, incrementando la reabsorción de sodio y la vasoconstricción y contribuyendo así al desarrollo de la hipertensión arterial (Landsberg 1986). Por otro lado, el aumento de los AGL que se produce en la obesidad aumenta también el riesgo de ECV a través de la producción endotelial de óxido nítrico (NO) que favorece la vasoconstricción, aumentando los requerimientos de oxígeno del miocardio, disminuyendo la contractilidad del mismo y favoreciendo las arritmias. A su vez, predisponen a la resistencia a la insulina en el músculo esquelético y en el hígado e incrementan la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por parte de los monocitos (Van Gaal *et al.* 2006), induciendo una disfunción endotelial (Dimitrijevic-Sreckovic *et al.* 2007).

Para tomar la hipertensión arterial como factor positivo del SM, a nivel prácticamente mundial se usan las tablas del Informe del Grupo de Estudio para hipertensión arterial (*Task Force Report on High Blood Pressure in Children and Adolescents: a working group report from the National High Blood Pressure Education Program*) en niños de acuerdo a la edad, el sexo y la talla. Algunos autores utilizan el percentil 90 como punto de corte, mientras que otros utilizan el 95.

Dislipemia

La relación existente entre la obesidad y las alteraciones del metabolismo lipídico son bien conocidas y hay estudios de sobra para documentarlo. Los niños obesos tienden a tener elevado los TAG y disminuidas las HDL-c (l'Allemand *et al.* 2010). Las alteraciones lipídicas consideradas componentes del SM son la hipertrigliceridemia y las bajas concentraciones de HDL-c (Weiss *et al.* 2004) aunque algunos autores incluyen también el colesterol plasmático total (Viner *et al.* 2004).

Estas alteraciones del metabolismo lipídico están asociadas a estados de resistencia insulínica, con la presencia o no de DM2. La resistencia a la insulina, fundamentalmente en las células musculares y en los adipocitos conlleva un aumento de la concentración plasmática de insulina a lo largo del día y, como consecuencia, se elevan los niveles de ácidos grasos

libres (AGL). Este aumento de AGL es debido al menor efecto antilipolítico de la insulina y a la pérdida de la inhibición de la lipasa sensible a las hormonas (HSL) a nivel del tejido adiposo (Aguilera *et al.* 2008). A raíz de esto, se produce en el hígado un incremento en la síntesis de TAG (Reaven 2006) y en la formación de apo-B, así como en el ensamblaje y en la secreción de VLDL a nivel hepático, conduciendo a una hipertrigliceridemia (Aguilera *et al.* 2008). Al aumentar los TAG plasmáticos se incrementa la tasa de transferencia de ésteres de colesterol desde las HDL hacia las VLDL, catalizada por la CETP; cuanto más alta es la concentración de VLDL, más alta será la tasa de transferencia y como consecuencia disminuyen los niveles de HDL-c (Swenson 1991). Así mismo, la lipasa hepática y la lipasa endotelial están sobre-expresadas, lo que provoca un hipermetabolismo de HDL-c que conlleva a la formación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) densas y pequeñas, las cuales atraviesan más fácilmente la pared arterial, se unen más ávidamente a los proteoglicanos y son más susceptibles a la oxidación. Existen evidencias que indican que la tasa de fraccionamiento catabólico de la apo-A1, componente estructural de las HDL-c, aumenta como consecuencia de la hipertrigliceridemia (Reaven 2006), lo cual es otro factor que contribuye a la disminución de HDL-c.

Tanto las concentraciones de TAG como las de HDL-c, son de los componentes del SM que más varían en el momento de clasificarlo, ya que cada definición propuesta utiliza tablas o valores diferentes. Por otra parte, hay autores que sugieren que dentro del perfil lipídico infantil se debería tomar en cuenta la apo-B y la apo-A1, pues tanto el incremento de la primera como el descenso de la segunda, característico en los niños obesos (Zhang *et al.* 2008), indican una predisposición al desarrollo de aterosclerosis en etapas posteriores (Juonala *et al.* 2008). Además, la apo-B se asocia más íntimamente con diversos biomarcadores inflamatorios y con resistencia insulínica, que los TAG y colesterol total o sus fracciones (Sniderman y Faraj 2007).

Genética de la obesidad

El rápido aumento de la prevalencia de obesidad en las últimas décadas ha dejado interrogantes como qué papel tiene la genética en su etiología. Está muy claro que los cambios seculares en la prevalencia de la obesidad se han dado como consecuencia de los cambios ambientales observados en los últimos años, como por ejemplo la rápida

urbanización de algunas zonas y las migraciones (O'Rahilly y Farooqi 2006), que han dado como resultado modificaciones en los estilos de vida donde predominan el alcance y la facilidad de conseguir y consumir alimentos con mucha palatabilidad y con alto contenido calórico y la disminución de la actividad física tanto en el trabajo como en las actividades de ocio. Todos estos cambios ambientales observados en muchas sociedades, no se pueden aislar de los factores biológicos, que normalmente controlan el peso y la composición corporal y de la evidencia de que diferencias inter-individuales de la susceptibilidad a la obesidad tienen determinantes genéticos. Esto tiene importancia, ya que los avances del conocimiento sobre esta enfermedad en los últimos años han permitido un mejor entendimiento de la misma. Los estudios familiares y de gemelos han demostrado que los factores genéticos aportan entre un 40 – 70 por ciento de las variaciones en el IMC (Willer *et al.* 2009). Tanto estudios de desequilibrio de ligamiento como de asociación han dado como resultado la identificación de *loci* en los cuales las variaciones genéticas se han asociado con la obesidad y sus fenotipos, y se han caracterizado varios síndromes monogénicos (O'Rahilly y Farooqi 2006).

Tipos de estudios genéticos en obesidad

Para la identificación de genes que contribuyen al riesgo de enfermedades complejas, hay que realizar un trabajo bastante tedioso y extenso. Las principales estrategias usadas para la identificación de estas enfermedades han sido: genes candidatos, análisis paramétricos y no paramétricos de ligamiento, estudios de asociación poblacional y modelos animales.

Para la identificación de SNPs o variantes génicas relacionadas con la obesidad común se han utilizado las siguientes estrategias:

Estudios de ligamiento: Los estudios de ligamiento se realizan con marcadores genéticos anónimos y no sobre genes candidatos. Cuando el número de marcadores es lo suficientemente elevado el estudio se denomina barrido genómico. Estos barridos permiten localizar *loci* asociados a una característica o rasgo cuantitativo (QTL), es decir, regiones del genoma que contienen genes susceptibles de influenciar el rasgo estudiado. Las regiones así localizadas pueden estudiarse posteriormente para identificar los genes responsables de los ligamientos genéticos con el rasgo cualitativo en estudio, por ejemplo la obesidad. En estos estudios se requiere la inclusión de una población relacionada, se suelen emplear familias grandes con varios miembros afectados y sus análisis permiten identificar zonas del genoma de interés, pero tienen poca resolución. En esas zonas identificadas puede haber centenares de

genes interesantes y miles de SNPs candidatos. Esta técnica ha sido exitosa en encontrar alelos relacionados en todo el genoma, particularmente en los desórdenes monogénicos o de transmisión mendeliana. Sin embargo, este tipo de estudios ha tenido menos éxito para encontrar genes asociados a enfermedades poligénicas y rasgos complejos. Esto puede deberse en parte, al limitado poder de la técnica para detectar el efecto de alelos comunes con modesta influencia en la enfermedad.

Estudios de asociación genética: Los estudios de asociación buscan relacionar un marcador genético particular con una enfermedad (o un rasgo complejo) a través de una población, más que dentro de familias. Existen varios esquemas posibles en el diseño de un estudio de asociación genética: estudios de caso-control retrospectivos o de cohortes prospectivas. En el primer caso, los individuos pueden ser elegidos basándose en su fenotipo y en el segundo los individuos miembros de una cohorte son seguidos longitudinalmente en el tiempo para observar el desarrollo de la enfermedad, mientras que también se miden otros fenotipos. Una ventaja de las cohortes prospectivas es que puede medirse, en forma no sesgada, un factor de interacción ambiental (lo que permite el control estadístico por la influencia de dicho factor). Por otra parte, los estudios de caso-control retrospectivos pueden introducir sesgos debido al conocimiento del estado de la enfermedad.

Los estudios de asociación pueden ser conducidos en múltiples familias o en grupos de individuos no relacionados. El uso de familias requiere métodos analíticos que tomen en cuenta la correlación esperada de genotipos entre individuos relacionados. El reclutamiento de pedigrís de sujetos relacionados puede ser difícil, caro y lento. Por otra parte, los individuos no relacionados son mucho más fáciles de reclutar, pero son susceptibles de estratificación poblacional. Una vez que los individuos y la información fenotípica han sido recolectados, deben seleccionarse los marcadores genéticos para genotipar. Pueden ser marcadores individuales, o que abarquen genes, regiones de cromosomas o en última instancia, el genoma entero.

Existen dos aproximaciones para establecer la relación entre variantes genéticas y riesgo de enfermedad:

El estudio de un "SNP candidato": es un test directo de asociación entre una variante putativa funcional y el riesgo de enfermedad. En este caso, se establece un gen candidato de antemano basado en estudios previos o evidencia experimental biológica.

La "asociación indirecta" consiste en probar un mapa denso de SNPs para la asociación con la enfermedad. La ventaja del análisis de asociación indirecta es que no requiere la determinación previa de cuál SNP podría ser funcionalmente importante. La desventaja es que se necesita genotipar un gran número de SNPs.

La disponibilidad actual de bases de datos de SNPs, así como de métodos de genotipado de alto rendimiento, hace posible utilizar esta última metodología con razonable éxito. El proyecto internacional HapMap tiene el objetivo principal de identificar adecuados grupos de SNPs que abarquen el genoma, facilitando en gran medida el acercamiento basado en el desequilibrio de ligamiento (DL). El inconveniente es que este tipo de estudios es habitualmente mal interpretado y por lo tanto parece ser pobremente reproducible. La posible causa de tales inconsistencias son los casos falsos-positivos o falsos-negativos que fallan al tratar de replicar una asociación válida, o posiblemente una verdadera heterogeneidad entre los estudios comparados. Es posible también que el fallo en la replicación de las asociaciones se deba al efecto modesto que tienen las variantes causales en el riesgo de enfermedad. En la mayoría de los estudios de asociación, la variable causal se asocia con un 10-15 por ciento de aumento del riesgo de enfermedad, y por lo tanto se requieren tamaños de muestras de miles de pacientes para alcanzar un valor nominal de $p < 0,05$.

Pese al elevado número de estudios cuyo objetivo es validar SNPs de diferentes genes, muchos han mostrado una asociación opuesta o nula de estos genes con la obesidad, por lo que en muchos casos no se puede llegar a una conclusión final. Esto se debe principalmente a que muchos de estos estudios incluyen poblaciones pequeñas, incluso de menos de 1.000 individuos. Por lo que en los últimos años se observan con mayor frecuencia estudios a gran escala o también llamados meta-análisis, que incluyen más de 5.000 participantes, y que proporcionan datos suficientes que permiten confirmar la asociación de un determinado gen a una enfermedad.

Estos estudios también han servido para desmentir asociaciones de genes candidatos a la obesidad establecidas tras realizar estudios de baja escala. Tal es el caso de la variante K121Q del gen *ENPP I* que tradicionalmente se había asociado a la obesidad y a la diabetes, pero que tras realizar tres estudios de asociación de gran escala con más de 8.000 individuos dos de ellos y, más de 5.000 un tercero, en adultos europeos y afroamericanos, se ha demostrado la falta de asociación de dicha variante génica a la obesidad. Igualmente ha

ocurrido con la variante -174G-C *IL6* antes asociada a la obesidad, y que tras un meta-análisis en 26.944 individuos de 25 poblaciones se desmintió tal conclusión.

Estudios amplios de asociación del genoma: Los GWAS representan la aproximación actual más utilizada para relacionar las variaciones genéticas con la diversidad fenotípica. En la última década se han producido importantes avances tecnológicos, los que han permitido pasar del análisis de un solo SNP al análisis de 1 millón de SNPs por individuo. Por otra parte, los esfuerzos de la comunidad científica para diseccionar el genoma en bloques de desequilibrio de ligamiento han sido extraordinarios. Se estima que 10 millones de los SNPs comunes, aquellos con una frecuencia alélica siquiera menor al 5 por ciento, se transmiten a través de las generaciones en bloques, permitiendo a algunos cuantos SNPs particulares o etiquetadores (tag) capturar a la mayoría de SNPs dentro de un mismo bloque (Manolio 2010). Estos avances han conducido a una verdadera avalancha de descubrimientos de variantes genéticas asociadas a las enfermedades comunes en los dos últimos años.

Hasta junio de 2010 se habían realizado más de 600 estudios GWA, los cuales asocian 904 SNPs con una significación de $p < 5 \times 10^{-8}$ a 165 enfermedades o rasgos distintos. Entre este total de GWAS son 20 los que se han realizado en obesidad, IMC, adiposidad o masa grasa (Hindorff *et al.* 2011).

Del total de SNPs asociados a algún rasgo o enfermedad, solamente el 12 por ciento están localizados dentro o están en desequilibrio de ligamiento con regiones de genes que codifican proteínas. Aproximadamente 40 por ciento de los SNPs asociados a algún rasgo están ubicados en zonas intergénicas y el otro 40 por ciento en intrones no codificantes. Estos dos hallazgos, han supuesto destacar los potenciales roles de los intrones y particularmente de las regiones intergénicas en la regulación y la expresión génicas (Hardy y Singleton 2009).

Sin embargo, los estudios GWA, aunque tienen muchos aspectos positivos, también tienen varias limitaciones importantes. Entre los beneficios podemos destacar que no necesitan una hipótesis inicial, usan datos en formato digital que pueden ser extraídos y aumentados sin degradación, fomentan la formación de consorcios los cuales establecen lazos para futuras investigaciones, descartan asociaciones genéticas específicas, aportan datos de la descendencia de cada individuo, los cuales ayudan a emparejar casos y controles, y proveen datos de las secuencias del DNA de casos y controles (SNP) así como de las variantes en el número de copias de un gen (Hardy y Singleton 2009).

Entre las limitaciones tenemos: la primera es la gran dificultad para moverse más allá de las meras asociaciones estadísticas a las bases funcionales de la relación entre un determinado intervalo genómico y una enfermedad o rasgo complejo dado. La segunda es que las asociaciones identificadas en una población frecuentemente no son transferibles a otras. La tercera es que la mayor parte de la fracción heredable de las enfermedades complejas no es tomada en cuenta por los estudios GWA. Esta última limitación se puede explicar por el hecho de que dichos estudios no capturan la información de las variantes raras del genoma (< 1 por ciento de frecuencia) que aún no se conocen. De hecho, las plataformas comerciales para los estudios GWA sólo contienen de 300.000 a 500.000 SNPs comunes para detectar diferencias entre casos y controles. Sin embargo el término «*genome-wide*» es equívoco, ya que sólo están etiquetados aproximadamente el 20 por ciento de los SNPs comunes y además no está contemplada ninguna de las variantes raras.

A pesar de todo ello, el uso de estas tecnologías para la determinación de las secuencias del DNA ha supuesto importantes avances en el conocimiento, a la vez que ha planteado nuevas cuestiones sobre el papel de las variantes genéticas humanas en la salud y la enfermedad.

El hallazgo más importante de estos estudios ha sido que la mayoría de los genes asociados a muchas enfermedades comunes no habían sido anteriormente relacionados con los rasgos fenotípicos bajo investigación. Esto implica que existen numerosas vías metabólicas y de señalización celular implicadas en las enfermedades comunes hasta ahora no descubiertas. Por ejemplo, la susceptibilidad a padecer diabetes de tipo 2 parece implicar a genes en diferentes vías que afectan a la formación y función de las células β del páncreas, así como a vías que afectan los niveles plasmáticos de glucosa en ayuno y a la obesidad.

Síndromes monogénicos y alteraciones cromosómicas o síndromes mendelianos.

Está bien establecido que diversas mutaciones en varios genes que codifican proteínas implicadas en la regulación del apetito son responsables de alteraciones patológicas mendelianas en las que la obesidad es el fenotipo más obvio. La dilucidación de las causas de algunas de estas formas de obesidad monogénica se ha beneficiado del clonado posicional de una serie de genes murinos entre los que se encuentran los de la leptina (*LEP*), receptor de la leptina (*LEPR*), carboxipeptidasa E y de la proteína orexigénica agouti. La manipulación genética dirigida ha hecho posible también establecer el papel regulador de moléculas tales

como el receptor de la melanocortina (*MC4R*). Estos descubrimientos fueron seguidos rápidamente por la identificación de formas recesivas monogénicas raras de obesidad humana causadas por mutaciones en los genes que codifican *LEP*, *LEPR*, prohormona convertasa 1 (*PC1*, una endopeptidasa implicada en el procesamiento de pro-hormonas tales como la insulina y la proopiomelanocortina - *POMC*) y la propia *POMC*. Asimismo, se han descubierto varias formas relativamente frecuentes de obesidad (1-6 por ciento) causadas por mutaciones en el gen que codifica para el *MC4R*. Todas estas formas de obesidad se asocian a obesidad mórbida juvenil. Los mecanismos responsables del exceso de acumulación de grasa en estas formas de obesidad son desconocidos, aunque se sabe que comparten algunos hechos fisiopatológicos semejantes a las formas genéticas de obesidad en ratones (Aguilera *et al.* 2009).

Por otra parte, existen al menos 20 síndromes raros causados por defectos genéticos discretos o anomalías cromosómicas, tanto autosómicas como ligadas al cromosoma X, que se caracterizan por un fenotipo obeso; cuatro de estos síndromes, entre los que se encuentra el de Prader Willi, comparten disfunción hipotalámica, lo que implica al sistema nervioso central en el origen de la obesidad (Aguilera *et al.* 2009).

Se sabe que las obesidades monogénicas y sindrómicas representan únicamente un 5 por ciento de los casos de obesidad y se considera que la principal causa del porcentaje restante (95 por ciento) se debe a la interacción del ambiente con SNPs de un sólo nucleótido de genes susceptibles o candidatos de obesidad (Rankinen *et al.* 2006).

Alteraciones poligénicas

Se denomina variantes poligénicas a cualquiera de un grupo de alelos en los *loci* de genes distintos que colectivamente controlan la herencia de un fenotipo cuantitativo o modifican la expresión de un carácter cualitativo. Generalmente se asume que para los rasgos cuantitativos, cada alelo tiene un efecto pequeño y estos efectos alélicos pueden ser aditivos o no aditivos. Potencialmente, muchas de estas variantes poligénicas relacionadas con la obesidad desempeñan un papel en la regulación del peso corporal. Se estima que el número total de genes con pequeños efectos supera los 100. Si un individuo alberga muchas variantes poligénicas que aumentan el peso corporal, puede llegar a ser obeso. Cualquier variante individual tendrá una frecuencia más alta en obesos que en personas con peso normal y delgados. Una base poligénica de la obesidad implica que es poco probable que el conjunto

específico de variantes poligénicas relevantes para la obesidad en un individuo sea el mismo que para otros obesos (Hinney *et al.* 2010).

Genes candidatos en la obesidad poligénica

El mapa genético de la obesidad humana en su última actualización de 2005, describió la identificación de 11 genes responsables de mutaciones en un único gen y el mapeo de 50 *loci* relacionados con síndromes mendelianos de los cuales se han identificado la mayoría de los genes causantes o fuertes candidatos a serlo. De los estudios en animales, se sabe que hay 244 genes identificados en estudios con ratones mutados o transgénicos que se asocian con el peso corporal y la adiposidad y adicionalmente, hay 408 *loci* asociados a fenotipos relacionados con la obesidad (QTL). En humanos el número de QTL asciende a 253, repartidos en todos los genes excepto en el Y, con un total de 52 regiones genómicas replicadas en 2 o más estudios. Aparte se han reportado 426 de asociaciones positivas con 127 genes candidatos (Rankinen 2006).

A partir de análisis de segregación y los GWAS, como se ha comentado anteriormente, se han obtenido una serie de resultados que indican que en la obesidad intervienen varios genes, que en combinación con el medio ambiente, dan lugar a la aparición de la misma. Por lo tanto, es muy probable que no exista un solo tipo de obesidad, sino varios genotipos con fenotipos similares. Entre los genes implicados en la etiología de la obesidad se encuentran genes que codifican péptidos con función de señal de hambre y saciedad, genes implicados en el crecimiento y la diferenciación de los adipocitos, genes metabólicos y genes implicados en el control del gasto energético. De los 127 genes candidatos descritos asociados a la obesidad tan sólo en 12 se ha demostrado su asociación firme, tras la confirmación de resultados en al menos 10 estudios: (*ADIPOQ*, *ADRB2*, *ADRB3*, *GNB3*, *HTR2C*, *NR3C1*, *LEP*, *LEPR*, *PPARG*, *UCP1*, *UCP2* y *UCP3*). Es necesario destacar que con los estudios GWA se han identificados varios SNPs no esperados asociados con la obesidad, como los de los genes *FTO*, *INSIG2* y *CTNBL1*, además de los del gen *MC4R*. Es necesario destacar la gran importancia del hallazgo del gen *FTO*, ya que su asociación al desarrollo de la obesidad se ha confirmado en diversos estudios con gran número de individuos de poblaciones diferentes. Por otra parte, GWAS recientes en más de 60.000 adultos y 6.000 niños y en estudios familiares de retrotransmisión alélica han confirmado la asociación de una región de 188 kb del gen *MC4R* con la masa grasa, el peso y el riesgo de obesidad. Las mutaciones en

esta región son también las causantes de obesidad monogénica. Asimismo, un meta-análisis realizado partir de 16 GWAS ha identificado dos *loci* (*TFAP2B* y *MSRA*) que se asocian con la CC (adiposidad central). Un tercer *locus*, cerca del gen *LYPALI*, se asocia con la obesidad central únicamente en las mujeres. Otro meta-análisis reciente indica que existen variantes de los genes *TMEM18*, *KCTD15*, *GNPDA2*; *SH2B1*, *MTCH2* y *NEGR1* (en este último la variante es una delección de 45 kb), que se expresan en el sistema nervioso central y que se asocian a obesidad. Un estudio de asociación de finales del año 2010 confirmó 32 asociaciones con la obesidad, de las cuales hay 18 nuevos loci asociados con el IMC cerca de los genes *RBJ-POMC-ADCY3*, *GPRC5B-IQCK*, *MAP2K5-LBXCOR1*, *TNNI3K*, *LRRN6C*, *FLJ35779-HMGCR*, *QPCTL-GIPR*, *SLC39A8*, *TMEM160-ZC3H4*, *FANCL*, *LRP1B*, *PTBP2*, *MTIF3-GTF3A*, *ZNF608*, *RPL27A-TUB*, *NUDT3*, *CADM2* y *PRKDI*, que no se habían asociado previamente con la obesidad ni con algún rasgo relacionado con ella (Speliotes *et al.* 2010).

Es conveniente señalar que a pesar del interés del conocimiento de las variantes genéticas comunes asociadas a la obesidad (frecuencia alélica > 5 por ciento), muchas de ellas con carácter acumulativo, su valor predictivo para la obesidad es muy escaso, ya que todas las variantes combinadas sólo explican el 0,9 por ciento de la variación en la masa corporal. Así, recientemente se ha observado que existen varias delecciones raras (< 1 por ciento) de más de 500 kb en el cromosoma 16p11.2 que se asocian a formas raras de obesidad de elevada penetrancia. Estas delecciones afectan a varios genes, pero en todos los casos al gen *SHB2*, el cual participa en la señalización de la leptina y la insulina. Por otra parte, algunos resultados recientes indican que determinados SNPs, como el rs7903146 del gen *TCF7L2*, influyen sobre la respuesta individual a la terapia de reducción de peso, de manera que los individuos que son homocigotos para el alelo de riesgo muestran una reducción de peso menor cuando se someten a una dieta hipocalórica.

Con independencia de las variantes genéticas, hay que recordar que muchas de las diferencias individuales se deben a factores epigenéticos. Los cambios epigenéticos se refieren a las modificaciones heredables derivadas de la metilación del DNA y de las histonas, que son modificadas por factores estocásticos y ambientales. En el caso de los individuos obesos que responden de forma pobre a los programas de pérdida de peso, se ha observado que existen diferencias en las frecuencias de metilación en 35 *loci*, respecto a los que

responden. Algunos de estos genes están relacionados con el control de peso y la secreción de insulina.

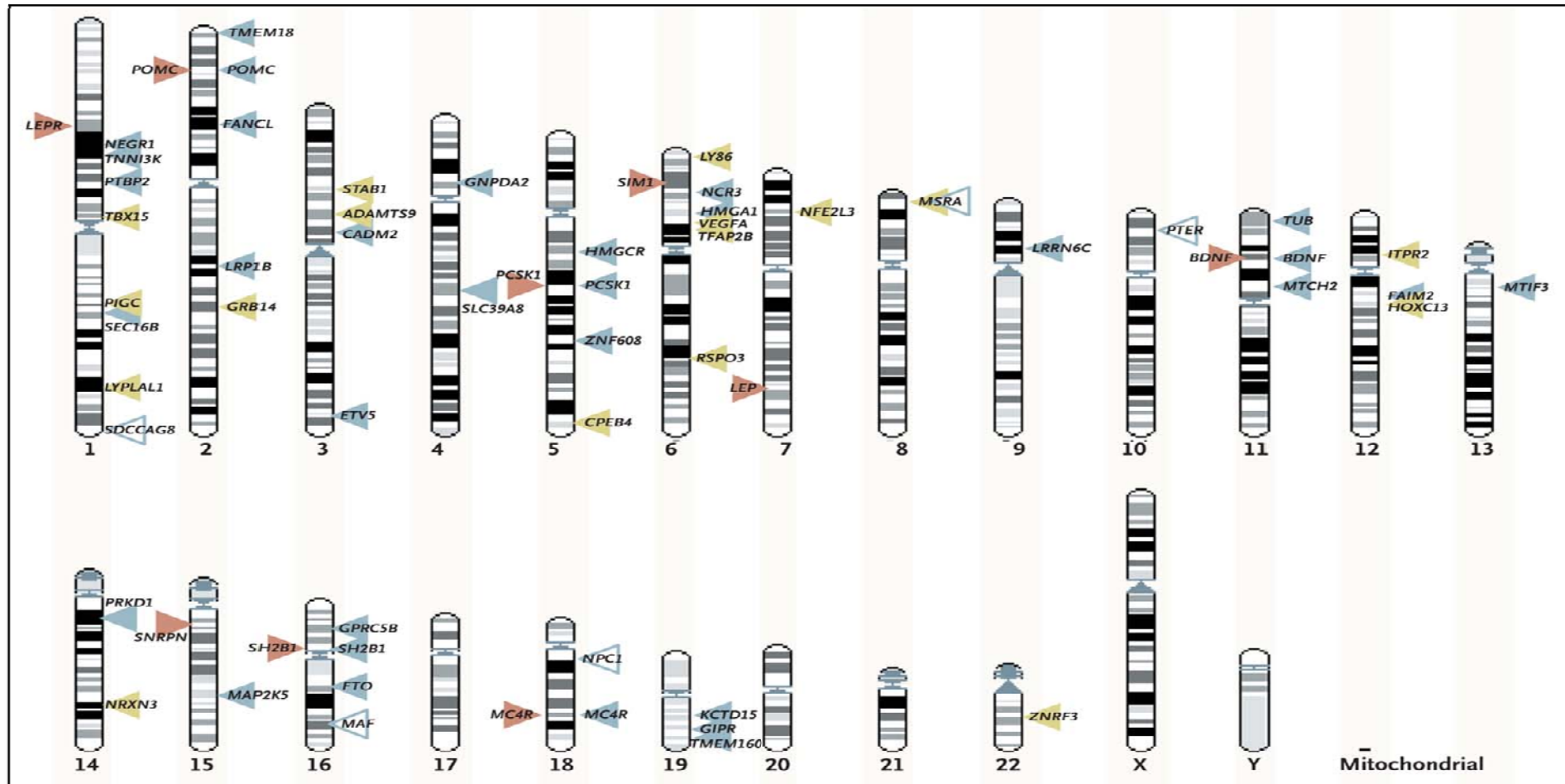


Figura 1.4 Localización genómica de las señales en las cuales se ha comprobado su relación con el IMC, obesidad y fenotipos relacionados. Las señales se muestran de acuerdo a su ubicación en cada cromosoma. Los genes que causan las formas monogénicas y sindrómicas (triángulos rojos). Variantes comunes asociadas con el IMC o la obesidad multifactorial a través de GWAS (triángulos azules), *loci* adicionales identificados en los análisis de caso-control de obesidad extrema (triángulos con borde azul), y las variantes identificadas por su asociación con la CC o el cociente cintura-cadera (sólido triángulos verdes). Tomado de McCarthy 2010

Futuro de la investigación en genética

Al observar las limitaciones de los estudios realizados y de las tecnologías utilizadas, la comunidad científica se ha puesto en marcha para realizar estudios cuyos resultados permitan mejorar las técnicas anteriores. Para ello se han planteado diferentes opciones que se exponen a continuación.

Se ha pensado que los SNPs con rasgos asociados podrían señalar el camino hacia las variantes genéticas funcionales, pero según la comprensión actual de la función y regulación genómica, es poco probable que sean estas variantes por sí mismas las variantes causales. Un primer paso es colocar todos los SNPs conocidos en el bloque del haplotipo representado por el SNP etiquetador (un proceso conocido como mapeo fino) para determinar si uno de estos SNPs tiene una asociación más fuerte (que el SNP etiquetador) o un efecto funcional establecido. Aunque este enfoque ha demostrado ser prometedor en la identificación de variantes causales, su rendimiento ha sido limitado. Secuencias extensas de una región asociada pueden identificar variantes raras previamente desconocidas (frecuencia <1 por ciento) con una posible función biológica (Manolio 2010).

Dada la falta de una buena representación de SNPs con prevalencias menores al 5 por ciento en las actuales matrices de asociación genómica, se está desarrollando un amplio catálogo de SNPs con una prevalencia de 1 al 5 por ciento por el Proyecto 1000 Genomas para su posible inclusión en los estudios de mapeo fino y en las matrices amplias de asociación genómica. En el estudio piloto del proyecto, se han identificado más de 11 millones de nuevos SNPs en lo que inicialmente fue una cobertura poca profunda de 179 personas. Por otro lado, los datos de expresión génica también pueden implicar a un determinado gen como garantía de asociación. Catálogos de anotación (mapas de las funciones de las variantes), tales como los relacionados con la transcripción del factor de unión (promotores de la expresión génica) o con los RNA de interferencia (genes silenciadores), se encuentran actualmente en desarrollo y podrían facilitar la identificación de variantes funcionales (Manolio 2010).

La pequeña proporción de la heredabilidad y el riesgo de la enfermedad normalmente explicados por los resultados de los GWAS presentan un desafío. La realización de GWAS más amplios que identifiquen un mayor número de variantes podría probablemente identificar variantes con efectos aún más pequeños. La importancia de la variación estructural, incluyendo las variantes del número de copias, las inversiones y las translocaciones, es un

área activa de investigación; muchas variantes estructurales para varias enfermedades incluyendo la obesidad subyacen bajo los GWAS.

También se necesitan estudios poblacionales que incluyan muestras con diversas ascendencias geográficas, en particular origen africano reciente. Estas poblaciones, que han sido objeto de más mutaciones y de un mayor número de eventos de recombinación, tienen un mayor grado de variación genética y tramos más cortos de desequilibrio de ligamiento, lo que permite una mejor localización de indicios de asociación genómica (Manolio 2010).

GENES ASOCIADOS CON LA OBESIDAD ESTUDIADOS EN ESTE TRABAJO

FTO

El gen *FTO* (*fat mass and obesity associated*) está ubicado en el cromosoma 16, su tamaño es de 410,499 bases, tiene 9 exones codificantes y la proteína que codifica está formada por 505 aminoácidos (NM_001080432), se ha asociado con el IMC y el riesgo de obesidad. El *FTO* se asoció inicialmente a la DM2, sin embargo análisis posteriores mostraron que la asociación con la DM2, se daba por su asociación al IMC (Frayling *et al.* 2007). Además de su asociación con el IMC y el riesgo de obesidad y sobrepeso, se han descrito asociaciones con otros rasgos relacionados, como el peso corporal, los niveles de leptina, la masa grasa y el perímetro de cintura. Subsecuentemente, el riesgo de ser obeso o tener sobrepeso en humanos asociado al *FTO* se ha confirmado en diversas poblaciones (Scuteri 2007; Scott 2007).

A raíz de su descubrimiento, se realizaron también estudios *in silico*, *in vitro* e *in vivo*; de los dos primeros se obtuvieron las secuencias de sus homólogos en otros animales vertebrados (desde peces hasta mamíferos) y en algas marinas.

Desde su descubrimiento se han estado realizando numerosos estudios para clarificar la función biológica de este gen y su papel en el desarrollo de la obesidad. Parece ser que el *FTO* podría tener una función importante en el balance energético. En estudios recientes se ha descrito este gen como miembro de la súper familia de las dioxigenasas, codificando a la dimetilasa 2-oxoglutarato la cual puede catalizar la desmetilación de ácidos nucleicos (Gerken 2007). Se puede pensar entonces, que la actividad de desmetilación de los ácidos nucleicos del *FTO*, podría regular la expresión de los genes relacionados con el metabolismo y que la

alteración de la regulación de estos procesos podría dar paso a la obesidad (Fawcett y Barroso 2010).

Estudios en ratones obesos *wildtype* han identificado una gran abundancia de mRNA de *FTO* en el cerebro, en especial, en el núcleo hipotalámico que gobierna el control de la ingesta y el gasto energético, sugiriendo que la expresión del *FTO* podría estar regulada por el estado nutricional. Además, se ha observado una sobreexpresión del mRNA de *FTO* en el núcleo arqueado del cerebro de ratones tras la ingesta de comida, y una inhibición tras el ayuno (Fredriksson 2008).

Se han diseñado dos modelos animales de deficiencia de *Fto*, el *Fto*^{-/-} con una mutación que anula el gen en el cual no hay expresión de la proteína, y el *Fto*^{I367F} con una mutación que produce una función parcial que disminuye los niveles de la proteína sin llegar a anularlos por completo. Ambos modelos experimentan diferentes formas de disminución de peso, el primero desde el nacimiento y el segundo hacia la vida adulta, más aún, el primero pesa entre 30-40 por ciento menos que el *wildtype* y el segundo sólo un 10 por ciento menos. Otra diferencia significativa entre ambos, es el hecho de que el primer modelo experimenta retraso del crecimiento, y muerte perinatal. Ahora bien, al alimentarlos con una dieta alta en grasa, ambos modelos experimentan reducción de peso y de tejido adiposo blanco al ser comparados con sus respectivos controles. Estos mismos estudios demostraron que la diferencia de peso no se debía a disminución en la ingesta de alimentos, sino a un aumento en el gasto energético, el cual no se debía a un aumento en la actividad física, sino a un aumento en la actividad del SNS (Fisher 2008; Church 2008). Este aumento en la actividad del SNS podría promover la lipólisis y la termogénesis en el tejido adiposo y muscular (Fawcett y Barroso 2010).

Adicionalmente se realizaron *microarrays* de tejido adiposo en los ratones *Fto*^{I367F} y se observó que la expresión de genes implicados en la inflamación estaba inhibida, y que por el contrario, la expresión de genes implicados en el catabolismo de los ácidos grasos estaba aumentada. Además, se observó una sobreexpresión de genes relacionados con la síntesis de ácidos grasos y con el metabolismo muscular de los carbohidratos, lo cual puede suceder como adaptación del organismo a las bajas reservas grasas. La expresión del neuropeptido Y (NPY) fue similar en ambos, mutado y *wildtype*, en estados de ayuno; sin embargo, después de comer la expresión en los ratones *Fto*^{I367F} fue más baja. Esto sugiere que los ratones

deficientes de *Fto*, son más sensibles a la saciedad y por ende están protegidos de la obesidad a través del control de la sobre alimentación (Fawcett y Barroso 2010).

En estudios de adultos humanos el primer SNP que se asoció significativamente con el IMC fue el rs9939609, el cual se validó en niños (Frayling 2007). Desde ese estudio inicial, se han realizado numerosos estudios que han confirmado esta asociación en población europea (Dina 2007; Hinney 2007; Hunt 2008; Scuteri 2007) y adicionalmente se han identificado otros SNPs como el rs9930506 (Scuteri 2007), rs1121980 (Dina 2007) y el rs8050136 (Stratigopoulos 2008; Wing 2009). En otras poblaciones, específicamente con raíces africanas, se han asociado significativamente los SNPs rs3751812 y rs9941349 a la obesidad (Hassanein 2010). A pesar de que inicialmente la relación entre el *FTO* y la DM2 fue a través del IMC, estudios recientes indican que en algunas poblaciones el *FTO* aumenta la susceptibilidad a DM2 independientemente del efecto en la ganancia de peso (Bressler 2010; Legry 2009; Yajnik 2009); esto sugiere que las variaciones del ambiente u otros factores genéticos pueden contribuir a las diferentes asociaciones observadas entre distintos grupos étnicos (Larder *et al.* 2010).

Los datos obtenidos en los diferentes estudios, tanto en adultos como en niños, indican un vínculo entre los alelos de riesgo del *FTO* y el aumento de la ingesta de alimentos, la falta de respuesta a la saciedad y la pérdida de control de la ingesta. Algo interesante a destacar es que los individuos con el alelo de riesgo, tienen preferencia por la comida con mayor densidad calórica, especialmente la alta en grasa. Por otro lado, se ha vinculado el tener el alelo de riesgo con el gasto energético; sin embargo, diversos estudios no han podido demostrar esto y los que han obtenido alguna asociación la han perdido al ajustar los datos por IMC o masa magra (Larder *et al.* 2010). Juntando estos hallazgos, se puede decir que en humanos el *FTO* ejerce mayor influencia en el consumo calórico que en el gasto.

Publicaciones recientes han añadido nuevos roles del *FTO* como coactivador transcripcional que incrementa el enlace del potenciador del enlace de las proteínas de la familia CCAAT, factores conocidos por su participación en la regulación de la transcripción de la adipogénesis, sugiriendo que el *FTO* podría participar en el desarrollo y mantenimiento del tejido adiposo (Wu 2010). Otros autores que han estudiado la expresión del mRNA del *FTO* en el músculo han llegado a la conclusión de que dicha expresión no está regulada ni por la glucosa ni por la insulina y que en pacientes con DM2 existe un aumento de la expresión muscular de *FTO* en el músculo esquelético y una sobreexpresión en miotúbulos cultivados

resultando en un aumento de lipogénesis y una disminución de la función mitocondrial indicando que el *FTO* podría contribuir a los defectos musculares que caracterizan la DM2 (Bravard 2011).

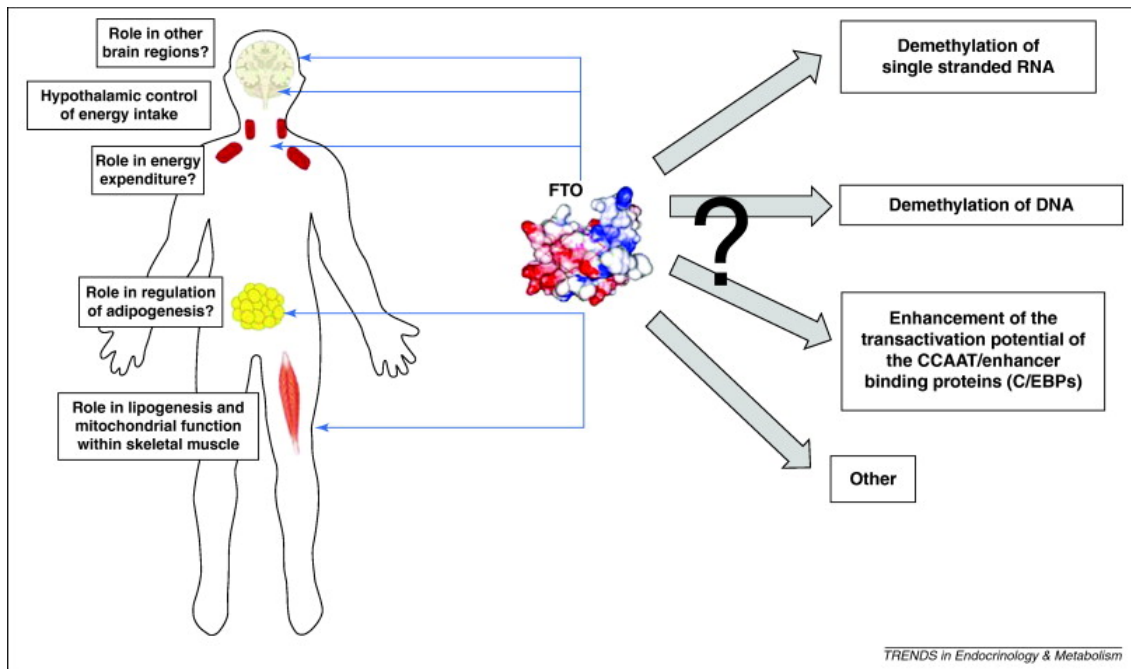


Figura 1.5. Posibles funciones fisiológicas y mecanismos celulares potenciales del FTO. El FTO se expresa fuertemente en el cerebro, y parece jugar un papel en el control hipotalámico de la ingesta energética. Datos recientes indican que el FTO también podría ser importante en la adipogénesis y la función muscular normal. Análisis funcionales sugiere que el FTO puede demetilar ácidos nucleicos, y también podría funcionar como un co-activador transcripcional, sin embargo, se necesita más investigación para entender completamente el papel de esta proteína. Tomado de Larder *et al* 2011.

A pesar de todos los progresos observados en los resultados de los estudios, los mecanismos mediante los cuales el *FTO* afecta la masa corporal en humanos, continúan siendo difíciles de dilucidar (Figura 1.5). Las diversas publicaciones indican que hay varios procesos como los circuitos neurológicos que gobiernan el apetito y el control energético del organismo, así como las vías metabólicas relacionadas con el gasto energético que contribuyen al riesgo de padecer obesidad. Controversias encontradas entre los estudios en animales y en humanos como los que indican que la pérdida de funcionalidad del *FTO* está relacionada con el aumento del gasto energético en los ratones, mientras que en los humanos se ha asociado al apetito y a la ingesta de alimentos, indican que el camino por recorrer es largo y que cada vez hay más pistas de cómo puede actuar metabólicamente este gen, lo cual siempre es positivo, ya que se van abriendo caminos para poder identificar su función exacta (Fawcett y Barroso 2010).

NPY

El NPY es un péptido que actúa como neurotransmisor o neuromodulador dependiendo del contexto. Tiene numerosas funciones entre las que destacan el control del apetito, la actividad neuro-cortical, la actividad cardíaca y la regulación de las emociones, y se le ha asociado a diversas enfermedades como la obesidad, el alcoholismo, la esquizofrenia o la depresión, cada uno de los cuales podría considerarse que tiene componentes conductuales o psiquiátricos (Brothers y Wahlestedt 2010).

La principal área hipotalámica involucrada en el control de la ingesta de alimentos es el núcleo arqueado (ARC). Esta zona contiene, entre otros, dos grupos interconectados de “primer orden” que son por un lado las neuronas que liberan el NPY y la proteína similar a agouti (AGRP), que estimulan el apetito y, por el otro, las neuronas que liberan sustancias anorexígenas como pro-opiomelanocortina (POMC) y el transcrito regulado por cocaína y anfetaminas (CART), los cuales estimulan la saciedad (Valassi *et al.* 2008; Nguyen 2011). Los axones de estas neuronas se proyectan hacia unas neuronas de “segundo orden”, que se encuentran en parte en el núcleo paraventricular (PVN), donde las sustancias anorexígenas, hormona liberadora de tirotropina (TRH), hormona liberadora de corticotropina (CRH) y la oxitocina se segregan, y en parte en el área hipotalámica lateral (LHA) y área perifornical (PFA), donde se producen las moléculas orexígenas, hormona concentradora de melanina (MCH) y orexinas. Cuando las señales de adiposidad llegan al ARC, los péptidos anorexígenos son liberados y activan el circuito catabólico. Por el contrario, la activación de la vía anabólica es conducida por la liberación de péptidos orexigénicos que se produce cuando las concentraciones de la adiposidad de la señal en el cerebro son bajas, lo que indica la urgencia de reponer las reservas de combustible (Valassi *et al.* 2008; Schwartz y Morton 2002) (Figura 1.6).

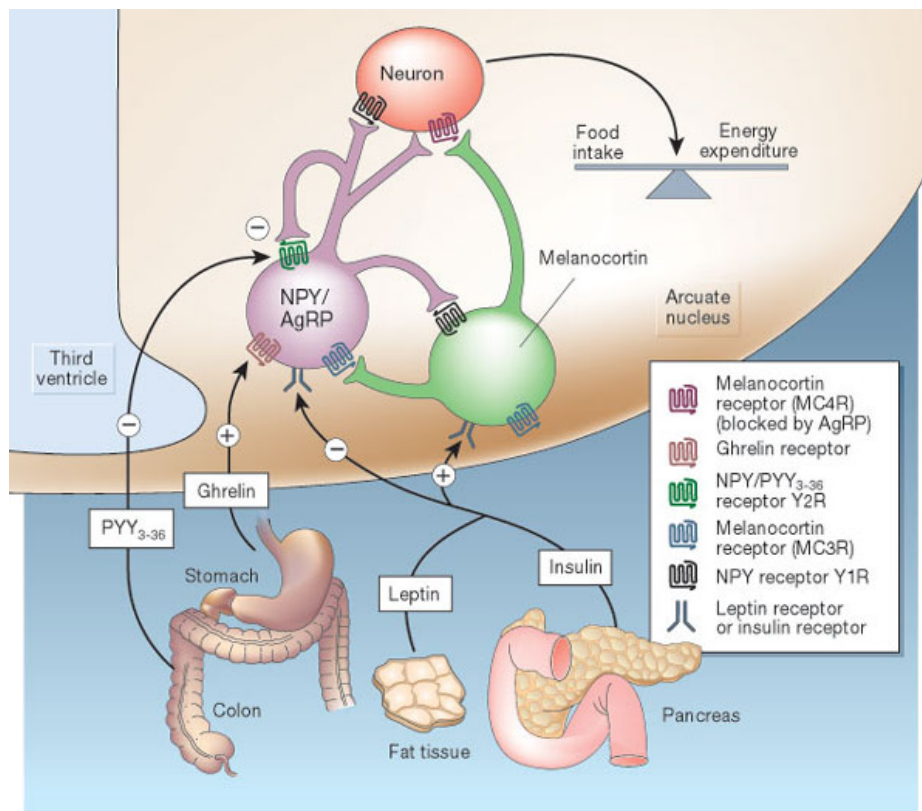


Figura 1.6. Hormonas que controlan el apetito. NPY: neuropéptido Y; PYY: polipéptido pancreático YY; AgRP: proteína similar a agouti. Tomado de Schwartz y Morton 2002.

El NPY es un gen ubicado en el cromosoma 7, su tamaño es de 7,689 bases y tiene 4 exones y sólo 3 codificantes, este péptido está formado por 97 aminoácidos. Los receptores de este gen se expresan además de en el ARC en otras zonas del cerebro y en la médula espinal, a nivel central, y a través del cuerpo en el sistema nervioso simpático entre otros, donde actúa junto con la norepinefrina y el ATP regulando la función cardiovascular. Este neuropéptido disminuye el gasto energético e incrementa la actividad de las enzimas lipogénicas del hígado y del tejido adiposo pudiendo llegar a producir obesidad. Tanto las bajas concentraciones de insulina como las de leptina aumentan la expresión de NPY y disminuyen la de POMC/CART, dando como resultado un aumento del apetito y una disminución de la saciedad; este proceso es contrario cuando las concentraciones de insulina y leptina son altas (Vettor *et al.* 2002; Schwartz *et al.* 2000); asimismo, se ha demostrado que la grelina estimula las vías de señalización NPY/AGRP e inhibe a las neuronas de la POMC provocando como en el caso anterior aumento del apetito (Lucidi *et al.* 2005). Por otro lado, se ha demostrado que el factor neurotrófico ciliar (CNTF) miembro de la familia de las citoquinas, como la IL-

6, suprime la expresión del NPY de la misma manera que la leptina, pero no a través de ella (Xu *et al.* 1998).

El NPY posee 6 receptores que comparte con el péptido YY (PYY) y con el polipéptido pancreático (PP). Se ha observado que los ratones *knockout* del NPY son normales y no presentan alteraciones en la ingesta de alimentos, sin embargo ratones *knockout* de los diferentes receptores tienen resultados contrarios, algunos son más pesados mientras otros lo son menos, estos estudios han dado pie a muchos ensayos clínicos que buscan antagonistas específicos de cada uno de los receptores del NPY para ser utilizados en el tratamiento de la obesidad. (Brothers y Wahlestedt 2010).

El gen del NPY se encuentra en el cromosoma siete y está formado por cuatro exones y tres intrones. Entre los primeros estudios de asociación positiva de alguna variante génica del NPY (-880I/D) con la obesidad se encuentran los de Bray *et al.* 2000, en familias de norteamericanos-mexicanos. Uno de los SNPs más estudiados de este gen es el rs16139; es un SNP funcional Leu7Pro que se ha asociado a numerosas condiciones como aumento del IMC en adultos (Ding *et al.* 2005), desarrollo de la obesidad en adultos jóvenes (van Rossum *et al.* 2006), riesgo a padecer hipertensión arterial (Karvonen *et al.* 2001), concentraciones elevadas de LDL en adultos y en niños (Karvonen *et al.* 1998; Salminen *et al.* 2008), incremento en los TAG séricos en preescolares, así como la asociación con un mayor peso al nacer (Karvonen *et al.* 2000), con el metabolismo de los ácidos grasos libres (Pihlajamaki *et al.* 2003), con el riesgo a acelerar el proceso aterosclerótico o a sufrir aterosclerosis carotídea en adultos (Karvonen *et al.* 2001; Niskanen *et al.* 2000), con el riesgo de sufrir nefropatía diabética en adultos con DM1 (Pettersson-Fernholm *et al.* 2004; Ma *et al.* 2007) y con el riesgo a padecer DM2 en adultos (Ukkola y Kesaniemi, 2007; Nordman *et al.* 2005); contrario a esto, existe un estudio en mujeres premenopáusicas que ha indicado la asociación de este SNP con bajos IMC. Sin embargo, este resultado puede deberse al escaso número de individuos con la variante de riesgo (Mattevi *et al.* 2002).

Existen variantes del gen que se han asociado al alcoholismo (Mottagui-Tabar *et al.* 2005; Fracès *et al.* 2011), a la esquizofrenia (Itokawa *et al.* 2003) y posiblemente a la depresión (Domschke *et al.* 2010). Varios estudios en diferentes poblaciones (predominantemente asiáticas) describen la asociación de algunos SNPs entre los que destacan el rs16147 y el rs16135 con accidentes cerebrovasculares isquémicos (Kim *et al.* 2009; Yu *et al.* 2010; Lee y Kong 2007) y específicamente este último SNP con el inicio de la

aterosclerosis (Shah *et al.* 2009). La expresión del *NPY* se ha asociado a vasoconstricción directa (Lundberg *et al.* 1982), potenciación de la respuesta de la noradrenalina (Schuerch *et al.* 1998), producción de óxido nítrico (Kaipio *et al.* 2009) y estimulación de la mitogénesis de las células musculares lisas (Erlinge *et al.* 2004). Todas estas funciones asociadas al *NPY* pueden explicar porqué la disfunción de este neuropéptido podría estar implicada tanto en la isquemia como en la aterosclerosis.

Aparte de actuar a través de los centros de saciedad, varios estudios han demostrado como el *NPY* puede tener un efecto sobre el metabolismo glucídico y lipídico a través de la activación del SNS (Ruohonen *et al.* 2008 y van de Hoek *et al.* 2008), de forma similar a como lo que sucede en los casos de estrés (Figura 1.7) (Kuo *et al.* 2007; Abe K *et al.* 2010).

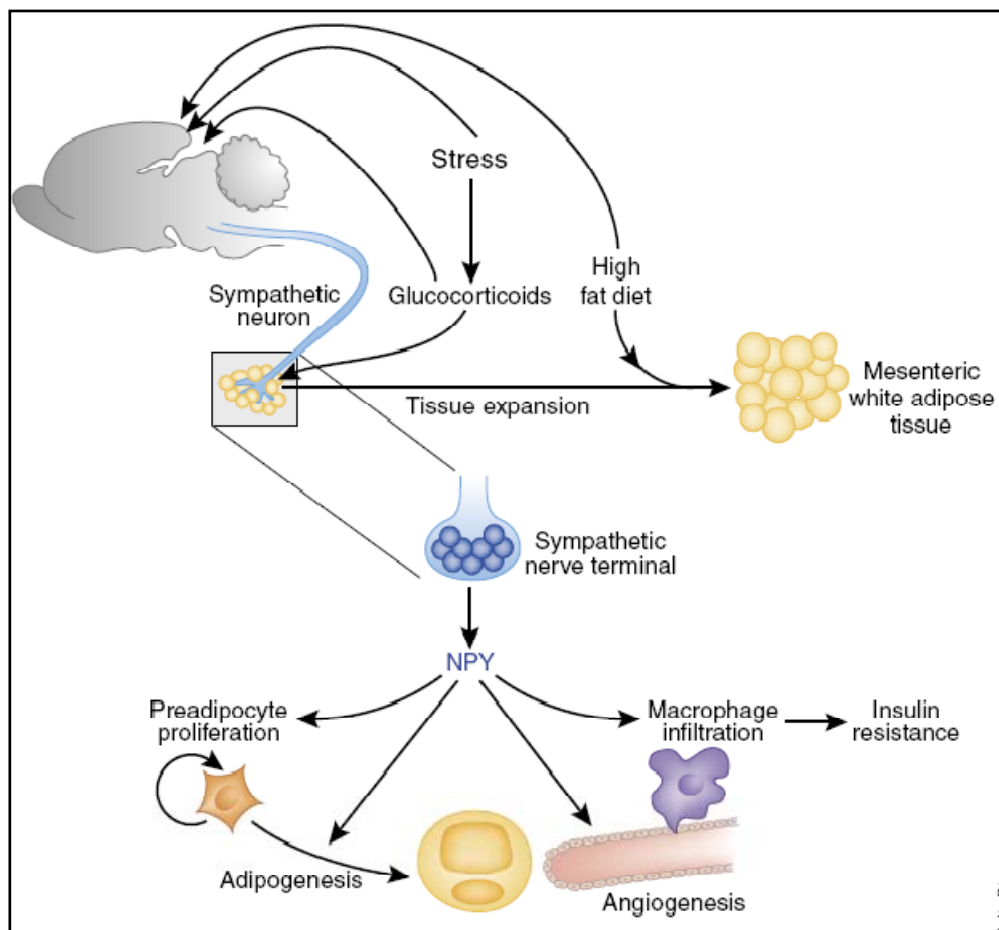


Figura 1.7. Inducción de obesidad a través del stress y el *NPY*. *NPY*: neuropéptido Y. Tomado de Kuo *et al.* 2007.

HSD11B1

La 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1 (11 β -HSD1) es una enzima que cataliza la regeneración del cortisol activo a partir de la cortisona biológicamente inactiva, provocando un aumento de las concentraciones de cortisol y la activación de los receptores de glucocorticoides en el tejido adiposo, en el hígado y en otros tejidos (Figura 1.8) (Stewart *et al.* 1999). La 11 β -HSD1 está regulada de manera compleja y específica en los tejidos. Además, existe evidencia que indica que las concentraciones tisulares locales de cortisol se ajustan independientemente de las concentraciones plasmáticas; por lo tanto, se piensa que podría estar involucrada en la obesidad y sus complicaciones. (Staab y Maser 2010; Morton 2010; Anagnostis *et al.* 2009). Se han observado concentraciones bajas de cortisol en el hígado debido a la disminución de la expresión y de la actividad de la 11 β -HSD1 (Stewart y Krozowski 1999; Rask *et al.* 2001; Simonyte *et al.* 2009). Por otro lado, se ha observado un aumento en el mRNA y en la actividad de la 11 β -HSD1 en el tejido adiposo subcutáneo de adultos (Sandeep *et al.* 2005; Paulmyer-Lacroix *et al.* 2002; Paulsen *et al.* 2007) y niños (Mericq *et al.* 2009), lo cual se traduce en un aumento de las concentraciones de glucocorticoides en los tejidos. Existe controversia acerca del un aumento en el mRNA de la 11 β -HSD1 en el tejido adiposo omental (Morton 2010). El mecanismo de esta desregulación en la obesidad humana permanece incierto

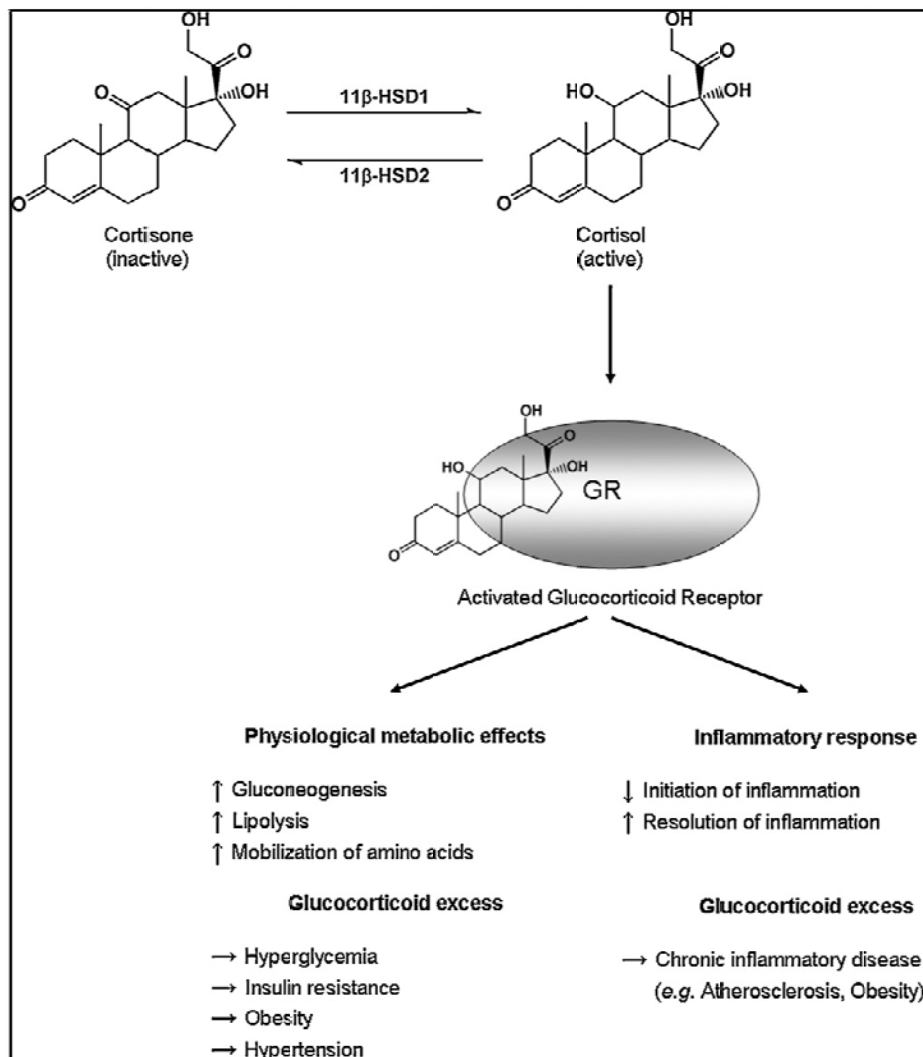


Figura 1.8. Interconversión de cortisona y cortisol por la 11β-HSD y la respuesta de los glucocorticoides. La 11β-HSD1 reduce la cortisona a cortisol el cual puede unirse al receptor de glucocorticoides (GR). El GR queda activado y modula la expresión de numerosos genes implicados en el metabolismo de nutrientes, así como en la inflamación. Los efectos fisiológicos resultantes incluyen la estimulación de la lipólisis en el tejido adiposo, la degradación de proteínas y la movilización de aminoácidos del músculo, y la gluconeogénesis hepática. Durante la respuesta inflamatoria normal, los glucocorticoides inhiben el inicio y promueven la resolución de la inflamación. Por el contrario, el exceso de glucocorticoides puede causar todos los síntomas del síndrome metabólico como hiperglucemia, resistencia a la insulina, obesidad e hipertensión, así como contribuir a enfermedades inflamatorias crónicas. GR: receptor de glucocorticoides. Tomado de Staab *et al.* 2011

Estudios en ratones que sobreexpresan la 11β-HSD1 en adipocitos, han mostrado un aumento de corticosterona en el tejido adiposo (el metabolito activo en ratones), hiperfagia, una mayor ganancia de peso (en especial al consumir dietas altas en grasa), aumento de grasa visceral, de resistencia a la insulina y de la expresión de la lipoproteína lipasa en la grasa omental. (Masuzaki *et al.* 2001). Por el contrario, cuando se inhibe la 11β-HSD1 disminuyen las consecuencias metabólicas de la obesidad, aumentando la sensibilidad insulínica y

disminuyendo las concentraciones de glucosa sanguínea en ratones obesos o diabéticos (Kotelevtsev *et al.* 1997; Morton *et al.* 2001; 2004 Alberts *et al.* 2003).

El gen *HSD11B* se encuentra en el cromosoma 1, su tamaño es de 48,757 bases y una de sus isoformas (NM_181755) está formado por 7 exones y sólo 6 codifican, su otra isoforma (NM_005525) tiene 6 exones codificantes y su tamaño es de 30,104 bases.

A pesar de la evidencia del papel que juega la 11 β -HSD1 en la obesidad, hasta la fecha no se han asociado significativamente SNPs del gen *HSD11B1* con la obesidad. Se han descrito algunas variantes asociadas a la DM2 (Nair *et al.* 2004) y a la hipertensión arterial (Franks *et al.* 2004) pero no a la obesidad *per se*. Recientemente se ha indicado la existencia de una asociación leve del SNP rs2236905 con el SM en japoneses (Miyamoto *et al.* 2009). En el caso de los niños, sólo hay un estudio publicado, donde se ha descrito la asociación positiva de la inserción 4436A en el gen *HSD11B1* con el IMC y la resistencia a la insulina en niños obesos (Gelernter-Yaniv *et al.* 2003).

MAP3K4

Vías de la MAPK

Las vías de señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) son activadas por diversos estímulos tanto intra como extracelulares incluyendo factores peptídicos de crecimiento, citoquinas, hormonas y algunos factores de estrés, como los implicados en el estrés oxidativo y del retículo endoplasmático. Estas vías de señalización regulan ciertas actividades como proliferación, diferenciación, supervivencia y muerte celular. En las células de mamíferos, existen al menos cuatro subfamilias de MAPKs que son ERK, p38, JNK y la ERK5 (Kyriakis *et al.* 2001). Cada MAPK es activada a través de cascadas de señalización que involucran a la MAP quinasa quinasa quinasa (MAPKKK o MEKK) y a la MAP quinasa quinasa (MAPKK, MKK o MEK) (Kyriakis *et al.* 2001). Las MAPKKKs de las familias Raf y Mos activan la MEK1/2, mientras que otras MAPKKKs como la MEKK1/2/3, MAP 3 quinasa 1 (MTK1 o MEKK4), la quinasa reguladora de la señal de la apoptosis 1 (ASK1 o MAPKKK5), la quinasa activada por TGF- β 1 (TAK1), la mil y un aminoácido (TAO) quinasa y las quinasas de linaje mixto (MLK) activan preferiblemente algunas o en algunos casos todas las MKK3, 4, 6, and 7. De esta manera las MAPKKKs, traducen el estímulo recibido activando la cascada de señalización intracelular mediante fosforilaciones

que determina el destino celular o la producción de compuestos bioactivos implicados principalmente en la inflamación.

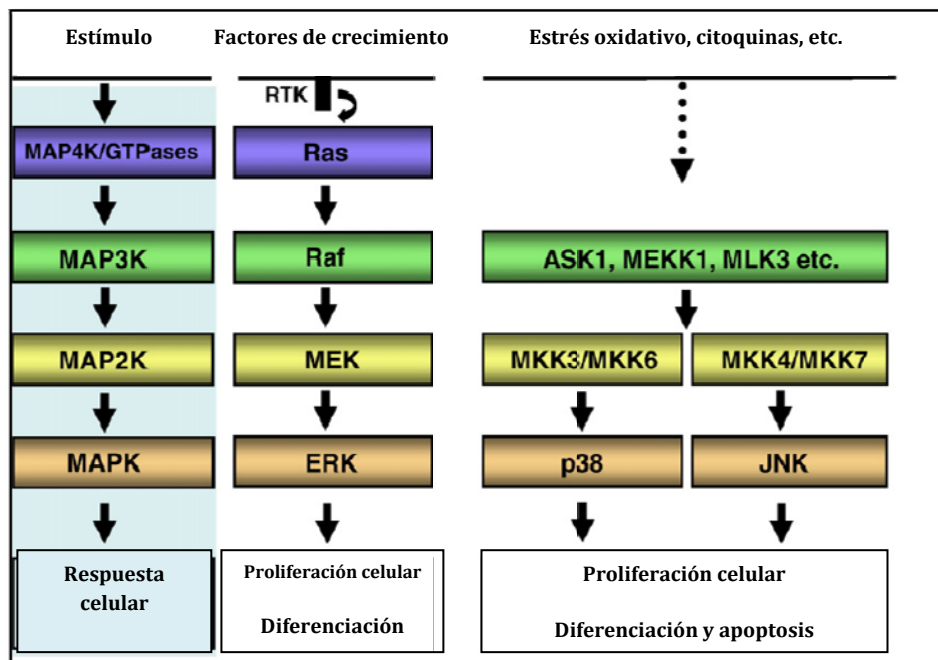


Figura 1.9. Vías de señalización de las MAPKs. MAPKs: proteínas quinasas activadas por mitógenos; RTK: receptor de tirosina quinasa; Ras: proteínas Ras (GTPasa); Raf: proteína Raf; MEK: quinasa reguladora de señales extracelulares; ERK: quinasa reguladora de señales extracelulares; ASK: quinasa reguladora de la señal de apoptosis; MEKK1:quinasa MEK 1; MKK: MAP quinasa quinasa; p38: quinasa p38; JNK: quinasa c-Jun N-terminal.

La JNK y la p38MAPKs en la obesidad y el síndrome metabólico.

La alteración del estricto control de las vías de señalización de las MAPK se ha implicado en el desarrollo de muchas enfermedades como la obesidad, la resistencia insulínica, el alzheimer, el parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica y varios tipos de cáncer en humanos (Kim y Choi 2010). La relación entre la obesidad y la resistencia a la insulina está muy bien documentada, así como la habilidad de la sobreactivación de la JNK para alterar la señalización insulínica (Aguirre *et al.* 2000). Hirosumi *et al.* (2002), demostraron que al inducir obesidad en modelos genéticos a través de la dieta, la actividad de la JNK aumentaba en el tejido adiposo, muscular y hepático. Un papel funcional de la JNK1 en la obesidad se demostró al administrar una dieta normal o alta en grasa a ratones *JNK1*^{-/-} y *JNK2*^{-/-} y se observó que producía una disminución de peso en los primeros a expensas de una reducción de tejido graso, pero no en los segundos. Los ratones *JNK1*^{-/-} mostraron también una disminución de los niveles plasmáticos de glucosa e insulina, así como un

aumento en la señal insulínica hepática, indicando una mejora en la sensibilidad a la insulina. A pesar de que estos estudios sugirieron que la JNK2 no estaba relacionada con la obesidad ni con la resistencia insulínica, la habilidad de la JNK2 para interferir en la fosforilación de c-Jun de la JNK1 sugiere que la pérdida de la JNK2 podría estar compensada por el aumento de la función de la JNK1. Para comprobar si la JNK2 contribuía con este fenotipo metabólico, se estudiaron ratones *JNK2*^{-/-} - *JNK1*^{+/-}. Estos ratones estaban protegidos contra la obesidad inducida por una dieta alta en grasa, sin embargo los que eran sólo *JNK1*^{+/-} no lo estaban, indicando que la JNK2 contribuye a la obesidad (Tuncman *et al.* 2006). Adicionalmente, se han descrito funciones diferentes para la JNK1 y JNK2 en la patogénesis de la EHGNA, una consecuencia importante del SM (Czaja 2010).

Menos conocido es el papel de la p38MAPK en la obesidad. Se han observado mayores concentraciones de p38 activa en el tejido adiposo, músculo esquelético y riñones de pacientes diabéticos (Koistinen *et al.* 2003; Carlson *et al.* 2003), sugiriendo que algunas respuestas de la p38 podrían ser importantes en la patogénesis de la obesidad y sus complicaciones. Estudios *in vitro* han demostrado que la inhibición de la p38 puede suprimir la adipogénesis, prevenir la resistencia insulínica en miotubos expuestos a TNF- α o a estrés oxidativo y estimular el transporte de glucosa en los adipocitos (Aouadi *et al.* 2007; Carlson *et al.* 2005). Puesto que los ratones *p38MAPK*^{-/-} no son viables, modelos de ratones *MKK3*^{-/-} y *MKK6*^{-/-}, los cuales son viables y fértiles, han proporcionado la oportunidad de estudiar el papel de la señalización de la p38 en las enfermedades. A pesar de los resultados *in vitro* que demuestran el papel de la p38 en la adipogénesis, un estudio con el modelo animal *MKK3*^{-/-} ha demostrado que la señalización de MKK3-p38 MAPK no es necesaria para el desarrollo de la obesidad o de la DM2 aunque sí en la nefropatología asociada a la diabetes (Lim *et al.* 2009)

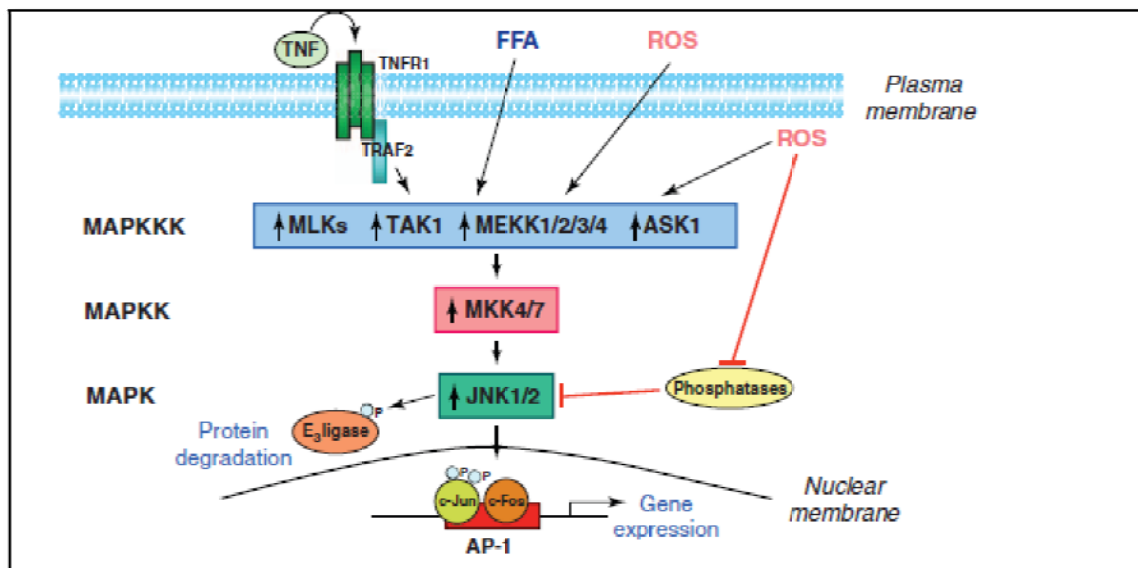


Figura 1.10. Vía de señalización de la JNK. Varios estímulos activan la cascada de señalización de JNK incluyendo el factor de necrosis tumoral, ácidos grasos libres (FFA) y especies reactivas al oxígeno (ROS) extra o intracelular. Hacia arriba los eventos no están bien definidos pero el resultado es la activación de una o más MAPK quinasa quinasa (MAPKKK), muchas de las cuales se indican. Las MAPKKKs activan las quinasa MAPK (MAPKK), MKK4 y MKK7, que fosforilan y activan la JNK. El nivel o la duración de la activación de JNK es regulada negativamente por la acción de la fosfatasa, y las ROS podrían estimular la activación de JNK mediante la inhibición de la actividad de la fosfatasa. La activación de las JNK1 y JNK2 fosforila la subunidad c-Jun de la AP-1, aumentando la transcripción. Como un heterodímero con otra subunidad como la c-Fos, c-Jun se une a la región promotora de AP-1 incrementando la expresión génica. Por otra parte, JNK también puede alterar los niveles de proteína a través de la fosforilación y la activación de la ubiquitina ligasa E3 que promueve la degradación de las proteínas. ASK1: quinasa 1 estimulante de la señal de apoptosis; MLK: proteínas quinasa de linaje mixto; Tak-1, TGF- β -quinasa 1 activada; TNFR1: receptor 1 TNF; TRAF2: receptor TNF asociada a proteína 2. Tomado de Czaja 2010.

Por otro lado se ha descrito que la leptina y la adiponectina ejercen un efecto de activación y supresión de la p38 MAPK, respectivamente. Se ha demostrado que la leptina aumenta la fosforilación de la p38 MAPK en células mononucleares y musculares (van den Brink *et al.* 2000, Agrawal *et al.* 2011). Además se descrito que la leptina incrementa la producción de TNF α a través de la vías p38 y JNK MAPKs en células de Kupffer estimuladas con lipopolisacáridos (Shen *et al.* 2005). Asimismo, la leptina induce hipertrofia en células de músculo liso vasculares a través de la p38 MAPK (Shin *et al.* 2005), indicando el papel potencial de esta hormona en la fisiología cardiovascular y su impacto en la remodelación vascular. Por el contrario, la adiponectina previene el envejecimiento prematuro de las células endoteliales progenitoras ocasionado por la diabetes y promueve la reparación endotelial a través de la supresión de la vía de señalización celular de la p38 MAP kinase/p16INK4A (Chang *et al.* 2010).

El gen MAP3K4

El gen *mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4 (MAP3K4)* está ubicado en el cromosoma 6 codifica la proteína MTK1, también conocida como MEKK4 o MAP3K4, esta proteína es una MAPKKK que regula la p38 y la JNK a través de la fosforilación de la MKK3/6 y la MKK4/7, respectivamente (Gerwins *et al.* 1997; Takekawa *et al.* 1997). La MTK1 es una proteína de 182-kDa con un dominio C terminal catalítico, un dominio N terminal autoinhibitorio y múltiples dominios de interacción que unen proteínas activadoras como las proteínas de detención de crecimiento y lesión del ADN-similares (GADD45) GADD45 α , β , y γ , Rac, Cdc42, Ccd1, receptor del TNF asociado al factor 4 (TRAF4), y axin o proteínas inhibitorias y glucógeno sintasa quinasa 3 beta (GSK3 β) (Gerwins *et al.* 1997; Mita *et al.* 2002; Luo 2003; Abell 2005a). La unión de estas proteínas activadoras a su sitio permiten la activación por fosforilación cascada abajo.

Sin embargo, el papel fisiológico de la MTK1 está aún por dilucidar. En células T aisladas de *MTK1*^{-/-}, la producción de interferón γ está alterada (Chi 2004), sugiriendo que la MTK1 podría estar implicada en la producción de citoquinas. Los ratones *MTK1*^{-/-} y los ratones mutantes de MTK1 con un dominio negativo (*MTK1K/R*) mostraron un desarrollo defectuoso del tubo neural (Chi 2005; Abell 2005b), sugiriendo que la MTK1 es fundamental en el cierre del tubo neural. Se ha descrito también, que la MTK1 es una molécula de señalización que induce la muerte de los cardiomiocitos, la remodelación cardíaca así como, fallo cardíaco en ratones (Mizote *et al.* 2010). Hasta ahora ninguna investigación se ha dedicado a estudiar el papel de esta proteína en el desarrollo de la obesidad o el SM. En cuanto a las variantes de este gen, en la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) se han depositado un total de 1321 SNPs de gen *MAP3K4* y ninguno se ha asociado clínicamente a ninguna enfermedad.

Metodología

METODOLOGIA

Diseño experimental

El diseño experimental del presente estudio fue observacional, analítico, transversal y multicéntrico (Figura 2.1).

Las Instituciones participantes fueron: el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Universidad de Granada, la Sección de Endocrinología Pediátrica del Servicio de Pediatría del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba, el Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Valle de los Pedroches de Pozoblanco (Córdoba), la Unidad de Investigación en Nutrición, Crecimiento y Desarrollo del Departamento de Pediatría del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, el Departamento de Pediatría del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza y la Escuela de Ciencias de la Salud de la Universidad de Zaragoza.

El protocolo se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el comité de ética de cada uno de los Hospitales participantes, así como por el de la Universidad de Granada y el de la Universidad de Zaragoza. La firma del consentimiento informado por parte de los padres o representantes se obtuvo después de explicar detalladamente el propósito del estudio y el procedimiento a seguir; por parte de los niños se obtuvo su asentimiento.

Se reclutaron 995 niños con edad comprendida entre 5-14 años en tres provincias de España (Córdoba, Santiago de Compostela y Zaragoza) 289 (222 prepúberes y 67 púberes) clasificados como normopeso, 227 (146 prepúberes y 81 púberes) como sobrepeso y 478 (321 prepúberes y 157 púberes) como obesos de acuerdo con las tablas de Cole *et al.* (2000).

Los niños fueron evaluados inicialmente en colegios o centros de salud de cada una de las provincias participantes. Si cumplían los criterios de inclusión, se contactaba con los padres o representantes y se les invitaba a asistir al Servicio de Endocrinología Pediátrica de cada uno de los Hospitales participantes, donde se realizaba un examen clínico y la extracción de sangre (detallado más adelante).

Criterios de inclusión

Niños y niñas con edad comprendida entre los 5-14 años, con obesidad exógena, sobrepeso o normo-peso, sin enfermedad relacionada con el estado nutricional y con ausencia de tratamiento farmacológico y/o dietético.

Criterios de exclusión

Niños y niñas con edad fuera del rango establecido, con desnutrición, diagnóstico de alguna enfermedad o en tratamiento con fármacos que alterasen la tensión arterial, el metabolismo glucídico o lipídico.



Figura 2.1 Diseño del estudio

Métodos

A cada niño se le realizó una historia clínica completa y una exploración física, incluyendo medidas antropométricas para valorar el estado nutricional, y se les tomó la tensión arterial. Posteriormente se extrajo una muestra de sangre para: hemograma, bioquímica general, adipoquinas y marcadores de inflamación y de daño endotelial, así como de riesgo de enfermedad cardiovascular.

Exploración física y antropometría

Los datos antropométricos recogidos fueron: talla, peso y CC. Se exploró físicamente a los niños para descartar fenotipos típicos de obesidad endógena, y para valorar el estadio de desarrollo puberal según la clasificación de Tanner (Tanner 1962) y otras patologías diferentes a la obesidad exógena.

Para tallar a los niños se usó un estadiómetro *Harpedem*® de precisión 1 mm y para pesarlos una balanza Seca de precisión 100 g. Con estos datos se calculó el IMC con la ecuación peso (kg)/talla (m²) y el *z score* del IMC como la diferencia entre el valor observado y el promedio de la población de referencia dividido por su desviación estándar de acuerdo al sexo y a la edad; la referencia usada para éste último fue la de Sobradillo *et al.* (2004).

La CC, indicador del depósito de grasa intraabdominal, se midió con una cinta métrica flexible, entre la última costilla y la cresta ilíaca superior, al final de una espiración. Con este dato se calculó el *z score* de la CC como la diferencia entre el valor observado y el promedio de la población de referencia dividido por su desviación estándar de acuerdo al sexo y a la edad; la referencia usada para éste último fue la de Moreno *et al.* (2003).

Medida de tensión arterial

La tensión arterial tanto sistólica como diastólica medida en mm Hg se tomó por triplicado con un manómetro electrónico *Orion*® modelo MX3 con manguito adecuado en el brazo izquierdo, estando el niño en reposo y sentado. Los percentiles se establecieron de acuerdo a la edad, sexo y talla del niño según las tablas del “*National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Children and Adolescents*” de 1996.

Toma de muestras

Las muestras de sangre se obtuvieron entre 8:00 y 9:30 am después de 12 horas de ayuno. A cada niño se le extrajo una muestra de 12 ml de sangre de la vena antecubital. Se emplearon 3 ml de sangre para la hematología y el recuento leucocitario y otros 3 ml para la bioquímica general, llevándose a cabo ambas determinaciones en cada uno de los Hospitales participantes. Los 6 ml restantes de sangre, se recogieron en tubos con EDTA-K₃, se centrifugaron a 1750 g durante 10 min a 4 °C, se tomó la capa de glóbulos blancos (*buffy*

coat) en un tubo y con el plasma se hicieron alícuotas y se guardaron a -80°C para la futura determinación de adipocinas, marcadores de inflamación, de daño endotelial y de riesgo de enfermedad cardiovascular en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Universidad de Granada. La capa de glóbulos blancos se utilizó para la obtención de DNA como se indica más adelante.

Determinaciones analíticas

Hematología y recuento leucocitario

Se realizó un hemograma completo y recuento leucocitario.

Análisis bioquímicos generales

Se realizó un análisis bioquímico general a todas las muestras obtenidas. Los parámetros medidos fueron: glucosa, insulina, TAG, colesterol total, HDL-c, LDL-c, VLDL-c, apo B, apo AI, urea, creatinina, ácido úrico, aspartato transaminasa (AST), alanino transaminasa (ALT), gamma glutamil transpeptidasa (GGT). La glucosa (CV: 1%) fue analizada usando el método de la glucosa-oxidasa en un autoanalizador automático modular P y D Roche-Hitachi (Roche Laboratory Systems, Mannheim, Alemania) y la insulina (CV: 2,6%) se analizó por enzimoimmunoensayo de partículas (MEIA), usando para ello un autoanalizador AxSYM[®] (Abbott Laboratories, Chicago, IL, EEUU). El HDL-c (CV: 0,8%), los triacilgliceroles (CV: 1,5%) y la creatinina (CV: 3,2%) se determinaron en un autoanalizador automático modular P y D Roche-Hitachi (Roche Laboratory Systems, Mannheim, Alemania).

Con los valores obtenidos en las determinaciones tanto de glucosa como de insulina se calcularon el HOMA-IR, definido por la ecuación $HOMA-IR = \text{glucosa en ayunas (mmol)} \times \text{insulina en ayunas } (\mu\text{U/ml}) / 22,5$ Mathew *et al.* (1985) y la sensibilidad insulínica a través del QUICKI, con la ecuación $QUICKI = 1 / (\log [\text{insulina en ayunas mU/l}] + \log [\text{glucosa en ayunas mg/dl}])$ Katz *et al.* (2000).

Determinación de hormonas

Se determinó la hormona folículo-estimulante (CV: 3,6%), la hormona luteinizante (CV: 3,1%), el 17- β -estradiol (CV: 1,8%), la testosterona (CV: 2%) y el cortisol (CV: 1,7%) en el plasma sanguíneo, por quimioluminiscencia en un autoanalizador automático Architect I4000 (Abbott Laboratories Chicago, IL, USA). Las concentraciones de las hormonas sexuales se usaron para confirmar el estadio puberal correspondiente de cada niño.

Determinación de adipocinas, marcadores de inflamación, de daño endotelial y de riesgo de enfermedad cardiovascular

Cinco de las alícuotas guardadas se utilizaron para la determinación de adipocinas, marcadores de inflamación, de daño endotelial y de riesgo de enfermedad cardiovascular:

1. Adiponectina (CV: 5,6%), resistina (CV: 6,0%) y PAI-1 activo (CV: 6,6%). *Human Serum Adipokine* (Panel A). (kit Cat. # HADK1-61K-A-03) (LINCO Research, MO, USA).
2. sE-Selectina (CV: 11,2%), sVCAM-1 (CV: 4,5%), sICAM-1 (CV: 7,9%), metaloproteinasa-9 de la matriz extracelular (MMP-9) (CV: 6,8%), mieloperoxidasa (MPO) (CV: 12,3%) y PAI-1 total (CV: 11,8%). *Human Cardiovascular Disease (CVD) Panel 1*. (kit Cat. # HCVD1-67AK-06) (LINCO Research, MO, USA).
3. IL-6 (CV: 7,8%), IL8 (CV: 7,9%), HGF (CV: 7,7%), MCP-1 (CV: 7,9%), leptina (CV: 7,9%), TNF- α (CV: 7,8%) y NGF (CV: 6,0%). *Human Serum Adipokine* (Panel B). (kit Cat. # HADK2-61K-B-07) (LINCO Research, MO, USA).
4. LDL oxidadas (CV: 7,6%) analizada mediante un kit de ELISA (Cat. No. BI-20042) (Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG, Viena, Austria).
5. PCR (CV 4%) se determinó con un inmunoensayo turbidimétrico (PETIA) (Dade Behring Inc., IL).

Las tres primeras alícuotas se utilizaron para realizar los analizar mediante ELISA multiplex utilizando tres kits LINCOPlex. Estos kits tienen la peculiaridad de que en el mismo pocillo de una placa se pueden determinar simultáneamente varios parámetros. Estos kits se miden en el equipo Luminex® 200, el cual utiliza la tecnología X-Map que se desarrolló en base a la citometría de flujo, el láser, las microesferas y el procesamiento de señales digitales.

Las microesferas son de polietileno y cada una es teñida internamente con fluoróforos que absorben luz en distintas proporciones de rojo e infrarrojo, creando un espectro único en cada microesfera de acuerdo con las proporciones de dichos fluoróforos. A cada microesfera se le asigna un anticuerpo específico para la determinación de un analito en particular. El principio de la técnica es muy similar al ELISA en sándwich, con la presencia de un anticuerpo primario (unido a las microesferas), un anticuerpo secundario biotinilado y como revelador la estreptavidina-ficoeritrina (SAPE). Sin embargo, vale la pena destacar que el anticuerpo primario va unido a la microesfera y no a la placa. El equipo detecta la coloración del interior de la microesfera con el láser rojo y la fluorescencia derivada del anticuerpo secundario conjugado con el SAPE con el láser verde (Figura 2.2).

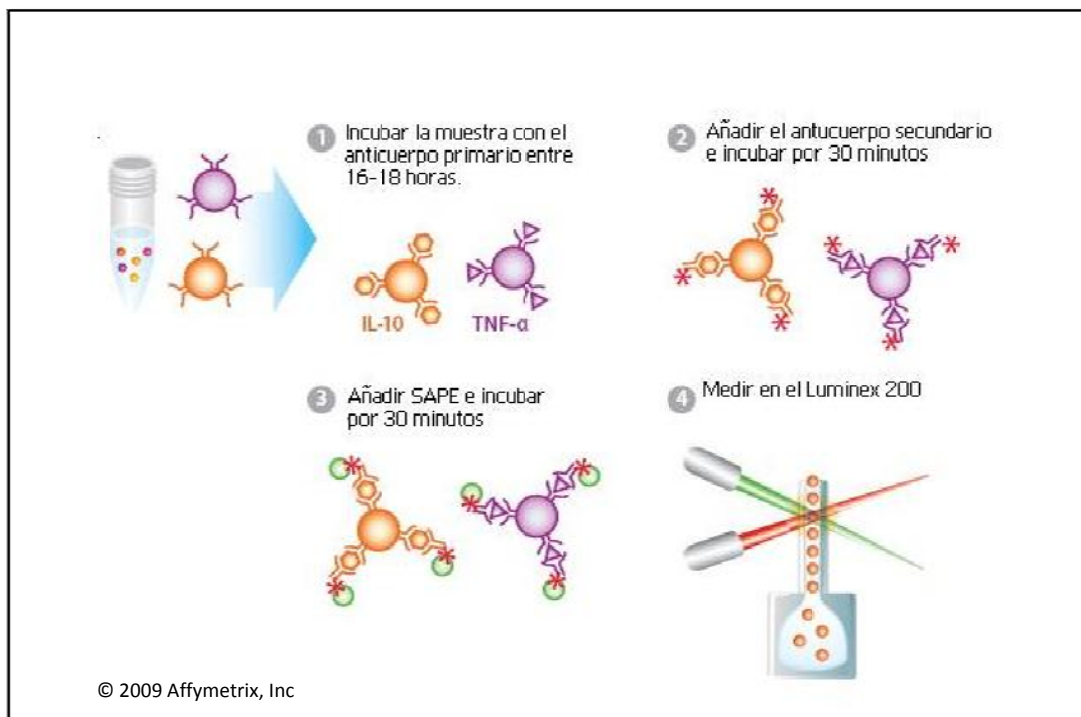


Figura 2.2. Método de determinación de antígenos diversos utilizando un sistema multiplex (LINCOpex).

El equipo LUMINEX 200 (Figura 2.3) consta de:

1. Dispensador de fluidos: se encarga tanto de ingresar como de sacar el líquido del sistema (un PBS modificado) al citómetro.
2. Lector (citómetro): tiene una aguja que absorbe la muestra para proceder a su lectura. Es el lugar donde se encuentran los dos láseres.

3. Plataforma XY: es el lugar donde se inserta la placa. Tiene también un receptáculo que tiene utilidades de limpieza y mantenimiento.
4. Ordenador: alberga el software de inicio de protocolos, alineamiento de placas, análisis y mantenimiento.

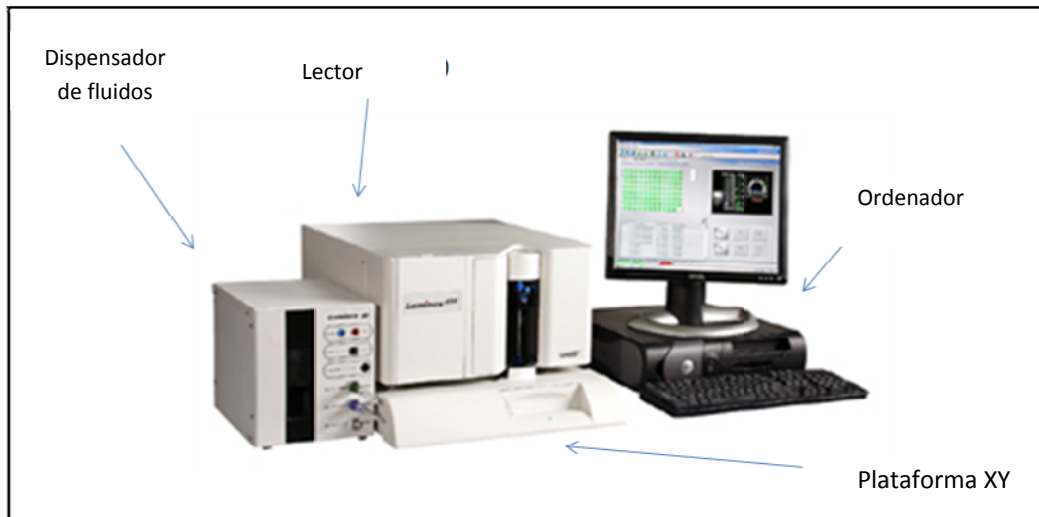


Figura 2.3. Equipo Luminex 200.

Procedimiento:

Materiales y reactivos ya listos para su uso: placa filtrante, selladores de placa, bote para la mezcla de microesferas, diluyente de microesferas, anticuerpo secundario, SAPE, tampón de ensayo.

Reactivos por reconstituir: anticuerpo primario (microesferas), estándar, controles de calidad, tampón de lavado, *serum matrix*.

Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente para ser utilizados.

- **Preparación de las muestras:** las alícuotas se descongelaron y centrifugaron a 1750 g durante 5 minutos. Las muestras se diluyeron 1:200 para el análisis del *Human Serum Adipokine (Panel A)*, 1:30 para el *Human Cardiovascular Disease (CVD) Panel 1* y para el *Human Serum Adipokine (Panel B)* se analizaron sin diluir. Las diluciones se hicieron con el tampón de ensayo de cada kit, constituido por PBS con azida sódica al 0,08 por ciento y suero bovino fetal al 1 por ciento en el caso del *Human Cardiovascular Disease (CVD) Panel 1* y por PBS con azida sódica al 0,08 por ciento, Tween 20, inhibidor de proteasas y BSA al 1 por ciento en el caso de los otros dos kits.

- *Preparación del anticuerpo primario (microesferas)*: Las microesferas correspondientes a cada analito vienen en diferentes viales. Cada vial se sonicó durante 30 segundos en un baño (Ultrasonic cleaner – Branson 200) y se agitó en un vortex por 30 segundos más. Cada vial contiene 200 µl, de los cuales se tomaron 150 µl y se añadieron a un bote oscuro vacío; una vez añadido el contenido de cada uno de los viales, se completó con el diluyente de microesferas hasta completar 3 ml.

- *Preparación de estándares*: se prepararon los estándares (estándar 7 o 6, el más concentrado, hasta estándar 1) con diluciones seriadas 1:5. El estándar más concentrado viene liofilizado y se reconstituyó con 250 µl de agua bidestilada. Las diluciones seriadas se hicieron añadiendo 50 µl del estándar más concentrado en 200 µl del tampón de ensayo y así sucesivamente hasta llegar al estándar 1. En las tablas 2.1, 2.2 y 2.3 se reflejan las concentraciones de los estándares de los distintos analitos.

Tabla 2.1. Concentración de los estándares del kit *Human Serum Adipokine (Panel A)*.

Tubo estándar	Resistina, aPAI-1 (pg/ml)	Adiponectina (pg/ml)
1	3,2	16
2	16	80
3	80	400
4	400	2.000
5	2.000	10.000
6	10.000	50.000
7	50.000	250.000

aPAI-1: inhibidor del activador del plasminógeno-1 activo.

Tabla 2.2. Concentración de los estándares del kit *Human Cardiovascular Disease (CVD) Panel 1*

Tubo estándar	sE-Selectin, sICAM-1, sVCAM-1 (ng/ml)	MMP-9, MPO, tPAI-1 (pg/ml)
1	0,08	16
2	0,4	80
3	2	400
4	10	2.000
5	50	10.000
6	250	50.000

sICAM-1: molécula de adhesión intracelular 1 soluble; sVCAM-1: molécula de adhesión vascular 1 soluble; MMP-9: metaloproteínasa 9; MPO: mieloperoxidasa; tPAI-1: inhibidor del activador del plasminógeno-1 total.

Tabla 2.3. Concentración de los estándares del kit *Human Serum Adipokine (Panel B)*.

Tubo estándar	IL-6, IL-8, TNF- α , MCP-1, NGF (pg/ml)	HGF (pg/ml)	Leptin, (pg/ml)
1	0,64	3,2	16
2	3,2	16	80
3	16	80	400
4	80	400	2.000
5	400	2.000	10.000
6	2.000	10.000	50.000
7	10.000	50.000	250.000

IL: interleuquina; TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa; MCP-1: proteína quimiotáctica de los monocitos 1; NGF: factor de crecimiento nervioso; HGF: factor de crecimiento de hepatocitos.

- *Preparación de los controles de calidad:* los controles de calidad vienen liofilizados y se reconstituyeron con 250 μ l de agua bidestilada.

- *Preparación del serum matrix:* este reactivo viene liofilizado y se reconstituyó con 1 ml de agua bidestilada. El *serum matrix* se usó únicamente en el kit *Human Serum Adipokine (Panel B)* donde las muestras no se diluyeron y el objetivo de añadirlo al blanco, estándares y controles de calidad es tratar de igualar las condiciones con las del plasma humano.

- *Preparación del tampón de lavado:* se añadieron los 30 ml del tampón de lavado a una botella y se completó con 270 ml de agua bidestilada.

- *Preparación de la placa:* se pipetearon 200 μ l de tampón de ensayo en cada pocillo y se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente (20-25°C).

Una vez preparados todos los reactivos se procedió a rellenar la placa de 96 pocillos.

1. Se hizo el diagrama de la placa.
2. Se aspiró la solución tampón de la placa y posteriormente se secó por debajo usando papel absorbente.
3. Se añadieron 25 μ l de solución tampón al blanco.
4. Se añadieron 25 μ l de los estándares y los controles de calidad.
5. Se añadieron 25 μ l de tampón de ensayo a todos los pocillos y en el caso del *Human Serum Adipokine (Panel B) serum matrix* al blanco, los estándares y los controles de calidad y tampón de ensayo a los pocillos de las muestras.
6. Se añadieron 25 μ l de cada muestra al pocillo correspondiente
7. Se añadieron 25 μ l de la mezcla de microesferas a cada pocillo, agitando el bote en el vortex cada 3 columnas.

8. Se selló la placa, se envolvió en papel de aluminio y se incubó en agitación constante durante 17 horas a 4°C.
9. Después de la incubación, se siguió agitando la placa por 30 min. A temperatura ambiente.
10. Se removió el fluido por vacío y se lavó 3 veces añadiendo 200 µl del tampón de lavado, secando la superficie inferior de la placa en cada ocasión con papel absorbente.
11. Se añadieron 50 µl del anticuerpo secundario en el caso de los kits de adipoquinas y se incubó por 30 min y 25 µl en el caso del kit de marcadores de riesgo cardiovascular y se incubó durante 1 hora. La incubación se realizó con las placas envueltas en papel de aluminio, en agitación y a temperatura ambiente.
12. Se añadieron 50 µl de SAPE en el caso de los kits de adipoquinas y 25 µl en el caso del kit de marcadores de riesgo cardiovascular y se incubó con las placas envueltas en papel de aluminio, en agitación durante 30 min a temperatura ambiente.
13. Se removió el fluido por vacío y se lavó 3 veces añadiendo 200 µl del tampón de lavado, secando la superficie inferior de la placa con papel absorbente.
14. Se añadieron 100 µl de fluido de sistema, cubriendo con papel de aluminio y agitando durante 5 minutos.
15. Finalmente se procedió al análisis en el equipo Luminex 200. Una vez terminada la lectura se analizaron los datos con el software Xponent[®].

Las concentraciones mínimas detectables se muestran en la tabla 2.4.

Tabla 2.4. Mínimas concentraciones detectables de cada uno de los analitos

Analito	Mínima concentración detectable (pg/ml)
Adiponectina	145,4
Resistina	6,7
aPAI-1	1,3
sE-selectin	79
sICAM-1	9
sVCAM-1	16
MMP-9	1
MPO	7
tPAI-1	1
IL-6	1,6
IL-8	0,2

Analito	Mínima concentración detectable (pg/ml)
Leptina	85,4
TNF α	0,14
MCP-1	0,14
NGF	2,5
HGF	19,2

aPAI-1: inhibidor del activador del plasminógeno-1 activo; sICAM-1: molécula de adhesión intracelular 1 soluble; sVCAM-1: molécula de adhesión vascular 1 soluble; MMP-9: metaloproteínasa 9; MPO: mieloperoxidasa; tPAI-1: inhibidor del activador del plasminógeno-1 total, IL: interleuquina; TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa; MCP-1: proteína quimiotáctica de los monocitos 1; NGF: factor de crecimiento nervioso; HGF: factor de crecimiento de hepatocitos

Determinación de LDL oxidadas

La determinación de LDL oxidada se realizó con un inmunoensayo enzimático mediante la técnica de ELISA.

Procedimiento:

Materiales y reactivos ya listos para su uso: placa con el anticuerpo, selladores de placa, tampón del ensayo, estándares, controles de calidad, anticuerpo conjugado, sustrato, solución para detener la reacción.

Reactivos por reconstituir: tampón de lavado (concentración final 1:20).

Las muestras se centrifugaron y se diluyeron 1:10 con el tampón de ensayo.

Todos los reactivos debían estar a temperatura ambiente para ser utilizados.

1. Se hizo el diagrama de la placa.
2. Se añadieron 100 μ l de blanco, estándares, controles de calidad y las muestras en sus correspondientes pocillos, se selló la placa y se incubó a 37°C durante 2 horas.
3. Se lavaron los pocillos con 300 μ l de tampón de lavado 5 veces volteando la placa y golpeándola contra un papel secante para asegurar el descarte de todo el tampón.
4. Se añadió 100 μ l del anticuerpo conjugado anti-LDLox en todos los pocillos a excepción del blanco, se selló la placa y se incubó a 37°C durante 1 hora.
5. Se lavaron los pocillos con 300 μ l de tampón de lavado 5 veces volteando la placa y golpeándola contra un papel secante para asegurar el descarte de todo el tampón.
6. Se añadieron 100 μ l del sustrato en todos los pocillos, se selló la placa y se incubó a temperatura ambiente en oscuridad durante 30 min.
7. Se añadieron 50 μ l de la solución que detiene la reacción en todos los pocillos y se agitó.
8. Se leyó en el espectrofotómetro inmediatamente a 450 nm con referencia a 620 nm.

9. La curva de las muestras se comparó con un estándar mediante un *software* específico.

La concentración mínima detectable es de 0,08 ng/ml.

Clasificación de síndrome metabólico

Cuando comenzamos a buscar una definición de SM para clasificar la población infantil, nos encontramos con que existían numerosas clasificaciones publicadas en la literatura y muy diferentes entre ellas en cuanto a las tablas de distribución de los parámetros y puntos de corte utilizados, con lo cual decidimos clasificar a los niños de nuestra población con diferentes definiciones y compararlas para observar el porcentaje de SM en nuestros niños de acuerdo a cada una ellas.

Para cumplir con este objetivo, la población de niños obesos se clasificó de acuerdo con siete definiciones (Tabla 2.5), accediendo a todas las referencias originales y sus respectivas tablas. Algunas de las definiciones originales fueron ligeramente modificadas ya que en algunos casos no se tomaban en cuenta los niños prepúberes y en otras porque las referencias originales no correspondían a ningún documento disponible. Las definiciones de Cruz *et al.* (2004) y la de Weiss *et al.* (2004) incluyen el test de tolerancia a la glucosa como uno de los criterios, sin embargo, nosotros no realizamos esa prueba, por lo que tomamos como criterio la glucosa en ayunas ≥ 110 mg/dl.

Análisis estadístico

Los datos se expresan como medias \pm error estándar de la media. Las variables con distribución no normal de acuerdo al test de Wilcoxon se transformaron logarítmicamente antes del análisis. La homogeneidad de varianzas se estimó aplicando el test de Levene. Un ANOVA de dos vías se utilizó para evaluar el efecto del peso (normopeso/sobrepeso/obeso) y el sexo en los niños prepúberes y púberes con un test posterior de Bonferroni o Tamhane para las comparaciones múltiples de la media de acuerdo a la homogeneidad o no de las varianzas, respectivamente. El test de χ^2 se utilizó para las comparaciones de las proporciones. El coeficiente kappa (κ) se utilizó para evaluar la concordancia entre las diferentes definiciones de SM. La concordancia se definió como pobre $\leq 0,2$; marginal entre 0,2 – 0,4; moderada entre 0,4 – 0,6; fuerte entre 0,6 – 0,8 y como muy fuerte por encima de 0,8. Se realizó un análisis de regresión logística múltiple para identificar las variables significativas de riesgo

asociadas a la presencia de SM en sujetos obesos. Se aplicó un análisis de componentes principales para investigar el SM en niños obesos tanto prepúberes como púberes. La extracción de un set inicial de componentes no correlacionados se realizó a través del método de factor principal y su interpretación se facilitó con la rotación ortogonal Varimax de los componentes. Después de eliminar la colinealidad (tensión arterial sistólica y diastólica, insulina y HOMA-IR), se incluyeron seis variables asociadas al SM para el análisis (IMC o *CC z score*, tensión arterial sistólica, TAG, HDL-c, glucosa plasmática y HOMA-IR). Estos componentes se incluyeron porque representaban más del total de la varianza que una sola variable ($Eigenvalue > 1$), basado en el Scree Plot. El factor de carga, una medida de asociación lineal entre una variable observada y un factor específico, se utilizó para interpretar la estructura del factor. La carga relativa se definió como: muy fuerte $> 0,8$; fuerte $> 0,6-0,8$; moderada $> 0,4-0,6$ y marginal $0,2-0,4$. La significancia estadística se consideró cuando $P < 0,05$. Para los análisis se utilizó el software SPSS (versión 15.01, SPSS Inc. Chicago, IL, USA).

Tabla 2.5. Criterios de diagnóstico de síndrome metabólico en niños y adolescentes (todas las definiciones consideran la presencia de síndrome metabólico cuando tres o más de las siguientes características están presentes).

Estudio	Población (grupo étnico, edad y sexo)	Exceso de adiposidad	Presión Arterial	Lípidos	Glucosa	Insulina
Cook et al. (2003)	Blancos, negros y americanos-mexicanos 12-19 años Varones y Hembras	Circunferencia de cintura $\geq 90^{\text{th}}$ percentil. (Li et al. 2006)	Tensión arterial sistólica o diastólica \geq percentil 90. (Task Force Report 1996)	Triacilglicerolos ≥ 110 mg/dl HDL colesterol ≤ 40 mg/dl. (NCEP 1991)	≥ 110 mg/dl. (ADA 2000)	
de Ferranti et al. (2004)	Americanos-mexicanos y blancos y negros no hispanos. 12-19 años Varones y Hembras	Circunferencia de cintura $> 75^{\text{th}}$ percentil. (Zhu et al. 2002)	Tensión arterial sistólica $>$ percentil 90. (Task Force Report 1996)	Triacilglicerolos ≥ 97 mg/dl HDL colesterol < 40 mg/dl (LRCP 1979)	≥ 110 mg/dl. (NCEP 2002)	
Weiss et al. (2004)	Blancos, negros e hispanos. 4-20 años Varones y Hembras	IMC $>$ percentil 97 o z score > 2 . (Kuczmarski et al. 2000)	Tensión arterial sistólica o diastólica \geq percentil 95. (Task Force Report 1996)	Triacilglicerolos $> 95^{\text{th}}$ percentil para edad sexo y grupo étnico HDL colesterol < 5 percentil para edad sexo y grupo étnico. (NGHS 1998)	IGTT > 140 y < 200 mg/dl, a las 2 horas. (ADA 1999)	
Cruz et al. (2004)	Hispanos (Americanos-mexicanos, centroamericanos o mixto)	Circunferencia de cintura \geq percentil 90. (Fernández et al. 2004)	Tensión arterial sistólica o diastólica $>$ percentil 90. (Task Force Report 1996)	Triacilglicerolos \geq percentil 90 para edad sexo y grupo étnico. HDL colesterol \leq percentil 10 para edad sexo y grupo étnico.	IGTT: Glucosa ≥ 140 mg/dl y < 200 mg/dl a las 2 horas. (ADA 2002)	

Estudio	Población (grupo étnico, edad y sexo)	Exceso de adiposidad	Presión Arterial	Lípidos	Glucosa	Insulina
	8- 13 años			(Hickman <i>et al.</i> 1998)		
Viner <i>et al.</i> (2005)	Varones y Hembras Blancos, negros, sur asiáticos, otros y mixtos. 2-18 años Varones y Hembras	IMC \geq percentil 95. (Cole <i>et al.</i> 1995)	Tensión arterial sistólica \geq percentil 95. (Task Force Report 1987)	Cualquiera de los siguientes: Triacilgliceroles altos (≥ 1.75 mmol/l), HDL colesterol bajos (< 0.9 mmol/l), o colesterol total alto (\geq percentil 95). (Hickman <i>et al.</i> 1998)	Cualquiera de los siguientes: hiperinsulinemia en ayunas (prepuberal > 15 mU/l, media-pubertad (estadios 2-4) > 30 mU/l y post-puberal > 20 mU/l), glucosa en ayunas ≥ 110 mg/dl) o IGTT: glucosa ≥ 140 mg/dl a las 2 horas. (Alberti <i>et al.</i> 1998; Goran <i>et al.</i> 2001)	
Ford <i>et al.</i> (2005)	12-17 años Varones y Hembras	Circunferencia de cintura \geq percentil 90. (Li <i>et al.</i> 2006)	Tensión arterial sistólica o diastólica \geq percentil 90. (Task Force Report 1996)	Triacilgliceroles ≥ 110 mg/dl HDL colesterol ≤ 40 mg/dl. (NCEP 1991)	≥ 100 mg/dl. (Grundy <i>et al.</i> 2004)	
Zimmet <i>et al.</i> (2007) IDF	10- < 16 años*	Circunferencia de cintura \geq percentil 90.	Tensión arterial sistólica ≥ 130 o diastólica ≥ 85 mm Hg.	Triacilgliceroles ≥ 150 mg/dl HDL colesterol < 40 mg/dl.	≥ 100 mg/dl.	*Mirar referencia para los detalles.

Genotipado de las muestras

Del total de niños del estudio se tomó una submuestra de 534 niños, de los cuales 292 (149 niños y 143 niñas) eran obesos y 242 (135 niños y 107 niñas) eran normopeso. El análisis de genotipado se llevó a cabo en este subgrupo utilizando la tecnología GoldenGate de Illumina en el formato 96-muestras Array Matrix.

Procesamiento de las muestras

A partir de las muestras de glóbulos blancos se extrajo el DNA genómico en placas de 96 pocillos utilizando el QIAamp 96 DNA Blood kit (Qiagen) y siguiendo las indicaciones del proveedor. En algunas de las muestras la extracción de DNA se hizo individualmente en columna utilizando el QIAamp DNA Blood Mini kit (Qiagen). Algunas de las muestras se chequearon en gel de agarosa para comprobar la integridad del DNA extraído.

Selección de polimorfismos

A partir de una lista de genes candidatos, se realizó la búsqueda de posibles SNPs para ser genotipados. Los criterios de búsqueda establecidos fueron los siguientes:

- Se seleccionaron todos los SNPs no sinónimos presentes en los genes independientemente de su frecuencia en población caucásica.
- Se seleccionaron aquellos SNPs situados tanto en la zona 5' como en la zona 3' con una frecuencia asociada mínima de 0,05 en poblaciones caucásicas.
- Se seleccionaron tag SNPs con una frecuencia mínima del alelo menor de 0,05 y un coeficiente de determinación r^2 mínimo de 0,8.
- Se seleccionaron todos los SNPs de la zona promotora y de la zona 3' con independencia de su frecuencia

La selección de SNPs no sinónimos y de las zonas del promotor y 3' se realizó utilizando la base de datos de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) mientras que para la selección de los tag SNPs se utilizó la base de datos de Hapmap (<http://www.hapmap.org/>).

Una vez seleccionados los SNPs candidatos se enviaron a Illumina para que certificase su validez y se procedió a realizar el diseño de las placas con los SNPs seleccionados.

Hibridación del array. Análisis de los controles.

El número total de muestras extraídas fue 555. En dos de ellas, la cantidad de DNA recuperada después de la extracción no alcanzaba los 250 ng, por lo que no se pudieron usar para el experimento.

El procesamiento de los DNAs y la hibridación y escaneado de los *arrays* se realizó en el servicio de genotipado del CIC Biogune utilizando el protocolo del GoldenGate Assay en la plataforma Illumina. En la figura 2.3 se puede ver un resumen del protocolo utilizado.

Básicamente, el protocolo consiste en una hibridación alelo-específica, una extensión y ligación y una amplificación con *primers* universales previamente marcados con Cy3 y Cy5.

La muestra de DNA es activada para unirse a partículas paramagnéticas. De esta forma, se requiere únicamente 250 ng de DNA para el análisis de 1536 SNPs. El paso de hibridación consiste en la combinación del DNA activado a los oligonucleótidos, el *buffer* de hibridación y las partículas paramagnéticas. Para cada SNP se diseñan 3 oligonucleótidos: dos oligos son específicos para cada alelo (ASOs = *Allele-Specific Oligos*), mientras que el tercer oligo hibrida varias bases corriente abajo del sitio del SNP (LSO = *Locus-Specific Oligo*). Cada uno de los tres oligos contiene regiones complementarias al genoma y sitios de unión de *primers* universales. Además, el LSO contiene una secuencia única que reconoce un tipo particular de microesfera magnética. Durante la hibridación, los oligos hibridan con el DNA genómico unido a las partículas paramagnéticas. Puesto que la hibridación es anterior a la amplificación, no hay sesgo debido al paso de amplificación. Después de la hibridación, tras varios pasos para la eliminación del exceso de oligos y los oligos no hibridados correctamente, se da lugar la extensión del ASO apropiado y la ligación. El producto unido proporciona el molde para la reacción en cadena de las polimerasas utilizando los *primers* universales previamente marcados con Cy3 y Cy5. El DNA marcado es hibridado a cada microesfera complementaria a través de las secuencias únicas (*address*). Después de la hibridación, la señal de fluorescencia del Sentrix Array Matriz es analizada en el escáner *BeadArray Reader*. El software específico es utilizado para el agrupamiento (*clustering*) y la asignación de genotipos.

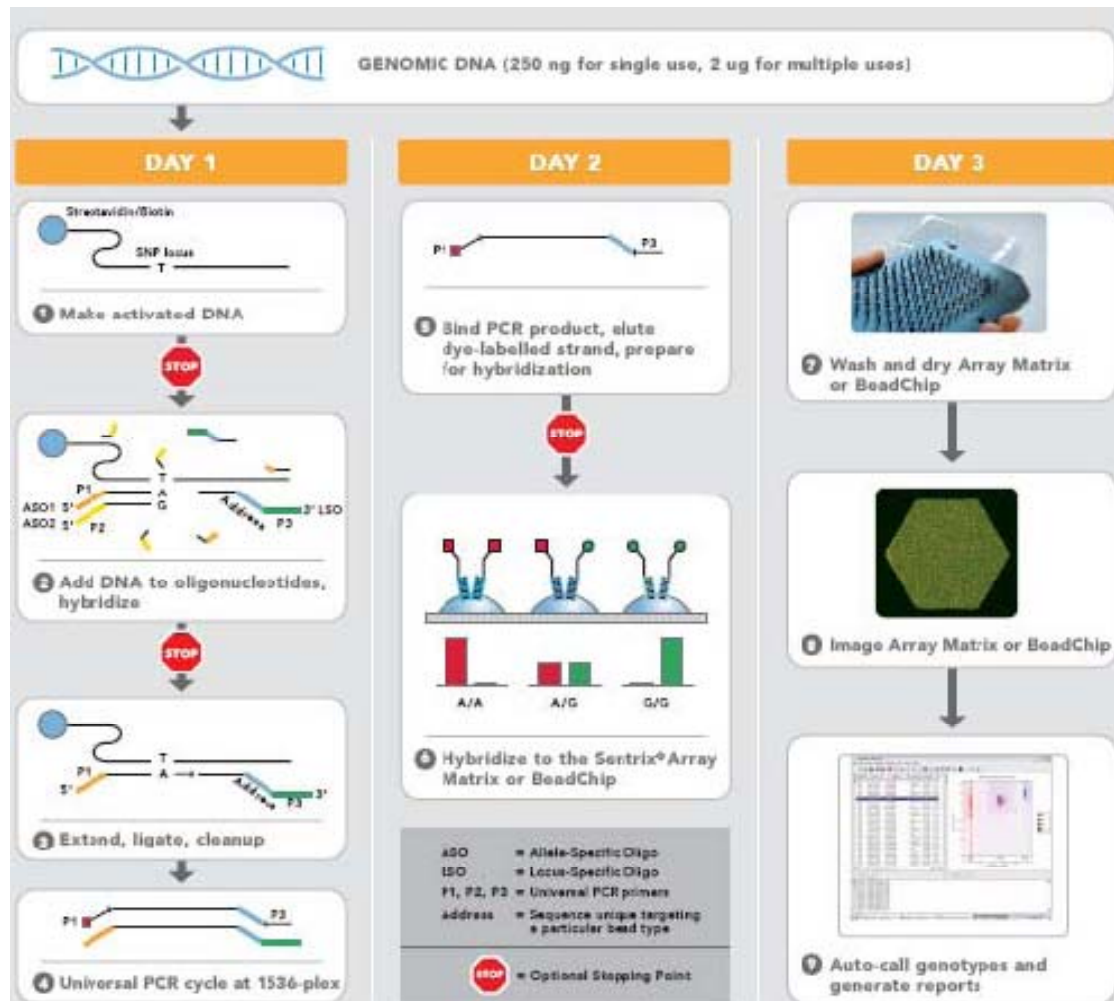


Figura 2.4. Tecnología GoldenGate para el análisis de SNPs

Una vez analizados los *arrays*, los datos originales se recibieron en la empresa Progenika para realizar los análisis de asociación. Dos de los parámetros de calidad verificados son el “*SNP call frequency*” (porcentaje de muestras en las que se ha asignado genotipo a un determinado SNP) y el “*sample call frequency*” (porcentaje de SNPs para los que se ha asignado genotipo en una determinada muestra).

En la tabla 2.6 vemos un resumen de los valores de *call frequency* obtenidos para cada SNP. Podemos ver que hay 35 SNPs que no han funcionado en ninguna de las muestras. Además hay otros 35 SNPs que han funcionado en menos del 90 por ciento de las muestras.

Tabla 2.6. *Call frequency* para cada SNP.

Valor de <i>call frequency</i>	Número de SNPs
$call\ freq = 0$	35
$0 < call\ freq < 0.90$	35
$0.90 < call\ freq < 1$	1064
$call\ freq = 1$	402
total	1536

SNP: polimorfismo de nucleótido simple

Respecto a los valores de *call frequency* obtenidos para cada muestra (Tabla 2.7), hay 19 muestras en las que el porcentaje de SNPs genotipados fue menor del 90 por ciento.

Tabla 2.7. *Call frequency* para cada muestra.

Valor de <i>call frequency</i>	Número de muestras
$call\ freq < 0.90$	19
$0.90 < call\ freq$	534
total	553

Análisis bioinformático

El análisis bioinformático determinó si existían genotipos significativamente asociados a la condición Obeso en su comparación con la condición Control. El número de muestras utilizado en el análisis se describe en la tabla 2.8.

Tabla 2.8. Relación del número de muestras implicadas en el análisis.

Condición	Nº de muestras
Control	242
Obeso	292

El análisis bioinformático siguió los siguientes pasos:

- Comprobación de equilibrio de Hardy-Weinberg (HW).
- Aplicación de herramientas estadísticas para la obtención de SNPs significativamente asociados.

De esta manera se obtuvieron listas de SNPs que presentan diferencias de genotipos entre las muestras comparadas (con un valor de significación p , que por defecto es seleccionado como 0,05). Todos estos pasos son descritos con más detalle en los siguientes apartados.

Filtrado inicial

A partir de los 1536 SNPs iniciales enviados a genotipar mediante la plataforma Illumina se eliminaron aquellos para los que no se obtuvo información del genotipo en al menos el 90 por ciento de las muestras. Ello supuso que se eliminasen un total de 70 SNPs y que los 1466 SNPs restantes continuaran el análisis.

El objeto de eliminar SNPs sin apenas información tiene dos objetivos: por un lado, eliminar aquellas secuencias que probablemente no habrían salido significativamente asociadas. Por otro lado, al disminuir el número de SNPs se reduce la probabilidad de obtener falsos positivos.

Equilibrio de Hardy Weinberg

En genética de poblaciones, el principio de HW establece que la composición genética de una población permanece en equilibrio mientras no actúe la selección natural ni ningún otro factor y no se produzca ninguna mutación. En el presente análisis se chequeó si las dos poblaciones, tanto obesa como control, se encontraban en equilibrio tomando como punto de corte 0,05 para cada uno de los 1466 SNPs restantes. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2.9.

Tabla 2.9. Resultados de la comprobación de equilibrio

Población	Nº de SNPs en equilibrio	Nº Muestras
Obeso	1358	292
Control	1381	242

SNP: polimorfismo de nucleótido simple

Se seleccionaron los SNPs que se encontraban en equilibrio en el grupo de los Controles (1381). Por lo tanto, quedarían descartados un total de 85 SNPs y se realizaron las pruebas estadísticas teniendo en cuenta 1381 SNPs. No es recomendable eliminar los SNPs que en el grupo de los obesos no se encuentren en equilibrio ya que podría darse el caso de

que dichos SNPs se encontrasen asociados a la enfermedad y por tanto no siguiesen un equilibrio de HW. Por lo que únicamente se eliminaron aquellos SNPs que no se encontraban en equilibrio en el grupo de los controles.

Análisis estadístico

Para la identificación de cambios en estudios de asociación estadísticamente significativos entre los grupos de muestras se realizó un test de alelos con el software PARTEK para tratar de determinar mediante una prueba de χ^2 si algún alelo en cada SNP se encuentra representado significativamente entre los grupos obeso y control.

El programa SPSS (version 15.01, SPSS Inc. Chicago, IL, USA) se utilizó para comparar las medias de todos los rasgos estudiados entre la población control y la obesa a través de un una t de *student* para muestras independientes.

El riesgo genotípico relativo se evaluó a través de la comparación del grupo control frente al obeso usando un modelo de regresión logística y calculando los OR con un 95 por ciento de intervalo de confianza, bajo un modelo aditivo. Se aplicó la regresión logística en toda la población, para estimar la asociación de cada SNP con los rasgos fenotípicos asociados a la obesidad así como a biomarcadores de inflamación y riesgo de ECV, bajo un modelo aditivo ajustado por sexo y edad. El programa PLINK (<http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/>) y la aplicación SNPassoc de la librería R se utilizaron para realizar los análisis iniciales de calidad de los datos, análisis de asociación genotipo-enfermedad y de genotipo-parámetros cuantitativos, para la obtención de frecuencias alélicas, genotipos y medias de los parámetros para los genotipos

Resultados

RESULTADOS

Características generales de la población estudiada

Las características generales, antropométricas y metabólicas de la población estudiada agrupadas en función del IMC (normopeso, sobrepeso y obeso) por estadio puberal y sexo se muestran en la tabla 3.1. En el grupo de los obesos de ambos sexos el IMC *z score* fue > 3 tanto en los niños prepúberes como en los púberes. En ambos grupos la CC fue mayor en el caso de los varones. En cuanto a la tensión arterial sistólica y diastólica, se observó que aumentaba significativamente a medida que aumentaba el IMC tanto en prepúberes como en púberes. Los TAG aumentaron significativamente mientras que el HDL-c disminuyó a mayor IMC en ambos sexos. El IMC, IMC *z score*, HDL-c y las concentraciones de glucosa fueron más elevados en los niños respecto de las niñas en el grupo prepuberal de obesos, pero no en el puberal. A excepción del grupo de los niños prepuberales, la glucosa no mostró diferencias significativas en función del IMC. Sin embargo, en los casos de la insulina y el índice HOMA-IR, se observó un aumento significativo con IMC más altos. El porcentaje de niños obesos con concentración de insulina > 15 mU/l fue 23,7 por ciento para las niñas prepúberes, 19,4 por ciento para los niños prepúberes, 57,8 por ciento para las niñas púberes y 51,4 por ciento para los niños púberes.

Tabla 3.1 Características generales de la población estudiada.

	Prepuberales				Puberales			
	Normopesos (N=222)	Sobrepesos (N=146)	Obesos (N=321)	<i>P (ajustada por peso)</i>	Normopesos (N=67)	Sobrepesos (N=81)	Obesos (N=157)	<i>P(ajustada por peso)</i>
Sexo - no, (%)								
Fem	99(31,4)	75(23,8)	141(44,8)	0,300	31(17,6) ^a	60(34,1) ^b	85(48,3) ^c	<0,001
Mas	123(32,9)	71(19,0)	180(48,1)	0,300	36(27,9) ^a	21(16,3) ^b	72(55,8) ^c	<0,001
P ajustada por sexo	0,107	0,741	0,029		0,373	<0,001	0,299	
Edad (años)								
Fem	9,0 ± 0,1 ^a	8,8 ± 0,2 ^{ab}	8,3 ± 0,2 ^b	0,003	12,8 ± 0,2 ^a	12,9 ± 0,2 ^a	12,2 ± 0,2 ^b	0,016
Mas	9,1 ± 0,1	9,4 ± 0,2	9,4 ± 0,1	0,307	12,5 ± 0,2	13,0 ± 0,3	12,8 ± 0,1	0,348
P ajustada por sexo	0,536	0,023	<0,001		0,412	0,726	0,012	
IMC (kg/m ²)								
Fem	16,8 ± 0,2 ^a	20,9 ± 0,2 ^b	26,4 ± 0,3 ^c	<0,001	19,4 ± 0,5 ^a	24,7 ± 0,2 ^b	30,0 ± 0,4 ^c	<0,001
Mas	16,7 ± 0,1 ^a	21,3 ± 0,2 ^b	27,6 ± 0,3 ^c	<0,001	19,2 ± 0,4 ^a	24,1 ± 0,4 ^b	30,6 ± 0,4 ^c	<0,001
P ajustada por sexo	0,768	0,293	0,005		0,749	0,186	0,343	
IMC <i>z score</i>								
Fem	-0,19 ± 0,05 ^a	1,11 ± 0,05 ^b	3,05 ± 0,91 ^c	<0,001	-0,03 ± 0,13 ^a	1,48 ± 0,05 ^b	3,11 ± 0,11 ^c	<0,001
Mas	-0,17 ± 0,05 ^a	1,43 ± 0,05 ^b	3,80 ± 0,10 ^c	<0,001	0,03 ± 0,10 ^a	1,36 ± 0,94 ^b	3,37 ± 0,15 ^c	<0,001
P ajustada por sexo	0,772	<0,001	<0,001		0,704	0,257	0,153	
Circunferencia de cintura (cm)								
Fem	58,8 ± 0,8 ^a	67,6 ± 1,3 ^b	78,7 ± 1,0 ^c	<0,001	69,9 ± 1,2 ^a	78,3 ± 0,9 ^b	86,6 ± 1,2 ^c	<0,001
Mas	58,5 ± 0,6 ^a	69,5 ± 1,4 ^b	83,2 ± 0,9 ^c	<0,001	69,6 ± 1,2 ^a	80,8 ± 1,5 ^b	93,8 ± 1,2 ^c	<0,001
P ajustada por sexo	0,749	0,314	0,001		0,869	0,160	<0,001	
TAS (mm Hg)								
Fem	97 ± 1 ^a	101 ± 1 ^a	109 ± 1 ^b	<0,001	101 ± 2 ^a	112 ± 1 ^b	118 ± 1 ^c	<0,001
Mas	95 ± 1 ^a	102 ± 2 ^b	110 ± 1 ^c	<0,001	102 ± 2 ^a	111 ± 3 ^b	120 ± 2 ^c	<0,001
P ajustada por sexo	0,375	0,538	0,381		0,572	0,912	0,229	
TAD (mm Hg)								

	Prepuberales				Puberales			
	Normopesos (N=222)	Sobrepesos (N=146)	Obesos (N=321)	<i>P (ajustada por peso)</i>	Normopesos (N=67)	Sobrepesos (N=81)	Obesos (N=157)	<i>P(ajustada por peso)</i>
Fem	59 ± 1 ^a	62 ± 1 ^a	68 ± 1 ^b	<0,001	61 ± 2 ^a	66 ± 1 ^{ab}	70 ± 2 ^b	0,002
Mas	57 ± 1 ^a	62 ± 1 ^b	68 ± 1 ^c	<0,001	59 ± 1 ^a	67 ± 2 ^b	71 ± 1 ^b	<0,001
P ajustada por sexo	0,098	0,791	0,938		0,281	0,695	0,486	
Triacilgliceroles (mg/dl)								
Fem	59 ± 3 ^a	62 ± 3 ^a	81 ± 3 ^b	<0,001	61 ± 4 ^a	64 ± 3 ^a	81 ± 4 ^b	0,001
Mas	53 ± 2 ^a	65 ± 4 ^b	73 ± 3 ^b	<0,001	69 ± 6 ^a	77 ± 9 ^{ab}	93 ± 7 ^b	0,029
P ajustada por sexo	0,035	0,468	0,097		0,248	0,088	0,149	
HDL-c (mg/dl)								
Fem	64 ± 2 ^a	56 ± 1 ^b	50 ± 1 ^c	<0,001	60 ± 2 ^a	52 ± 2 ^b	48 ± 2 ^b	<0,001
Mas	66 ± 1 ^a	61 ± 2 ^b	54 ± 1 ^c	<0,001	59 ± 2 ^a	50 ± 3 ^b	47 ± 1 ^b	<0,001
P ajustada por sexo	0,266	0,012	0,005		0,676	0,482	0,576	
Glucosa (mg/dl)								
Fem	84 ± 1	85 ± 1	85 ± 1	0,530	91 ± 1	89 ± 1	89 ± 1	0,300
Mas	84 ± 1 ^a	87 ± 1 ^b	87 ± 1 ^b	0,006	93 ± 1	89 ± 1	90 ± 1	0,064
P por sexo	0,863	0,186	0,044		0,258	0,966	0,326	
Insulina (mU/l)								
Fem	5,9 ± 0,3 ^a	7,2 ± 0,5 ^a	11,9 ± 0,7 ^b	<0,001	13,3 ± 1,9 ^a	11,8 ± 0,7 ^a	18,5 ± 1,2 ^b	<0,001
Mas	5,1 ± 0,2 ^a	7,5 ± 0,4 ^b	10,6 ± 0,6 ^c	<0,001	8,7 ± 0,8 ^a	10,1 ± 1,2 ^a	17,9 ± 1,2 ^b	<0,001
P ajustada por sexo	0,037	0,649	0,127		0,019	0,221	0,723	
HOMA-IR								
Fem	1,26 ± 0,08 ^a	1,55 ± 0,12 ^a	2,57 ± 0,16 ^b	<0,001	3,12 ± 0,56 ^a	2,64 ± 0,17 ^a	4,15 ± 0,28 ^b	<0,001
Mas	1,08 ± 0,05 ^a	1,63 ± 0,10 ^b	2,34 ± 0,14 ^c	<0,001	2,02 ± 0,18 ^a	2,24 ± 0,27 ^a	4,04 ± 0,28 ^b	<0,001
P ajustada por sexo	0,052	0,626	0,269		0,050	0,235	0,789	

Fem: femenino; Mas: masculino; IMC: índice de masa corporal; TAS: tensión arterial sistólica; TAD: tensión arterial diastólica; HDL-c: Colesterol de lipoproteínas de alta densidad. HOMA-IR: *Homeostatic model assessment of insulin resistance*. Results are given as mean ± standard error of the mean. Diferentes letras en la posición de superíndice indica diferencia significativa entre grupos

Síndrome metabólico

Prevalencia de síndrome metabólico

La figura 3.1. muestra el porcentaje de SM en nuestra población obesa (definida utilizando el criterio de Cole *et al.* 2000) de acuerdo a las diferentes definiciones utilizadas. El mayor porcentaje de SM (34,20 por ciento) lo encontramos al usar la definición de de Ferranti *et al.* (2004). y el menor (8,3 por ciento) usando la de Weiss *et al.* (2004). Las diferencias en los porcentajes respecto del sexo se observaron únicamente al usar la definición de de Ferranti *et al.* (2004); al usar esta misma definición se observaron diferencias de acuerdo al estadio puberal, siendo mayor en el grupo de púberes (Fig. 3.1).

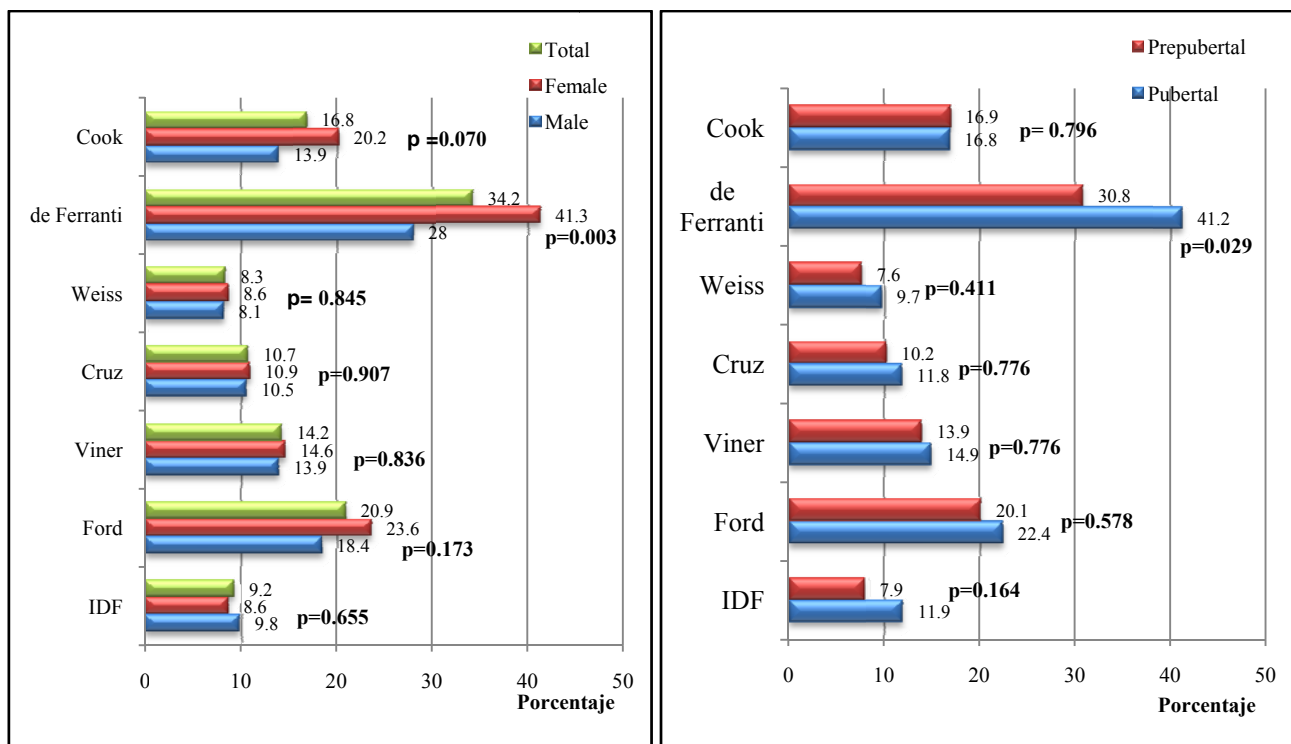


Figura 3.1. Porcentaje de síndrome metabólico en niños obesos de acuerdo con diferentes definiciones por sexo (A) y estadio puberal (B). Diferencias en el porcentaje de síndrome metabólico entre niños y niñas (A) y entre prepúberes y púberes (B) en niños obesos para cada una de las definiciones utilizadas.

Análisis de concordancia

En la tabla 3.2 se muestra el análisis de concordancia entre los porcentajes de SM de las diferentes clasificaciones utilizadas, la concordancia más elevada se observa entre las definiciones de Cook *et al.* (2003) y Ford *et al.* (2005) ($\kappa = 0,873$; $P < 0,001$). Una concordancia relativamente alta se observó entre Cruz *et al.* (2004) y Weiss *et al.* (2004), Cruz *et al.* (2004) y Cook *et al.* (2003), y entre Cruz *et al.* (2004) e IDF (2007). La

concordancia más baja se observó entre de Ferranti *et al.* (2004) y la definición de la IDF, Weiss *et al.* (2004), Cruz *et al.* (2004) y Viner *et al.* (2005).

Tabla 3.2 Análisis de concordancia entre las diferentes clasificaciones de síndrome metabólico en niños obesos.

	Cook <i>et al.</i> 2003	de Ferranti <i>et al.</i> 2004	Weiss <i>et al.</i> 2004	Cruz <i>et al.</i> 2004	Viner <i>et al.</i> 2005	Ford <i>et al.</i> 2005	IDF 2007
Cook <i>et al.</i>							
Coefficiente de concordancia (κ)	1	0,522	0,540	0,694	0,475	0,873	0,488
P		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
de Ferranti <i>et al.</i>							
Coefficiente de concordancia (κ)	-	1	0,276	0,327	0,365	0,549	0,264
P			<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Weiss <i>et al.</i>							
Coefficiente de concordancia (κ)	-	-	1	0,724	0,555	0,445	0,545
P				<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Cruz <i>et al.</i>							
Coefficiente de concordancia (κ)	-	-	-	1	0,588	0,584	0,614
P					<0,001	<0,001	<0,001
Viner <i>et al.</i>							
Coefficiente de concordancia (κ)	-	-	-	-	1	0,481	0,589
P						<0,001	<0,001
Ford <i>et al.</i>							
Coefficiente de concordancia (κ)	-	-	-	-	-	1	0,534
P							<0,001
IDF							
Coefficiente de concordancia (κ)	-	-	-	-	-	-	1

La concordancia entre las definiciones de síndrome metabólico se calculó utilizando el coeficiente kappa (κ). La concordancia se definió como pobre $\leq 0,2$; marginal entre 0,2–0,4; moderada entre 0,4–0,6; fuerte entre 0,6–0,8 y como muy fuerte por encima de 0,8.

Análisis de componentes principales de las características asociadas al síndrome metabólico.

Como se muestra en la tabla 3.3, tres factores fueron suficientes para explicar las correlaciones entre las diferentes características del SM: metabolismo glucídico (factor 1),

grado de dislipidemia (factor 2) y obesidad/tensión arterial (factor 3). Estos tres factores explican el 72 por ciento o 71,6 por ciento del total de la varianza en los datos cuando se utiliza el IMC *z score* o la CC *z score*, respectivamente, para evaluar la obesidad: un 26,7 por ciento o 27,8 por ciento de la varianza se explica por el primer factor, un 25,1 por ciento o 24,8 por ciento adicional por el segundo factor y finalmente un 20,1 por ciento o 19 por ciento por el tercer factor.

Tabla 3.3 Análisis de componentes principales de los componentes del síndrome metabólico en la población obesa estudiada.

Variable	Factores en el modelo 1*			Factores en el modelo 2		
	Metabolismo Glucídico	Dislipidemia	Obesidad y Tensión Arterial	Metabolismo Glucídico	Dislipidemia	Obesidad y Tensión Arterial
		<i>Factor de carga</i>			<i>Factor de carga</i>	
IMC <i>z score</i> transformado logarítmicamente	-0,12	0,02	0,89	-	-	-
CC <i>z score</i>	-	-	-	-0,10	0,12	0,88
Tensión arterial sistólica transformada logarítmicamente	0,42	0,05	0,58	0,52	-0,04	0,54
Triacilgliceroles transformados logarítmicamente	0,18	0,82	0,11	0,246	0,81	-0,01
HDL-c transformado logarítmicamente	-0,02	-0,86	0,04	0,01	-0,85	-0,12
Glucosa transformada logarítmicamente	0,89	-0,01	-0,11	0,83	0,04	-0,19
HOMA-IR transformado logarítmicamente	0,76	0,32	0,24	0,79	0,30	0,17
		<i>Porcentaje</i>			<i>Porcentaje</i>	
Varianza	26,7	25,1	20,1	27,8	24,8	19,0
Varianza acumulada†	26,7	51,9	72,0	27,8	52,6	71,6

IMC: índice de masa corporal; CC: circunferencia de cintura; HDL-c: colesterol presente en la lipoproteínas de alta densidad; HOMA-IR: *Homeostatic model assessment of insulin resistance* * El Modelo 1 se estableció incluyendo el IMC *z score* y el modelo 2 incluyendo la circunferencia de cintura *z score*. El factor de carga es la asociación lineal entre una variable observada y un factor específico. La carga relativa se definió como: muy fuerte > 0,8; fuerte > 0,6 – 0,8; moderada > 0,4 – 0,6 y marginal 0,2 – 0,4.

†El primer valor en la fila es la proporción de la varianza explicada por el metabolismo glucídico, el segundo es la proporción explicada por el metabolismo glucídico más la dislipidemia y el tercero es la proporción explicada por los dos primeros más obesidad y tensión arterial.

Análisis de regresión logística múltiple de factores de riesgo asociados al SM.

En un análisis de regresión logística múltiple de factores de riesgo asociados con el SM, introdujimos el sexo, la edad (en 3 grupos: 5-7,99 años, 8-10,99 años y 11-14 años), y el estadio puberal. Los resultados mostraron que las niñas tienen menor riesgo de padecer SM que los varones (*odd ratio* [OR] 0,58; 95% intervalo de confianza [IC], 0,37~0,92). El análisis también mostró un riesgo aumentado a mayor edad (OR 2,23; 95% IC: 1,52~3,27) y estadio puberal (OR, 2,81; 95% IC: 1,56~5).

Análisis de genotipado

Características de la población genotipada

La tabla 3.4 muestra las características generales de la población genotipada donde se observa que no hubo diferencias significativas con respecto al sexo y a la edad. En cuanto al peso, talla, IMC, IMC *z score* y CC la población obesa mostró valores significativamente más altos que la control. En relación a las concentraciones plasmáticas de cortisol y testosterona, se observa que las primeras fueron más bajas en el grupo de los obesos mientras que las segundas no presentaron diferencias entre ambos grupos.

Tabla 3.4. Características generales de la población genotipada

	Normopesos	Obesos	<i>P</i>
n	242	292	
Sexo (M/F)	135/107	149/143	0,273
Edad (a)	9,73 ± 0,2	9,43 ± 0,2	0,172
Peso (kg)	32,9 ± 0,7	55,9 ± 1,0	<0,001
Talla (m)	1,37 ± 0,01	1,41 ± 0,01	0,001
IMC (kg/m ²)	17,14 ± 0,13	27,56 ± 0,24	<0,001
IMC <i>z score</i>	-0,17 ± 0,04	3,49 ± 0,08	<0,001
Circunferencia de cintura (cm)	60,2 ± 0,5	84,0 ± 0,9	<0,001
Cortisol (nmol/l)	362,71 ± 9,75	286,70 ± 9,00	<0,001
Testosterona (µg/l)	0,49 ± 0,09	0,37 ± 0,03	0,263

M: masculino; F: femenino; IMC: índice de masa corporal.

En la tabla 3.5 se pueden observar las características de la población genotipada relacionadas con el SM. En el grupo de los obesos la tensión arterial sistólica y diastólica, insulina, HOMA-IR, TAG y apo B fueron más elevados en el grupo de los obesos que en el grupo control, mientras que las concentraciones plasmáticas de colesterol total, apo AI y HDL-c fueron más bajas. La glucosa no presentó diferencia entre ambos grupos. El porcentaje

de niños obesos con SM en la población genotipada de acuerdo a la definición de Vinner fue de 10,78 por ciento.

Tabla 3.5 Características relacionadas con el síndrome metabólico en la población genotipada

	Normopesos	Obesos	P
n	242	292	
TA sistólica (mm Hg)	97 ± 1	111 ± 1	<0,001
TA diastólica (mm Hg)	60 ± 1	69 ± 1	<0,001
Glucosa (mg/dl)	84 ± 0	85 ± 1	0,772
Insulina (mU/l)	5,95 ± 0,23	11,46 ± 0,51	<0,001
HOMA-IR	1,26 ± 0,05	2,43 ± 0,12	<0,001
Triacilgliceroles (mg/dl)	55 ± 1	75 ± 2	<0,001
Apo-AI (mg/dl)	150 ± 2	132 ± 1	<0,001
Apo-B (mg/dl)	67 ± 1	71 ± 1	0,008
Colesterol (mg/dl)	171 ± 2	165 ± 2	0,012
HDL-c (mg/dl)	64 ± 1	51 ± 1	<0,001

TA: tensión arterial; HOMA-IR: *homeostatic model assesment for insulin resistance*.

Los biomarcadores de inflamación estudiados se muestran en la tabla 3.6. La PCR, la IL-6, la IL-8 y el TNF- α fueron significativamente más elevados en el grupo de niños obesos, al igual que la MPO y los marcadores de daño endotelial como sE-selectina e sICAM-1 y de trombosis como PAI, tanto total como activo; por el contrario, la sVCAM-1 estaba más elevada en el grupo control que en el de los niños obesos. Tanto el MCP-1 como la MMP-9 no mostraron diferencias significativas al comparar ambos grupos.

Tabla 3.6 Biomarcadores de inflamación y de riesgo de enfermedad cardiovascular en la población genotipada.

	Normopesos	Obesos	P
n	242	292	
Proteína C reactiva (mg/l)	0,95 ± 0,23	3,43 ± 0,25	<0,001
Interleuquina 6 (ng/l)	4,50 ± 0,53	6,95 ± 0,75	0,012
Interleuquina 8 (ng/l)	1,57 ± 0,11	2,16 ± 0,15	0,003
Factor de necrosis tumoral alfa (ng/l)	3,06 ± 0,11	4,01 ± 0,13	<0,001
Proteína quimiotáctica de los monocitos 1 (ng/l)	110,5 ± 3,67	110,7 ± 3,50	0,965
Metaloproteinasa-9 de la matriz extracelular (µg/l)	79,99 ± 3,15	88,42 ± 3,90	0,636
Mieloperoxidasa (µg/l)	13,10 ± 1,16	21,51 ± 1,70	<0,001
Selectina endotelial soluble (µg/l)	22,93 ± 0,76	31,26 ± 1,05	<0,001
Molécula de adhesión intercelular 1 soluble (mg/l)	0,153 ± 0,004	0,175 ± 0,005	<0,001
Molécula de adhesión vascular 1 soluble (mg/l)	1,14 ± 0,02	1,07 ± 0,02	0,024
Inhibidor del activador del plasminógeno 1 activo (µg/l)	5,16 ± 0,27	11,96 ± 0,57	<0,001
Inhibidor del activador del plasminógeno 1 total (µg/l)	18,95 ± 0,85	27,23 ± 1,01	<0,001

La tabla 3.7 muestra las concentraciones de las transaminasas hepáticas, siendo la ALT y la GGT más altas en el grupo de los niños obesos y la AST más baja al compararlas con el grupo normopeso. La concentración plasmática de adiponectina fue más baja en la población obesa al contrario que la leptina y la resistina, sin embargo el LDL-c no mostró diferencia entre grupos.

Tabla 3.7 Adipoquinas y otros marcadores clínicos

	Normopesos	Obesos	P
n	242	292	
ALT (U/l)	16,76 ± 0,56	20,85 ± 0,50	<0,001
AST (U/l)	23,70 ± 0,48	21,23 ± 0,40	<0,001
GGT (U/l)	8,39 ± 0,27	10,84 ± 0,29	<0,001
Adiponectina (mg/l)	28,28 ± 0,77	22,57 ± 0,66	<0,001
Resistina (µg/l)	9,65 ± 0,33	11,71 ± 0,34	<0,001
Leptina (µg/l)	4,30 ± 0,26	22,91 ± 0,86	<0,001
LDL-c (mg/dl)	94 ± 2	97 ± 1	0,144

ALT: alanina transamina; AST: aspartato transaminasa; GGT: gamma glutamil transpeptidasa.

Análisis de asociación con obesidad

En el anexo 1 se detallan los 1536 polimorfismos seleccionados e incluidos en el análisis de genotipado de la plataforma Illumina. En la tabla 3.8 se muestran los polimorfismos estadísticamente significativos asociados a la obesidad tras el análisis estadístico realizado con el software PARTEK. Un total de 72 SNPs se asociaron significativamente con el riesgo de padecer obesidad en los niños estudiados. Los 76 pertenecían a un total de 34 genes.

Tabla 3.8. Polimorfismos asociados significativamente a la obesidad

Polimorfismo	GEN		Cromosoma	P
rs9935401	<i>FTO</i>	<i>Fat mass and obesity associated</i>	16	0,000020
rs9939609	<i>FTO</i>	<i>Fat mass and obesity associated</i>	16	0,000098
rs9928094	<i>FTO</i>	<i>Fat mass and obesity associated</i>	16	0,000099
rs9930333	<i>FTO</i>	<i>Fat mass and obesity associated</i>	16	0,000197
rs8061518	<i>FTO</i>	<i>Fat mass and obesity associated</i>	16	0,000237
rs10852521	<i>FTO</i>	<i>Fat mass and obesity associated</i>	16	0,001265
rs3753519	<i>HSD11B1</i>	<i>Hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 1</i>	1	0,002729
rs1534020	<i>MAP3K4</i>	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4</i>	6	0,004542
rs3826945	<i>DF</i>	<i>Complement factor D (adipsin)</i>	19	0,005970
rs9365248	<i>MAP3K4</i>	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4</i>	6	0,006069
rs16131	<i>NPY</i>	<i>Neuropeptide Y</i>	7	0,007242
rs1867283	<i>NTRK2</i>	<i>Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2</i>	9	0,007545
rs5755694	<i>MAPK1</i>	<i>Mitogen-activated protein kinase 1</i>	22	0,009484
rs1322482	<i>ZA20D2</i>	<i>Zinc finger, AN1-type domain 5</i>	9	0,009918
rs6496589	<i>PLIN</i>	<i>Perilipin 1</i>	15	0,009948
rs816050	<i>TNFRSF1B</i>	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B</i>	1	0,010136
rs11804091	<i>LEPR</i>	<i>Leptin receptor</i>	1	0,011806
rs11177694	<i>FRS2</i>	<i>Fibroblast growth factor receptor substrate 2</i>	12	0,012115
rs10487133	<i>PON2</i>	<i>Paraoxonase 2</i>	7	0,012255
rs933271	<i>COMT</i>	<i>Catechol-O-methyltransferase</i>	22	0,013175
rs16135	<i>NPY</i>	<i>Neuropeptide Y</i>	7	0,013545
rs11177719	<i>FRS2</i>	<i>Fibroblast growth factor receptor substrate 2</i>	12	0,014110
rs16147	<i>NPY</i>	<i>Neuropeptide Y</i>	7	0,014119
rs11760945	<i>UBE2H</i>	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2H (UBC8 homolog, yeast)</i>	7	0,014274
rs9430012	<i>HSD11B1</i>	<i>Hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 1</i>	1	0,014711
rs6672256	<i>HSD11B1</i>	<i>Hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 1</i>	1	0,015360
rs10157275	<i>LEPR</i>	<i>Leptin receptor</i>	1	0,015923
rs11208659	<i>LEPR</i>	<i>Leptin receptor</i>	1	0,016049

Polimorfismo	GEN		Cromosoma	P
rs17703883	<i>CYP19A1</i>	<i>Cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1</i>	15	0,017162
rs11265618	<i>IL6R</i>	<i>Interleukin 6 receptor</i>	1	0,017434
rs6919510	<i>MAP3K4</i>	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4</i>	6	0,018085
rs4122269	<i>PIK3R1</i>	<i>Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha)</i>	5	0,018240
rs6235	<i>PCSK1</i>	<i>Proprotein convertase subtilisin/kexin type 1</i>	5	0,019724
rs2276310	<i>ARRB1</i>	<i>Arrestin, beta 1</i>	11	0,019914
rs7626560	<i>PPARG</i>	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>	3	0,022306
rs12050772	<i>CYP19A1</i>	<i>Cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1</i>	15	0,022496
rs1080750	<i>CNTFR</i>	<i>Ciliary neurotrophic factor receptor</i>	9	0,023213
rs6954044	<i>GHRHR</i>	<i>Growth hormone releasing hormone receptor</i>	7	0,024701
rs7858891	<i>SMARCA2</i>	<i>SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 2</i>	9	0,024784
rs765771	<i>CDH11</i>	<i>Cadherin 11, type 2, OB-cadherin (osteoblast)</i>	16	0,026332
rs17159769	<i>GHRHR</i>	<i>Growth hormone releasing hormone receptor</i>	7	0,026748
rs9458113	<i>MAP3K4</i>	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4</i>	6	0,027005
rs4545755	<i>CYP19A1</i>	<i>Cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1</i>	15	0,028224
rs10773111	<i>SCARB1</i>	<i>Scavenger receptor class B, member 1</i>	12	0,028468
rs3792752	<i>NPR3</i>	<i>Natriuretic peptide receptor C/guanylate cyclase C (atrionatriuretic peptide receptor C)</i>	5	0,028544
rs17256948	<i>KIAA1128</i>	<i>Family with sequence similarity 190, member B</i>	10	0,029724
rs3779249	<i>GHRHR</i>	<i>Growth hormone releasing hormone receptor</i>	7	0,029966
rs858744	<i>CALCRL</i>	<i>Calcitonin receptor-like</i>	2	0,030540
rs4729189	<i>PON2</i>	<i>Paraoxonase 2</i>	7	0,031788
rs9347479	<i>MAP3K4</i>	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4</i>	6	0,032310
rs7906260	<i>KIAA1128</i>	<i>Family with sequence similarity 190, member B</i>	10	0,032883
rs4680	<i>COMT</i>	<i>Catechol-O-methyltransferase</i>	22	0,036062
rs659366	<i>UCP2</i>	<i>Uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier)</i>	11	0,036983
rs9930786	<i>CDH11</i>	<i>Cadherin 11, type 2, OB-cadherin (osteoblast)</i>	16	0,037151
rs2235543	<i>HSD11B1</i>	<i>Hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 1</i>	1	0,037562

Polimorfismo	GEN		Cromosoma	P
rs7021817	SMARCA2	<i>SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 2</i>	9	0,039080
rs9436303	LEPR	<i>Leptin receptor</i>	1	0,039322
rs16953563	MAP2K1	<i>Mitogen-activated protein kinase 1</i>	15	0,040706
rs35195	CDH11	<i>Cadherin 11, type 2, OB-cadherin (osteoblast)</i>	16	0,040903
rs17559596	UBE2H	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2H (UBC8 homolog, yeast)</i>	7	0,041002
rs3842748	INS	<i>Insulin</i>	11	0,041162
rs4911252	COMMD7	<i>COMM domain containing 7</i>	20	0,041183
rs1799964	TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>	6	0,041762
rs3756668	PIK3R1	<i>Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha)</i>	5	0,041764
rs1800630	TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>	6	0,043449
rs1063311	MAPK1	<i>Mitogen-activated protein kinase 1</i>	22	0,044359
rs11201017	KIAA1128	<i>Family with sequence similarity 190, member B</i>	10	0,045652
rs1902584	CYP19A1	<i>Cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1</i>	15	0,045667
rs13283799	SMARCA2	<i>SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 2</i>	9	0,046556
rs3763613	CNTFR	<i>Ciliary neurotrophic factor receptor</i>	9	0,047613
rs9355867	MAP3K4	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase 4</i>	6	0,048565
rs7902	PIG8	<i>Etoposide induced 2.4 mRNA</i>	11	0,049494

Análisis de polimorfismos de los genes más relevantes.*FTO*

La tabla 3.9 muestra las características de los polimorfismos analizados del gen *FTO*. Se observa que los polimorfismos rs1125337, rs9929152, rs16952649, rs8053966, rs8054364 no se encontraban en equilibrio de HW en el grupo control, por lo que no continuaron en el análisis. Al asociar el resto de los polimorfismos con la obesidad (Tabla 3.10), observamos que seis de los cuarenta y siete restantes se asociaron significativamente con ésta después de ser ajustados por sexo y edad bajo un modelo aditivo, sin embargo sólo cinco, el rs9939609, rs9928094, rs9930333, rs9935401 y el rs8061518 permanecieron estadísticamente significativos después de hacer la corrección por Bonferroni.

Tabla 3.9 Descripción de los polimorfismos genotipados y analizados del gen *FTO*.

Polimorfismo	Posición	FAM	Alelos (M/m)	EHW P	Call rate (%)
rs9939609		0,444	T/A	0,682	99,4
rs9928094		0,462	A/G	0,789	99,8
rs9930333		0,463	T/G	0,687	99,4
rs16952624		0,001	C/T	1	99,6
rs9935401		0,439	G/A	1	99,3
rs1136002		0,317	T/C	0,462	100
rs2075202		0,025	T/G	1	100
rs10521303		0,439	C/A	0,069	99,1
rs2540781		0,128	C/A	0,345	100
rs17818902		0,245	T/G	0,855	99,8
rs12932373		0,138	C/T	0,589	99,4
rs1008400		0,459	C/T	0,153	99,6
rs10852521		0,446	C/T	0,606	99,8
rs1125337		0,450	A/T	0,027	99,8
rs3826169		0,228	T/C	1	100
rs17833492		0,313	C/A	0,466	99,6
rs2111114		0,212	A/G	0,843	99,8
rs7203181		0,339	C/A	0,780	100
rs7194907		0,479	T/C	0,091	98,9
rs2689248		0,480	C/A	0,368	99,4
rs13334214		0,201	C/T	0,228	98,3
rs1861868		0,466	A/G	0,797	99,8
rs7194336		0,441	G/T	0,199	100
rs8044353		0,053	G/A	1	99,8
rs1558687		0,242	C/T	0,864	99,4
rs9929152		0,277	A/G	0,040	99,6
rs16952649		0,122	C/T	0,008	100
rs4784351		0,270	A/G	0,742	97,6
rs12596638		0,136	G/A	1	99,8

rs8056299	0,429	A/G	0,696	99,8
rs7205986	0,084	A/G	0,246	99,8
rs11643744	0,267	A/G	0,256	99,8
rs7203521	0,383	A/G	1	100
rs7194243	0,219	C/T	0,337	100
rs8061518	0,309	A/G	0,889	97,9
rs6499656	0,130	G/C	0,356	100
rs1558756	0,444	C/T	0,119	100
rs7199716	0,394	C/T	0,893	99,8
rs10852525	0,106	G/A	0,159	99,1
rs12445162	0,075	G/A	0,681	100
rs8053966	0,184	T/C	0,007	99,6
rs11075986	0,084	C/G	0,201	100
rs7190053	0,183	C/T	1	99,1
rs8054364	0,146	C/G	0,040	99,8
rs8049235	0,393	G/A	0,285	99,6
rs17225435	0,115	A/G	1	100
rs16952623	0,132	T/C	0,388	99,4
rs7200579	0,060	C/G	0,536	100
rs697771	0,427	C/T	0,362	100
rs7191513	0,424	G/A	0,241	100
rs8049933	0,108	C/T	0,284	99,3
rs2111113	0,074	G/C	0,330	99,6

Call-rate: tasa de éxito del genotipado; EHW P: Equilibrio de Hardy-Weinberg (p para el grupo control); FAM: frecuencia alélica menor.

Tabla 3.10 Distribución genotípica para los polimorfismos analizados del gen *FTO* y su asociación con la obesidad.

Polimorfismo	Alelo 1/alelo 2	Caso			Control			Alelo de Riesgo		OR (95%IC)	P	P corr*	
		11	12	22	11	12	22	Alelo de Riesgo	Caso				Control
rs9939609	T/A	72	149	69	90	118	33	A	0,491	0,377	1,73(1,26-2,37)	0,0006	0,009
rs9928094	A/G	67	149	75	88	114	40	G	0,511	0,398	1,66(1,22-2,24)	0,0009	0,018
rs9930333	T/G	67	150	74	87	112	41	G	0,511	0,398	1,64(1,21-2,22)	0,001	0,023
rs16952624	C/T	289	1	0	242	0	0	T	0,002	0,000			1
rs9935401	G/A	72	150	69	95	111	33	A	0,419	0,370	1,76(1,29-2,41)	0,0003	0,004
rs1136002	T/C	135	130	27	109	111	22	C	0,316	0,320	0,90(0,66-1,24)	0,529	1
rs2075202	T/G	277	14	1	231	11	0	G	0,026	0,023	0,69(0,25-1,88)	0,469	1
rs10521303	C/A	91	151	48	64	133	42	A	0,400	0,436	0,84(0,62-1,15)	0,284	1
rs2540781	C/A	225	54	13	190	47	5	A	0,136	0,119	0,87(0,57-1,32)	0,507	1
rs17818902	T/G	162	107	22	145	84	13	G	0,261	0,227	1,19(0,84-1,67)	0,329	1
rs12932373	C/T	214	76	2	175	61	3	T	0,136	0,139	0,77(0,49-1,21)	0,261	1
rs1008400	C/T	81	148	61	67	132	43	T	0,469	0,451	0,97(0,71-1,32)	0,860	1
rs10852521	C/T	104	139	49	64	116	61	T	0,410	0,496	0,67(0,49-0,90)	0,008	0,327
rs3826169	T/C	170	102	20	151	81	10	C	0,245	0,210	1,32(0,92-1,89)	0,132	1
rs17833492	C/A	140	127	24	106	112	23	A	0,296	0,322	0,88(0,63-1,22)	0,437	1
rs2111114	A/G	175	107	10	151	81	9	G	0,219	0,203	1,19(0,82-1,74)	0,362	1
rs7203181	C/A	142	111	39	101	109	32	A	0,329	0,356	0,88(0,65-1,19)	0,412	1
rs7194907	T/C	81	153	57	65	105	67	C	0,458	0,509	0,87(0,64-1,18)	0,370	1
rs2689248	C/A	79	153	59	64	113	63	A	0,463	0,492	0,79(0,59-1,07)	0,124	1
rs13334214	C/T	178	102	6	155	71	13	T	0,198	0,204	1,07(0,74-1,57)	0,710	1
rs1861868	A/G	85	155	52	63	118	60	G	0,453	0,494	0,78(0,58-1,06)	0,108	1
rs7194336	G/T	98	144	50	63	131	48	T	0,418	0,470	0,74(0,55-1,01)	0,053	1
rs8044353	G/A	259	31	1	219	23	0	A	0,056	0,047	1,21(0,61-2,39)	0,589	1
rs1558687	C/T	169	107	15	134	92	14	T	0,233	0,250	0,94(0,67-1,33)	0,738	1
rs4784351	A/G	154	113	20	122	96	16	G	0,268	0,275	0,92(0,65-1,28)	0,612	1
rs12596638	G/A	221	66	4	176	61	5	A	0,126	0,150	0,99(0,64-1,53)	0,979	1

Polimorfismo	Alelo 1/alelo 2	Caso			Control			Alelo de Riesgo	Alelo de Riesgo		OR (95%IC)	P	P corr*
		11	12	22	11	12	22		Caso	Control			
rs8056299	A/G	104	140	47	77	116	49	G	0,402	0,441	0,84(0,62-1,14)	0,255	1
rs7205986	A/G	68	151	72	70	111	61	G	0,505	0,483	0,78(0,46-1,34)	0,369	1
rs11643744	A/G	157	117	18	123	104	14	G	0,268	0,278	0,86(0,61-1,22)	0,404	1
rs7203521	A/G	110	143	39	90	116	36	G	0,381	0,388	0,93(0,68-1,28)	0,667	1
rs7194243	C/T	180	93	19	147	87	8	T	0,227	0,214	0,82(0,57-1,18)	0,295	1
rs8061518	A/G	159	107	22	95	108	32	G	0,262	0,365	0,56(0,40-0,78)	0,0006	0,025
rs6499656	G/C	218	67	7	189	48	5	C	0,140	0,121	1,30(0,84-2,03)	0,237	1
rs1558756	C/T	86	152	54	69	132	41	T	0,441	0,443	1,14(0,83-1,57)	0,421	1
rs7199716	C/T	101	146	44	91	116	35	T	0,402	0,384	0,91(0,67-1,24)	0,547	1
rs10852525	G/A	229	59	1	194	41	5	A	0,105	0,105	0,89(0,55-1,45)	0,641	1
rs12445162	G/A	253	39	0	203	37	2	A	0,066	0,085	0,63(0,35-1,11)	0,108	1
rs11075986	C/G	249	42	1	200	38	4	G	0,075	0,097	1,07(0,80-1,44)	0,630	1
rs7190053	C/T	190	87	13	165	67	7	T	0,196	0,172	1,21(0,82-1,78)	0,338	1
rs8049235	G/A	100	156	34	91	108	43	A	0,383	0,396	1,01(0,74-1,59)	0,930	1
rs17225435	A/G	225	61	6	194	46	2	G	0,122	0,104	1,51(0,93-2,46)	0,093	1
rs16952623	T/C	215	72	3	181	58	2	C	0,134	0,128	0,98(0,62-1,56)	0,930	1
rs7200579	C/G	257	33	2	216	25	1	G	0,065	0,055	0,91(0,50-1,68)	0,772	1
rs697771	C/T	102	137	53	72	127	43	T	0,413	0,443	1,00(0,74-1,36)	0,985	1
rs7191513	G/A	98	145	49	82	110	50	A	0,418	0,441	0,96(0,72-1,30)	0,805	1
rs8049933	C/T	231	52	7	195	41	4	T	0,115	0,103	0,83(0,52-1,32)	0,425	1
rs2111113	G/C	247	45	0	208	30	2	C	0,079	0,068	1,00(0,56-1,78)	0,996	1

IC: intervalo de confianza; OR: *odds ratio*. El OR para cada polimorfismo se ajustó por sexo y edad bajo un modelo aditivo.*P después de la corrección por Bonferroni.

La figura 3.2 muestra el análisis de haplotipos de todas las variantes génicas analizadas en este estudio del gen *FTO* y la figura 3.3 muestra también el análisis de haplotipos, pero incluye únicamente las variantes significativas asociadas con la obesidad. Podemos observar que los SNPs asociados positivamente con la obesidad se encuentran en desequilibrio de ligamiento con el rs9939609. rs9928094 $D' = 0,925$ $r^2 = 0,791$, rs9930333 $D' = 0,933$ $r^2 = 0,790$, rs10852521 $D' = 0,975$ $r^2 = 0,571$, rs9935401 $D' = 1$ $r^2 = 0,956$, por el contrario el rs8061518 asociado negativamente con la obesidad no $D' = 0,278$ $r^2 = 0,028$.

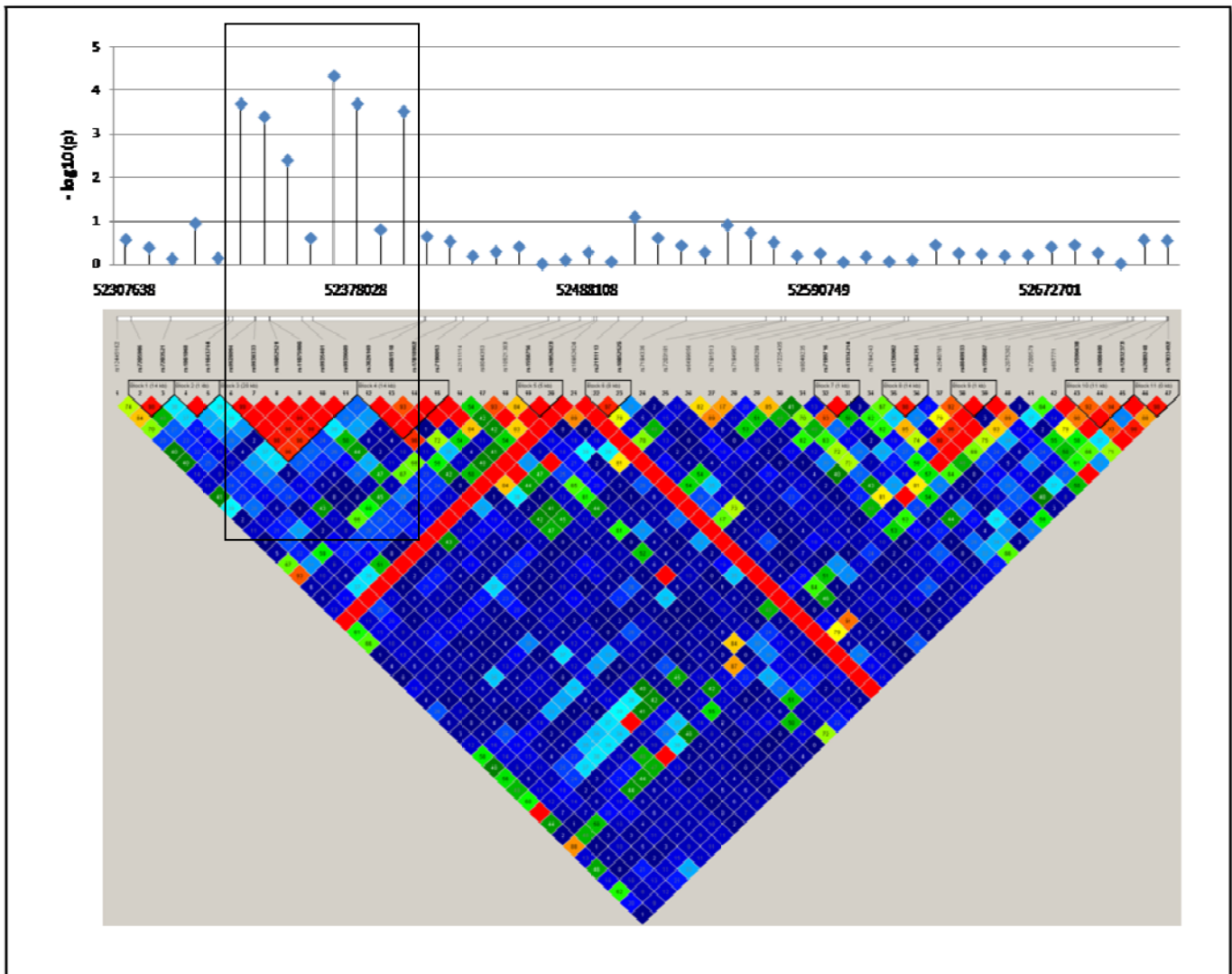


Figura 3.2. Desequilibrio de ligamiento de las variantes estudiadas del gen *FTO*

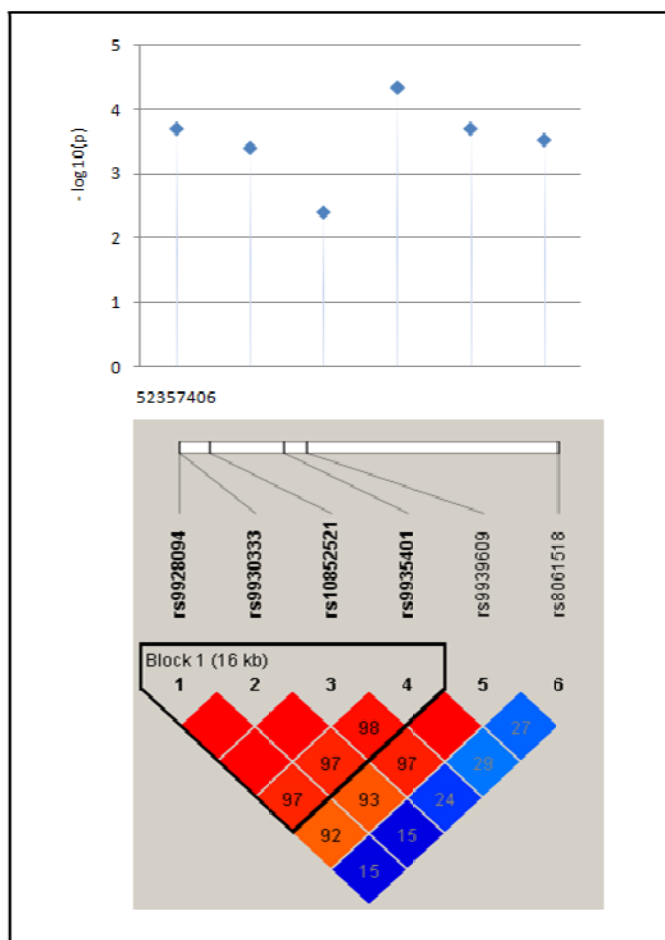


Figura 3.3. Desequilibrio de ligamiento de las variantes asociadas a la obesidad del gen *FTO*

A continuación describiremos la asociación de cada uno de los polimorfismos significativos, después de la corrección por Bonferroni, del gen *FTO* con rasgos asociados a la obesidad y al SM así como con biomarcadores de inflamación y ECV. Todos estos análisis al igual que los anteriores se realizaron bajo un modelo aditivo y fueron ajustados por sexo y edad.

La tabla 3.11 y 3.12 corresponden al rs9939609; en la primera se puede observar que la presencia del alelo de riesgo se asocia con pesar 3,31 kg (95% IC: 1,52~5,10) más, tener un IMC y un IMC *z score* más elevados [1,32 kg/m² (95% IC: 0,59~2,05) y 0,45 (95% IC: 0,19~0,71)], respectivamente, y tener una mayor CC, 3,35 cm (95% IC: 0,61~6,10) que los que no tienen el alelo de riesgo.

Ninguno de los biomarcadores de inflamación (IL-6, IL-8, TNF- α , MCP-1 y PCR), mostró diferencia. Ahora bien, dentro de los marcadores de riesgo de ECV (sICAM-1,

selectina, MPO, MMP-9, PAI-1 activo y total) únicamente la MMP-9 elevada, 0,03 $\mu\text{g/l}$ (95% IC: 0,0002~0,07) se asoció al alelo de riesgo en nuestra población.

El polimorfismo rs9928094 se expone en las tablas 3.13 y 3.14. Se puede observar claramente que el alelo de riesgo se asocia de manera similar que el polimorfismo anterior (rs9939609), pero además muestra asociación negativa con la apo A1, siendo menor en 3,41 mg/dl (-6,72~-0,09) en el grupo que posee el alelo de riesgo. A su vez, estos niños pesan 3,14 kg (95% IC: 1,37~4,91) más, tienen un incremento del IMC e IMC *z score* de [1,26 kg/m^2 (95% IC: 0,53~1,98) y 0,44 (95% IC: 0,18~0,69)] respectivamente y tienen una CC 3,35 cm (95% IC: 0,61~6,10) mayor.

Poseer el alelo de riesgo provoca que la MMP-9 sea 0,04 $\mu\text{g/l}$ (0,003~0,07) más elevada que en el grupo que no lo posee.

Tabla 3.11 Asociación del polimorfismo rs9939609 del gen *FTO* con fenotipos relacionados con la obesidad.

	TT	AT	AA	β (95%IC)	P
n	162	267	102		
Talla (m)	1,38 \pm 0,01	1,39 \pm 0,01	1,40 \pm 0,02	-0,003(-0,01~0,001)	0,148
Peso (kg)	42,3 \pm 1,4	45,6 \pm 1,1	50,1 \pm 2,2	3,31(1,52~5,10)	<0,001
IMC	21,69 \pm 0,48	22,89 \pm 0,36	24,51 \pm 0,64	1,32(0,59~2,05)	<0,001
IMC z score	1,48 \pm 0,16	1,86 \pm 0,13	2,32 \pm 0,22	0,45(0,19~0,71)	0,001
Circunferencia de cintura (cm)	70,58 \pm 1,39	72,85 \pm 0,99	77,46 \pm 1,71	3,35(0,61~6,10)	0,017
TA sistólica (mm Hg)	104 \pm 1	104 \pm 1	107 \pm 1	1,14(-0,71~2,99)	0,227
TA diastólica (mm Hg)	63 \pm 1	65 \pm 1	66 \pm 1	1,24(-0,26~2,74)	0,106
Glucosa (mg/dl)	85 \pm 1	84 \pm 0	84 \pm 1	-0,47(-1,34~0,39)	0,286
Insulina (mU/l)	8,82 \pm 0,64	8,73 \pm 0,43	9,78 \pm 0,71	0,02(-0,01~0,05)	0,253
HOMA-IR	1,89 \pm 0,15	1,85 \pm 0,10	2,07 \pm 0,16	0,02(-0,02~0,05)	0,345
Triacilgliceroles (mg/dl)	67 \pm 3	64 \pm 2	68 \pm 4	0,07(-3,90~4,03)	0,974
Apo-AI (mg/dl)	142 \pm 2	141 \pm 2	135 \pm 3	-3,01(-6,36~0,34)	0,079
Apo-B (mg/dl)	70 \pm 2	68 \pm 1	70 \pm 2	-0,28(-2,56~2,00)	0,811
Colesterol (mg/dl)	169 \pm 3	166 \pm 2	170 \pm 2	0,002(-0,01~0,01)	0,721
HDL-c (mg/dl)	57 \pm 1	57 \pm 1	55 \pm 1	-0,94(-2,76~0,89)	0,316
LDL-c (mg/dl)	96 \pm 2	93 \pm 2	99 \pm 2	0,92(-2,20~4,04)	0,563
Adiponectina (mg/l)	25,89 \pm 0,95	25,13 \pm 0,74	24,16 \pm 1,10	-0,72(-2,18~0,73)	0,331
Resistina (μg/l)	10,33 \pm 0,44	10,81 \pm 0,35	11,43 \pm 0,55	0,55(-0,15~1,25)	0,125
Leptina (μg/l)	13,57 \pm 1,23	14,37 \pm 0,83	16,29 \pm 1,52	1,38(-0,43~3,18)	0,135
ALT (U/l)	23 \pm 1	22 \pm 0	22 \pm 1	-0,19(-0,02~0,63)	0,646
AST (U/l)	18 \pm 1	19 \pm 1	20 \pm 1	0,83(-0,27~1,93)	0,140
GGT (U/l)	10 \pm 0	10 \pm 0	10 \pm 0	-0,06(-0,67~0,55)	0,845

El coeficiente β representa el cambio en el valor absoluto de los rasgos de cada riesgo alélico adicional. El modelo lineal general se usó para analizar la asociación ajustado por sexo y edad asumiendo un efecto aditivo. IMC: índice de masa corporal; TA: tensión arterial; HOMA-IR: *homeostasis model assessment for insulin resistance*. ALT: alanina transamina; AST: aspartato transaminasa; GGT: gamma glutamil transpeptidasa.

Tabla 3.12 Asociación del polimorfismo rs9939609 del gen *FTO* con biomarcadores de riesgo de inflamación y de enfermedad cardiovascular.

	TT	AT	AA	β (95%IC)	P
n	162	267	102		
Proteína C reactiva (mg/l)	2,08 \pm 0,29	2,21 \pm 0,23	2,77 \pm 0,53	0,37(-0,14~0,88)	0,153
Interleuquina 6 (ng/l)	5,61 \pm 0,90	6,00 \pm 0,69	6,19 \pm 1,05	0,42(-0,96~1,80)	0,550
Interleuquina 8 (ng/l)	1,86 \pm 0,16	1,95 \pm 0,15	1,83 \pm 0,21	0,03(-0,25~0,30)	0,853
Factor de necrosis tumoral alfa (ng/l)	3,53 \pm 0,16	3,66 \pm 0,13	3,33 \pm 0,20	-0,02(-0,27~0,23)	0,875
Proteína quimiotáctica de los monocitos 1 (ng/l)	117,08 \pm 4,92	110,13 \pm 3,36	101,05 \pm 6,05	-6,83(-13,93~0,27)	0,060
Metaloproteinasa-9 de la matriz (μg/l)	80,39 \pm 4,35	83,62 \pm 3,70	92,82 \pm 6,05	0,03(0,0002~0,07)	0,049
Mieloperoxidasa (μg/l)	17,56 \pm 2,06	17,84 \pm 1,61	17,65 \pm 1,88	0,29(-2,80~3,38)	0,853
Selectina endotelial soluble (μg/l)	26,34 \pm 1,14	28,22 \pm 1,05	26,64 \pm 1,40	0,66(-1,25~2,56)	0,500
Molécula de adhesión intercelular 1 soluble (mg/l)	0,162 \pm 0,005	0,168 \pm 0,004	0,158 \pm 0,006	0,001(-0,01~0,01)	0,997
Molécula de adhesión vascular 1 soluble (mg/l)	1,12 \pm 0,03	1,09 \pm 0,02	1,11 \pm 0,04	-0,002(-0,05~0,04)	0,924
Inhibidor del activador del plasminógeno 1 activo (μg/l)	8,35 \pm 0,58	8,61 \pm 0,52	10,35 \pm 0,97	0,85(-0,19~1,89)	0,109
Inhibidor del activador del plasminógeno 1 total (μg/l)	23,22 \pm 1,34	22,21 \pm 0,92	26,84 \pm 2,09	0,02(-0,02~0,06)	0,359

El coeficiente β representa el cambio en el valor absoluto de los rasgos de cada riesgo alélico adicional. El modelo lineal general se usó para analizar la asociación ajustado por sexo y edad asumiendo un efecto aditivo.

Tabla 3.13 Asociación del polimorfismo rs9928094 del gen *FTO* con fenotipos relacionados con la obesidad.

	AA	AG	GG	β (95%IC)	P
n	155	263	115		
Talla (m)	1,38 \pm 0,01	1,39 \pm 0,01	1,39 \pm 0,01	-0,003(-0,01~0,001)	0,167
Peso (kg)	42,2 \pm 1,4	45,9 \pm 1,1	48,8 \pm 2,0	3,14(1,37~4,91)	0,001
IMC	21,55 \pm 0,49	23,02 \pm 0,36	24,12 \pm 0,61	1,26(0,53~1,98)	0,001
IMC z score	1,43 \pm 0,17	1,88 \pm 0,13	2,25 \pm 0,20	0,44(0,18~0,69)	0,001
Circunferencia de cintura (cm)	70,43 \pm 1,40	73,16 \pm 1,01	76,45 \pm 1,61	2,77(0,03~5,51)	0,048
TA sistólica (mm Hg)	104 \pm 1	105 \pm 1	105 \pm 1	0,90(-0,91~2,72)	0,330
TA diastólica (mm Hg)	63 \pm 1	65 \pm 1	65 \pm 1	0,81(-0,67~2,28)	0,285
Glucosa (mg/dl)	85 \pm 1	84 \pm 0	84 \pm 1	-0,37(-1,22~0,49)	0,399
Insulina (mU/l)	8,81 \pm 0,66	8,86 \pm 0,43	9,35 \pm 0,65	0,02(-0,02~0,05)	0,349
HOMA-IR	1,88 \pm 0,15	1,87 \pm 0,10	1,98 \pm 0,14	0,01(-0,02~0,05)	0,443
Triacilgliceroles (mg/dl)	68 \pm 3	63 \pm 2	68 \pm 3	-0,64(-0,45~3,27)	0,748
Apo-AI (mg/dl)	143 \pm 2	140 \pm 2	136 \pm 3	-3,41(-6,72~-0,09)	0,044
Apo-B (mg/dl)	70 \pm 2	68 \pm 1	69 \pm 1	-0,98(-3,23~1,26)	0,391
Colesterol (mg/dl)	169 \pm 3	166 \pm 2	168 \pm 2	-0,001(-0,01~0,01)	0,811
HDL-c (mg/dl)	58 \pm 1	57 \pm 1	55 \pm 1	-0,84(-2,65~0,96)	0,360
LDL-c (mg/dl)	96 \pm 2	94 \pm 2	97 \pm 2	-0,13(-3,20~2,95)	0,936
Adiponectina (mg/l)	25,94 \pm 0,99	25,15 \pm 0,73	24,22 \pm 1,06	-0,50(-1,93~0,93)	0,496
Resistina (μg/l)	10,28 \pm 0,46	10,91 \pm 0,35	11,15 \pm 0,51	0,50(-0,19~1,19)	0,158
Leptina (μg/l)	13,69 \pm 1,29	14,50 \pm 0,84	15,55 \pm 1,38	1,00(-0,78~2,78)	0,273
ALT (U/l)	23 \pm 1	22 \pm 0	23 \pm 1	-0,24(-0,05~0,58)	0,568
AST (U/l)	19 \pm 1	19 \pm 1	19 \pm 1	0,45(-0,64~1,54)	0,416
GGT (U/l)	10 \pm 0	10 \pm 0	10 \pm 0	0,06(-0,55~0,66)	0,849

El coeficiente β representa el cambio en el valor absoluto de los rasgos de cada riesgo alélico adicional. El modelo lineal general se usó para analizar la asociación ajustado por sexo y edad asumiendo un efecto aditivo. IMC: índice de masa corporal; TA: tensión arterial; HOMA-IR: *homeostasis model assessment for insulin resistance*. ALT: alanina transamina; AST: aspartato transaminasa; GGT: gamma glutamil transpeptidasa

Tabla 3.14 Asociación del polimorfismo rs9928094 del gen *FTO* con biomarcadores de riesgo de inflamación y de enfermedad cardiovascular.

	AA	AG	GG	β (95%IC)	P
n	155	263	115		
Proteína C reactiva (mg/l)	2,02 ± 0,30	2,31 ± 0,24	2,59 ± 0,48	0,31(-0,19~0,81)	0,228
Interleuquina 6 (ng/l)	5,73 ± 0,93	5,66 ± 0,62	6,67 ± 1,21	0,53(-0,83~1,89)	0,448
Interleuquina 8 (ng/l)	1,87 ± 0,16	1,90 ± 0,14	1,95 ± 0,22	0,06(-0,21~0,34)	0,645
Factor de necrosis tumoral alfa (ng/l)	3,58 ± 0,17	3,69 ± 0,13	3,30 ± 0,18	-0,07(-0,32~0,18)	0,568
Proteína quimiotáctica de los monocitos 1 (ng/l)	117,95 ± 5,19	109,73 ± 3,30	102,93 ± 5,70	-6,86(-13,86~0,14)	0,055
Metaloproteinasa-9 de la matriz (μg/l)	82,36 ± 4,57	80,95 ± 3,67	94,46 ± 5,61	0,04(0,003~0,07)	0,034
Mieloperoxidasa (μg/l)	17,77 ± 2,16	17,67 ± 1,61	17,63 ± 1,75	0,14(-2,91~3,19)	0,929
Selectina endotelial soluble (μg/l)	26,06 ± 1,17	28,43 ± 1,06	26,38 ± 1,33	0,61(-1,27~2,50)	0,525
Molécula de adhesión intercelular 1 soluble (mg/l)	0,162 ± 0,005	0,168 ± 0,005	0,160 ± 0,005	0,004(-0,01~0,01)	0,993
Molécula de adhesión vascular 1 soluble (mg/l)	1,11 ± 0,03	1,08 ± 0,02	1,14 ± 0,03	0,02(-0,03~0,06)	0,423
Inhibidor del activador del plasminógeno 1 activo (μg/l)	8,39 ± 0,60	8,64 ± 0,52	10,04 ± 0,88	0,80(-0,22~1,82)	0,127
Inhibidor del activador del plasminógeno 1 total (μg/l)	23,04 ± 1,34	22,22 ± 0,94	26,72 ± 1,90	0,02(-0,01~0,06)	0,223

El coeficiente β representa el cambio en el valor absoluto de los rasgos de cada riesgo alélico adicional. El modelo lineal general se usó para analizar la asociación ajustado por sexo y edad asumiendo un efecto aditivo.

Las tablas 3.15 y 3.16 describen la asociación del polimorfismo rs9930333 con los fenotipos relacionados a la obesidad, al SM y a los biomarcadores de inflamación y de riesgo de ECV. Al igual que en el caso del polimorfismo rs9928094 sus asociaciones son a los mismos rasgos, a excepción de la CC. Los niños con el alelo de riesgo pesan 3,07 kg (1,31~4,84) más, tienen un IMC e IMC *z score* mayores en [1,23 kg/m² (95% IC: 0,52~1,96) y 0,43 (95% IC: 0,18~0,69)], respectivamente, y una asociación negativa con la apo A1, siendo 3,59 mg/dl (-6,90~-0,29) más baja.

Poseer el alelo de riesgo provoca a su vez que la MMP-9 sea 0,04 µg/l (0,006~0,07) más elevada que en el grupo que no lo posee.

El polimorfismo rs9935401 se describe en las tablas 3.17 y 3.18. Este polimorfismo únicamente se asocia positivamente con el peso, el IMC, el IMC *z score* y la CC. Esto se traduce en que los niños que poseen el alelo de riesgo pesan 3,44 kg (1,66~5,22) más, tienen un IMC e IMC *z score* mayores en [1,37 kg/m² (95% IC: 0,65~2,10) y 0,47 (95% IC: 0,22~0,73)] respectivamente y su CC es mayor en 3,37 cm (95% IC: 0,62~6,14) que los niños que no lo poseen.

Ningún biomarcador de inflamación (IL-6, IL-8, TNF- α , MCP-1 y PCR) ni de riesgo de ECV (sICAM-1, sE-selectina, MPO, MMP-9, PAI-1 activo y total) mostró asociación con el alelo de riesgo.

Tabla 3.15 Asociación del polimorfismo rs9930333 del gen *FTO* con fenotipos relacionados con la obesidad.

	TT	TG	GG	β (95%IC)	P
n	154	262	115		
Talla (m)	1,38 \pm 0,01	1,39 \pm 0,01	1,39 \pm 0,01	-0,003(-0,01~0,001)	0,192
Peso (k)	42,4 \pm 1,4	46,0 \pm 1,1	48,5 \pm 2,0	3,07(1,31~4,84)	0,001
IMC	21,60 \pm 0,49	23,09 \pm 0,36	24,03 \pm 0,61	1,23(0,52~1,96)	0,001
IMC z score	1,44 \pm 0,17	1,90 \pm 0,13	2,23 \pm 0,20	0,43(0,18~0,69)	0,001
Circunferencia de cintura (cm)	70,54 \pm 1,41	73,31 \pm 1,02	76,30 \pm 1,61	2,73(-0,003~5,47)	0,051
TA sistólica (mm Hg)	104 \pm 1	105 \pm 1	105 \pm 1	0,88(-0,93~2,69)	0,339
TA diastólica (mm Hg)	63 \pm 1	65 \pm 1	65 \pm 1	0,83(-0,65~2,30)	0,272
Glucosa (mg/dl)	85 \pm 1	84 \pm 0	84 \pm 1	-0,37(-1,22~0,49)	0,402
Insulina (mU/l)	8,83 \pm 0,67	8,89 \pm 0,43	9,31 \pm 0,65	0,02(-0,02~0,05)	0,400
HOMA-IR	1,89 \pm 0,15	1,88 \pm 0,10	1,97 \pm 0,14	0,01(-0,02~0,05)	0,499
Triacilgliceroles (mg/dl)	68 \pm 3	63 \pm 2	68 \pm 3	-0,42(-4,32~3,48)	0,034
Apo-AI (mg/dl)	143 \pm 2	141 \pm 2	135 \pm 3	-3,59(-6,90~-0,29)	0,033
Apo-B (mg/dl)	70 \pm 2	68 \pm 1	69 \pm 1	-0,92(-3,16~1,32)	0,419
Colesterol (mg/dl)	169 \pm 3	167 \pm 2	168 \pm 2	-0,002(-0,01~0,01)	0,728
HDL-c (mg/dl)	57 \pm 1	57 \pm 1	55 \pm 1	-0,97(-2,77~0,83)	0,293
LDL-c (mg/dl)	96 \pm 2	94 \pm 2	97 \pm 2	-0,18(-3,24~2,89)	0,911
Adiponectina (mg/l)	25,77 \pm 0,98	25,37 \pm 0,75	23,78 \pm 1,01	-0,73(-2,16~0,70)	0,319
Resistina (μg/l)	10,28 \pm 0,46	10,95 \pm 0,35	11,10 \pm 0,51	0,45(-0,23~1,14)	0,198
Leptina (μg/l)	13,76 \pm 1,29	14,56 \pm 0,84	15,56 \pm 1,38	0,98(-0,80~2,75)	0,283
ALT (U/l)	23 \pm 1	22 \pm 0	23 \pm 1	-0,24(-1,05~0,57)	0,557
AST (U/l)	19 \pm 1	19 \pm 1	19 \pm 1	0,43(-0,65~1,52)	0,433
GGT (U/l)	10 \pm 0	10 \pm 0	10 \pm 0	0,07(-0,54~0,67)	0,831

El coeficiente β representa el cambio en el valor absoluto de los rasgos de cada riesgo alélico adicional. El modelo lineal general se usó para analizar la asociación ajustado por sexo y edad asumiendo un efecto aditivo. IMC: índice de masa corporal; TA: tensión arterial; HOMA-IR: *homeostasis model assessment for insulin resistance*. ALT: alanina transamina; AST: aspartato transaminasa; GGT: gamma glutamil transpeptidasa

Tabla 3.16 Asociación del polimorfismo rs9930333 del gen *FTO* con biomarcadores de riesgo de inflamación y de enfermedad cardiovascular.

	TT	TG	GG	β (95%IC)	P
n	154	262	115		
Proteína C reactiva (mg/l)	2,03 \pm 0,30	2,31 \pm 0,24	2,60 \pm 0,48	0,32(-0,18~0,82)	0,371
Interleuquina 6 (ng/l)	5,74 \pm 0,93	5,67 \pm 0,62	6,68 \pm 1,21	0,51(-0,84~1,87)	0,461
Interleuquina 8 (ng/l)	1,86 \pm 0,16	1,90 \pm 0,15	1,95 \pm 0,22	0,06(-0,21~0,33)	0,656
Factor de necrosis tumoral alfa (ng/l)	3,57 \pm 0,17	3,70 \pm 0,13	3,32 \pm 0,18	-0,08(-0,32~0,17)	0,552
Proteína quimiotáctica de los monocitos 1 (ng/l)	117,07 \pm 5,14	109,35 \pm 3,30	104,28 \pm 5,70	-6,56(-13,55~0,43)	0,066
Metaloproteinasa-9 de la matriz (μg/l)	81,61 \pm 4,54	80,95 \pm 3,71	96,34 \pm 5,60	0,04(0,006~0,07)	0,021
Mieloperoxidasa (μg/l)	17,65 \pm 2,17	17,78 \pm 1,62	17,57 \pm 1,75	0,07(-2,97~3,12)	0,962
Selectina endotelial soluble (μg/l)	26,06 \pm 1,17	28,43 \pm 1,06	26,38 \pm 1,33	0,56(-1,33~2,44)	0,562
Molécula de adhesión intercelular 1 soluble (mg/l)	0,162 \pm 0,005	0,169 \pm 0,005	0,159 \pm 0,005	-0,0003(-0,01~0,01)	0,953
Molécula de adhesión vascular 1 soluble (mg/l)	1,10 \pm 0,03	1,08 \pm 0,02	1,14 \pm 0,03	0,02(-0,03~0,06)	0,434
Inhibidor del activador del plasminógeno 1 activo (μg/l)	8,40 \pm 0,60	8,69 \pm 0,52	10,06 \pm 0,88	0,79(-0,23~1,81)	0,129
Inhibidor del activador del plasminógeno 1 total (μg/l)	23,02 \pm 1,35	22,13 \pm 0,94	27,04 \pm 1,90	0,03(-0,01~0,06)	0,187

El coeficiente β representa el cambio en el valor absoluto de los rasgos de cada riesgo alélico adicional. El modelo lineal general se usó para analizar la asociación ajustado por sexo y edad asumiendo un efecto aditivo.

Tabla 3.17 Asociación del polimorfismo rs9935401 del gen *FTO* con fenotipos relacionados con la obesidad.

	GG	AG	AA	β (95%IC)	P
n	167	261	102		
Talla (m)	1,38 ± 0,01	1,39 ± 0,01	1,40 ± 0,02	-0,003(-0,01~0,001)	0,115
Peso (kg)	42,1 ± 1,4	45,9 ± 1,1	50,1 ± 2,2	3,44(1,66~5,22)	<0,001
IMC	21,56 ± 0,47	23,08 ± 0,37	24,51 ± 0,64	1,37(0,65~2,10)	<0,001
IMC z score	1,42 ± 0,16	1,93 ± 0,13	2,32 ± 0,22	0,47(0,22~0,73)	<0,001
Circunferencia de cintura (cm)	70,29 ± 1,35	73,35 ± 1,01	77,46 ± 1,71	3,37(0,62~6,14)	0,017
TA sistólica (mm Hg)	104 ± 1	105 ± 1	107 ± 1	1,19(-0,65~3,02)	0,205
TA diastólica (mm Hg)	63 ± 1	65 ± 1	66 ± 1	1,39(-0,10~2,88)	0,068
Glucosa (mg/dl)	85 ± 1	84 ± 0	84 ± 1	-0,42(-1,28~0,44)	0,342
Insulina (mU/l)	8,78 ± 0,62	8,78 ± 0,44	9,78 ± 0,71	0,02(-0,01~0,05)	0,209
HOMA-IR	66 ± 3	64 ± 2	68 ± 4	0,34(-3,61~4,29)	0,866
Triacilgliceroles (mg/dl)	1,88 ± 0,14	1,86 ± 0,10	2,07 ± 0,16	0,02(-0,02~0,05)	0,286
Apo-AI (mg/dl)	143 ± 2	141 ± 2	135 ±	-3,04(-6,38~0,31)	0,076
Apo-B (mg/dl)	70 ± 2	68 ± 1	70 ± 2	-0,04(-2,31~2,22)	0,970
Colesterol (mg/dl)	168 ± 2	166 ± 2	170 ± 2	0,003(-0,01~0,01)	0,584
HDL-c (mg/dl)	58 ± 1	57 ± 1	55 ± 1	-1,04(-2,86~0,79)	0,266
LDL-c (mg/dl)	95 ± 2	94 ± 2	99 ± 2	1,29(-1,82~4,39)	0,417
Adiponectina (mg/l)	26,09 ± 0,95	24,80 ± 0,73	24,16 ± 1,10	-0,67(-2,11~0,78)	0,366
Resistina (μg/l)	10,30 ± 0,43	10,85 ± 0,36	11,43 ± 0,55	0,59(-0,10~1,29)	0,096
Leptina (μg/l)	13,29 ± 1,20	14,68 ± 0,84	16,29 ± 1,52	1,51(-0,28~3,30)	0,100
ALT (U/l)	23 ± 1	22 ± 0	22 ± 1	-0,30(-1,12~0,52)	0,469
AST (U/l)	18 ± 1	19 ± 1	20 ± 1	0,72(-0,37~1,82)	0,195
GGT (U/l)	10 ± 0	10 ± 0	10 ± 0	-0,08(-0,69~0,52)	0,784

El coeficiente β representa el cambio en el valor absoluto de los rasgos de cada riesgo alélico adicional. El modelo lineal general se usó para analizar la asociación ajustado por sexo y edad asumiendo un efecto aditivo. IMC: índice de masa corporal; TA: tensión arterial; HOMA-IR: *homeostasis model assessment for insulin resistance*. ALT: alanina transamina; AST: aspartato transaminasa; GGT: gamma glutamil transpeptidasa

Tabla 3.18 Asociación del polimorfismo rs9935401 del gen *FTO* con biomarcadores de riesgo de inflamación y de enfermedad cardiovascular.

	GG	AG	AA	β (95%IC)	P
n	167	261	102		
Proteína C reactiva (mg/l)	2,05 ± 0,29	2,29 ± 0,23	2,77 ± 0,53	0,38(-0,12~1,89)	0,140
Interleuquina 6 (ng/l)	5,56 ± 0,87	6,00 ± 0,70	6,19 ± 1,05	0,44(-0,93~1,82)	0,528
Interleuquina 8 (ng/l)	1,86 ± 0,15	1,96 ± 0,15	1,83 ± 0,21	0,03(-0,24~0,31)	0,819
Factor de necrosis tumoral alfa (ng/l)	3,52 ± 0,16	3,69 ± 0,13	3,33 ± 0,20	-0,01(-0,26~0,24)	0,962
Monocyte chemotactic protein 1 (ng/l)	117,19 ± 4,91	109,61 ± 3,33	101,05 ± 6,05	-6,52(-13,59~0,55)	0,071
Metaloproteinasa-9 de la matriz (μg/l)	82,52 ± 4,42	82,49 ± 3,73	92,82 ± 6,05	0,03(-0,004~0,07)	0,080
Mieloperoxidasa (μg/l)	17,65 ± 2,02	17,92 ± 1,63	17,65 ± 1,88	0,27(-2,81~3,35)	0,865
Selectina endotelial soluble (μg/l)	26,18 ± 1,12	28,25 ± 1,07	26,64 ± 1,40	0,74(-1,16~2,64)	0,448
Molécula de adhesión intercelular 1 soluble (mg/l)	0,162 ± 0,005	0,169 ± 0,005	0,158 ± 0,006	0,0003(-0,01~0,01)	0,951
Molécula de adhesión vascular 1 soluble (mg/l)	1,12 ± 0,03	1,09 ± 0,02	1,11 ± 0,04	-0,002(-0,05~0,04)	0,946
Inhibidor del activador del plasminógeno 1 activo (μg/l)	8,41 ± 0,58	8,62 ± 0,52	10,35 ± 0,97	0,90(-0,13~1,93)	0,089
Inhibidor del activador del plasminógeno 1 total (μg/l)	23,26 ± 1,31	22,18 ± 0,92	26,84 ± 2,09	0,02(-0,02~0,06)	0,313

El coeficiente β representa el cambio en el valor absoluto de los rasgos de cada riesgo alélico adicional. El modelo lineal general se usó para analizar la asociación ajustado por sexo y edad asumiendo un efecto aditivo.

Finalmente, la descripción de las asociaciones del polimorfismo rs8061518 con la obesidad y el SM aparece en las tablas 3.19 y 3.20. Este polimorfismo se asocia de manera totalmente opuesta a los descritos anteriormente para este mismo gen (*FTO*). En primer lugar, se asocia negativamente al peso corporal, IMC e IMC *z score*, lo que significa que tener el alelo de riesgo hace que los niños tengan 2,44 kg (95% IC: -4,35~-0,54) menos que los que no lo tienen, asimismo el IMC e IMC *z score* son menores en [1,27 kg/m² (95% IC: -2,05~-0,53) y 0,45 (95% IC: -0,72~-0,17)], respectivamente. Asimismo, la tensión arterial sistólica, 2,23 mm Hg (95% IC: (-3,80~-0,65), la insulina y el índice HOMA [0,05 mU/l (95% IC: (-0,09~-0,02) 0,05 (95% IC: (-0,09~-0,02), respectivamente] y la leptina 3,55 µg/l (95% IC: (-5,43~-1,66), son menores en los niños con el alelo de riesgo.

Ninguno de los biomarcadores de inflamación (IL-6, IL-8, TNF- α , MCP-1 y PCR) mostró asociación con el alelo de riesgo. Entre los marcadores de riesgo de ECV (sICAM-1, selectina, MPO, MMP-9, PAI-1 activo y total), únicamente la concentración plasmática de PAI-1 activo se asoció al alelo de riesgo en la población estudiada de forma negativa siendo sus concentraciones 1,71 µg/l (95% IC: -2,80~-0,62) menores en los sujetos con el alelo de riesgo.

Tabla 3.19 Asociación del polimorfismo rs8061518 del gen *FTO* con fenotipos relacionados con la obesidad.

	AA	AG	GG	β (95%IC)	P
n	254	215	54		
Talla (m)	1,39 \pm 0,01	1,40 \pm 0,01	1,39 \pm 0,02	-0,001(-0,01~0,003)	0,613
Peso (kg)	46,8 \pm 1,2	44,9 \pm 1,3	42,6 \pm 2,4	-2,44(-4,35~-0,54)	0,012
IMC	23,70 \pm 0,38	22,33 \pm 0,42	21,48 \pm 0,81	-1,27(-2,05~-0,50)	0,001
IMC z score	2,16 \pm 0,14	1,61 \pm 0,14	1,36 \pm 0,30	-0,45(-0,72~-0,17)	0,001
Circunferencia de cintura (cm)	74,74 \pm 1,07	71,99 \pm 1,18	71,10 \pm 2,25	-1,70(-4,63~1,22)	0,254
TA sistólica (mm Hg)	106 \pm 1	103 \pm 1	104 \pm 2	-1,74(-3,69~0,21)	0,080
TA diastólica (mm Hg)	66 \pm 1	64 \pm 1	61 \pm 1	-2,23(-3,80~-0,65)	0,006
Glucosa (mg/dl)	85 \pm 0	84 \pm 0	85 \pm 1	-0,11(-1,02~0,80)	0,816
Insulina (mU/l)	9,52 \pm 0,48	8,56 \pm 0,48	8,17 \pm 1,13	-0,05(-0,09~-0,02)	0,003
HOMA-IR	2,02 \pm 0,10	1,80 \pm 0,11	1,79 \pm 0,30	-0,05(-0,09~-0,02)	0,003
Triacilglicerolos (mg/dl)	68 \pm 2	63 \pm 2	66 \pm 6	-2,33(-6,52~1,86)	0,276
Apo-AI (mg/dl)	141 \pm 2	137 \pm 2	145 \pm 4	0,15(-3,40~3,71)	0,932
Apo-B (mg/dl)	68 \pm 1	68 \pm 1	71 \pm 3	1,00(-1,34~3,35)	0,403
Colesterol (mg/dl)	166 \pm 2	168 \pm 2	172 \pm 4	0,01(-0,004~0,02)	0,223
HDL-c (mg/dl)	57 \pm 1	56 \pm 1	58 \pm 2	0,07(-1,87~2,01)	0,945
LDL-c (mg/dl)	93 \pm 1	96 \pm 2	98 \pm 4	2,74(-0,41~5,89)	0,089
Adiponectina (mg/l)	25,46 \pm 0,77	23,92 \pm 0,73	27,90 \pm 1,81	0,38(-1,15~1,91)	0,628
Resistina (μg/l)	11,34 \pm 0,40	10,30 \pm 0,33	10,37 \pm 0,72	-0,68(-1,42~0,06)	0,074
Leptina (μg/l)	16,98 \pm 1,02	12,57 \pm 0,85	11,21 \pm 1,70	-3,55(-5,43~-1,66)	<0,001
ALT (U/l)	23 \pm 0	22 \pm 0	22 \pm 1	-0,29(-1,56~0,58)	0,515
AST (U/l)	20 \pm 1	18 \pm 1	18 \pm 1	-1,07(-2,22~0,08)	0,070
GGT (U/l)	10 \pm 0	10 \pm 0	9 \pm 1	-0,63(-1,26~0,004)	0,052

El coeficiente β representa el cambio en el valor absoluto de los rasgos de cada riesgo alélico adicional. El modelo lineal general se usó para analizar la asociación ajustado por sexo y edad asumiendo un efecto aditivo. IMC: índice de masa corporal; TA: tensión arterial; HOMA-IR: *homeostasis model assessment for insulin resistance*. ALT: alanina transamina; AST: aspartato transaminasa; GGT: gamma glutamil transpeptidasa

Tabla 3.20 Asociación del polimorfismo rs8061518 del gen *FTO* con biomarcadores de riesgo de inflamación y de enfermedad cardiovascular.

	AA	AG	GG	β (95%IC)	P
n	254	215	54		
Proteína C reactiva (mg/l)	2,50 ± 0,26	2,26 ± 0,31	1,70 ± 0,30	-0,34(-0,89~0,20)	0,217
Interleuquina 6 (ng/l)	5,62 ± 0,64	6,56 ± 0,90	4,71 ± 0,91	0,09(-1,36~1,53)	0,905
Interleuquina 8 (ng/l)	1,94 ± 0,14	1,98 ± 0,17	1,57 ± 0,19	-0,10(-0,39~0,19)	0,495
Factor de necrosis tumoral alfa (ng/l)	3,62 ± 0,14	3,51 ± 0,14	3,60 ± 0,27	-0,05(-0,32~0,22)	0,711
Proteína quimiotáctica de los monocitos 1 (ng/l)	111,97 ± 3,92	107,55 ± 3,67	115,23 ± 8,44	-1,17(-8,69~6,35)	0,761
Metaloproteinasa-9 de la matriz (μg/l)	82,62 ± 3,42	86,21 ± 4,14	84,12 ± 8,05	0,01(-0,03~0,04)	0,764
Mieloperoxidasa (μg/l)	19,19 ± 1,68	16,65 ± 1,44	16,55 ± 4,26	-1,63(-4,94~1,68)	0,336
Selectina endotelial soluble (μg/l)	28,19 ± 0,98	26,13 ± 1,08	26,61 ± 2,34	-1,09(-3,13~0,95)	0,296
Molécula de adhesión intercelular 1 soluble (mg/l)	0,165 ± 0,004	0,168 ± 0,005	0,155 ± 0,007	-0,002(-0,01~0,01)	0,605
Molécula de adhesión vascular 1 soluble (mg/l)	1,11 ± 0,02	1,09 ± 0,03	1,09 ± 0,05	-0,01(-0,05~0,04)	0,662
Inhibidor del activador del plasminógeno 1 activo (μg/l)	9,81 ± 0,62	8,45 ± 0,49	6,16 ± 0,63	-1,71(-2,80~-0,62)	0,002
Inhibidor del activador del plasminógeno 1 total (μg/l)	24,74 ± 1,11	22,56 ± 1,16	20,66 ± 1,85	-0,04(-0,08~0,003)	0,073

El coeficiente β representa el cambio en el valor absoluto de los rasgos de cada riesgo alélico adicional. El modelo lineal general se usó para analizar la asociación ajustado por sexo y edad asumiendo un efecto aditivo.

NPY

La tabla 3.21 muestra las características de los polimorfismos analizados del gen *NPY*. Se observa claramente que los polimorfismos rs16479 y rs16139 no se encontraban en equilibrio de HW en el grupo control, aparte, el polimorfismo rs16148 obtuvo una tasa de éxito de genotipado de 84,5 por ciento (menor del 90 por ciento) y además, el polimorfismo rs5574 también seleccionado inicialmente, pero que no aparece en la tabla, falló en el genotipado, por lo que no obtuvimos datos del mismo. Como consecuencia de lo expuesto anteriormente, únicamente a los cuatro polimorfismos que aparecen en la tabla 3.22 se les realizó el análisis sucesivo. Al asociar este último grupo de polimorfismos con la obesidad, obtuvimos que tres de los cuatro se asociaron significativamente con ésta después de ser ajustados por sexo y edad bajo un modelo aditivo; sin embargo, sólo los polimorfismos rs16147 y rs16131 permanecieron estadísticamente significativos después de hacer la corrección por Bonferroni.

Tabla 3.21 Descripción de los polimorfismos genotipados y analizados del gen *NPY*

Polimorfismo	Posición	FAM	Alelos (M/m)	EHW P	Call rate (%)
rs16479	Promotor	0,054	T/C	9,52E-57	99,8
rs16148	Promotor	0,360	T/C	0,547	84,5
rs16147	Promotor	0,486	G/A	0,430	96,6
rs16478	Intrón 1	0,280	C/T	0,195	96,4
rs16139	Exón 1	0,474	G/A	4,63E-47	96,4
rs16135	Intrón 2	0,078	C/T	0,162	99,1
rs16131	Intrón 3	0,141	A/G	0,485	99,6

Call-rate: tasa de éxito del genotipado; EHW P: Equilibrio de Hardy-Weinberg (p para el grupo control); FAM: frecuencia alélica menor.

Tabla 3.22 Distribución genotípica para los polimorfismos analizados del gen *NPY* y su asociación con la obesidad.

Polimorfismo	Alelo 1/alelo 2	Caso			Control			Alelo de Riesgo	Alelo de Riesgo		OR (95%IC)	P	P corr*
		11	12	22	11	12	22		Caso	Control			
rs16147	G/A	69	128	82	70	123	43	A	0,526	0,444	1,65(1,21-2,26)	0,001	0,040
rs16478	C/T	146	112	22	116	104	14	T	0,280	0,285	1,07(0,75-1,53)	0,701	1
rs16135	C/T	237	49	3	214	23	2	T	0,096	0,058	1,83(1,03-3,23)	0,035	0,078
rs16131	A/G	207	66	17	192	48	1	G	0,171	0,104	2,06(1,33-3,19)	7,78E-04	0,016

IC: intervalo de confianza; OR: *odds ratio*. El OR para cada polimorfismo se ajustó por sexo y edad bajo un modelo aditivo.*P después de la corrección por Bonferroni.

Las tablas 3.23 y 3.24 muestran la asociación del polimorfismo rs16147 con fenotipos relacionados con la obesidad y el SM, la primera, y con biomarcadores de inflamación y riesgo de ECV, la segunda, en toda la población estudiada, después de ajustar por sexo y edad y bajo un modelo aditivo. Como se observa, este polimorfismo se asoció positivamente con el peso, el IMC, el IMC *z score* y negativamente con el HDL-c. Poseer el alelo de riesgo (A) conllevó a tener un incremento de 2,21 kg (95% IC: 0,43~4,00), 1,03 kg/m² (95% IC: 0,30~1,76) y 0,38 (95% IC: 0,12~0,64) de IMC *z score*. Por el contrario, en el caso del HDL-c los sujetos presentaron 2,18 mg/dl (95% IC: -3,98~-0,37) menos que los que no poseían el alelo de riesgo. La ALT también se asoció negativamente con poseer el alelo A, 0,90 U/l (-1,70~-0,09), no así la AST ni la GGT.

Ningún biomarcador de inflamación (IL-6, IL-8, TNF- α , MCP-1 y PCR) ni de riesgo de ECV (sICAM-1, sE-selectina, MPO, MMP-9, PAI-1 activo y total) mostró asociación con el alelo de riesgo.

Tabla 3.23 Asociación del polimorfismo rs16147 del gen *NPY* con fenotipos relacionados con la obesidad.

	GG	AG	AA	β (95%IC)	P
n	139	251	125		
Talla (m)	1,39 ± 0,01	1,39 ± 0,01	1,39 ± 0,01	-0,003(-0,01~0,00)	0,121
Peso (kg)	45,0 ± 1,6	44,3 ± 1,2	48,1 ± 1,6	2,21(0,43~4,00)	0,016
IMC	22,37 ± 0,52	22,36 ± 0,39	24,22 ± 0,53	1,03(0,30~1,76)	0,006
IMC z score	1,57 ± 0,18	1,68 ± 0,13	2,39 ± 0,20	0,38(0,12~0,64)	0,004
Circunferencia de cintura (cm)	71,95 ± 1,55	72,17 ± 1,07	76,08 ± 1,39	1,84(-0,90~4,58)	0,189
TA sistólica (mm Hg)	104 ± 2	105 ± 1	106 ± 1	1,55(-0,27~3,37)	0,096
TA diastólica (mm Hg)	64 ± 1	65 ± 1	65 ± 1	0,42(-1,07~1,91)	0,584
Glucosa (mg/dl)	85 ± 1	84 ± 0	85 ± 1	0,18(-0,68~1,04)	0,684
Insulina (mU/l)	8,79 ± 0,66	9,22 ± 0,52	8,53 ± 0,43	0,02(-0,01~0,06)	0,169
HOMA-IR	1,88 ± 0,16	1,96 ± 0,12	1,80 ± 0,09	0,02(-0,01~0,06)	0,178
Triacilgliceroles (mg/dl)	66 ± 3	66 ± 2	65 ± 2	-0,26(-4,17~3,65)	0,897
Apo-AI (mg/dl)	140 ± 2	140 ± 2	140 ± 2	-0,37(-3,72~2,99)	0,830
Apo-B (mg/dl)	68 ± 1	69 ± 1	69 ± 2	0,45(-1,79~2,68)	0,691
Colesterol (mg/dl)	167 ± 2	168 ± 2	166 ± 3	-0,001(-0,01~0,01)	0,691
HDL-c (mg/dl)	58 ± 1	57 ± 1	54 ± 1	-2,18(-3,98~-0,37)	0,018
LDL-c (mg/dl)	94 ± 2	95 ± 2	96 ± 2	1,52(-1,53~4,58)	0,329
Adiponectina (mg/l)	25,36 ± 0,93	24,71 ± 0,77	26,21 ± 1,11	0,36(-1,02~1,80)	0,628
Resistina (μg/l)	10,68 ± 0,42	10,66 ± 0,37	11,16 ± 0,52	0,28(-0,40~0,97)	0,417
Leptina (μg/l)	13,98 ± 1,46	13,82 ± 0,86	16,42 ± 1,11	1,26(-0,50~3,02)	0,160
ALT (U/l)	23 ± 1	23 ± 0	21 ± 1	-0,90(-1,70~-0,09)	0,029
AST (U/l)	19 ± 1	19 ± 1	19 ± 1	-0,19(-1,28~0,89)	0,728
GGT (U/l)	10 ± 0	10 ± 0	10 ± 0	-0,13(-0,73~0,47)	0,668

El coeficiente β representa el cambio en el valor absoluto de los rasgos de cada riesgo alélico adicional. El modelo lineal general se usó para analizar la asociación ajustado por sexo y edad asumiendo un efecto aditivo. IMC: índice de masa corporal; TA: tensión arterial; HOMA-IR: *homeostasis model assessment for insulin resistance*. ALT: alanina transamina; AST: aspartato transaminasa; GGT: gamma glutamil transpeptidasa.

Tabla 3.24 Asociación del polimorfismo rs16147 del gen *NPY* con biomarcadores de riesgo de inflamación y de enfermedad cardiovascular.

	GG	AG	AA	β (95%IC)	P
n	139	251	125		
Proteína C reactiva (mg/l)	2,23 ± 0,39	2,22 ± 0,27	2,61 ± 0,33	0,16(-0,35~0,67)	0,537
Interleuquina 6 (ng/l)	6,14 ± 1,00	5,78 ± 0,61	6,09 ± 1,22	-0,05(-1,43~1,32)	0,941
Interleuquina 8 (ng/l)	1,90 ± 0,22	1,89 ± 0,14	1,88 ± 0,18	-0,05(-0,32~0,23)	0,744
Factor de necrosis tumoral alfa (ng/l)	3,45 ± 0,16	3,54 ± 0,13	3,78 ± 0,21	0,12(-0,13~0,37)	0,346
Proteína quimiotáctica de los monocitos 1 (ng/l)	100,88 ± 4,20	113,22 ± 3,89	113,61 ± 5,30	5,26(-1,74~12,26)	0,141
Metaloproteinasa-9 de la matriz (μg/l)	82,07 ± 4,47	86,99 ± 3,95	80,74 ± 5,28	-0,01(-0,05~0,02)	0,395
Mieloperoxidasa (μg/l)	17,71 ± 2,06	18,17 ± 1,57	17,23 ± 2,43	-0,43(-3,52~2,66)	0,785
Selectina endotelial soluble (μg/l)	26,46 ± 1,22	27,95 ± 0,96	26,58 ± 1,66	0,09(-1,83~2,00)	0,931
Molécula de adhesión intercelular 1 soluble (mg/l)	0,165 ± 0,007	0,167 ± 0,004	0,162 ± 0,005	-0,003(-0,01~0,01)	0,478
Molécula de adhesión vascular 1 soluble (mg/l)	1,09 ± 0,03	1,12 ± 0,02	1,08 ± 0,03	-0,01(-0,06~0,03)	0,525
Inhibidor del activador del plasminógeno 1 activo (μg/l)	8,15 ± 0,74	9,33 ± 0,56	8,92 ± 0,66	0,48(-0,55~1,51)	0,357
Inhibidor del activador del plasminógeno 1 total (μg/l)	22,16 ± 1,20	25,05 ± 1,19	21,51 ± 1,34	-0,01(-0,05~0,03)	0,653

El coeficiente β representa el cambio en el valor absoluto de los rasgos de cada riesgo alélico adicional. El modelo lineal general se usó para analizar la asociación ajustado por sexo y edad asumiendo un efecto aditivo.

En la tabla 3.25 se muestra la asociación del polimorfismo rs16131 con fenotipos relacionados con la obesidad y el SM, en este caso se observa que el peso, IMC, IMC *z score* se asociaron positivamente. Poseer el alelo de riesgo (G) conllevó a tener un incremento de 2,97 kg (95% IC: 0,55~5,40), 1,40 kg/m² (95% IC: 0,41~2,39) y 0,47 (95% IC: 0,12~0,82) de IMC *z score*. Igualmente tanto la insulina, como el índice HOMA, los TAG y la leptina estaban más elevados al tener el alelo de riesgo 0,06 mU/l (95% IC: 0,01~0,10), 0,06 (95% IC: 0,01~0,10), 7,09 mg/dl (95% IC: 1,79~12,39) y 3,29 (95% IC: 0,88~5,70) respectivamente; contrario a esto la concentración de HDL-c fue menor en 3,28 mg/dl (95% IC: -5,73~-0,83) al poseer el alelo G, en toda la población al ajustar por sexo y edad y bajo un modelo aditivo. Al observar que este polimorfismo se asociaba con prácticamente todas las características de SM, realizamos un análisis de regresión logística múltiple con todos los rasgos significativos, evitando la colinealidad, y el resultado arrojó que la única variable que se mantenía a lo largo del análisis fue los TAG OR 1,007 (95% IC: 1,002-1,013), lo cual indica que es la que se asocia con mayor fuerza a poseer al menos un alelo de riesgo.

Los biomarcadores de inflamación y riesgo de ECV se exponen en la tabla 3.26. De entre los dos grupos de biomarcadores únicamente la MCP-1 se asoció positivamente a poseer el alelo de riesgo, estos niños presentaron 10 ng/l (0,49~19,52) más, que los que no lo poseían.

Tabla 3.25 Asociación del polimorfismo rs16131 del gen *NPY* con fenotipos relacionados con la obesidad.

	AA	AG	GG	β (95%IC)	P
n	399	114	18		
Talla (m)	1,39 ± 0,01	1,38 ± 0,01	1,40 ± 0,02	-0,01(-0,01~-0,001)	0,034
Peso (kg)	45,1 ± 0,9	45,2 ± 1,7	54,2 ± 3,0	2,97(0,55~5,40)	0,017
IMC	22,59 ± 0,30	23,01 ± 0,60	27,36 ± 1,01	1,40(0,41~2,39)	0,006
IMC z score	1,73 ± 0,11	1,90 ± 0,20	3,59 ± 0,41	0,47(0,12~0,82)	0,008
Circunferencia de cintura (cm)	72,64 ± 0,88	73,49 ± 1,46	81,50 ± 2,95	0,62(-3,13~4,37)	0,747
TA sistólica (mm Hg)	105 ± 1	105 ± 1	107 ± 4	0,71(-1,78~3,20)	0,578
TA diastólica (mm Hg)	64 ± 1	65 ± 1	64 ± 3	0,62(-1,41~2,64)	0,550
Glucosa (mg/dl)	85 ± 0	84 ± 1	87 ± 2	0,26(-0,90~1,43)	0,657
Insulina (mU/l)	8,80 ± 0,36	8,93 ± 0,76	12,69 ± 1,38	0,06(0,01~0,10)	0,015
HOMA-IR	1,88 ± 0,08	1,86 ± 0,16	2,73 ± 0,31	0,06(0,01~0,10)	0,018
Triacilgliceroles (mg/dl)	64 ± 1	72 ± 4	74 ± 6	7,09(1,79~12,39)	0,009
Apo-AI (mg/dl)	140 ± 1	140 ± 3	138 ± 4	-0,48(-5,01~4,05)	0,836
Apo-B (mg/dl)	68 ± 1	71 ± 2	68 ± 4	1,18(-1,94~4,30)	0,459
Colesterol (mg/dl)	168 ± 1	168 ± 3	161 ± 7	-0,004(-0,02~0,01)	0,527
HDL-c (mg/dl)	58 ± 1	55 ± 1	50 ± 3	-3,28(-5,73~-0,83)	0,009
LDL-c (mg/dl)	95 ± 1	97 ± 3	95 ± 6	1,51(-2,68~5,70)	0,480
Adiponectina (mg/l)	25,18 ± 0,57	24,86 ± 1,21	25,81 ± 3,37	-0,25(-2,12~1,70)	0,799
Resistina (μg/l)	10,60 ± 0,27	11,61 ± 0,64	9,68 ± 0,56	0,41(-0,53~1,36)	0,392
Leptina (μg/l)	13,72 ± 0,74	15,99 ± 1,34	22,20 ± 2,28	3,29(0,88~5,70)	0,008
ALT (U/l)	22 ± 0	23 ± 1	20 ± 1	-0,37(-1,48~0,74)	0,511
AST (U/l)	19 ± 0	20 ± 1	21 ± 2	0,83(-0,65~2,31)	0,272
GGT (U/l)	10 ± 0	10 ± 0	11 ± 1	0,66(-0,15~1,46)	0,111

El coeficiente β representa el cambio en el valor absoluto de los rasgos de cada riesgo alélico adicional. El modelo lineal general se usó para analizar la asociación ajustado por sexo y edad asumiendo un efecto aditivo. IMC: índice de masa corporal; TA: tensión arterial; HOMA-IR: *homeostasis model assessment for insulin resistance*. ALT: alanina transamina; AST: aspartato transaminasa; GGT: gamma glutamil transpeptidasa

Tabla 3.26 Asociación del polimorfismo rs16131 del gen *NPY* con biomarcadores de riesgo de inflamación y de enfermedad cardiovascular.

	AA	AG	GG	β (95%IC)	P
n	399	114	18		
Proteína C reactiva (mg/l)	2,30 \pm 0,33	2,01 \pm 0,24	3,49 \pm 0,47	-0,02(-0,67~0,71)	0,675
Interleuquina 6 (ng/l)	5,85 \pm 0,55	6,67 \pm 1,15	2,52 \pm 0,45	-0,30(-2,17~1,57)	0,750
Interleuquina 8 (ng/l)	1,85 \pm 0,11	2,04 \pm 0,22	1,81 \pm 0,23	0,07(-0,31~0,44)	0,730
Factor de necrosis tumoral alfa (ng/l)	3,47 \pm 0,10	3,79 \pm 0,18	4,16 \pm 0,57	0,26(0,08~0,59)	0,139
Proteína quimiotáctica de los monocitos 1 (ng/l)	106,99 \pm 2,91	118,27 \pm 5,54	131,27 \pm 11,89	10(0,49~19,52)	0,040
Metaloproteinasa-9 de la matriz (μg/l)	82,87 \pm 2,94	88,45 \pm 5,50	84,72 \pm 16,46	-0,002(-0,05~0,04)	0,927
Mieloperoxidasa (μg/l)	17,42 \pm 1,21	19,28 \pm 2,74	12,74 \pm 2,46	-0,28(-4,44~3,88)	0,895
Selectina endotelial soluble (μg/l)	27,58 \pm 0,81	26,35 \pm 1,35	26,32 \pm 4,01	-1,30(-3,98~1,39)	0,345
Molécula de adhesión intercelular 1 soluble (mg/l)	0,163 \pm 0,004	0,168 \pm 0,006	0,171 \pm 0,014	0,002(-0,01~0,01)	0,681
Molécula de adhesión vascular 1 soluble (mg/l)	1,11 \pm 0,02	1,08 \pm 0,03	1,00 \pm 0,09	-0,05(-0,11~0,01)	0,084
Inhibidor del activador del plasminógeno 1 activo (μg/l)	8,60 \pm 0,43	9,33 \pm 0,79	11,70 \pm 1,63	1,01(-0,38~2,41)	0,155
Inhibidor del activador del plasminógeno 1 total (μg/l)	23,11 \pm 0,81	23,07 \pm 1,72	32,15 \pm 5,86	0,02(-0,04~0,07)	0,549

El coeficiente β representa el cambio en el valor absoluto de los rasgos de cada riesgo alélico adicional. El modelo lineal general se usó para analizar la asociación ajustado por sexo y edad asumiendo un efecto aditivo.

HSD11B1

La tabla 3.27 muestra las características de los 10 polimorfismos analizados del gen *HSD11B1*. En este gen se han descrito dos transcritos alternativos P1 (NM_181755.1) y P2 (NM_005525.2) cuya expresión es contralada por dos promotores distintos, el P1 y el P2. (Figura 3.4). De los 10 SNPs analizados seis se encuentran en la región promotora y los cuatro restantes en el intrón 3 según el transcrito P2 (Tabla 3.27).

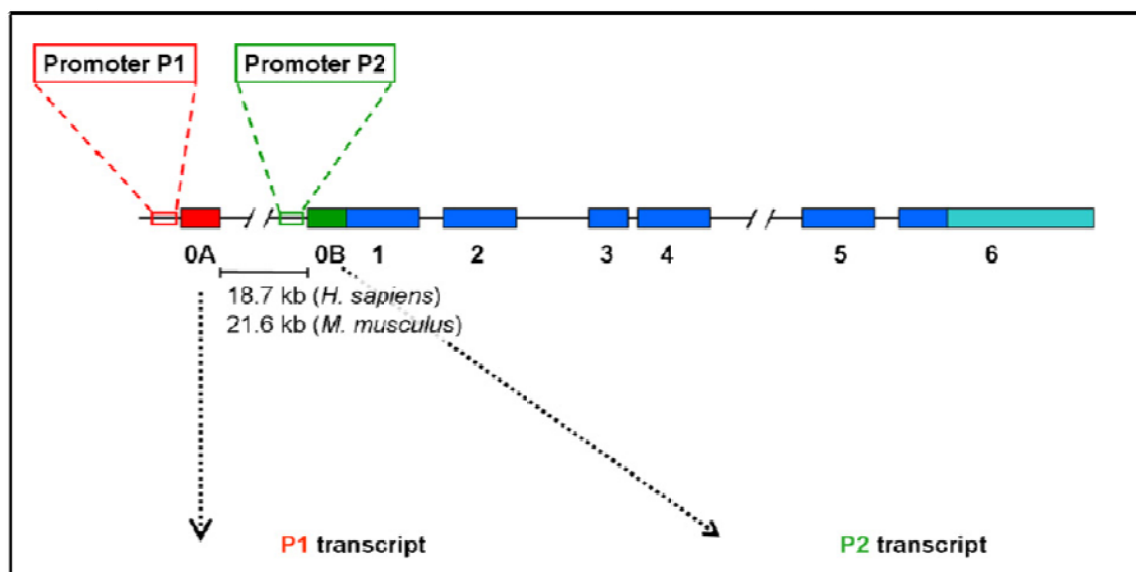


Figura 3.4. Estructura de los exones del gen *HSD11B1* de acuerdo a sus dos promotores. Tomado de Staab *et al.* 2011

El porcentaje de éxito del genotipado (*call rate*) fue superior al 90 por ciento, excepto en el caso del polimorfismo rs846906 que fue menor del 90 por ciento, específicamente 75 por ciento, por lo cual fue eliminado de los análisis sucesivos. Todos los SNPs se encontraban en equilibrio de HW.

Al asociar los polimorfismos restantes con la obesidad, obtuvimos que cinco de los nueve se asociaron significativamente con ésta después de ser ajustados por sexo y edad bajo un modelo aditivo; sin embargo, el polimorfismo rs3753519 mostró el mayor valor de OR y fue el único que se mantuvo estadísticamente significativo después de aplicar la corrección de Bonferroni (Tabla 3.28).

Tabla 3.27 Descripción de los polimorfismos genotipados y analizados del gen *HSD11B1*.

Polimorfismo	Posición^a	FAM	Alelos (M/m)	EHW P	Call rate (%)
rs2235543	<i>5'upstream</i>	0,124	C/T	0,4837	100
rs12565406	<i>5'upstream</i>	0,062	G/T	1	99,8
rs10082248	<i>5'upstream</i>	0,059	G/A	1	99,8
rs4844880	<i>5'upstream</i>	0,140	T/A	1	100
rs846910	<i>5'upstream</i>	0,043	G/A	1	99,6
rs3753519	<i>5'upstream</i>	0,084	G/A	1	99,8
rs4844488	Intrón 3	0,032	A/G	1	99,8
rs846906	Intrón 3	0,137	C/T	0,1996	75,0
rs6672256	Intrón 3	0,194	T/A	0,8143	99,6
rs9430012	Intrón 3	0,196	G/C	0,4776	98,5

Call-rate: tasa de éxito del genotipado; EHW P: equilibrio de Hardy-Weinberg (p para el grupo control); FAM: frecuencia alélica menor. ^a Posición del polimorfismo según el transcrito P2 del gen (NM_005525.2).

Tabla 3.28 Distribución genotípica para los polimorfismos analizados del gen *HSD11B1* y su asociación con la obesidad.

Polimorfismo	Alelo 1/alelo 2	Caso			Control			Alelo de riesgo	Alelo de Riesgo		OR (95%IC)	P	P cor*
		11	12	22	11	12	22		Caso	Control			
rs2235543	C/T	217	64	10	194	46	1	T	0,144	0,099	1,51(1,03-2,18)	0,031	0,313
rs12565406	G/T	253	35	2	214	27	0	T	0,067	0,056	1,21(0,73-2,01)	0,465	1
rs10082248	G/A	251	36	3	220	21	0	A	0,072	0,044	1,72(1,01-2,95)	0,046	0,464
rs4844880	T/A	211	68	12	187	51	3	A	0,158	0,118	1,36(0,96-1,93)	0,080	0,803
rs846910	G/A	262	27	1	223	17	0	A	0,050	0,035	1,44(0,78-2,65)	0,249	1
rs3753519	G/A	233	52	5	214	27	0	A	0,107	0,056	1,97(1,23-3,16)	0,004	0,046
rs4844488	A/G	269	21	0	228	13	0	G	0,036	0,027	1,33(0,65-2,73)	0,432	1
rs6672256	T/A	172	109	9	168	65	7	A	0,219	0,165	1,48(1,07-2,04)	0,017	0,176
rs9430012	G/C	170	109	9	166	62	8	C	0,221	0,165	1,48(1,07-2,04)	0,018	0,181

IC: intervalo de confianza; OR: *odds ratio*. El OR para cada polimorfismo se ajustó por sexo y edad bajo un modelo aditivo. *P después de la corrección por Bonferroni.

El análisis de asociación del SNP rs3753519 con diferentes rasgos relacionados con la obesidad y el SM mostró una asociación significativa con el IMC, IMC *z score*, peso y CC elevados y con bajas concentraciones de adiponectina y cortisol después de ajustarse por sexo y edad. Los niños que tenían el alelo de riesgo (A), tuvieron un incremento del IMC, peso y CC de 2,4 kg/m² (95% IC: 1,21~3,64), 5 kg (95% IC: 1,93~8,15) y 5,1 cm (95% IC: 0,36~9,92) por alelo, respectivamente. Por el contrario, concentraciones plasmáticas menores de adiponectina en 2,62 mg/l (95% IC: -5,15~ -0,09) y de cortisol en 42,8 nmol/l (95% IC: -77,24~ -8,2) fueron halladas por alelo de riesgo (Tabla 3.29). La enzima hepática GGT, marcador de EHGNA, estaba significativamente elevada en los niños que poseían el alelo A 1,03 U/l (95% IC: 0,03~2,02); por el contrario, tanto la ALT como la AST no mostraron ninguna diferencia.

La tabla 3.30 muestra el efecto de llevar el alelo de riesgo del polimorfismo sobre biomarcadores plasmáticos de inflamación y de ECV. Ninguno de los biomarcadores de inflamación (IL-6, IL-8, TNF- α , MCP-1 y PCR) mostró asociación con el alelo de riesgo después de ser ajustados por peso y edad. Entre los marcadores de riesgo de ECV (sICAM-1, sE-selectina, MPO, MMP-9, PAI-1 activo y total) únicamente la concentración plasmática de PAI-1 activo se asoció al alelo de riesgo en la población estudiada de forma significativa, 2,44 μ g/l (95% IC: 0,65~4,22).

Tabla 3.29 Asociación del polimorfismo rs3753519 del gen *HSD11B1* con fenotipos relacionados con la obesidad.

	GG	GA	AA	β (95%IC)	P
n	449	79	5		
Talla (m)	1,39 \pm 0,01	1,39 \pm 0,02	1,40 \pm 0,08	-0,01(-0,02~0,00)	0,118
Peso (kg)	44,79 \pm 0,87	48,14 \pm 2,15	59,24 \pm 7,69	5,00(1,93~8,15)	<0,001
IMC	22,49 \pm 0,28	24,27 \pm 0,73	30,67 \pm 2,02	2,39 (1,21~3,65)	<0,001
IMC z score	1,71 \pm 0,10	2,30 \pm 0,24	4,69 \pm 0,87	0,77 (0,32~1,22)	<0,001
Circunferencia de cintura (cm)	72,4 \pm 0,8	75,9 \pm 2,0	92,4 \pm 5,1	5,14 (0,37~9,92)	0,035
TA sistólica (mm Hg)	105 \pm 1	104 \pm 2	117 \pm 7	0,95 (-2,21~4,12)	0,555
TA diastólica (mm Hg)	64 \pm 1	65 \pm 2	71 \pm 7	1,35 (-1,24~3,94)	0,306
Glucosa (mg/dl)	85 \pm 0	84 \pm 1	76 \pm 5	-1,45 (-2,94~0,03)	0,056
Insulina (mU/l)	8,81 \pm 0,35	9,55 \pm 0,80	12,56 \pm 4,63	0,05 (-0,00~0,11)	0,068
HOMA-IR	1,88 \pm 0,08	1,99 \pm 0,17	2,47 \pm 0,97	0,04 (-0,01~0,10)	0,141
Triacilgliceroles (mg/dl)	66 \pm 2	64 \pm 3	102 \pm 26	2,17 (-4,66~9,00)	0,534
Apo-AI (mg/dl)	141 \pm 1	137 \pm 3	127 \pm 11	-4,30 (-10,13~1,53)	0,149
Apo-B (mg/dl)	69 \pm 1	67 \pm 2	77 \pm 7	-1,51 (-5,10~2,79)	0,567
Colesterol (mg/dl)	169 \pm 1	162 \pm 3	159 \pm 7	-0,02 (-0,03~-0,00)	0,045
HDL-c (mg/dl)	57 \pm 1	57 \pm 2	44 \pm 3	-1,35 (-4,51~1,82)	0,405
LDL-c (mg/dl)	96 \pm 1	91 \pm 3	94 \pm 6	-4,14 (-9,49~1,22)	0,131
Testosterona (μg/l)	0,43 \pm 0,05	0,41 \pm 0,10	0,36 \pm 0,08	0,06 (-0,14~0,25)	0,585
Adiponectina (mg/l)	25,57 \pm 0,56	23,43 \pm 1,30	17,68 \pm 2,36	-2,63 (-5,16~-0,10)	0,042
Resistina (μg/l)	10,78 \pm 0,27	10,77 \pm 0,65	10,57 \pm 3,06	-0,02 (-1,23~1,19)	0,973
Leptina (μg/l)	14,19 \pm 0,70	15,71 \pm 1,55	22,15 \pm 2,41	2,12 (-0,98~5,22)	0,181
Cortisol (nmol/l)	326,5 \pm 7,6	292,3 \pm 14,7	279,9 \pm 64,2	-42,88 (-77,24~-8,52)	0,015
ALT (U/l)	22 \pm 0	22 \pm 1	20 \pm 3	-6,68 (-2,57~1,22)	0,485
AST (U/l)	19 \pm 0	19 \pm 1	15 \pm 2	-0,83 (-2,25~0,59)	0,254
GGT (U/l)	10 \pm 0	11 \pm 0	12 \pm 3	1,03 (0,03~2,03)	0,045

El coeficiente β representa el cambio en el valor absoluto de los rasgos de cada riesgo alélico adicional. El modelo lineal general se usó para analizar la asociación ajustado por sexo y edad asumiendo un efecto aditivo. IMC: índice de masa corporal; TA: tensión arterial; HOMA-IR: *homeostasis model assessment for insulin resistance*. ALT: alanina transaminasa; AST: aspartato transaminasa; GGT: gamma glutamil transpeptidasa.

Tabla 3.30 Asociación del polimorfismo rs3753519 del gen *HSD11B1* con biomarcadores de riesgo de inflamación y de enfermedad cardiovascular.

	GG	GA	AA	β (95%IC)	P
n	449	79	5		
Proteína C reactiva (mg/l)	2,11 ± 0,19	3,22 ± 0,58	3,93 ± 0,61	0,79 (-0,71~2,29)	0,302
Interleuquina 6 (ng/l)	5,88 ± 0,51	6,24 ± 1,48	2,05 ± 0,63	-0,21 (-2,55~2,13)	0,859
Interleuquina 8 (ng/l)	1,89 ± 0,11	1,98 ± 0,21	1,20 ± 0,54	-0,02 (-0,49~0,45)	0,933
Factor de necrosis tumoral alfa (μg/l)	3,51 ± 0,10	3,92 ± 0,27	3,61 ± 0,67	0,32 (-0,12~0,75)	0,156
Proteína quimiotáctica de los monocitos 1 (μg/l)	109,64 ± 2,70	116,44 ± 7,69	111,60 ± 15,01	5,20 (-7,25~17,64)	0,413
Metaloproteinasa-9 de la matriz (μg/l)	83,79 ± 2,72	86,81 ± 7,73	92,26 ± 19,45	-0,00 (-0,06~0,06)	0,991
Mieloperoxidasa (μg/l)	17,19 ± 1,19	20,57 ± 2,63	17,25 ± 7,07	2,48 (-2,85~7,81)	0,363
Selectina endotelial soluble (μg/l)	27,18 ± 0,73	27,73 ± 1,98	30,40 ± 13,83	0,56 (-2,85~3,98)	0,746
Molécula de adhesión intercelular 1 soluble (mg/l)	0,165 ± 0,003	0,160 ± 0,007	0,178 ± 0,024	-0,00 (-0,02~0,01)	0,679
Molécula de adhesión vascular 1 soluble (mg/l)	1,11 ± 0,02	1,07 ± 0,04	0,96 ± 0,20	-0,05 (-0,13~0,024)	0,182
Inhibidor del activador del plasminógeno 1 activo (μg/l)	8,56 ± 0,38	9,83 ± 1,03	21,89 ± 8,48	2,44 (0,65~4,22)	0,008
Inhibidor del activador del plasminógeno 1 total (μg/l)	23,16 ± 0,80	24,52 ± 1,90	31,40 ± 6,33	0,04 (-0,03~0,11)	0,254

El coeficiente β representa el cambio en el valor absoluto de los rasgos de cada riesgo alélico adicional. El modelo lineal general se usó para analizar la asociación ajustado por sexo y edad asumiendo un efecto aditivo.

MAP3K4

La tabla 3.31 muestra las características de los polimorfismos analizados del gen *MAP3K4*. Se observa que los polimorfismos rs625977 y rs70828 no se encontraban en equilibrio de HW en el grupo control, el polimorfismo rs12174748 obtuvo una tasa de éxito de genotipado de 71,9 por ciento (menor del 90 por ciento) y además, el polimorfismo rs12528950 también seleccionado inicialmente, pero que no aparece en la tabla, falló en el genotipado, por lo que no obtuvimos sus datos. Estos cuatro polimorfismos se excluyeron de los análisis sucesivos. Al asociar el resto de los polimorfismos con la obesidad (Tabla 3.32), obtuvimos que tres de los dieciocho se asociaron significativamente con ésta después de ser ajustados por sexo y edad bajo un modelo aditivo; sin embargo, sólo el rs1534020 permaneció estadísticamente significativo después de hacer la corrección por Bonferroni.

Tabla 3.21 Descripción de los polimorfismos genotipados y analizados del gen *MAP3K4*

Polimorfismo	Posición	FAM	Alelos(M/m)	EHW P	Call rate (%)
rs678290	Promotor	0,466	G/A	0,693	99,6
rs625977	Intrón	0,192	C/T	0,001	99,3
rs705828	Intrón	0,181	A/T	0,026	100
rs594602	Intrón	0,124	T/C	0,797	99,6
rs11757882	Intrón	0,064	G/A	0,351	99,9
rs9355867	Intrón	0,124	C/G	0,483	100
rs3798906	Intrón	0,042	G/A	0,526	99,4
rs3729613	Intrón	0,484	T/A	0,829	99,6
rs6919510	Intrón	0,194	C/T	0,486	100
rs4559074	Exón	0,024	A/G	0,798	100
rs35730939	Exón	0,000	G/G	0,900	99,4
rs9365246	Intrón	0,142	A/G	0,914	100
rs12174748	Intrón	0,070	C/A	0,603	71,9
rs9458113	Intrón	0,004	T/C	0,899	100
rs9458114	Intrón	0,082	G/C	0,404	99,8
rs9365248	Intrón	0,093	C/T	0,266	99,6
rs9347479	Intrón (<i>boundary</i>)	0,261	T/C	0,249	99,6
rs1534020	Intrón	0,154	T/G	0,376	99,8
rs6940321	Intrón	0,107	A/G	0,550	99,6
rs12195182	Intrón	0,468	C/G	0,888	99,6
rs1488	3' <i>upstream</i>	0,319	A/G	0,606	99,6

Call-rate: tasa de éxito del genotipado; EHW P: Equilibrio de Hardy-Weinberg (p para el grupo control); FAM: frecuencia alélica menor.

Tabla 3.32 Distribución genotípica para los polimorfismos analizados del gen *MAP3K4* y su asociación con la obesidad.

Polimorfismo	Alelo 1/alelo 2	Caso			Control			Alelo de Riesgo	Alelo de Riesgo		OR (95%IC)	P	P corr*
		11	12	22	11	12	22		Caso	Control			
rs678290	G/A	82	147	62	67	123	51	A	0,623	0,626	1,03(0,76-1,41)	0,842	1
rs594602	T/C	220	65	5	188	51	3	C	0,131	0,119	1,21(0,77-1,90)	0,412	1
rs11757882	G/A	250	41	0	211	27	0	A	0,070	0,057	1,54(0,82-2,91)	0,356	1
rs9355867	C/G	219	63	10	194	47	1	G	0,141	0,102	1,58(1,00-2,48)	0,045	1
rs3798906	G/A	265	26	0	221	19	0	A	0,044	0,038	1,11(0,51-2,44)	0,791	1
rs3729613	T/A	67	120	53	77	141	74	A	0,495	0,468	1,11(0,82-1,51)	0,485	1
rs6919510	C/T	177	102	13	171	63	8	T	0,219	0,165	1,62(1,10-2,38)	0,123	0,492
rs4559074	A/G	273	19	0	235	7	0	G	0,033	0,015	3,14(1,11-8,9)	0,024	1
rs35730939	G/G	291	0	0	240	0	0	A					
rs9365246	A/G	215	71	6	177	61	4	G	0,142	0,144	1,03(0,67-1,58)	0,882	1
rs9458113	T/C	292	0	0	238	4	0	C		0,008			
rs9458114	G/C	251	36	4	199	43	0	C	0,075	0,089	0,80(0,47-1,37)	0,419	1
rs9365248	C/T	229	54	7	211	31	0	T	0,117	0,064	2,27(1,32-3,92)	0,002	0,081
rs9347479	T/C	146	125	21	139	91	10	C	0,289	0,232	1,26(0,89-1,78)	0,191	0,806
rs1534020	T/G	191	93	7	187	53	2	G	0,185	0,119	2,17(1,40-3,36)	0,0003	0,034
rs6940321	A/G	227	61	3	197	41	3	G	0,114	0,199	1,41(0,86-2,33)	0,171	1
rs12195182	C/G	78	153	61	69	119	52	G	0,477	0,462	1,09(0,81-1,47)	0,559	1
rs1488	A/G	129	132	30	118	102	21	G	0,332	0,299	1,28(0,92-1,78)	0,141	1

IC: intervalo de confianza; OR: *odds ratio*. El OR para cada polimorfismo se ajustó por sexo y edad bajo un modelo aditivo. *P después de la corrección por Bonferroni.

Los fenotipos relacionados con la obesidad y el SM del polimorfismo rs1534020 del gen *MAP3K4* se muestran en la tabla 3.33. Podemos observar que poseer el alelo de riesgo (G) se asocia con un mayor peso corporal 3,62 kg (95% IC: 1,10~6,13), mayor IMC 1,53 kg/m² (95% IC: 0,50~2,55) y mayor IMC *z score* 0,50 (95% IC: 0,14~0,86), asimismo con elevada tensión arterial sistólica y diastólica [3,01 mm Hg (95% IC: 0,46~5,56); 3,23 mm Hg (95% IC: 1,61~5,29)] y con altas concentraciones de leptina 3,52 µg/l (95% IC: 1,01~6,03). Por el contrario, se asoció a concentraciones bajas de apo A1 5,79 mg/dl (95% IC: (-10,38~-1,01)). Todos estos resultados se ajustaron por sexo y edad y se analizaron bajo un modelo aditivo. La enzima hepática GGT, marcador de EHGNA, estaba significativamente elevada en los niños que poseían el alelo A 1,08 U/l (95% IC: 0,25~1,92); por el contrario, tanto la ALT como la AST no mostraron ninguna asociación con el alelo de riesgo.

Ningún biomarcador de inflamación (IL-6, IL-8, TNF- α , MCP-1 y PCR) ni de riesgo de ECV (sICAM-1, sE-selectina, MPO, MMP-9, PAI-1 activo y total) mostró asociación con el alelo de riesgo (Tabla 3.34).

Tabla 3.33 Asociación del polimorfismo rs1534020 del gen *MAP3K4* con fenotipos relacionados con la obesidad.

	TT	TG	GG	β (95%IC)	P
n	378	146	9		
Talla (m)	1,38 \pm 0,01	1,41 \pm 0,01	1,42 \pm 0,04	-0,004(-0,01~0,001)	0,145
Peso (kg)	43,9 \pm 0,9	48,9 \pm 1,6	53,6 \pm 7,1	3,62(1,10~6,13)	0,005
IMC	22,30 \pm 0,31	24,04 \pm 0,52	25,56 \pm 2,09	1,53(0,50~2,55)	0,004
IMC z score	1,69 \pm 0,11	2,17 \pm 0,17	2,40 \pm 0,49	0,50(0,14~0,86)	0,007
Circunferencia de cintura (cm)	72,27 \pm 0,87	74,86 \pm 1,43	78,22 \pm 4,91	3,03(-0,85~6,92)	0,127
TA sistólica (mm Hg)	104 \pm 1	107 \pm 1	115 \pm 4	3,01(0,46~5,56)	0,021
TA diastólica (mm Hg)	63 \pm 1	66 \pm 1	76 \pm 5	3,23(1,61~5,29)	0,002
Glucosa (mg/dl)	84 \pm 0	84 \pm 1	87 \pm 3	-0,05(-1,26~1,16)	0,940
Insulina (mU/l)	8,78 \pm 0,39	9,42 \pm 0,57	8,21 \pm 1,81	0,01(-0,03~0,06)	0,540
HOMA-IR	1,86 \pm 0,09	2,00 \pm 0,13	1,82 \pm 0,44	0,01(-0,03~0,06)	0,568
Triacilglicerolos (mg/dl)	65 \pm 2	67 \pm 3	68 \pm 6	1,68(-3,86~7,22)	0,552
Apo-AI (mg/dl)	142 \pm 1	136 \pm 2	133 \pm 9	-5,79(-10,38~-1,01)	0,018
Apo-B (mg/dl)	69 \pm 1	68 \pm 1	74 \pm 4	0,55(-2,63~3,74)	0,733
Colesterol (mg/dl)	168 \pm 2	166 \pm 2	172 \pm 10	-0,003(-0,02~0,01)	0,686
HDL-c (mg/dl)	57 \pm 1	56 \pm 1	52 \pm 4	-1,28(-3,84~1,28)	0,326
LDL-c (mg/dl)	95 \pm 1	95 \pm 2	105 \pm 7	0,70(-3,66~5,06)	0,753
Adiponectina (mg/l)	25,22 \pm 0,58	25,16 \pm 1,07	19,83 \pm 5,12	-0,57(-2,60~1,47)	0,584
Resistina (μg/l)	10,86 \pm 0,30	10,70 \pm 0,43	8,45 \pm 1,63	-0,53(-1,51~0,46)	0,294
Leptina (μg/l)	13,34 \pm 0,72	17,11 \pm 1,29	20,26 \pm 6,09	3,52(1,01~6,03)	0,006
ALT (U/l)	23 \pm 0	22 \pm 1	19 \pm 2	-0,44(-1,59~0,72)	0,459
AST (U/l)	19 \pm 0	20 \pm 1	19 \pm 2	0,79(-2,60~1,47)	0,584
GGT (U/l)	10 \pm 0	11 \pm 0	11 \pm 1	1,08(0,25~1,92)	0,012

El coeficiente β representa el cambio en el valor absoluto de los rasgos de cada riesgo alélico adicional. El modelo lineal general se usó para analizar la asociación ajustado por sexo y edad asumiendo un efecto aditivo. IMC: índice de masa corporal; TA: tensión arterial; HOMA-IR: *homeostasis model assessment for insulin resistance*. ALT: alanina transamina; AST: aspartato transaminasa; GGT: gamma glutamil transpeptidasa

Tabla 3.34 Asociación del polimorfismo rs1534020 del gen *MAP3K4* con biomarcadores de riesgo de inflamación y de enfermedad cardiovascular.

	TT	TG	GG	β (95%IC)	P
n	378	146	9		
Proteína C reactiva (mg/l)	2,19 ± 0,23	2,51 ± 0,24	3,44 ± 1,56	0,46(-0,27~1,19)	0,219
Interleuquina 6 (ng/l)	5,69 ± 0,55	6,56 ± 1,04	3,86 ± 1,31	0,49(-1,44~2,42)	0,619
Interleuquina 8 (ng/l)	1,87 ± 0,11	2,04 ± 0,21	1,07 ± 0,15	0,07(-0,32~0,46)	0,722
Factor de necrosis tumoral alfa (ng/l)	3,61 ± 0,11	3,48 ± 0,16	3,51 ± 0,59	-0,06(-0,42~0,29)	0,726
Proteína quimiotáctica de los monocitos 1 (ng/l)	112,72 ± 3,08	106,51 ± 4,61	92,07 ± 16,56	-6,44(-16,35~3,47)	0,203
Metaloproteinasa-9 de la matriz (μg/l)	82,01 ± 2,80	91,54 ± 5,87	83,27 ± 17,50	0,03(-0,02~0,07)	0,073
Mieloperoxidasa (μg/l)	17,64 ± 1,37	18,21 ± 1,73	13,20 ± 3,13	0,03(-4,31~4,37)	0,990
Selectina endotelial soluble (μg/l)	26,61 ± 0,81	28,63 ± 1,32	30,93 ± 5,54	2,34(-0,31~4,99)	0,085
Molécula de adhesión intercelular 1 soluble (mg/l)	0,165 ± 0,004	0,163 ± 0,006	0,187 ± 0,033	0,002(-0,01~0,01)	0,779
Molécula de adhesión vascular 1 soluble (mg/l)	1,11 ± 0,02	1,08 ± 0,03	0,92 ± 0,05	-0,04(-0,10~0,02)	0,207
Inhibidor del activador del plasminógeno 1 activo (μg/l)	8,62 ± 0,41	9,57 ± 0,78	7,50 ± 2,54	0,57(-0,88~2,02)	0,439
Inhibidor del activador del plasminógeno 1 total (μg/l)	23,16 ± 0,86	23,92 ± 1,48	25,64 ± 4,53	0,03(-0,03~0,08)	0,342

El coeficiente β representa el cambio en el valor absoluto de los rasgos de cada riesgo alélico adicional. El modelo lineal general se usó para analizar la asociación ajustado por sexo y edad asumiendo un efecto aditivo.

Discusión

DISCUSIÓN

Los hallazgos fundamentales del presente trabajo han sido que los niños obesos, tanto en edad prepuberal como puberal, en una proporción elevada, presentan SM. Por otra parte, existen variantes en las secuencias de los genes *FTO*, *NPY*, *HSD11B1* y *MAP3K4* que se asocian a la obesidad infantil y a características propias del SM. A continuación se discuten de forma individualizada los anteriores hallazgos.

Síndrome metabólico

Existe un debate controvertido en relación a los componentes del SM en niños, especialmente antes de la pubertad, que se ha reavivado de nuevo después de que en 2007 la IDF publicara una nueva definición con directrices para la clasificación de los niños (Zimmet *et al.* 2007). No se pueden usar puntos de corte individuales para definir la composición corporal o las anormalidades metabólicas en los niños porque éstos cambian con la edad, el sexo y el estadio puberal. Además, es importante destacar que no se ha tomado en cuenta el impacto de la pubertad en la composición corporal y los rasgos metabólicos ya que las definiciones de SM hasta la fecha consideran la edad, antes que el estadio puberal de los niños, para diagnosticarlos.

Los criterios publicados para la clasificación de SM difieren en los parámetros elegidos para evaluar el exceso de adiposidad. Algunos autores usan el IMC (Weiss *et al.* 2004; Viner *et al.* 2005), mientras otros usan la CC (Cook *et al.* 2003; De Ferranti *et al.* 2004; Cruz *et al.* 2004) por su fuerte correlación con masa grasa. La definición propuesta por la IDF es la única que considera la CC como condición *sine qua non* para el diagnóstico del SM.

En nuestra revisión de los diferentes criterios de SM en la infancia y adolescencia nos hemos encontrado con algunos inconvenientes. En la definición de Cook *et al.* (2003) no se indicaban las referencias estándar utilizadas para la CC; sin embargo, los autores nos las suministraron amablemente (Li *et al.* 2006). Todas las definiciones, a excepción de la de la IDF, utilizan las tablas del *National High Blood Pressure Education Program* para identificar los casos de presión arterial elevada (NHBPEP 1996). Sin embargo, algunas utilizan el percentil 90, mientras que otras usan el percentil 95. A pesar del amplio conocimiento en cuanto a las diferencias de presión arterial de acuerdo con la edad y el sexo, la cual se ve afectada también por la talla, la propuesta de la IDF usa criterios de la población adulta para este parámetro (Zimmet *et al.* 2007).

Para la clasificación de los componentes del metabolismo lipídico que forman parte del SM, no hay un estándar único establecido para las concentraciones plasmáticas de TAG y HDL-c. Sólo las definiciones de Weiss *et al.* (2004) y Cruz *et al.* (2004) toman en cuenta el sexo y la edad en las referencias empleadas. En adolescentes, Cook *et al.* (2003), de Ferranti *et al.* (2004) y Ford *et al.* (2006) utilizan valores absolutos que corresponden al punto medio entre los datos para mujeres y hombres respecto a la edad, en el caso de los TAG el percentil 90 y en el de las HDL-c percentil 10 del *National Cholesterol Education Program* (NCEP 1991). La definición de la IDF utiliza valores absolutos tomados del *Adult Treatment Panel III* (ATP III) (NHANES III 1994), sugiriendo que estos valores se deben utilizar hasta que estén disponibles futuras referencias.

Como se comentó anteriormente, utilizando la definición de de Ferranti *et al.* (2004) se obtuvo la mayor prevalencia de SM; esto es debido a que el punto de corte elegido para la CC es el percentil 75. También se observó una alta prevalencia cuando se usaron las definiciones de Cook *et al.* y Ford *et al.* La frecuencia más baja se obtuvo al utilizar la definición de Weiss *et al.* (2004) y la de la IDF. La definición de Weiss *et al.* (2004) usa los criterios más laxos y la definición de la IDF considera valores absolutos para adultos en la mayoría de sus criterios.

A pesar de que la mayoría de las definiciones utilizan criterios específicos respecto del sexo para definir el síndrome, únicamente encontramos diferencias significativas en cuanto al sexo al utilizar la definición de de Ferranti *et al.* (2004), donde se muestra una mayor prevalencia en el sexo femenino que en el masculino. Vale la pena destacar que independientemente de la definición utilizada, el SM fue diagnosticado tanto en prepúberes como en púberes, encontrándose en general una frecuencia un poco más elevada en los sujetos púberes (excepto en la definición de Cook *et al.* 2003) Este hallazgo coincide con los descritos Chi *et al.* (2006) y Reihner *et al.* (2007).

Por otro lado, en nuestro análisis de componentes principales, identificamos tres factores principales (metabolismo glucídico, dislipidemia y obesidad/presión arterial) que explican una gran proporción (72 por ciento) de la varianza del SM al utilizar tanto el IMC como la CC. Weiss *et al.* (2004) también identificaron tres componentes principales: obesidad/metabolismo glucídico, dislipidemia y presión arterial, aunque distribuidos de manera diferente. Las diferencias entre ambos estudios se puede deber a que ellos incluyeron niños con sobrepeso; en efecto, la varianza acumulada que describen Weiss *et al.* (2004) fue

solamente del 50 por ciento. Goodman *et al.* (2005) identificaron un grupo de 4 factores de riesgo cardiovascular en adolescentes. Ellos utilizaron prácticamente los mismos factores que nosotros, pero incluyeron también fibrinógeno y colesterol total (adiposidad: IMC, CC y fibrinógeno; colesterol: LDL-c y colesterol total; metabolismo-glucídico: glucosa, insulina, HDL-c y TAG; presión arterial (sistólica y diastólica). Estos factores están agrupados de diferente manera y explican el 69 por ciento de la varianza para riesgo de enfermedades cardiovasculares.

Tomando en cuenta lo expuesto anteriormente y de acuerdo con nuestros resultados, se puede afirmar que independientemente de la clasificación utilizada para el diagnóstico de SM, no sólo los niños en edad puberal, sino también los prepuberales presentan el síndrome. No obstante, parece conveniente que la comunidad científica se ponga de acuerdo tanto en las tablas a utilizar como en los puntos de corte para que exista una homogeneidad de criterios a la hora del diagnóstico.

Considerando la relevancia clínica del diagnóstico temprano del SM, se podría argumentar que todos los niños y adolescentes obesos deberían beneficiarse de modificaciones en el estilo de vida, este tratamiento fácil de implementar y sobre todo económico, es la única manera para tratar a los niños pre-puberales; además, se puede usar la presencia del SM como argumento para motivar a que toda la familia tome conciencia y mejore los hábitos de vida para evitar sufrir o retardar la aparición de enfermedades crónicas en la edad adulta.

FTO

Como era de esperar, nosotros hemos podido validar la asociación del SNP rs9939609 del gen *FTO* con la obesidad (peso, IMC, IMC *z score* y CC) en una población infantil. Más aún, hemos podido identificar otras variantes (rs9928094, rs9930333 y rs9935401), las cuales también se asocian positivamente a la obesidad, en todos los casos con peso, IMC e IMC *z score* y en algunos también con la CC. Por el contrario, hemos localizado el SNP rs8061518, el cual se asocia negativamente a la obesidad y a la concentración plasmática de leptina, así como a algunas características del SM, como la presión arterial diastólica, insulina y HOMA-IR.

Los resultados aquí obtenidos son consistentes con los hallazgos anteriores que muestran la asociación del gen *FTO* con la obesidad tanto en adultos (Frayling *et al.* 2007)

como en adolescentes y niños de diferentes etnias (Rutters *et al.* 2011; Mei *et al.* 2010; Zhao *et al.* 2009; Ruiz *et al.* 2010; Pausova *et al.* 2009). La variante más estudiada de este gen es la rs9939609 que se ha asociado a IMC, peso corporal y CC; sin embargo, pocos autores han encontrado asociación con rasgos típicos de la obesidad y el SM como HDL-c, TAG, presión arterial o insulina en niños o adolescentes. Nuestros resultados están en concordancia con los observados por Müller *et al.* (2008) en niños y adolescentes alemanes, quienes no encontraron asociación alguna con estos rasgos; no obstante, en adolescentes canadienses Pausova *et al.* (2009) describieron una asociación con presión arterial sistólica elevada. En adultos se han publicado algunos estudios de asociación del rs9939609 con rasgos metabólicos tales como insulina, glucosa, TAG y HDL-c (Freathy *et al.* 2008) y con medidas antropométricas, como pliegue tricípital o subescapular en ésta y otras variantes (Zhang *et al.* 2010).

Los SNPs rs9935401 y rs10852521 que se asociaron a obesidad en nuestra población coinciden con los resultados observados por Zhang *et al.* (2010), aunque ellos la describieron en población adulta.

Otros de los SNPs estudiados por nosotros, rs9928094 y rs9930333, se asociaron negativamente con la apo AI, sugiriendo alguna posible asociación con el metabolismo de las lipoproteínas. Las cuatro variantes asociadas positivamente a la obesidad (rs9939609, rs9928094, rs9930333 y rs9935401), también se asociaron o mostraron una tendencia a asociarse positivamente con la MMP-9. Esto podría indicar una posible relación del gen *FTO* con la ECV. Sin embargo, se conoce muy poco sobre la función de la proteína que codifica este gen, por lo cual esas relaciones necesitan, por una parte confirmación de las asociaciones en otras poblaciones independientes y un estudio detallado de las funciones biológicas del gen.

Llama la atención la asociación negativa del rs8061518 con la obesidad y con algunos rasgos presentes en el SM, así como con concentraciones bajas de PAI-1 activo. La evidencia de los estudios en animales muestra que la ausencia del *FTO* conduce a una reducción significativa del tejido adiposo y de la masa magra, pero también a un retraso de crecimiento postnatal (Fisher *et al.* 2009). Recientemente se ha observado en una gran familia árabe-palestina consanguínea que la pérdida de funcionalidad del *FTO* debido a una mutación no sinónima en la posición R316Q (cambio de una Arg por una Gln en la posición 316) dio como resultado una enfermedad autosómica recesiva (Boissel *et al.* 2009). El síndrome incluye retraso del crecimiento postnatal, dimorfismo de cabeza y cara, retardo psicomotor severo,

déficit funcional del cerebro y, en algunos pacientes, malformaciones cerebrales, defectos cardíacos, anomalías genitales, paladar hendido y todos los hijos afectados murieron en la infancia. Sin embargo, los padres heterocigotos para esta mutación no presentaron ningún fenotipo asociado. No obstante, este no es nuestro caso, ya que poseer el alelo de riesgo de la variante rs8061518 se asocia a niños más delgados, lo cual es bastante interesante y novedoso; de hecho, estos niños no presentan ninguna de las características comentadas anteriormente.

Un estudio reciente examinó las propiedades enzimáticas funcionales del *FTO* y halló 26 nuevas mutaciones heterocigotas no sinónimas; siete de las cuales eran comunes para sujetos obesos y delgados, lo cual sugiere que la pérdida de una copia funcional del *FTO* no se asocia a un determinado IMC. Otras observaciones importantes son que las mutaciones no sinónimas son tres veces menos frecuentes en la región COOH-terminal que en el resto de la molécula y también que, si bien las variantes no sinónimas en otras partes de la molécula se encuentran por igual en las personas delgadas y obesas, ocho de esas variantes que se encuentran en el COOH-terminal se detectaron en sujetos obesos y sólo dos en los delgados. Estos hallazgos preliminares son de gran interés y podrían conducir a una mejor comprensión de la función del *FTO* y del papel que desempeña en la homeostasis energética (Meyre *et al.* 2010).

Los diferentes hallazgos han puesto de manifiesto que el *FTO* se expresa fuertemente en el cerebro y parece jugar un papel en el control hipotalámico de la ingesta energética, en la adipogénesis y la función muscular normal. También se ha sugerido, a raíz de los resultados de análisis funcionales, que el *FTO* puede desmetilar ácidos nucleicos, y también podría funcionar como un co-activador transcripcional; sin embargo, a pesar de la gran cantidad de estudios de asociación que se han realizado en los últimos años, aunado a los experimentos de pérdida de funcionalidad o sobreexpresión en animales y el hallazgo en humanos de un síndrome mortal a causa de la pérdida de funcionalidad de un residuo crucial en un dominio catalítico del *FTO* (Larder *et al.* 2010), la verdadera función celular del *FTO* continúa siendo un enigma, por lo que debemos esperar un poco más para conocer con exactitud su mecanismo de acción.

NPY

El principal resultado obtenido del análisis de los SNPs del gen *NPY*, ha sido la asociación de dos variantes génicas (rs16147 y rs16131) a la obesidad, específicamente al peso corporal y al IMC en niños. Además, estas variantes se han asociado con algunos rasgos presentes en el SM, en ambos casos con concentraciones bajas de HDL-c y en el caso del rs16131 también con concentraciones altas de TAG e insulina.

El papel que desempeña el NPY en el control hipotalámico del balance energético está bien establecido. Este neuropéptido es un potente orexígeno que, cuando es administrado crónicamente en el sistema nervioso central, conduce a un aumento de la ingesta de alimentos, del peso corporal y de la adiposidad en ratas (Stanley *et al.* 1996; Vettor *et al.* 1994). La obesidad inducida por el NPY no se debe únicamente a la hiperfagia sino también al aumento de la acumulación de lípidos en el tejido adiposo blanco, a la inhibición de la termogénesis en el tejido adiposo marrón y a la estimulación de hiperinsulinemia e hipercorticosterolemia (Billington *et al.* 1991; Sainsbury *et al.* 1997). A pesar de que existe mucha evidencia del papel clave del NPY en la regulación de energía en ratas, la evidencia en humanos es escasa. Las publicaciones se basan fundamentalmente en los estudios del SNP rs16139, el cual se ha asociado al desarrollo de la obesidad (Ding *et al.* 2005; van Rossum *et al.* 2006), a alteraciones en el metabolismo glucídico, lipídico y al desarrollo de la aterosclerosis (Pesonen 2006). En nuestra población este SNP no se encontraba en equilibrio de HW para el grupo control y fue eliminado del análisis, por lo que no podemos ni confirmar ni desmentir su asociación con la obesidad y/o sus rasgos en nuestra población.

En nuestro estudio, el SNP rs16147, localizado en la zona del promotor y asociado en algunos estudios con el alcoholismo (Mottagui-Tabar *et al.* 2005; Fracès *et al.* 2011) y con accidentes cerebrovasculares (Kim *et al.* 2009; Yu *et al.* 2010; Lee y Kong 2007), se asoció a la obesidad y a concentraciones bajas de HDL-c. A su vez, el SNP rs16131 se asoció a los mismos rasgos del anterior y, adicionalmente, a TAG, insulina, HOMA-IR y leptina elevados. Como puede observarse, prácticamente todos estos rasgos están presentes en el SM, por lo que podríamos pensar que existe una relación entre el NPY y el desarrollo del SM. Es bien sabido que el origen del SM se asocia fundamentalmente a la resistencia insulínica; a su vez, diferentes estudios han demostrado que el NPY también participa en el desarrollo de la resistencia a la insulina, por lo que este podría ser el punto de encuentro entre la relación del SM y este neuropéptido. Sin, embargo al hacer un análisis de regresión múltiple entre los

componentes significativos del SM y el SNP rs16131, la concentración plasmática de TAG fue la única que se asoció de forma independiente con dicho polimorfismo, lo que podría indicar que esta variante génica del NPY, más que con la regulación de la ingesta energética se relacionaría con la acción de este neuropéptido en los órganos clave implicados en la síntesis y utilización de los TAG, tales como el hígado y el tejido adiposo.

Van den Hoek *et al.* (2008) demostraron que la administración cerebroventricular de NPY en ratas, induce resistencia insulínica a través de la activación de las terminaciones nerviosas simpáticas que llegan al hígado. Por su parte, Ruohonens *et al.* (2008) demostraron en ratones D β H-NPY transgénicos que una sobreexpresión de NPY en el SNS y en neuronas noradrenérgicas del cerebro causan un incremento de adiposidad y acumulación hepática de TAG, lo cual genera hiperinsulinemia y disfunción del metabolismo glucídico con el tiempo y que este cambio es independiente de las concentraciones de NPY en el hipotálamo.

Lo que observamos a través de estos estudios es que el hipotálamo está involucrado en el control autonómico de varios tejidos (Strack *et al.* 1989) contiene muchas neuronas que expresan receptores del NPY en diferentes núcleos cerebrales (Wolak *et al.* 2003). Un incremento del NPY haría que las terminaciones nerviosas simpáticas actuaran constantemente en el hígado, provocando un aumento de la acetil-CoA carboxilasa, lo que daría lugar a un incremento de AGL y de TAG, lo cual desembocaría en una esteatosis hepática; del hígado salen VLDL que a través de la lipoproteín lipasa, que es activada por la insulina, entran en el tejido adiposo haciendo que aumenten los AGL y a su vez los TAG en este tejido. Al principio, este mecanismo actúa de una manera fluida, pero a medida que pasa el tiempo comienza a deteriorarse, ya que la actividad de la lipoprotein lipasa disminuye y los TAG aumentan a nivel plasmático; de aquí en adelante se crea un círculo vicioso, ya que el tejido adiposo sufre una hipertrofia y por la acción de la lipasa sensible a las hormonas, no inhibida totalmente a causa de la resistencia insulínica, se incrementa el flujo de AGL al hígado manteniendo los TAG elevados en este órgano. A raíz de esto, por un lado hay un incremento de gluconeogénesis y por otro, las mismas terminaciones simpáticas hacen que a nivel hepático disminuya la glucógeno sintetasa y aumente la glucógeno fosforilasa (van de Hoek *et al.* 2008) siendo en conjunto el resultado final una hiperglucemia que no puede ser suprimida por la insulina.

El papel que juega el NPY extrahipotalámico en la homeostasis energética ha sido pobremente estudiado; sin embargo, los trabajos de Kuo *et al.* (2007) y Abe *et al.* (2010) han

demostrado que el estrés, puede provocar disminución de peso por el efecto de la noradrenalina en la lipólisis. Por el contrario cuando el estrés es extremo y se combina con una dieta alta en grasa y azúcares, la liberación endógena de NPY a la grasa visceral aumenta la formación de nuevos adipocitos y acelera la obesidad visceral y el desarrollo del SM. Este proceso esta mediado por la sobre regulación del sistema adipogénico del NPY del tejido graso, facilitado por los glucocorticoides liberados en los procesos de estrés y revertido por antagonistas de los glucocorticoides o del receptor 2 del NPY (NPY-Y₂R). Los efectos que produce el estrés en la liberación del NPY y homeostasis de la energía son similares a los expuestos por Van den Hoek *et al.* (2008) y Ruohonens *et al.* (2008), por lo que podría decirse que este fenotipo es causado por una sobreexpresión del NPY en las neuronas noradrenérgicas.

Al observar los trabajos realizados en animales y en adipocitos humanos (los cuales injertados en ratones y tratados con NPY mostraron que estimulaban la angiogénesis y la adipogénesis) se puede afirmar que la sobreproducción de NPY aumenta la acumulación de TAG, lo cual conlleva a una hiperinsulinemia que deriva en un metabolismo glucídico alterado, a través de la activación del SNS. Nuestros resultados sugieren la hipótesis que poseer el alelo de riesgo del SNP rs16131 podría producir este efecto: No obstante, es necesario estudiar más profundamente los mecanismos que conducen a estas alteraciones metabólicas y validar en otras poblaciones el efecto de este SNP.

HSD11B1

El hallazgo más relevante encontrado al estudiar el gen *HSD11B1* en nuestra población infantil, ha sido la fuerte asociación del SNP rs3753519 con la obesidad. Los niños que poseen el alelo de riesgo tienen una probabilidad de pesar 5 kg más que los niños que no lo poseen. Además, estos niños muestran un incremento en el IMC, IMC *z score* y la CC y una disminución en las concentraciones plasmáticas de adiponectina. Estos resultados que vinculan el genotipo tanto con la prevalencia como con los rasgos fenotípicos sugieren que este gen *HSD11B1* podría desempeñar un papel importante en la patogénesis de la obesidad.

La regulación del la expresión del gen *HSD11B1* es específica de los tejidos y abarca el uso de dos promotores alternativos, uno distal P1, y otro proximal P2 (Bruley *et al.* 2006). En un estudio reciente se ha descrito que la transcripción mediada por P2 predomina en el hígado, pulmón y tejido adiposo subcutáneo, mientras que la mediada por P1 predomina en

líneas celulares tumorales (Staab *et al.* 2011). El SNP rs3753519 está localizado en la zona del promotor P2 a -2679 nucleótidos del punto de inicio de la transcripción, por lo que podría afectar su tasa de transcripción; sin embargo, se necesitan estudios adicionales para conocer las consecuencias funcionales de este SNP. Variantes en la región del promotor P2, como el rs846910, o en una región intrónica intensificadora, como el rs12086634, se han asociado con la DM2 y/o con la hipertensión arterial en tres poblaciones diferentes; sin embargo, en ninguno de los casos se ha asociado directamente con la obesidad (Nair *et al.* 2004, Franks *et al.* 2004, Morales *et al.* 2008). Estudios *in vitro*, han demostrado que el alelo G del SNP rs12086634 se asocia con una disminución en la transcripción de la enzima 11 β -HSD1 (Draper *et al.* 2003). Sin embargo, no se han observado consecuencias funcionales de la variación alélica del SNP rs846910 en este tipo de estudios (Malavasi *et al.* 2010). Otro SNP estudiado también *in vitro*, localizado en la zona del promotor P2 a dos nucleótidos del comienzo del lugar de la traducción (rs13306421), ha mostrado consecuencias funcionales, aumentando la expresión y la actividad de la enzima 11 β -HSD1 (Malavasi *et al.* 2010); no obstante, la presencia de esta variante no ha sido detectada en población caucásica.

En el presente estudio no se observó asociación entre el SNP rs846910 y los fenotipos relacionados con DM2 e hipertensión arterial, contrariamente a lo publicado hasta ahora (Nair *et al.* 2004, Franks *et al.* 2004). A pesar de encontrarse en DL con el SNP rs3753519 ($D'=1$; $r^2=0,495$, calculado con el software Haploview) el SNP rs846910 no se asoció con la obesidad y no fenotipos relacionados. El motivo por el cual no se encuentra una asociación clara entre la variabilidad genética de la 11 β -HSD1 y la obesidad ha sido publicado con anterioridad. A pesar de las evidencias de su efecto en animales y humanos, la falta de asociación podría deberse a que ninguno de los SNPs estudiados es funcional y la débil asociación encontrada con los fenotipos relacionados con la obesidad podría atribuirse a que se encuentran en DL con un locus funcional. Considerando la fuerte asociación entre el SNP rs3753519 con la obesidad que nosotros hemos encontrado y debido a su localización en el promotor P2, podríamos hipotetizar que esta variante fuese el locus funcional para la regulación de la expresión del gen *HSD11B1*.

Las bajas concentraciones de cortisol plasmático asociadas con la presencia del alelo de riesgo (A) del SNP rs3753519 hallados en este estudio, podrían indicar un efecto de esta variante en la transcripción genética y en la actividad de la enzima. Se ha descrito una baja actividad de la 11 β -HSD1 (analizada a través de la relación entre el tetrahydrocortisol urinario

+ 5 α -THF/tetrahidrocortisona) en niños obesos (Wiegand *et al.* 2007) y confirmada por el hallazgo de que la activación de la cortisona ingerida por vía oral a cortisol está alterada en la obesidad (Stewart *et al.* 1999). Sin embargo, no existe un consenso en relación a las concentraciones de cortisol en sujetos obesos. Debido a que el cortisol es secretado en diferentes concentraciones lo largo del día, la interpretación de sus niveles plasmáticos es complicada (Hellman *et al.* 1999) y una sola medida puede no ser representativa. Este problema se puede eliminar midiendo la concentración media del cortisol plasmático en 24 horas o la concentración plasmática integrada en 24 horas (Salehi *et al.* 2005). Únicamente los estudios que usen alguno de estos métodos mencionados anteriormente deberían ser aceptados para la evaluación de las concentraciones plasmáticas de cortisol en sujetos obesos. En efecto, se han descrito concentraciones bajas de cortisol en individuos obesos utilizando este tipo de análisis, probablemente debido a la baja respuesta del eje hipofisario-hipotalámico-adrenal (HPA) ante la estimulación por retroalimentación (Salehi *et al.* 2005). A pesar de que en este estudio el método utilizado para medir el cortisol plasmático es una limitación, ésta hormona fue analizada en todos los sujetos bajo las mismas condiciones (después de 12 horas de ayuno y entre las 8:00 y 9:30 de la mañana). Por lo tanto, la disminución de las concentraciones plasmáticas de cortisol encontradas en niños obesos podría apoyar la hipótesis planteada anteriormente.

Independientemente de las concentraciones plasmáticas de cortisol, se ha descrito una mala regulación de los glucocorticoides tisulares en la obesidad común, representada por la disminución del cortisol hepático secundario a la reducción de la actividad de la 11 β -HSD1 (Stewart *et al.* 1999; Rask *et al.* 2001; Simonyte *et al.* 2009) y por el incremento del mRNA de la 11 β -HSD1 y de su actividad en el tejido adiposo (Rask *et al.* 2001; Sandeep *et al.* 2005; Paulmyer-Lacroix *et al.* 2002; Paulsen 2007; Simonyte *et al.* 2009). Sin embargo, los mecanismos subyacentes para el patrón de expresión específico de los tejidos son poco conocidos. En los últimos años, se ha propuesto que algunos reguladores del metabolismo lipídico y de la inflamación, como el receptor activado de proliferadores de los peroxisomas (PPAR) α , el PPAR γ , el receptor X del hígado (LXR) y las proteínas de unión a la secuencia CCAAT (C/EBPs) participan en la expresión del *HSD11B1* (revisado en Staab *et al.* 2011). La presencia del rs3753519 en la zona promotora -reguladora del gen, podría dar respuesta a un mecanismo de regulación transcripcional diferencial y específico para los tejidos. Aunque se requieren estudios funcionales para confirmarlo.

Vale la pena comentar que la asociación del rs3753519 con concentraciones elevadas de la enzima hepática GGT, como marcador de hígado graso, junto con la disminución de adiponectina, como marcador de resistencia insulínica, y elevadas concentraciones de PAI-1 activo, como marcador de ECV, podrían suponer una posible función de esta variante génica en la etiología de las complicaciones de la obesidad.

MAP3K4

Ninguno de los 1321 SNPs registrados en el NCBI para el gen *MAP3K4* ha mostrado asociación con el riesgo de enfermedad. No obstante, se han descrito alteraciones en otros genes involucrados en las vías de señalización de la MAPK, como en el caso del cáncer de tiroides (revisado en Xing 2010), más recientemente en el cáncer colorectal, a través de un GWAS (Lascorz *et al.* 2010), y en el grosor de la intima media de la carótida (Formoso *et al.* 2011). A pesar del papel biológico tan importante que desempeña la vía de señalización de la MAPK en la obesidad y la resistencia insulínica, hasta el momento no se han asociado SNPs génicos con la enfermedad o sus complicaciones en ninguno de los múltiples genes involucrados en estas vías. En el presente estudio, se ha encontrado una asociación novedosa del SNP rs1534020 del gen *MAP3K4* con la obesidad. El riesgo de padecer obesidad en los niños que poseían el alelo de riesgo (G) fue cerca del doble comparado con los que no lo poseían. Inclusive, la presencia de esta variante en nuestra cohorte se asoció con IMC, IMC *z score*, peso corporal y leptina plasmática elevados. Estos datos que vinculan el genotipo tanto con la enfermedad como con los rasgos asociados a esta, sugieren el papel del gen *MAP3K4* en la patogénesis de la obesidad; sin embargo, se necesitan estudios adicionales de asociación en otras poblaciones caucásicas para validar nuestro hallazgo e investigar la asociación de este SNP con la obesidad y los rasgos que la definen.

La asociación de la presencia del alelo G con la presión arterial tanto sistólica como diastólica en los niños, podría indicar un posible papel de la *MAP3K4* en el desarrollo del SM. Recientemente se ha descrito en ratones un aumento de la actividad de la MTK1, codificada por el gen *MAP3K4*, tras una sobrecarga de presión en el corazón en ratones y por estrés oxidativo en cardiomiocitos (Mizote *et al.* 2010). Es interesante destacar que en el grupo de los obesos el rs1534020 se asoció con concentraciones elevadas de LDL-ox [P=0,03 β (95% IC) 0,44 (0,03–0,84)] y bajas concentraciones de vitamina A [P=0,005 β (95% IC) -0,02 (-0,04–-0,006)]. Estos resultados podrían apoyar la implicación de la MTK1 en la presión

arterial y el estrés oxidativo. La variante del gen *MAP3K4* aquí estudiada, no se asoció a ninguno de los biomarcadores de inflamación analizados y este hecho podría estar en concordancia con la activación de la vía de la MAPK por el estímulo del estrés oxidativo en el SM.

Por otra parte, el rs1534020 se asoció con concentraciones plasmáticas elevadas de GGT, pero no con otras enzimas hepáticas como la AST o la ALT. La GGT, además de ser un marcador clásico de hígado graso, también es considerada un biomarcador de ECV. Una asociación positiva entre la GGT basal, los cambios temporales en ésta y eventos cardiovasculares y mortalidad por causa cardiovascular no relacionada con el consumo de alcohol, se ha descrito en numerosos estudios prospectivos (revisado en Ghouri *et al.* 2010). Parece que también existe una fuerte y poco reconocida interacción de la edad con la GGT y la incidencia de enfermedad coronaria, siendo fuerte en individuos jóvenes y relativamente débil en sujetos mayores (Lee *et al.* 2009). Por el contrario, la ALT parece estar débilmente asociada con la enfermedad coronaria incidente. Se ha demostrado que la expresión de la GGT aumenta después de un estrés oxidativo que involucra a Ras y a una gran cantidad de factores implicados en vías de señalización celular, como la Akt, p38 MAPK y MEK1 en células de carcinoma de colon de ratas (Pandur *et al.* 2007). Aunque se requieren nuevos estudios en células hepáticas y endoteliales, la vía de actuación de la GGT en hígado y las paredes vasculares podría ser por activación de las vías MAPKs.

Teniendo en cuenta que la *MAP3K4* regula la JNK y la p38 MAPK, la asociación de variantes génicas del gen de la *MAP3K4* con la GGT y la presión arterial en niños obesos encontradas en este estudio, junto con un incremento de las LDL oxidadas, parece indicar que esta enzima hepática es un biomarcador que vincula el desarrollo de la enfermedad de hígado graso no alcohólica y el daño cardiovascular a través de la vía de la MAPK.

Conclusions

Conclusiones



1. The metabolic syndrome is present both in pubertal and in prepubertal children regardless of any international classification and it ranges from 8.3% to 34.20%.
2. Definitive criteria for the metabolic syndrome in childhood and adolescence have not yet been determined and it is mandatory to take into account age, sex, pubertal stage and body composition to establish their components and cut-off values.
3. The variants rs9939609, rs9928094, rs9935401 and rs9930333 in the *FTO* gene are associated with obesity in a cohort of Spanish children.
4. The variant in the *FTO* gene rs8061518 is negatively associated with obesity and some features of the metabolic syndrome in a cohort of Spanish children.
5. The variants rs16147 and rs16131 in the *NPY* gene are associated with obesity and the latter with some features of the metabolic syndrome in a cohort of Spanish children.
6. The variant rs3753519 in the *HSD11B1* gene is associated with susceptibility to paediatric obesity and its complications, low adiponectin and, high PAI-1 and gamma-glutamyl transpeptidase in a cohort of Spanish children.
7. The variant rs1534020 in *MAP3K4* gene is associated with obesity, high blood pressure and high gamma-glutamyl transpeptidase in a cohort of Spanish children.

General conclusion

Selecting candidate genes from elected metabolic and signalling pathways related to pathophysiological origin of obesity, and from those differentially expressed in the omental adipose tissue of obese subjects, as done in the present work in children, appears to be a complementary strategy to GWAS in the identification of gene variants associated with obesity and its comorbidities, namely metabolic syndrome. The new identified variants in genes *FTO*, *NPY*, *HSD11B1* and *MAPK3K* provide novel and original insight on the genetic origins of obesity and add further support to the complexity of this disease.

1. El Síndrome Metabólico esta presente tanto en niños en edad puberal como en edad prepuberal independientemente de la clasificación internacional utilizada y, se sitúa en un rango que va desde 8,3 por ciento a 34,20 por ciento.
2. Aún no se ha establecido una definición definitiva para el síndrome metabólico en la infancia y la adolescencia, es muy importante tener en cuenta la edad, sexo, estadio puberal y la composición corporal para establecer sus componentes y los puntos de corte.
3. Las variantes rs9939609, rs9928094, rs9935401 and rs9930333 del gen *FTO* se asocian con la obesidad en una cohorte de niños españoles.
4. La variante rs8061518 del gen *FTO* se asocia negativamente con la obesidad y algunas características presentes en el síndrome metabólico en una cohorte de niños españoles.
5. Las variantes rs16147 y rs16131 del gen *NPY* se asocian con la obesidad y este último con algunas características presentes en el síndrome metabólico en una cohorte de niños españoles.
6. La variante rs3753519 en el gen *HSD11B1* se asocia con la susceptibilidad a la obesidad pediátrica y sus complicaciones, adiponectina baja y PAI-1 y gamma-glutamil transpeptidasa altos en una cohorte de niños españoles.
7. La variante rs1534020 en el gen *MAP3K4* se asocia con la obesidad, tensión arterial elevada y con la gamma-glutamil transpeptidasa en una cohorte de niños españoles.

Conclusión general

Genes candidatos seleccionados a partir de rutas metabólicas y de señalización celular relacionadas con la fisiopatología de la obesidad, y de aquellos que se han expresado diferencialmente en el tejido adiposo omental de niños obesos, como se ha hecho en el presente trabajo, parece ser una estrategia complementaria a los GWAS en la identificación de variantes genéticas asociadas a la obesidad y sus comorbilidades, es decir, el síndrome metabólico. Las nuevas variantes identificadas en los genes *FTO*, *NPY*, *HSD11B1* y *MAPK3K* proporcionan una idea novedosa y original sobre los orígenes genéticos de la obesidad y suponen un mayor respaldo a la complejidad de esta enfermedad.

Bibliografía

- Abell AN, Johnson GL. MEKK4 is an effector of the embryonic TRAF4 for JNK activation. *J Biol Chem* 2005; 280:35793–35796.
- Abell AN, Rivera-Perez JA, Cuevas BD, Uhlik MT, Sather S, Johnson NL, *et al.* Ablation of MEKK4 kinase activity causes neurulation and skeletal patterning defects in the mouse embryo. *Mol Cell Biol* 2005; 25:8948–8959.
- ADA. Type 2 diabetes in children and adolescents. American Diabetes Association American. *Diabetes Care* 2000; 23:381-389.
- Agrawal S, Gollapudi S, Su H, Gupta S. Leptin Activates Human B Cells to Secrete TNF- α , IL-6, and IL-10 via JAK2/STAT3 and p38MAPK/ERK1/2 Signaling Pathway. *J Clin Immunol* DOI 10.1007/s10875-010-9507-1
- Aguilera CM, Gil-Campos M, Cañete R, Gil A. Alterations in plasma and tissue lipids associated with obesity and metabolic syndrome. *Clin Sci* 2008; 114:83-93.
- Aguilera CM, Gomez-Llorente C, Gil A. Bases genéticas de la susceptibilidad Obesogénica. En: *La obesidad en los niños. Un problema de todos.* 2009 Edit. Rosa Lama. Edit. Tilt Van S.L. Madrid.
- Aguirre V, Uchida T, Yenush L, Davis R, White MF. The c-Jun NH2-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser307. *J Biol Chem* 2000; 275:9047– 9054
- Akinci G, Ciskun S, Akinci B, Hemkimsoy Z, Bayindir P, Onur E, *et al.* Atherosclerosis risk factors in children of parents with the metabolic syndrome. *Atherosclerosis* 2007; 194:165-171.
- Alberti KG y Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications, part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 1998; 15:539-553.
- Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, *et al.* Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the international Diabetes Federation Task force on epidemiology and prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American heart Association; World heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the study of obesity. *Circulation* 2009; 120:1640-1645.
- Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome-a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med* 2006; 23:469-480.
- Alberti KG, Zimmet PZ, Shaw JE. The metabolic syndrome-a new world-wide definition from the International Diabetes Federation Consensus. *Lancet* 2005; 366:1059-1062.
- Alberts P, Nilsson C, Selen G, Engblom LO, Edling NH, Norling S, *et al.* Selective inhibition of 11-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 improves hepatic insulin sensitivity in hyperglycemic mice strains. *Endocrinology* 2003; 144:4755–4762.
- American Diabetes Association. Clinical practice recommendations. *Diabetes Care* 2002 25; Suppl 1:S1–S147.
- Anagnostis P, Athyros VG, Tziomalos K, Karagiannis A, Mikhailidis DP. Clinical review: The pathogenetic role of cortisol in the metabolic syndrome: a hypothesis. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94:2692-2701.

- Aouadi M, Jager J, Laurent K, Gonzalez T, Cormont M, Binétruy B, *et al.* p38MAP kinase activity is required for human primary adipocyte differentiation. *FEBS Lett* 2007; 581:5591–5596
- Bays H, González-Campoy JM, Bray GA, Kitabchi AE, Bergman DA, Schorr AB, *et al.* Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increased visceral adiposity. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2008; 6:343–368.
- Berg AH, Scherer PE. Adipose Tissue, Inflammation, and Cardiovascular Disease. *Circ Res* 2005; 96:939–949.
- Billington CJ, Briggs JE, Grace M, Levine AS. Effects of intracerebroventricular injection of neuropeptide Y on energy metabolism. *Am J Physiol* 1991; 260:R321–R327.
- Boissel S, Reish O, Proulx K, Kawagoe-Takaki H, Sedgwick B, Yeo GS, *et al.* Loss-of-function mutation in the dioxygenase-encoding FTO gene causes severe growth retardation and multiple malformations. *Am J Hum Genet* 2009; 85:106–111.
- Bravard A, Lefai E, Meugnier E, Pesenti S, Disse E, Vouillarmet J, *et al.* FTO is increased in muscle during type 2 diabetes and its over-expression in myotubes alters insulin signalling, enhances lipogenesis and ROS production, and induces mitochondrial dysfunction. *Diabetes* 2011; 60:258–268.
- Bressler J, Kao WH, Pankow JS, Boerwinkle E. Risk of type 2 diabetes and obesity is differentially associated with variation in FTO in whites and African-Americans in the ARIC study. *PLoS One* 2010; 5:pe10521.
- Brothers SP, Wahlestedt C. Therapeutic potential of neuropeptide Y (NPY) receptor ligands. *EMBO Mol Med* 2010; 2:429–439.
- Bruley C, Lyons V, Worsley AG, Wilde MD, Darlington GD, Morton NM, Seckl JR, Chapman KE. A novel promoter for the 11-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 gene is active in lung and is C/EBP independent. *Endocrinology* 2006; 147:2879–2885.
- Cañete R, Gil-Campos M, Aguilera CM, Gil A. Development of insulin resistance and its relation to diet in the obese child. *Eur J Nutr* 2007; 46:81–87.
- Carlson CJ, Koterski S, Sciotti RJ, Pocard GB, Rondinone CM. Enhanced basal activation of mitogen-activated protein kinases in adipocytes from type 2 diabetes: potential role of p38 in the downregulation of GLUT4 expression. *Diabetes* 2003; 52:634–641.
- Carlson CJ, Rondinone CM. Pharmacological inhibition of p38 MAP kinase results in improved glucose uptake in insulin-resistant 3T3-L1 adipocytes. *Metabolism* 2005; 54:895–901.
- Chang J, Li Y, Huang Y, Lam KS, Hoo RL, Wong WT, *et al.* Adiponectin prevents diabetic premature senescence of endothelial progenitor cells and promotes endothelial repair by suppressing the p38 MAP kinase/p16INK4A signaling pathway. *Diabetes* 2010; 59: 2949–2959.
- Chen W, Srinivasan S, Li S. Metabolic syndrome variables at low levels in childhood are beneficially associated with adulthood cardiovascular risk. The Bogalusa Heart Study. *Diabetes Care* 2005; 28:138–143.

- Chi C, Wang Y, Wilson DM, Robinson TN. Definition of metabolic syndrome in preadolescent girls. *J Pediatr* 2006; 148:788-792.
- Chi H, Lu B, Takekawa M, Davis RJ, Flavell RA. GADD45 β /GADD45 γ and MEKK4 comprise a genetic pathway mediating STAT4-independent IFN γ production in T cells. *EMBO J* 2004; 23:1576–1586.
- Chi H, Sarkisian MR, Rakic P, Flavell RA. Loss of mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MEKK4) results in enhanced apoptosis and defective neural tube development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:3846–3851.
- Chiarelli F, Marcovecchio ML. Insulin resistance and obesity in childhood. *Eur J Endocrinol* 2008; 159:S67-74.
- Church C, Lee S, Bagg EA, McTaggart JS, Deacon R, Gerken T, *et al.* A mouse model for the metabolic effects of the human fat mass and obesity associated FTO gene. *PLoS Genet*. 2009; 5:e1000599
- Cole TJ, Bellizzi MC, Flegal KM, Dietz WH. Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: International survey. *BMJ* 2000; 320:1240-1243.
- Cole TJ, Freeman JV, Preece MA. Body mass index reference curves for the UK, 1990. *Arch Dis Child* 1995; 73:25-29.
- Cook S, Weitzman M, Auinger P, Nguyen M, Dietz WH. Prevalence of metabolic syndrome phenotype in adolescents: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2003; 157:821-827.
- Crepaldi G. Origin and development of the metabolic syndrome. En: *The metabolic syndrome at the beginning of the XXIst century*. Edit: Serrano-Ríos M, Caro JF, Carraro R, Gutiérrez-Fuentes JA. Elsevier España SA. Madrid, España. 2005; 5-13.
- Cruz ML, Weigensberg MJ, Huang TT, Ball G, Shaibi GQ, Goran MI. The metabolic syndrome in overweight Hispanic youth and the role of insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:108-113.
- Czaja MJ. JNK regulation of hepatic manifestations of the metabolic syndrome. *Trends Endocrinol Metab* 2010; 21: 707-713.
- Dalmau J, Alonso M, Gómez L, Martínez C, Sierra C. Obesidad Infantil. Recomendaciones del Comité de Nutrición de la Asociación Española de Pediatría. Parte II. Diagnóstico. Comorbilidades. Tratamiento. *An Pediatr (Barc)* 2007; 66:294-304.
- De Ferranti SD, Gauvreau K, Ludwig DS, Neufeld EJ, Newburger JW, Rifai N. Prevalence of the metabolic syndrome in American adolescents: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Circulation* 2004; 110:2494-2497.
- De Ferranti SD, Gauvreau K, Ludwig DS. Inflammation and changes in metabolic syndrome abnormalities in US adolescents: findings from the 1988-1994 and 1999-2000 National Health and Nutrition Examination Surveys. *Clin Chem* 2006; 52:1325-1330.
- Dimitrijevic-Sreckovic V, Colak E, Djordjevic P, Gostiljac D, Sreckovic B, Popovic S, *et al.* Prothrombotic factors and reduced antioxidative defense in children and adolescents with pre-metabolic and metabolic syndrome. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45:1140-1144.
- Dina C, Meyre D, Gallina S, Durand E, Körner A, Jacobson P, *et al.* Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nat. Genet* 2007; 39:724–726.

- Ding B, Kull B, Liu Z, Mottagui-Tabar S, Thonberg H, Gu HF, *et al.* Human neuropeptide Y signal peptide gain-of-function polymorphism is associated with increased body mass index: possible mode of function. *Regul Pept* 2005; 127:45–53.
- Draper N, Walker EA, Bujalska IJ, Tomlinson JW, Chalder SM, Arlt W, *et al.* Mutations in the genes encoding 11-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase interact to cause cortisone reductase deficiency. *Nat Genet* 2003; 34:434–439.
- Erlinge D, Brunkwall J, Edvinsson L. Neuropeptide Y stimulates proliferation of human vascular smooth muscle cells: cooperation with noradrenaline and ATP. *Regul Pept* 1994; 50:259–265.
- Eyzaguirre F, Mericq V. Insulin resistance markers in children. *Horm Res* 2009; 71:65-74.
- Fawcett KA, Barroso I. The genetics of obesity: FTO leads the way. *Trends Genet* 2010; 26:266–274.
- Fernández JR, Redden DT, Pietrobelli A, Allison DB. Waist circumference percentiles in nationally representative samples of African-American, European-American, and Mexican-American children and adolescents. *J Pediatr* 2004; 145:439-444.
- Fischer J, Koch L, Emmerling C, Vierkotten J, Peters T, Brüning JC, *et al.* Inactivation of the Fto gene protects from obesity. *Nature* 2009; 458:894–898.
- Fischer J, Koch L, Emmerling C, Vierkotten J, Peters T, Brüning JC, Rütger U. Inactivation of the Fto gene protects from obesity. *Nature* 2009; 458:894-898.
- Fischer J, Koch L, Emmerling C, Vierkotten J, Peters T, Brüning JC, *et al.* Inactivation of the Fto gene protects from obesity. *Nature* 2009; 458:894-898.
- Ford ES, Ajani UA, Morkdad AH. The metabolic syndrome and concentration of C-reactive protein among U.S. youth. *Diabetes care* 2005; 28:878-881.
- Ford ES, Li C. Defining the metabolic syndrome in children and adolescents: Will the real definition please stand up? *J Pediatr* 2008; 152:160-164.
- Formoso G, Di Tomo P, Andreozzi F, Succurro E, Di Silvestre S, Prudente S, *et al.* The TRIB3 R84 variant is associated with increased carotid intima-media thickness in vivo and with enhanced MAPK signalling in human endothelial cells. *Cardiovasc Res* 2011; 89:184-192.
- Francès F, Guillen M, Verdú F, Portolés O, Castelló A, Sorlí JV, *et al.* The 1258 G>A polymorphism in the neuropeptide Y gene is associated with greater alcohol consumption in a Mediterranean population. *Alcohol* 2011; 45:131-136.
- Franks PW, Knowler WC, Nair S, Koska J, Lee YH, Lindsay RS, *et al.* Interaction between an 11HSD1 gene variant and birth era modifies the risk of hypertension in Pima Indians. *Hypertension* 2004; 44:681–688.
- Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM, *et al.* A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science* 2007; 316:889–894.
- Freathy RM, Timpson NJ, Lawlor DA, Pouta A, Ben-Shlomo Y, Ruukonen A, *et al.* Common variation in the FTO gene alters diabetes-related metabolic traits to the extent expected given its effect on BMI. *Diabetes* 2008; 57:1419-1426.

- Fredriksson R, Hägglund M, Olszewski PK, Stephansson O, Jacobsson JA, Olszewska AM, *et al.* The obesity gene, FTO, is of ancient origin, up-regulated during food deprivation and expressed in neurons of feeding-related nuclei of the brain. *Endocrinology* 2008; 149:2062–2071.
- Freedman DS, Dietz WH, Tang R, Mensah GA, Bond MG, Urbina EM, *et al.* The relation of obesity through-out life to carotid intima-media thickness in adulthood: the Bogalusa Heart Study. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004; 28:159-166.
- Gelernter-Yaniv L, Feng N, Sebring NG, Hochberg Z, Yanovski JA. Associations between a polymorphism in the 11 beta hydroxysteroid dehydrogenase type I gene and body composition. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003; 27:983–986.
- Gerken T, Girard CA, Tung YC, Webby CJ, Saudek V, Hewitson KS, *et al.* The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. *Science* 2007; 318:1469–1472.
- Gerwins P, Blank JL, Johnson GL. Cloning of a novel mitogen-activated protein kinase kinase kinase, MEKK4, that selectively regulates the c-Jun amino terminal kinase pathway. *J Biol Chem* 1997; 272:8288–8295.
- Ghouri N, Preiss D, Sattar N. Liver enzymes, nonalcoholic fatty liver disease, and incident cardiovascular disease: a narrative review and clinical perspective of prospective data. *Hepatology* 2010; 52:1156-1161.
- Gil A, Aguilera CM, Gil-Campos M, Cañete R. Altered signalling and gene expresión associated with the immune system and the inflammatory response in obesity. *Br J Nutr* 2007; 98:121-126.
- Gil-Campos M, Ramírez-Tortosa MC, Aguilera CM, Cañete R, Gil A. Fasting and postprandial adiponectin alterations anticipate NEFA and TNF- α changes in prepubertal obese children. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2011; 21:62-68.
- Goodman E, Dolan LM, Morrison JA, Daniels SR. Factor analysis of clustered cardiovascular risks in adolescence: obesity is the predominant correlate of risk among youth. *Circulation* 2005; 111:1970-1977.
- Goran MI, Gower BA. Longitudinal study on pubertal insulin resistance. *Diabetes* 2001; 50:2444–2450.
- Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory Mechanisms in Obesity. *Annu Rev Immunol*. *Annu Rev Immunol* 2011; 29:415-445.
- Grundy SM, Brewer HB Jr, Cleeman JI, Smith SC Jr, Lenfant C, American Heart Association, National Heart, Lung, and Blood Institute. Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation* 2004; 109:433-438.
- Gungor N, Saad R, Janosky J, Arslanian S. Validation of surrogate estimates of insulin sensitivity and insulin secretion in children and adolescent. *J Pediatr* 2004; 144:47-55.
- Han JC, Lawlor DA, Kimm SY. Childhood obesity. *Lancet* 2010; 375:1737-48.
- Hansen BC, Peternel R, Bray GA. Metabolic Syndrome-Past and Future. En: The metabolic syndrome. Edit: Hansen BC y Bray GB. Humana Press. NJ, EEUU. 2008; 1-7.

- Hardy J, Singleton A. Genomewide association studies and human disease. *N Engl J Med* 2009; 360:1759-1768.
- Hassanein MT, Lyon HN, Nguyen TT, Akyzbekova EL, Waters K, Lettre G, *et al.* Fine mapping of the association with obesity at the FTO locus in African-derived populations. *Hum Mol Genet* 2010; 19:2907–2916.
- Hellman L, Nakada F, Curti J, *et al.* Cortisol is secreted episodically by normal man. *J Clin Endocrinol Metab* 1970; 30: 411-422.
- Hickman TB, Briefel RR, Carroll MD, Rifkind BM, Cleeman JI, Maurer KR, *et al.* Distributions and trends of serum lipid levels among United States children and adolescents ages 4–19 years: data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Prev Med* 1998; 27:879–890.
- Hindorff LA, Junkins HA, Hall PN, Mehta JP, Manolio TA. A Catalog of Published Genome-Wide Association Studies. Disponible en: www.genome.gov/gwastudies. Acceso 15 de febrero 2011.
- Hinney A, Nguyen TT, Scherag A, Friedel S, Brönner G, Müller TD, *et al.* Genome wide association (GWA) study for early onset extreme obesity supports the role of fat mass and obesity associated gene (FTO) variants. *PLoS One* 2007; 2:pe1361.
- Hinney A, Vogel CI, Hebebrand J. From monogenic to polygenic obesity: recent advances. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 2010; 19:297-310.
- Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Görgün CZ, Uysal KT, Maeda K, *et al.* A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 2002; 420:333–336.
- Hunt SC, Stone S, Xin Y, Scherer CA, Magness CL, Iadonato SP, *et al.* Association of the FTO gene with BMI. *Obesity (Silver Spring)* 2008; 16:902–904.
- l'Allemand D, Wiegand S, Reinehr T, Müller J, Wabitsch M, Widhalm K, *et al.* Cardiovascular risk in 26,008 European overweight children as established by a multicenter database. *Obesity (Silver Spring)* 2008; 16:1672167-1672169.
- Ijzerman RG, Stehouwer CD, Serné EH, Voordouw JJ, Smulders YM, Delemarre-van de Waal HA, *et al.* Incorporation of the fasting free fatty acid concentration into quantitative insulin sensitivity check index improves its association with insulin sensitivity in adults, but not in children. *Eur J Endocrinol* 2009; 160:59-64.
- Itokawa M, Arai M, Kato S, Ogata Y, Furukawa A, Haga S, *et al.* Association between a novel polymorphism in the promoter region of the neuropeptide Y gene and schizophrenia in humans. *Neurosci Lett* 2003; 347:202-204.
- Juonala M, Viikari JS, Kähönen M, Solakivi T, Helenius H, Jula A, *et al.* Childhood levels of serum apolipoproteins B and A-I predict carotid intima-media thickness and brachial endothelial function in adulthood: the cardiovascular risk in young Finns study. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52:293-299.
- Kaipio K, Vahlberg T, Suominen M, Pesonen U. The role of non-synonymous NPY gene polymorphism in the nitric oxide production in HUVECs. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 381:587–591.
- Karvonen MK, Koulu M, Pesonen U, Uusitupa MI, Tammi A, Viikari J, *et al.* Leucine 7 to proline 7 polymorphism in the preproneuropeptide Y is associated with birth weight and

- serum triglyceride concentration in preschool aged children. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 1455–1460.
- Karvonen MK, Pesonen U, Koulu M, Niskanen L, Laakso M, Rissanen A, *et al.* Association of a leucine (7)-to-proline (7) polymorphism in the signal peptide of neuropeptide Y with high serum cholesterol and LDL cholesterol levels. *Nat Med* 1998; 4: 1434–1437.
- Karvonen MK, Valkonen VP, Lakka TA, Salonen R, Koulu M, Pesonen U, *et al.* Leucine7 to proline7 polymorphism in the preproneuropeptide Y is associated with the progression of carotid atherosclerosis, blood pressure and serum lipids in Finnish men. *Atherosclerosis* 2001; 159:145–151.
- Katz A, Nambi SS, Mather K, Baron AD, Follman DA, Sullivan G, *et al.* Quantitative insulin sensitivity check index: A simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:2402-2410.
- Kim EK, Choi EJ. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1802:396-405.
- Kim NS, Oh SM, Ko MM, Cha MH, Kang BK, Bang OS. Association of the C-399T promoter polymorphism of neuropeptide Y with susceptibility to ischemic stroke. *Clin Biochem.* 2009; 42:1699-1704.
- Koistinen HA, Chibalin AV, Zierath JR. Aberrant p38 mitogen-activated protein kinase signalling in skeletal muscle from Type 2 diabetic patients. *Diabetologia* 2003; 46:1324–1328
- Kotelevtsev Y, Holmes MC, Burchell A, Houston PM, Schmoll D, Jamieson P, *et al.* 11-Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 knockout mice show attenuated glucocorticoid inducible responses and resist hyperglycaemia on obesity or stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:14924–14929.
- Kuczumarski RJ, Ogden CL, Grummer- Strawn LM, Flegal KM, Guo SS, Wei RR, *et al.* CDC growth charts: United States. Advanced data from vital and health statistics. No. 314. Hyattsville, Md.: National Center for Health Statistics, 2000: 1-27. (DHHS publication no. (PHS) 2000-1250 0-0431.)
- Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 2001; 81:807–869.
- Landsberg L. Diet, obesity and hypertension: an hypothesis involving insulin, the sympathetic nervous system, and adaptive thermogenesis. *Q J Med* 1986; 61:1081-1090.
- Lansang MC, Williams GH, Carroll JS. Correlation between the glucose clamp technique and the homeostasis model assessment in hypertension. *Am J Hypertens* 2001; 14:51-53.
- Larder R, Cheung MK, Tung YC, Yeo GS, Coll AP. Where to go with FTO? *Trends Endocrinol Metab* 2011; 22:53-59.
- Lascorz J, Försti A, Chen B, Buch S, Steinke V, Rahner N, *et al.* Genome-wide association study for colorectal cancer identifies risk polymorphisms in German familial cases and implicates MAPK signalling pathways in disease susceptibility. *Carcinogenesis* 2010; 31:1612-1619.
- Lauer RM, Lee J, Clarke WR. Factors affecting the relationship between childhood and adult cholesterol levels: the Muscatine Study. *Pediatrics* 1988; 82:309–318.

- Lee C, Kong M. An interactive association of common sequence variants in the neuropeptide Y gene with susceptibility to ischemic stroke. *Stroke* 2007; 38:2663-2669.
- Lee DH, Buijsse B, Steffen L, Holtzman J, Luepker R, Jacobs DR Jr. Association between serum gamma-glutamyltransferase and cardiovascular mortality varies by age: the Minnesota Heart Survey. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2009; 16:16-20.
- Legry V, Cotel D, Ferrières J, Arveiler D, Andrieux N, Bingham A, *et al.* Effect of an FTO polymorphism on fat mass, obesity, and type 2 diabetes mellitus in the French MONICA Study. *Metabolism* 2009; 58:971-975.
- Li C, Ford ES, Mokdad AH, Cook S. Recent trends in waist circumference and waist-height ratio among US children and adolescents. *Pediatrics* 2006 ;118: e1390-1398.
- Lim AK, Nikolic-Paterson DJ, Ma FY, Ozols E, Thomas MC, Flavell RA, *et al.* Role of MKK3-p38 MAPK signalling in the development of type 2 diabetes and renal injury in obese db/db mice. *Diabetologia* 2009; 52:347-358.
- Liu J, Young TK, Zinman B, Harris SB, Connelly PW. Lifestyle variables, no-traditional cardiovascular risk factors, and the metabolic syndrome in an aboriginal Canadian population. *Obesity* 2006; 14:500-508.
- Lobstein T, Baur L, Uauy R. Obesity in children and young people: a crisis in public health. *Obes Rev* 2004; 5:4-104.
- Lucidi P, Murdolo G, Di Loreto C, Parlanti N, De Cicco A, Fatone C, *et al.* Metabolic and endocrine effects of physiological increments in plasma ghrelin concentrations. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2005; 15:410-417.
- Lundberg JM, Terenius L, Hökfelt T, Martling CR, Tatemoto K, Mutt V, *et al.* Neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity in peripheral noradrenergic neurons and effects of NPY on sympathetic function. *Acta Physiol Scand* 1982; 116:477-480.
- Luo W, Ng WW, Jin L-H, Ye Z, Han J, Lin S-C. Axin utilizes distinct regions for competitive MEKK1 and MEKK4 binding and JNK activation. *J Biol Chem* 2003; 278: 37451-37458.
- Ma J, Nordman S, Mollsten A, Falhammar H, Brismar K, Dahlquist G, *et al.* Distribution of neuropeptide Y Leu7Pro polymorphism in patients with type 1 diabetes and diabetic nephropathy among Swedish and American populations. *Eur J Endocrinol* 2007; 157:641-645.
- Madruga D, Fané M. Obesidad Infantil en: Tratamiento en gastroenterología, hepatología y nutrición pediátrica. Ed Ergon. Sociedad Española de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición. Madrid. 2008. 639-658.
- Magnussen CG, Koskinen J, Chen W, Thomson R, Schmidt MD, Srinivasan SR, *et al.* Pediatric metabolic syndrome predicts adulthood metabolic syndrome, subclinical atherosclerosis, and type 2 diabetes mellitus but is no better than body mass index alone: the Bogalusa Heart Study and the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Circulation* 2010; 122:1604-1611.
- Malavasi EL, Kelly V, Nath N, Gambineri A, Dakin RS, Pagotto U, *et al.* Functional effects of polymorphisms in the human gene encoding 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 beta-HSD1): a sequence variant at the translation start of 11 beta-HSD1 alters enzyme levels. *Endocrinology* 2010; 151:195-202.

- Manolio TA. Genome wide association studies and assesment of the risk of disease. *N Engl J Med* 2010; 363:166-176.
- Martínez A, Soto AM, Ramirez A, Oliver B, Lama C, Macarro C, *et al.* Plan integral de obesidad infantil de Andalucía 207-2012. Junta de Andalucía, Consejería de Salud. 2006.
- Martos-Moreno GA, Chowen JA, Argente J. Metabolic signals in human puberty: effects of over and undernutrition. *Mol Cell Endocrinol* 2010; 324:70-81.
- Masuzaki H, Paterson J, Shinyama H, Morton NM, Mullins JJ, Seckl JR, *et al.* A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science* 2001; 294:2166–2170.
- Mattevi VS, Zembruški VM, Hutz MH. Association analysis of genes involved in the leptin-signaling pathway with obesity in Brazil. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002; 26:1179–1185.
- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28:412-419.
- McCarthy MI. Genomics, type 2 diabetes, and obesity. *N Engl J Med* 2010; 363:2339-2350.
- Mei H, Chen W, Srinivasan SR, Jiang F, Schork N, Murray S, *et al.* FTO influences on longitudinal BMI over childhood and adulthood and modulation on relationship between birth weight and longitudinal BMI. *Hum Genet* 2010; 128:589-596.
- Mericq V, Medina P, Kakarieka E, Márquez L, Johnson MC, Iñiguez G. Differences in expression and activity of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and 2 in human placentas of term pregnancies according to birth weight and gender. *Eur J Endocrinol* 2009; 161:419-425.
- Meyre D, Proulx K, Kawagoe-Takaki H, Vatin V, Gutiérrez-Aguilar R, Lyon D, *et al.* Prevalence of loss-of-function FTO mutations in lean and obese individuals. *Diabetes* 2010; 59:311-318.
- Ministerio de Sanidad y Consumo. Encuesta Nacional de Salud de España 2006: avance de resultados junio 2006-enero 2007. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo; 2007. Disponible en: <http://www.msc.es/estadEstudios/estadisticas/encuestaNacional/encuesta2006.htm>
- Misra A, Vikram NK. Clinical and pathophysiological consequences of abdominal adiposity and abdominal adipose tissue depots. *Nutrition* 2003; 19:457-466.
- Misra A. Risk factors for atherosclerosis in young individuals. *J Cardiovasc Risk* 2000; 7: 215.
- Mita H, Tsutsui J, Takekawa M, Witten EA, Saito H. Regulation of MTK1/MEKK4 kinase activity by its N-terminal autoinhibitory domain and GADD45 binding. *Mol Cell Biol* 2002; 22:4544–4555.
- Miyamoto Y, Morisaki H, Yamanaka I, Kokubo Y, Masuzaki H, Okayama A, *et al.* Association study of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 gene polymorphisms and metabolic syndrome in urban Japanese cohort. *Diabetes Res Clin Pract* 2009; 85:132-138.

- Mizote I, Yamaguchi O, Hikoso S, Takeda T, Taneike M, Oka T, *et al.* Activation of MTK1/MEKK4 induces cardiomyocyte death and heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2010; 48:302-309.
- Morales MA, Carvajal CA, Ortiz E, Mosso LM, Artigas RA, Owen GI, *et al.* Possible pathogenetic role of 11-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11HSD1) gene polymorphisms in arterial hypertension. *Rev Med Chil* 2008; 136:701–710.
- Morton NM, Holmes MC, Fievet C, Staels B, Tailleux A, Mullins JJ, *et al.* Improved lipid and lipoprotein profile, hepatic insulin sensitivity, and glucose tolerance in 11-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 null mice. *J Biol Chem* 2001; 276:41293–41300.
- Morton NM, Paterson JM, Masuzaki H, Holmes MC, Staels B, Fievet C, *et al.* Novel adipose tissue-mediated resistance to diet-induced visceral obesity in 11-hydroxysteroid dehydrogenase type 1-deficient mice. *Diabetes* 2004; 53:931–938.
- Morton NM. Obesity and corticosteroids: 11beta-hydroxysteroid type 1 as a cause and therapeutic target in metabolic disease. *Mol Cell Endocrinol* 2010; 316:154-164.
- Mottagui-Tabar S, Prince JA, Wahlestedt C, Zhu G, Goldman D, *et al.* A novel single nucleotide polymorphism of the neuropeptide Y (NPY) gene associated with alcohol dependence. *Alcohol Clin Exp Res* 2005; 29:702-707.
- Müller TD, Hinney A, Scherag A, Nguyen TT, Schreiner F, Schäfer H, *et al.* 'Fat mass and obesity associated' gene (FTO): no significant association of variant rs9939609 with weight loss in a lifestyle intervention and lipid metabolism markers in German obese children and adolescents. *BMC Med Genet* 2008; 9:85.
- Nair S, Lee YH, Lindsay RS, Walker BR, Tataranni PA, Bogardus C, Baier LJ, Permana PA. 11-Hydroxysteroid dehydrogenase type 1: genetic polymorphisms are associated with type 2 diabetes in Pima Indians independently of obesity and expression in adipocyte and muscle. *Diabetologia* 2004; 47:1088–1095.
- National Cholesterol Education Program. Report of the Expert Panel on Blood Cholesterol Levels in Children and Adolescents. Bethesda, Md.: National Heart, Lung, and Blood Institute, September 1991. (NIH publication no. 91-2732.)
- National High Blood Pressure Education Program Working Group on Hypertension Control in Children and Adolescents. Update on the 1987 Task Force Report on High Blood Pressure in Children and Adolescents: a working group report from the National High Blood Pressure Education Program. *Pediatrics* 1996; 98:649-658.
- Nelson RA, Bremer AA. Insulin resistance and metabolic syndrome in the pediatric population. *Metab Syndr Relat Disord.* 2010; 8:1-14.
- NGHS Coordinating Center. NHLBI Growth and Health Study (NGHS) data monitoring report. Baltimore: Maryland Medical Research, 1998.
- Nguyen AD, Herzog H, Sainsbury A. Neuropeptide Y and peptide YY: important regulators of energy metabolism. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2011; 18:56-60.
- Niskanen L, Karvonen MK, Valve R, Koulu M, Pesonen U, Mercuri M, *et al.* Leucine 7 to proline 7 polymorphism in the neuropeptide Y gene is associated with enhanced carotid atherosclerosis in elderly patients with type 2 diabetes and control subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:2266–2269.

- Nordman S, Ding B, Ostenson CG, Kärvestedt L, Brismar K, Efendic S, *et al.* Leu7Pro polymorphism in the neuropeptide Y (NPY) gene is associated with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes in Swedish men. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2005; 113:282-287.
- O'Rahilly S, Farooqi IS. Genetics of obesity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2006; 361:1095-1105
- Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol* 2011; 11:85-97.
- Pandur S, Pankiv S, Johannessen M, Moens U, Huseby NE. Gamma-glutamyltransferase is upregulated after oxidative stress through the Ras signal transduction pathway in rat colon carcinoma cells. *Free Radic Res* 2007; 41:1376-1384.
- Paulmyer-Lacroix O, Boullu S, Oliver C, Alessi MC, Grino M. Expression of the mRNA coding for 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in adipose tissue from obese patients: an in situ hybridization study. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:2701–2705.
- Paulsen SK, Pedersen SB, Fisker S, Richelsen B. 11Beta-HSD type 1 expression in human adipose tissue: impact of gender, obesity, and fat localization. *Obesity* 2007; 15:1954–1960.
- Pausova Z, Syme C, Abrahamowicz M, Xiao Y, Leonard GT, Perron M, *et al.* A common variant of the FTO gene is associated with not only increased adiposity but also elevated blood pressure in French Canadians. *Circ Cardiovasc Genet* 2009; 2:260–269.
- Pesonen U. Human NPY gene variants in cardiovascular and metabolic diseases. *Exs* 2006; 95: 247–267.
- Pettersson-Fernholm K, Karvonen MK, Kallio J, Forsblom CM, Koulu M, Pesonen U, *et al.* Leucine 7 to proline 7 polymorphism in the preproneuropeptide Y is associated with proteinuria, coronary heart disease, and glycemic control in type 1 diabetic patients. *Diabetes Care* 2004; 27:503–509.
- Pihlajamaki J, Karhapaa P, Vauhkonen I, Kekalainen P, Kareinen A, Viitanen L, *et al.* The Leu7Pro polymorphism of the neuropeptide Y gene regulates free fatty acid metabolism. *Metabolism* 2003; 52:643–646.
- Preventing chronic diseases: A vital investment. World Global Report. Geneva: World Health Organization; 2005.
- Rabe K, Lahrke M, Parhofer K, Broedl U C. Adipokines and insulin resistance. *Mol Med* 2008; 14:741-751.
- Rankinen T, Zuberi A, Chagnon Y C, Weisnagel SJ, Argyropoulos G, Walts B, Perusse L, Bouchard C. The human obesity gene map: the 2005 update. *Obes Res* 2006; 14:529-644.
- Rask E, Olsson T, Söderberg S, Andrew R, Livingstone DE, Johnson O, *et al.* Tissue-specific dysregulation of cortisol metabolism in human obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:1418–1421.
- Reaven GM. Metabolic Syndrome: Definition, relationship to insulin resistance, and clinical utility. En: Shils ME (ed) *Modern Nutrition in Health and Disease*. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, Pennsylvania, EEUU, 2006, pp 1004-1012.

- Reinehr T, de Sousa G, Toschke AM, Andler W. Comparison of metabolic syndrome prevalence using eight different definitions: a critical approach. *Arch Dis Child* 2007; 92:1067-1072.
- Ruiz JR, Labayen I, Ortega FB, Legry V, Moreno LA, Dallongeville J, *et al.* Attenuation of the effect of the FTO rs9939609 polymorphism on total and central body fat by physical activity in adolescents: the HELENA study. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2010; 164:328-333.
- Rutters F, Nieuwenhuizen AG, Bouwman F, Mariman E, Westerterp-Plantenga MS. Associations between a Single Nucleotide Polymorphism of the FTO Gene (rs9939609) and Obesity-Related Characteristics over Time during Puberty in a Dutch Children Cohort. *J Clin Endocrinol Metab.* doi:10.1210/jc.2010-2413
- Sainsbury A, Rohner-Jeanrenaud F, Cusin I, Zakrzewska KE, Halban PA, Gaillard RC, *et al.* Chronic central neuropeptide Y infusion in normal rats: status of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis, and vagal mediation of hyperinsulinaemia. *Diabetologia* 1997; 40:1269–1277.
- Salehi M, Ferenczi A, Zumoff B. Obesity and Cortisol Status. *Horm Metab Res.* 2005; 37:193-197.
- Salminen M, Lehtimäki T, Fan YM, Vahlberg T, Kivela SL. Leucine 7 to proline 7 polymorphism in the neuropeptide Y gene and changes in serum lipids during a family-based counselling intervention among school-aged children with a family history of CVD. *Public Health Nutr* 2008; 11:1156–1162.
- Sandeep TC, Andrew R, Homer NZ, Andrews RC, Smith K, Walker BR. Increased in vivo regeneration of cortisol in adipose tissue in human obesity and effects of the 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitor carbenoxolone. *Diabetes* 2005; 54:872–879.
- Schuerch L, Linder LM, Grouzmann E, Haefeli WE. Human neuropeptide Y potentiates alpha-1 adrenergic blood pressure responses in vivo. *Am J Physiol* 1998; 275:H760–766.
- Schuster DP. Changes in physiology with increasing fat mass. *Semin Pediatr Surg* 2009; 18:126-35.
- Schwartz MW, Morton GJ. Obesity: keeping hunger at bay. *Nature* 2002; 418:595-597.
- Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control and food intake. *Nature* 2000; 404:661-671.
- Scott LJ, Mohlke KL, Bonnycastle LL, Willer CJ, Li Y, Duren WL, Erdos MR, *et al.* A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. *Science* 2007; 316:1341–1345.
- Scuteri A, Sanna S, Chen WM, Uda M, Albai G, Strait J, *et al.* Genome-wide association scan shows genetic variants in the FTO gene are associated with obesity-related traits. *PLoS Genet* 2007; 3:e115.
- Serra Majem L, Ribas Barba L, Aranceta Bartrina J, Pérez Rodrigo C, Saavedra Santana P. Epidemiología de la obesidad infantil en España. Resultados del estudio enKid (1998-200). Ed Masson, 2001:81-108.
- Shah SH, Freedman NJ, Zhang L, Crosslin DR, Stone DH, Haynes C, *et al.* Neuropeptide Y gene polymorphisms confer risk of early-onset atherosclerosis. *PLoS Genet* 2009; 5:e1000318.

- Shen J, Sakaida I, Uchida K, Terai S, Okita K. Leptin enhances TNF- α production via p38 and JNK MAPK in LPS-stimulated Kupffer cells. *Life Sci* 2005; 77:1502–1515
- Shin HJ, Oh J, Kang SM, Lee JH, Shin MJ, Hwang KC, *et al.* Leptin induces hypertrophy via p38 mitogen-activated protein kinase in rat vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res Commun* 2005; 329:18–24
- Simonyte K, Rask E, Näslund I, Angelhed JE, Lönn L, Olsson T, *et al.* Obesity is accompanied by disturbances in peripheral glucocorticoid metabolism and changes in FA recycling. *Obesity* 2009; 17:1982-7.
- Smith U, Andersson Ch, Gustafson B, Hammarstedt A, Isakson P, Wallerstedt E. Adipokines, systemic inflammation and inflamed adipose tissue in obesity and insulin resistance. *International Congress Series* 2007; 1303:31-34.
- Sniderman AD, Faraj M. Apolipoprotein B, apolipoprotein A-I, insulin resistance and the metabolic syndrome. *Curr Opin Lipidol* 2007; 18:633-637.
- Speliotes EK, Willer CJ, Berndt SI, Monda KL, Thorleifsson G, Jackson AU, *et al.* Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. *Nat Genet* 2010; 42:937-948.
- Staab CA, Maser E. 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is an important regulator at the interface of obesity and inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010; 119:56-72.
- Staab CA, Stegk JP, Haenisch S, Neiß E, Köbsch K, Ebert B, *et al.* Analysis of alternative promoter usage in expression of HSD11B1 including the development of a transcript-specific quantitative real-time PCR method. *Chem Biol Interact.* 2011 doi: 10.1016/j.cbi.2010.12.027
- Stanley BG, Kyrkouli SE, Lampert S, Leibowitz SF. Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. *Peptides* 1986; 7:1189–1192.
- Stewart PM, Boulton A, Kumar S, Clark PMS, Shackleton CHL. Cortisol metabolism in human obesity: impaired cortisone - cortisol conversion in subjects with central adiposity. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:1022–1027.
- Stewart PM, Krozowski ZS. 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase. *Vitam Horm* 1999; 57:249-324.
- Strack AM, Sawyer WB, Hughes JH, Platt KB, Loewy AD. A general pattern of CNS innervation of the sympathetic outflow demonstrated by transneuronal pseudorabies viral infections. *Brain Res* 1989; 491:156–162.
- Stratigopoulos G, Padilla SL, LeDuc CA, Watson E, Hattersley AT, McCarthy MI, *et al.* Regulation of Fto/Ftm gene expression in mice and humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008; 294:R1185–R1196.
- Sweeting HN. Measurement and definitions of obesity in childhood and adolescence: a field guide for the uninitiated. *Nutr J* 2007; 6:32.
- Swenson TL. The role of the cholesteryl ester transfer protein in lipoprotein metabolism. *Diabetes Metab Rev* 1991; 7:139-153.
- Taylor AM, Peeters PH, Norat T, Vineis P, Romaguera D. An update on the prevalence of the metabolic syndrome in children and adolescents. *Int J Pediatr Obes* 2010; 5:202-213.

- Takekawa M, Posas F, Saito HA. human homolog of the yeast Ssk2/Ssk22 MAP kinase kinase kinases, MTK1, mediates stress-induced activation of the p38 and JNK pathways. *EMBO J* 1997; 16:4973–4982.
- Tanner JM. *Growth at Adolescence: with a General Consideration of the Effects of Hereditary and Environmental Factors upon Growth and maturation from Birth to Maturity*, 2^{en} ed. Oxford, UK: Blackwell Scientific, 1962.
- Task Force on Blood Pressure Control in Children. Report of the Second Task Force on Blood Pressure Control in children-1987. *Pediatrics* 1987; 79:1-25.
- Ten S, Maclaren N. Insulin resistance syndrome in children. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:2526-2539.
- The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1999; 22:Suppl 1:S5-S19.
- The Fourth Report on the Diagnosis, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure in Children and Adolescents. National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Children and Adolescents, 2004.
- The Lipid Research Clinics Program Epidemiology Committee. Plasma lipid distributions in selected North Am populations: the Lipid Research Clinics Program Prevalence Study. *Circulation* 1979; 60:427-39.
- Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III) Public-Use Data Files. Atlanta: National Center for Health Statistics, 1994. www.cdc.gov/nchs/products/elec_prods/subject/nhanes3.htm. (accedido 5 Oct 2008).
- Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III): Final Report. Bethesda, Md: National Heart, Lung, and Blood Institute. 2002. (Accedido October 10, 2008 at <http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/cholesterol/atp3full.pdf>)
- Trayhurn P, Wood IS. Horizons in Nutritional Science Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 2004; 92:347-355.
- Tuncman G, Hirosumi J, Solinas G, Chang L, Karin M, Hotamisligil GS. Functional in vivo interactions between JNK1 and JNK2 isoforms in obesity and insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006; 103:10741–10746.
- Ukkola O, Kesaniemi YA. Leu7Pro polymorphism of PreproNPY associated with an increased risk for type II diabetes in middle-aged subjects. *Eur J Clin Nutr* 2007; 61: 1102–1105.
- Unger RH, Zhou YT. Lipotoxicity of beta-cells in obesity and in other causes of fatty acid spillover. *Diabetes* 2001;50 Suppl 1:S118-121.
- Update on the 1987 Task Force Report on High Blood Pressure in Children and Adolescents: a working group report from the National High Blood Pressure Education Program. *Pediatrics* 1996; 98:649-658.
- Valassi E, Scacchi M, Cavagnini F. Neuroendocrine control of food intake. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2008; 18:158-168.

- van den Brink GR, O'Toole T, Hardwick JC, van den Boogaardt DE, Versteeg HH, van Deventer HH, *et al.* Leptin signaling in human peripheral blood mononuclear cells, activation of p38 and p42/44 mitogen-activated protein (MAP) kinase and p70 S6 kinase. *Mol. Cell Biol. Res. Commun* 2000; 4:144–150.
- van den Hoek AM, van Heijningen C, Schröder-van der Elst JP, Ouwens DM, Havekes LM, Romijn JA, *et al.* Intracerebroventricular administration of neuropeptide Y induces hepatic insulin resistance via sympathetic innervation. *Diabetes* 2008; 57:2304-2310.
- Van der Sluis, de Ridder MA, Boot AM, Krenning EP, de Muinck Keizer-Schrama SM. Reference data for bone density and body composition measured with dual energy X ray absorptiometry in white children and young adults. *Arch. Dis Child* 2002; 87:341–347
- Van Gaal LC, Mertens IL, De Block Ch E. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature* 2006; 444:875-880.
- van Rossum CT, Pijl H, Adan RA, Hoebee B, Seidell JC. Polymorphisms in the NPY and AGRP genes and body fatness in Dutch adults. *Int J Obes (Lond)* 2006; 30:1522–1528.
- Vettor R, Fabris R, Pagano C, Federspil G. Neuroendocrine. Regulation of eating behaviour. *J Endocrinol Invest* 2002; 25:836-854.
- Vettor R, Zarjevski N, Cusin I, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B. Induction and reversibility of an obesity syndrome by intracerebroventricular neuropeptide Y administration to normal rats. *Diabetologia* 1994; 37:1202–1208.
- Vinner RM, Segal TY, Lichtarowicz-Krynska E, Hidmarsh P. Prevalence of the insulin resistance syndrome in obesity. *Arch Dis Child* 2005; 90:10-14.
- Weiss R, Dziura J, Burgert T, Tanborlane W, Taksali S, Yeckel C, *et al.* Obesity and metabolic syndrome in children and adolescents. *N Engl J Med* 2004; 350:2362-2374.
- Wells JC. Sexual dimorphism of body composition. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol Metab* 2007; 21:415-4430.
- WHO. Global Strategy on Diet, Physical Activity and Health. Childhood overweight and obesity. <http://www.who.int/dietphysicalactivity/childhood/en/index.html> accedido Feb. 5 de 2011.
- Wiegand S, Richardt A, Remer T, Wudy SA, Tomlinson JW, Hughes B, *et al.* Reduced 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity in obese boys. *Eur J Endocrinol* 2007; 157:319-324.
- Willer CJ, Speliotes EK, Loos RJ, Li S, Lindgren CM, Heid IM, *et al.* Genetic Investigation of ANthropometric Traits Consortium. Six new loci associated with body mass index highlight a neuronal influence on body weight regulation. *Nat Genet* 2009; 41:25-34.
- Wing MR, Ziegler J, Langefeld CD, Ng MC, Haffner SM, Norris JM, *et al.* Analysis of FTO gene variants with measures of obesity and glucose homeostasis in the IRAS Family Study. *Hum Genet* 2009; 125:615–626.
- Wolak ML, DeJoseph MR, Cator AD, Mokashi AS, Brownfield MS, Urban JH. Comparative distribution of neuropeptide Y Y1 and Y5 receptors in the rat brain by using immunohistochemistry. *J Comp Neurol* 2003; 464:285–311.

- Wu Q, Saunders RA, Szkudlarek-Mikho M, Serna Ide L, Chin KV. The obesity-associated Fto gene is a transcriptional coactivator. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 401:390–395.
- Xing M. Genetic alterations in the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway in thyroid cancer. *Thyroid* 2010; 20:697-706.
- Xu B, Dube GM, Kalra PS, Farmerie WG, Kaibara A, Moldawer LL, *et al.* Anorectic effects of the cytokine, ciliary neurotropic factor, are mediated by hypothalamic neuropeptide Y: comparison with leptin. *Endocrinology* 1998; 139:466-673.
- Yajnik CS, Janipalli CS, Bhaskar S, Kulkarni SR, Freathy RM, Prakash S, *et al.* FTO gene variants are strongly associated with type 2 diabetes in South Asian Indians. *Diabetologia* 2009; 52:247–252.
- Yu JT, Yu NN, Gao SS, Song JH, Ma T, Wang ND, *et al.* Neuropeptide Y polymorphisms and ischemic stroke in Chinese population. *Clin Chim Acta* 2010; 411:242-245.
- Zhang G, Karns R, Narancic NS, Sun G, Cheng H, Missoni S, *et al.* Common SNPs in FTO gene are associated with obesity related anthropometric traits in an island population from the eastern Adriatic coast of Croatia. *PLoS One* 2010; 5:e10375.
- Zhang Y, Thompson AM, Tong W, Xu T, Chen J, Zhao L, *et al.* Biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction and risk of hypertension among Inner Mongolians in China. *J Hypertens* 2010; 28:35-40.
- Zhao J, Bradfield JP, Li M, Wang K, Zhang H, Kim CE, *et al.* The role of obesity-associated loci identified in genome-wide association studies in the determination of pediatric BMI. *Obesity (Silver Spring)* 2009; 17:2254-2257.
- Zhu S, Wang Z, Heshka S, Heo M, Faith MS, Heymsfield SB. Waist circumference and obesity associated risk factors among whites in the third National Health and Nutrition Examination Survey: clinical action thresholds. *Am J Clin Nutr* 2002; 76:743-749.
- Zimmet P, Alberti K, Kuafman F, Tajima N, Silink M, Arslanian S, *et al.* The metabolic syndrome in children and adolescents - an IDF consensus report. *Pediatr Diabetes* 2007; 8:299-306.

Anexos



Abreviaturas

- 11 β -HSD1: 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1
- AGL: ácidos grasos libres
- AGRP: proteína similar a agouti
- ALT: alanina transamina
- AMP-K: adenosin monofosfato-quinasa
- ANGPTL2: proteína relacionada con la angiopietina 2
- AP-1: activador de la proteína 1
- apo AI: apolipoproteína AI
- apo B: apolipoproteína B
- ARC: núcleo arqueado
- ASK1 o MAPKKK5: quinasa reguladora de la señal de la apoptosis 1
- AST: aspartato transaminasa
- CART: transcrito regulado por cocaína y anfetaminas
- CC: circunferencia de cintura
- CCL2: quimiocina del ligando 2 del motif C-C
- CETP: proteína transferidora de ésteres de colesterol
- CNTF: factor neurotrófico ciliar
- CRH: hormona liberadora de corticotropina
- CXCL5: quimiocina CXC 5
- DL: desequilibrio de ligamiento
- DM: diabetes mellitus
- ECA: enzima convertidora de angiotensina
- ECV: enfermedades cardiovasculares
- EHGNA: enfermedad hepática grasa no alcohólica
- ERK: quinasa reguladora de señales extracelulares
- GADD45: proteínas de detención de crecimiento y lesión del ADN-similares
- GGT: gamma glutamil transpeptidasa
- GLUT-4: transportador de glucosa-4
- GSK3 β : proteínas inhibitorias y glucógeno sintasa quinasa 3 beta
- GWAS: estudios amplios de asociación del genoma humano

HDL: lipoproteínas de alta densidad
HGF: factor de crecimiento de hepatocitos
HOMA-IR: *Homeostasis Model Assesment of insulin resistance*
HSL: lipasa sensible a las hormonas
HW: equilibrio de Hardy-Weinberg
IC: intervalo de confianza
IDF: Federación Internacional de Diabetes
IKK: inhibidor de la k quinasa
IL: interleuquina
IMC: índice de masa corporal
IRF: factor regulador del interferon
IRS-1: receptor de sustrato de la insulina 1
JNK: quinasa c-Jun N-terminal
LDL: lipoproteínas de baja densidad
LDL-ox: lipoproteínas de baja densidad oxidadas
LHA: área hipotalámica lateral
LXR: receptor X del hígado
MAPK: MAP quinasa
MAPKK, MKK o MEK: MAP quinasa quinasa
MAPKKK o MEKK: MAP quinasa quinasa quinasa
MCH: hormona concentradora de melanina
MCP-1: proteína quimiotáctica de los monocitos 1
MLK: quinasas de linaje mixto
MMP-9: metaloproteínasa-9 de la matriz extracelular
MPO: mieloperoxidasa
mTOR: blanco de la rapamicina en los mamíferos
NAMPT: nicotinamida fosforibosiltransferasa o Visfatina
NCBI: *National Center for Biotechnology Information*
NCEP ATP: *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel*
NFκB: factor nuclear kappa B
NGF: factor de crecimiento nervioso
NO: óxido nítrico

NPY: neuropeptido Y
OR: *odds ratio*
PAI-1: activador del inhibidor del plasminógeno
PCR: proteína C reactiva
PFA: área perifornical
PKC: proteína quinasa-C
PKC θ : proteína quinasa C θ
PKR: la proteína quinasa R
POMC: pro-opiomelanocortina
PPAR: receptor activado de proliferadores de los peroxisomas
PVN: núcleo paraventricular
PYY: polipéptido pancreático YY
QLT: rasgo cuantitativo
QUICKI: *Quantitative Insulin Sensitivity Check Index*
RBP4: proteína enlazadora de retinol 4
ROS: especies reactivas de oxígeno
RTK: receptor de tirosina quinasa
S6K: proteína S6 quinasa
SAPE: estreptavidina-ficoeritrina
SFRP5: proteínas secretadas rizado relacionadas 5
sICAM-1: molécula de adhesión intracelular soluble
SM: síndrome metabólico
SNP: polimorfismos de nucleótido simple
SNS: sistema nervioso simpático
SRAA: sistema renina-angiotensina-aldosterona
sVCAM-1: la molécula de adhesión vascular soluble
Tag SNP: : polimorfismos de nucleótido simple etiquetador
TAG: triacilgliceroles
TAO: mil y un aminoácido quinasa
TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa
TRAF4: receptor del TNF asociado al factor 4
TRH: hormona liberadora de tirotrópina

VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad

Anexo 1

Listado de polimorfismos analizados en el estudio.

GEN	SNP	Cromosoma	TIPO
ABCC8	rs3758953	11	PRO
ABCC8	rs2188966	11	PRO
ABCC8	rs757110	11	NS
ABCC8	rs28936371	11	NS
ABCC8	rs4148619	11	NS
ABCC8	rs1048095	11	NS
ABCC8	rs1048098	11	NS
ABCC8	rs10400391	11	NS
ABCC8	rs6486370	11	TAG
ABCC8	rs4148618	11	TAG
ABCC8	rs10766398	11	TAG
ABCC8	rs11024284	11	TAG
ABCC8	rs2299641	11	TAG
ABCC8	rs2073583	11	TAG
ABCC8	rs2077655	11	TAG
ABCC8	rs4148638	11	TAG
ABCC8	rs12293803	11	TAG
ABCC8	rs4148626	11	TAG
ABCC8	rs2074311	11	TAG
ABCC8	rs722341	11	TAG
ABCC8	rs2283255	11	TAG
ABCC8	rs2355017	11	TAG
ABCC8	rs1799854	11	TAG
ABCC8	rs1048099	11	TAG
ABCC8	rs2299639	11	TAG
ABCC8	rs11024300	11	TAG
ABCC8	rs7106053	11	TAG
ABCC8	rs2074308	11	TAG
ABCG5	rs11887534	2	PRO
ABCG5	rs3806471	2	PRO
ABCG5	rs3806470	2	PRO
ABCG5	rs6720173	2	NS
ABCG5	rs17031672	2	NS
ABCG5	rs4076029	2	NS
ABCG5	rs6756629	2	NS
ABCG5	rs1864815	2	TAG
ABCG5	rs4148188	2	TAG
ABCG5	rs4148193	2	TAG
ABCG5	rs4148189	2	TAG
ABCG5	rs4953020	2	TAG
ABCG5	rs17031664	2	TAG
ACAA2	rs9967237	18	PRO
ACAA2	rs11549285	18	NS
ACAA2	rs11549282	18	NS

ACAA2	rs11549021	18	PRO
ACAA2	rs2678716	18	TAG
ACAA2	rs7237253	18	TAG
ACAA2	rs617619	18	TAG
ACAA2	rs7506023	18	TAG
ACAA2	rs2276168	18	TAG
ACAA2	rs3927785	18	TAG
ACAA2	rs1942421	18	TAG
ACAA2	rs2298630	18	TAG
ADIPOQ=ACDC	rs16861194	3	PRO
ADIPOQ=ACDC	rs17366743	3	NS
ADIPOQ=ACDC	rs13061862	3	NS
ADIPOQ=ACDC	rs2241767	3	TAG
ADIPOQ=ACDC	rs3774261	3	TAG
ADIPOQ=ACDC	rs822394	3	TAG
ADIPOQ=ACDC	rs1501299	3	TAG
ADIPOQ=ACDC	rs7649121	3	TAG
ADIPOQ=ACDC	rs16861210	3	TAG
ADIPOQ=ACDC	rs822391	3	TAG
ADIPOQ=ACDC	rs17366568	3	TAG
ADIPOQ=ACDC	rs3821799	3	TAG
ADIPOQ=ACDC	rs182052	3	TAG
ADIPOQ=ACDC	rs12495941	3	TAG
ADIPOR1	rs12072660	1	NS
ADIPOR1	rs10494839	1	TAG
ADIPOR1	rs2275737	1	TAG
ADIPOR1	rs16850799	1	TAG
ADIPOR1	rs7539542	1	TAG
ADIPOR1	rs10753929	1	TAG
ADIPOR1	rs12733285	1	TAG
ADIPOR2	rs1029629	12	PRO
ADIPOR2	rs12298275	12	NS
ADIPOR2	rs12578449	12	NS
ADIPOR2	rs10773982	12	TAG
ADIPOR2	rs6489326	12	TAG
ADIPOR2	rs7132184	12	TAG
ADIPOR2	rs11061973	12	TAG
ADIPOR2	rs11061946	12	TAG
ADIPOR2	rs2058035	12	TAG
ADIPOR2	rs12826079	12	TAG
ADIPOR2	rs1044471	12	TAG
ADIPOR2	rs10773983	12	TAG
ADIPOR2	rs7975600	12	TAG
ADRB2	rs17778257	5	PRO
ADRB2	rs2895795	5	PRO
ADRB2	rs2400707	5	PRO
ADRB2	rs2053044	5	PRO
ADRB2	rs12654778	5	PRO

ADRB2	rs11168070	5	PRO
ADRB2	rs1800888	5	NS
ADRB2	rs3729943	5	NS
ADRB2	rs1042719	5	TAG
ADRB3	rs4994	8	NS
AGRP	rs5030980	16	NS
AGT	rs1805090	1	NS
AGT	rs17856352	1	NS
AGT	rs699	1	NS
AGT	rs5041	1	NS
AGT	rs4762	1	NS
AGT	rs2229389	1	NS
AGT	rs5039	1	NS
AGT	rs5049	1	PRO
AGT	rs5046	1	PRO
AGT	rs2071405	1	PRO
AGT	rs2071404	1	PRO
AGT	rs11122580	1	PRO
AGT	rs2493135	1	PRO
AGT	rs2493136	1	PRO
AGT	rs5050	1	PRO
AGT	rs1926723	1	TAG
AGT	rs2493133	1	TAG
AGT	rs6687360	1	TAG
AGT	rs3789678	1	TAG
AGT	rs2478545	1	TAG
AGT	rs2478523	1	TAG
AGT	rs2493132	1	TAG
AGT	rs11568054	1	TAG
AGT	rs7079	1	TAG
AGT	rs2004776	1	TAG
AKT2	rs3730051	19	TAG
AKT2	rs11671439	19	TAG
AKT2	rs16974157	19	TAG
AKT2	rs12460555	19	TAG
AKT2	rs1991823	19	TAG
ANXA1	rs11557056	9	NS
ANXA1	rs11557052	9	NS
ANXA1	rs2310312	9	PRO
ANXA1	rs2795108	9	PRO
ANXA1	rs1050305	9	TAG
ANXA1	rs4301502	9	TAG
ANXA1	rs2795117	9	TAG
ANXA1	rs10869229	9	TAG
ANXA1	rs1342017	9	TAG
ANXA1	rs1342018	9	TAG
ANXA1	rs2795112	9	TAG
ANXA1	rs10512015	9	TAG

APLN	rs909657	X	TAG
APLN	rs2235306	X	TAG
APOE	rs28931576	19	NS
APOE	rs11083750	19	NS
APOE	rs405509	19	PRO
APPL	rs4381906	3	NS
APPL	rs11544593	3	NS
APPL	rs3806622	3	PRO
APPL	rs4640525	3	TAG
APPL	rs1913302	3	TAG
AQP7	rs4008659	9	NS
AQP7	rs2381002	9	NS
AQP7	rs3758268	9	PRO
AQP7	rs590111	9	TAG
AQP7	rs17251987	9	TAG
ARRB1	rs1789681	11	TAG
ARRB1	rs504683	11	TAG
ARRB1	rs501372	11	TAG
ARRB1	rs643523	11	TAG
ARRB1	rs546812	11	TAG
ARRB1	rs611908	11	TAG
ARRB1	rs490528	11	TAG
ARRB1	rs553664	11	TAG
ARRB1	rs2510894	11	TAG
ARRB1	rs2276310	11	TAG
ARRB1	rs529513	11	TAG
ARRB1	rs685929	11	TAG
ARRB1	rs746168	11	TAG
ARRB1	rs7929974	11	TAG
ARRB1	rs531793	11	TAG
ARRB1	rs576014	11	TAG
ARRB1	rs7127461	11	TAG
ARRB1	rs17133921	11	TAG
ARRB1	rs750465	11	TAG
ARRB1	rs528833	11	TAG
ARRB1	rs12797588	11	TAG
ARRB1	rs747221	11	TAG
ARRB1	rs687652	11	TAG
ARRB1	rs11602383	11	TAG
ARRB1	rs657561	11	TAG
ASAH1	rs17636067	8	NS
ASAH1	rs10103355	8	NS
ASAH1	rs2472205	8	NS
ASAH1	rs1049874	8	NS
ASAH1	rs12544854	8	NS
ASAH1	rs13263632	8	NS
ASAH1	rs7387252	8	PRO
ASAH1	rs12541181	8	TAG

ASAH1	rs2283120	8	TAG
ASAH1	rs17515264	8	TAG
ATP1A2	rs3761684	1	PRO
ATP1A2	rs3761685	1	PRO
ATP1A2	rs28716941	1	NS
ATP1A2	rs28933401	1	NS
ATP1A2	rs28933400	1	NS
ATP1A2	rs28933398	1	NS
ATP1A2	rs7548116	1	TAG
ATP1A2	rs6695366	1	TAG
BCKDHA	rs10853751	19	PRO
BCKDHA	rs12983789	19	PRO
BCKDHA	rs892044	19	PRO
BCKDHA	rs11549938	19	NS
BCKDHA	rs1473248	19	TAG
BCKDHA	rs11879090	19	TAG
BCKDHA	rs4803464	19	TAG
BDNF	rs1048221	11	NS
BDNF	rs6265	11	NS
BDNF	rs8192466	11	NS
BDNF	rs962369	11	TAG
BDNF	rs2049046	11	TAG
BDNF	rs11030107	11	TAG
BHMT2	rs642431	5	PRO
BHMT2	rs642934	5	PRO
BHMT2	rs644191	5	PRO
BHMT2	rs671960	5	TAG
BHMT2	rs670220	5	TAG
BHMT2	rs557302	5	TAG
C1QTNF5	rs9640	11	TAG
CALCRL	rs34010553	2	NS
CALCRL	rs698577	2	NS
CALCRL	rs858744	2	TAG
CALCRL	rs3815524	2	TAG
CALCRL	rs3771076	2	TAG
CALCRL	rs17463994	2	TAG
CALCRL	rs3755251	2	TAG
CALCRL	rs16829012	2	TAG
CALCRL	rs11887657	2	TAG
CAPN10	rs2975755	2	PRO
CAPN10	rs3749164	2	PRO
CAPN10	rs2975760	2	TAG
CAPN10	rs3792272	2	TAG
CAPN10	rs4234123	2	TAG
CAPN10	rs2975759	2	TAG
CAPN10	rs2975770	2	TAG
CAPN10	rs11680323	2	TAG
CAPN10	rs2953161	2	TAG

CARTTP	rs11544173	5	NS
CARTTP	rs12517689	5	NS
CARTTP	rs3763154	5	PRO
CARTTP	rs3763153	5	PRO
CARTTP	rs10515114	5	PRO
CARTTP	rs3857384	5	PRO
CARTTP	rs4991862	5	PRO
CARTTP	rs6894603	5	PRO
CARTTP	rs6894772	5	PRO
CARTTP	rs17358216	5	PRO
CARTTP	rs2239670	5	TAG
CCKAR	rs17846992	4	NS
CCKAR	rs2000978	4	TAG
CCKAR	rs2725307	4	TAG
CCKAR	rs7665027	4	TAG
CCKAR	rs915889	4	TAG
CCL18	rs1102934	17	PRO
CCL18	rs1967293	17	PRO
CCL18	rs2015070	17	TAG
CCL18	rs712042	17	TAG
CDH11	rs35145978	16	NS
CDH11	rs411127	16	NS
CDH11	rs35213	16	NS
CDH11	rs1130822	16	NS
CDH11	rs4424934	16	NS
CDH11	rs35195	16	NS
CDH11	rs7500476	16	TAG
CDH11	rs9930786	16	TAG
CDH11	rs7187376	16	TAG
CDH11	rs16968359	16	TAG
CDH11	rs16968496	16	TAG
CDH11	rs7498336	16	TAG
CDH11	rs1520237	16	TAG
CDH11	rs765771	16	TAG
CDH11	rs2088285	16	TAG
CDH11	rs17510737	16	TAG
CDH11	rs4967869	16	TAG
CDH11	rs11647738	16	TAG
CDH11	rs12598268	16	TAG
CDH11	rs16968480	16	TAG
CDH11	rs12445232	16	TAG
CDH11	rs12931204	16	TAG
CDH11	rs17431820	16	TAG
CEBPA	rs16967952	19	PRO
CEBPA	rs12691	19	TAG
CES1	rs2307227	16	NS
CES1	rs4784575	16	NS
CES1	rs5023780	16	NS

CES1	rs2307240	16	NS
CES1	rs3826192	16	NS
CES1	rs28563878	16	NS
CES1	rs12443580	16	TAG
CNTFR	rs3808873	9	PRO
CNTFR	rs3808871	9	PRO
CNTFR	rs2381162	9	TAG
CNTFR	rs2381165	9	TAG
CNTFR	rs10738931	9	TAG
CNTFR	rs12001648	9	TAG
CNTFR	rs10758268	9	TAG
CNTFR	rs3763615	9	TAG
CNTFR	rs7047619	9	TAG
CNTFR	rs2274592	9	TAG
CNTFR	rs12551429	9	TAG
CNTFR	rs4363285	9	TAG
CNTFR	rs6476455	9	TAG
CNTFR	rs1080750	9	TAG
CNTFR	rs6476454	9	TAG
CNTFR	rs3763613	9	TAG
CNTFR	rs16931623	9	TAG
COMMD7	rs2064933	20	TAG
COMMD7	rs2064936	20	TAG
COMMD7	rs4911252	20	TAG
COMT	rs6270	22	NS
COMT	rs5031015	22	NS
COMT	rs4680	22	NS
COMT	rs1800706	22	PRO
COMT	rs2020917	22	PRO
COMT	rs3810595	22	PRO
COMT	rs6269	22	PRO
COMT	rs933271	22	TAG
COMT	rs5993883	22	TAG
COMT	rs174696	22	TAG
COMT	rs9332377	22	TAG
COMT	rs740603	22	TAG
COMT	rs165774	22	TAG
COMT	rs4646316	22	TAG
CR1	rs7525160	1	PRO
CR1	rs3991747	1	NS
CR1	rs2274567	1	NS
CR1	rs3737002	1	NS
CR1	rs17259045	1	NS
CR1	rs17047660	1	NS
CR1	rs6691117	1	NS
CR1	rs2296160	1	NS
CR1	rs7542544	1	TAG
CR1	rs1986158	1	TAG

CR1	rs4274065	1	TAG
CR1	rs1831150	1	TAG
CR1	rs9429944	1	TAG
CR1	rs6701713	1	TAG
CR1	rs12567990	1	TAG
CR1	rs6661764	1	TAG
CR1	rs1887632	1	TAG
CRP	rs3093059	1	PRO
CRP	rs1130864	1	TAG
CRP	rs1800947	1	TAG
CRP	rs1205	1	TAG
CRYAB	rs1801966	11	NS
CRYAB	rs2234704	11	NS
CRYAB	rs11549440	11	NS
CRYAB	rs762550	11	PRO
CRYAB	rs2070894	11	TAG
CYP7A1	rs8192875	8	NS
CYP7A1	rs8192874	8	NS
CYP7A1	rs3808607	8	PRO
CYP7A1	rs3824260	8	PRO
CYP7A1	rs8192871	8	TAG
CYP11B2	rs1799998	8	PRO
CYP11B2	rs10087214	8	PRO
CYP11B2	rs11781082	8	PRO
CYP11B2	rs5317	8	NS
CYP11B2	rs4545	8	NS
CYP11B2	rs5315	8	NS
CYP11B2	rs28930074	8	NS
CYP11B2	rs4537	8	NS
CYP11B2	rs6414	8	TAG
CYP11B2	rs3097	8	TAG
CYP19A1	rs28757190	15	NS
CYP19A1	rs28757184	15	NS
CYP19A1	rs1803154	15	NS
CYP19A1	rs2236722	15	NS
CYP19A1	rs752760	15	PRO
CYP19A1	rs10046	15	TAG
CYP19A1	rs12050772	15	TAG
CYP19A1	rs17647719	15	TAG
CYP19A1	rs936308	15	TAG
CYP19A1	rs8029807	15	TAG
CYP19A1	rs2470150	15	TAG
CYP19A1	rs17601241	15	TAG
CYP19A1	rs1004982	15	TAG
CYP19A1	rs11070843	15	TAG
CYP19A1	rs2414099	15	TAG
CYP19A1	rs4545755	15	TAG
CYP19A1	rs17703883	15	TAG

CYP19A1	rs2899470	15	TAG
CYP19A1	rs2445762	15	TAG
CYP19A1	rs4646	15	TAG
CYP19A1	rs17523880	15	TAG
CYP19A1	rs1902584	15	TAG
CYP19A1	rs12591359	15	TAG
CYP19A1	rs7174997	15	TAG
CYP19A1	rs10519295	15	TAG
CYP19A1	rs10459592	15	TAG
CYP19A1	rs3751592	15	TAG
CYP19A1	rs2470152	15	TAG
DF	rs2230216	19	NS
DF	rs1683564	19	PRO
DF	rs3826945	19	TAG
DF	rs1683563	19	TAG
ENPP1	rs11539799	6	NS
ENPP1	rs1044498	6	NS
ENPP1	rs17847050	6	NS
ENPP1	rs1805138	6	NS
ENPP1	rs8192683	6	NS
ENPP1	rs1800949	6	PRO
ENPP1	rs1044582	6	TAG
ENPP1	rs6917903	6	TAG
ENPP1	rs9402345	6	TAG
ENPP1	rs6939185	6	TAG
ENPP1	rs7771841	6	TAG
ENPP1	rs858343	6	TAG
ENPP1	rs858341	6	TAG
ENPP1	rs7769712	6	TAG
ENPP1	rs12201710	6	TAG
ENPP1	rs858338	6	TAG
ENPP1	rs1409183	6	TAG
ENPP1	rs9402349	6	TAG
ENPP1	rs7767111	6	TAG
ENPP1	rs6569759	6	TAG
ENPP1	rs1409181	6	TAG
ENPP1	rs858339	6	TAG
ENPP1	rs7768480	6	TAG
ENPP1	rs943004	6	TAG
FABP2	rs1799883	4	NS
FABP2	rs6857641	4	PRO
FABP2	rs10034579	4	PRO
FABP2	rs1546503	4	TAG
FABP2	rs11724758	4	TAG
FADS1	rs17856235	11	NS
FADS1	rs11548149	11	NS
FADS1	rs174562	11	PRO
FADS1	rs174547	11	TAG

FASN	rs1140623	17	NS
FASN	rs11550612	17	NS
FASN	rs17848948	17	NS
FASN	rs1140617	17	NS
FASN	rs2228306	17	NS
FASN	rs2229426	17	NS
FASN	rs1140613	17	NS
FASN	rs4363911	17	NS
FASN	rs12946178	17	NS
FASN	rs17848929	17	NS
FASN	rs1140610	17	NS
FASN	rs1140606	17	NS
FASN	rs9905991	17	TAG
FASN	rs4502283	17	TAG
FASN	rs1140616	17	TAG
FOXO1A	rs4603422	13	TAG
FOXO1A	rs2701870	13	TAG
FOXO1A	rs4943794	13	TAG
FOXO1A	rs12865518	13	TAG
FOXO1A	rs2755217	13	TAG
FOXO1A	rs2951787	13	TAG
FOXO1A	rs9603776	13	TAG
FOXO1A	rs2984121	13	TAG
FOXO1A	rs2755209	13	TAG
FOXO1A	rs12876443	13	TAG
FOXO3A	rs11551770	6	NS
FOXO3A	rs4945816	6	PRO
FOXO3A	rs12202209	6	TAG
FOXO3A	rs1935952	6	TAG
FOXO3A	rs2802292	6	TAG
FOXO3A	rs10499051	6	TAG
FOXO3A	rs9480865	6	TAG
FOXO3A	rs13220810	6	TAG
FOXO3A	rs12212067	6	TAG
FOXO3A	rs12206094	6	TAG
FOXO3A	rs3800230	6	TAG
FRS2	rs12580717	12	NS
FRS2	rs17851899	12	NS
FRS2	rs221076	12	TAG
FRS2	rs800651	12	TAG
FRS2	rs473366	12	TAG
FRS2	rs221093	12	TAG
FRS2	rs11177719	12	TAG
FRS2	rs11177694	12	TAG
FTL	rs11553243	19	NS
FTL	rs11553207	19	NS
FTL	rs11553209	19	NS
FTL	rs11553216	19	NS

FTL	rs1803580	19	NS
FTL	rs1833783	19	Splice site
FTO	rs9939609	16	Articulo
FTO	rs9928094	16	Articulo
FTO	rs9930333	16	Articulo
FTO	rs16952624	16	NS
FTO	rs9935401	16	TAG
FTO	rs1136002	16	TAG
FTO	rs2075202	16	TAG
FTO	rs10521303	16	TAG
FTO	rs2540781	16	TAG
FTO	rs17818902	16	TAG
FTO	rs12932373	16	TAG
FTO	rs1008400	16	TAG
FTO	rs10852521	16	TAG
FTO	rs1125337	16	TAG
FTO	rs3826169	16	TAG
FTO	rs17833492	16	TAG
FTO	rs2111114	16	TAG
FTO	rs7203181	16	TAG
FTO	rs7194907	16	TAG
FTO	rs2689248	16	TAG
FTO	rs13334214	16	TAG
FTO	rs1861868	16	TAG
FTO	rs7194336	16	TAG
FTO	rs8044353	16	TAG
FTO	rs1558687	16	TAG
FTO	rs9929152	16	TAG
FTO	rs16952649	16	TAG
FTO	rs4784351	16	TAG
FTO	rs12596638	16	TAG
FTO	rs8056299	16	TAG
FTO	rs7205986	16	TAG
FTO	rs11643744	16	TAG
FTO	rs7203521	16	TAG
FTO	rs7194243	16	TAG
FTO	rs8061518	16	TAG
FTO	rs6499656	16	TAG
FTO	rs1558756	16	TAG
FTO	rs7199716	16	TAG
FTO	rs10852525	16	TAG
FTO	rs12445162	16	TAG
FTO	rs8053966	16	TAG
FTO	rs11075986	16	TAG
FTO	rs7190053	16	TAG
FTO	rs8054364	16	TAG
FTO	rs8049235	16	TAG
FTO	rs17225435	16	TAG

FTO	rs16952623	16	TAG
FTO	rs7200579	16	TAG
FTO	rs697771	16	TAG
FTO	rs7191513	16	TAG
FTO	rs8049933	16	TAG
FTO	rs2111113	16	TAG
GAD2	rs8190591	10	NS
GAD2	rs8190600	10	NS
GAD2	rs2839673	10	NS
GAD2	rs8190671	10	NS
GAD2	rs2839678	10	NS
GAD2	rs8190730	10	NS
GAD2	rs2839670	10	PRO
GAD2	rs1065239	10	PRO
GAD2	rs2236418	10	PRO
GAD2	rs7902107	10	TAG
GAD2	rs3781118	10	TAG
GAD2	rs8190775	10	TAG
GAD2	rs3781107	10	TAG
GAD2	rs8190645	10	TAG
GAD2	rs3781117	10	TAG
GAD2	rs12243037	10	TAG
GAD2	rs11015008	10	TAG
GAD2	rs17667367	10	TAG
GAD2	rs8190612	10	TAG
GAD2	rs11015025	10	TAG
GCG	rs5650	19	NS
GCG	rs35920035	19	NS
GCG	rs11552334	19	NS
GCG	rs11552338	19	NS
GFPT1	rs4592895		TAG
GFPT1	rs12473304	2	TAG
GFPT1	rs4625963	2	TAG
GHRHR	rs2302022	7	Splice site
GHRHR	rs4988496	7	NS
GHRHR	rs4988498	7	NS
GHRHR	rs10227922	7	NS
GHRHR	rs28371560	7	NS
GHRHR	rs2228078	7	NS
GHRHR	rs2075585	7	PRO
GHRHR	rs6954044	7	PRO
GHRHR	rs17159769	7	PRO
GHRHR	rs28371552	7	PRO
GHRHR	rs17159772	7	PRO
GHRHR	rs2302019	7	PRO
GHRHR	rs2741	7	TAG
GHRHR	rs3779249	7	TAG
GHRHR	rs4988494	7	TAG

GHRHR	rs4723038	7	TAG
GHRHR	rs2267723	7	TAG
GHRHR	rs4988505	7	TAG
GHRHR	rs11761979	7	TAG
GHRL	rs4684677	3	NS
GHRL	rs696217	3	NS
GHRL	rs34911341	3	NS
GHRL	rs27647	3	PRO
GHRL	rs35680	3	TAG
GHRL	rs26802	3	TAG
GPC4	rs1048369	X	NS
GPC4	rs1129980	X	NS
GPR24	rs11914085	22	NS
GPR24	rs133068	22	PRO
GPR24	rs3087592	22	TAG
GPR24	rs133074	22	TAG
GSK3A	rs35978177	19	NS
HLA-E	rs1264457	6	NS
HLA-E	rs11548295	6	NS
HLA-E	rs1264459	6	PRO
HMGCL	rs6424115	1	PRO
HMGCL	rs2256179	1	TAG
HMGCL	rs2076344	1	TAG
HMGCL	rs2076343	1	TAG
HSD11B1	rs9430012	1	TAG
HSD11B1	rs6672256	1	TAG
HSD11B1	rs4844880	1	TAG
HSD11B1	rs2235543	1	TAG
HSD11B1	rs10082248	1	TAG
HSD11B1	rs12565406	1	TAG
HSD11B1	rs3753519	1	TAG
HSD11B1	rs4844488	1	TAG
HSD11B1	rs846906	1	TAG
HSD11B1	rs846910	1	TAG
IAPP	rs1800203	12	NS
IAPP	rs11558904	12	NS
IAPP	rs7137767	12	PRO
IAPP	rs12811082	12	TAG
IAPP	rs5486	12	TAG
IDE	rs12356364	10	NS
IDE	rs1042444	10	NS
IDE	rs5030982	10	NS
IDE	rs11187039	10	NS
IDE	rs3758505	10	PRO
IDE	rs6583820	10	TAG
IDE	rs7908111	10	TAG
IDE	rs11187025	10	TAG
IDE	rs6583817	10	TAG

IDE	rs11187007	10	TAG
IDE	rs4646957	10	TAG
IDE	rs7078413	10	TAG
IDE	rs4646958	10	TAG
IDE	rs3737225	10	TAG
IGF2	rs14367	11	NS
IGF2	rs3213221	11	TAG
IL6	rs2069827	7	PRO
IL6	rs1800797	7	PRO
IL6	rs1800795	7	PRO
IL6	rs11544633	7	NS
IL6	rs2069860	7	NS
IL6	rs2069845	7	TAG
IL6	rs2069840	7	TAG
IL6R	rs11557724	1	NS
IL6R	rs8192284	1	
IL6R	rs28730735	1	
IL6R	rs11265618	1	TAG
IL6R	rs2229238	1	TAG
IL6R	rs4240872	1	TAG
IL6R	rs12083537	1	TAG
IL6R	rs4845617	1	TAG
IL6R	rs4075015	1	TAG
IL6R	rs4601580	1	TAG
IL6R	rs6684439	1	TAG
INS	rs28933985	11	NS
INS	rs13306444	11	NS
INS	rs3842748	11	TAG
INSIG2	rs11123469	2	PRO
INSIG2	rs10185316	2	PRO
INSIG2	rs4848492	2	PRO
INSIG2	rs1559509	2	TAG
INSIG2	rs10490625	2	TAG
INSIG2	rs17047757	2	TAG
INSIG2	rs2161829	2	TAG
INSIG2	rs12464355	2	TAG
INSIG2	rs889904	2	TAG
INSIG2	rs10490624	2	TAG
INSIG2	rs9308762	2	TAG
IRS1	rs3731594	2	NS
IRS1	rs1801278	2	NS
IRS1	rs1801277	2	NS
IRS1	rs1801120	2	NS
IRS1	rs13306469	2	NS
IRS1	rs1801276	2	NS
IRS1	rs1801108	2	NS
IRS1	rs4675094	2	TAG
IRS1	rs17208470	2	TAG

IRS2	rs4771645	13	TAG
IRS2	rs2289046	13	TAG
IRS2	rs1865434	13	TAG
IRS2	rs12584136	13	TAG
IRS2	rs7323191	13	TAG
IRS2	rs7997595	13	TAG
IRS2	rs4773092	13	TAG
IRS2	rs11618950	13	TAG
IRS2	rs913949	13	TAG
IRS2	rs4771644	13	TAG
ITGB5	rs2291090	3	NS
ITGB5	rs11540688	3	NS
ITGB5	rs1064177	3	NS
ITGB5	rs28372859	3	NS
ITGB5	rs13091878	3	TAG
ITGB5	rs3772813	3	TAG
ITGB5	rs3772852	3	TAG
ITGB5	rs848807	3	TAG
ITGB5	rs848798	3	TAG
ITGB5	rs3772812	3	TAG
ITGB5	rs848788	3	TAG
ITGB5	rs6771896	3	TAG
ITGB5	rs3772836	3	TAG
ITGB5	rs2674	3	TAG
ITGB5	rs3772841	3	TAG
ITGB5	rs10934691	3	TAG
ITGB5	rs16836080	3	TAG
ITGB5	rs621209	3	TAG
ITGB5	rs13314004	3	TAG
ITGB5	rs10804563	3	TAG
ITGB5	rs2076722	3	TAG
ITGB5	rs3772832	3	TAG
ITGB5	rs2619328	3	TAG
ITGB5	rs3863065	3	TAG
ITGB5	rs702037	3	TAG
ITGB5	rs585021	3	TAG
KIAA1128	rs7906260	10	PRO
KIAA1128	rs3814205	10	NS
KIAA1128	rs35526567	10	NS
KIAA1128	rs11201058	10	NS
KIAA1128	rs11557865	10	NS
KIAA1128	rs12771480	10	TAG
KIAA1128	rs10887298	10	TAG
KIAA1128	rs4934005	10	TAG
KIAA1128	rs10887305	10	TAG
KIAA1128	rs12359129	10	TAG
KIAA1128	rs1777112	10	TAG
KIAA1128	rs970993	10	TAG

KIAA1128	rs10887296	10	TAG
KIAA1128	rs17342019	10	TAG
KIAA1128	rs4562753	10	TAG
KIAA1128	rs1572430	10	TAG
KIAA1128	rs17256948	10	TAG
KIAA1128	rs868090	10	TAG
KIAA1128	rs11201017	10	TAG
KIAA1128	rs1475816	10	TAG
KLHL5	rs6813885	4	PRO
KLHL5	rs34646863	4	NS
KLHL5	rs2566116	4	TAG
KLHL5	rs6812540	4	TAG
KLHL5	rs12503506	4	TAG
KLHL5	rs2712006	4	TAG
KLHL5	rs2566134	4	TAG
KLHL5	rs2566120	4	TAG
KLHL5	rs12500509	4	TAG
KLHL5	rs2712008	4	TAG
LEP	rs17151919	7	NS
LEP	rs13228377	7	PRO
LEP	rs2122627	7	TAG
LEP	rs2278815	7	TAG
LEP	rs11763517	7	TAG
LEP	rs11760956	7	TAG
LEPR	rs1137099	1	NS
LEPR	rs1137100	1	NS
LEPR	rs1137101	1	NS
LEPR	rs13306526	1	NS
LEPR	rs8179183	1	NS
LEPR	rs3806318	1	PRO
LEPR	rs1327118	1	PRO
LEPR	rs970468	1	TAG
LEPR	rs17412723	1	TAG
LEPR	rs1627238	1	TAG
LEPR	rs10157275	1	TAG
LEPR	rs6673591	1	TAG
LEPR	rs6678033	1	TAG
LEPR	rs17412175	1	TAG
LEPR	rs11804091	1	TAG
LEPR	rs9436739	1	TAG
LEPR	rs6697315	1	TAG
LEPR	rs4468199	1	TAG
LEPR	rs3790429	1	TAG
LEPR	rs3762274	1	TAG
LEPR	rs9436303	1	TAG
LEPR	rs1475397	1	TAG
LEPR	rs11585329	1	TAG
LEPR	rs4655802	1	TAG

LEPR	rs6704167	1	TAG
LEPR	rs11208659	1	TAG
LEPR	rs6672331	1	TAG
LEPR	rs9436740	1	TAG
LIPE	rs3745238	19	NS
LIPE	rs16975748	19	NS
LIPE	rs16975750	19	NS
LPL	rs1801177	8	NS
LPL	rs11542065	8	NS
LPL	rs1800011	8	NS
LPL	rs268	8	NS
LPL	rs300	8	NS
LPL	rs5934	8	NS
LPL	rs328	8	NS
LPL	rs331	8	TAG
LPL	rs256	8	TAG
LPL	rs320	8	TAG
LPL	rs258	8	TAG
LPL	rs17410577	8	TAG
LPL	rs3779788	8	TAG
LPL	rs283	8	TAG
LPL	rs285	8	TAG
LPL	rs248	8	TAG
LPL	rs4922115	8	TAG
LPL	rs281	8	TAG
LPL	rs1534649	8	TAG
LPL	rs249	8	TAG
LRP6	rs34815107	12	NS
LRP6	rs2302685	12	NS
LRP6	rs2302686	12	NS
LRP6	rs7975614	12	NS
LRP6	rs17848270	12	NS
LRP6	rs11054720	12	TAG
LRP6	rs4477532	12	TAG
LRP6	rs7301012	12	TAG
LRP6	rs1181333	12	TAG
LRP6	rs1012672	12	TAG
LRP6	rs2417085	12	TAG
LRP6	rs12833575	12	TAG
LRP6	rs10743980	12	TAG
LRP6	rs17302049	12	TAG
LRP6	rs10845493	12	TAG
LRP6	rs11054704	12	TAG
MAP2K1	rs28730804	15	NS
MAP2K1	rs12914597	15	TAG
MAP2K1	rs891848	15	TAG
MAP2K1	rs7181936	15	TAG
MAP2K1	rs16953563	15	TAG

MAP2K1	rs7166547	15	TAG
MAP2K1	rs1432442	15	TAG
MAP2K2	rs35737722	19	NS
MAP2K2	rs350887	19	TAG
MAP2K2	rs350912	19	TAG
MAP2K2	rs12459484	19	TAG
MAP2K2	rs350896	19	TAG
MAP2K2	rs4525614	19	TAG
MAP2K2	rs350895	19	TAG
MAP2K2	rs350916	19	TAG
MAP2K2	rs1823059	19	TAG
MAP3K2	rs12622436	2	TAG
MAP3K2	rs10496661	2	TAG
MAP3K2	rs6430937	2	TAG
MAP3K2	rs6737103	2	TAG
MAP3K4	rs678290	6	PRO
MAP3K4	rs4559074	6	NS
MAP3K4	rs35730939	6	NS
MAP3K4	rs9458113	6	TAG
MAP3K4	rs9365248	6	TAG
MAP3K4	rs9365246	6	TAG
MAP3K4	rs6919510	6	TAG
MAP3K4	rs705828	6	TAG
MAP3K4	rs9355867	6	TAG
MAP3K4	rs3729613	6	TAG
MAP3K4	rs9458114	6	TAG
MAP3K4	rs12528950	6	TAG
MAP3K4	rs594602	6	TAG
MAP3K4	rs3798906	6	TAG
MAP3K4	rs1488	6	TAG
MAP3K4	rs625977	6	TAG
MAP3K4	rs11757882	6	TAG
MAP3K4	rs1534020	6	TAG
MAP3K4	rs9347479	6	TAG
MAP3K4	rs6940321	6	TAG
MAP3K4	rs12195182	6	TAG
MAP3K4	rs12174748	6	TAG
MAPK1	rs1063311	22	TAG
MAPK1	rs9610487	22	TAG
MAPK1	rs17759796	22	TAG
MAPK1	rs5755694	22	TAG
MAPK1	rs2298432	22	TAG
MAPK1	rs12172554	22	TAG
MAPK1	rs8141815	22	TAG
MC3R	rs3746619	20	NS
MC3R	rs3827103	20	NS
MC3R	rs17847261	20	NS
MC3R	rs6092276	20	PRO

MC3R	rs6014649	20	PRO
MC3R	rs11697509	20	PRO
MC3R	rs6127698	20	PRO
MC4R	rs13447337	18	NS
MC4R	rs13447336	18	NS
MC4R	rs13447334	18	NS
MC4R	rs1016862	18	NS
MC4R	rs13447331	18	NS
MC4R	rs2229616	18	NS
MC4R	rs13447326	18	NS
MC4R	rs13447325	18	NS
MLLT2-AFF1	rs3733378	4	NS
MLLT2-AFF1	rs11721639	4	NS
MLLT2-AFF1	rs3775214	4	TAG
MLLT2-AFF1	rs767315	4	TAG
MLLT2-AFF1	rs10516789	4	TAG
MLLT2-AFF1	rs1471251	4	TAG
MLLT2-AFF1	rs13103234	4	TAG
MLLT2-AFF1	rs3733377	4	TAG
MLLT2-AFF1	rs13136465	4	TAG
MLLT2-AFF1	rs3775229	4	TAG
MLLT2-AFF1	rs13142380	4	TAG
MLLT2-AFF1	rs3822041	4	TAG
MLLT2-AFF1	rs13143182	4	TAG
NPR3	rs2270915	5	NS
NPR3	rs11749133	5	TAG
NPR3	rs11740452	5	TAG
NPR3	rs3792752	5	TAG
NPR3	rs11744078	5	TAG
NPR3	rs16890187	5	TAG
NPR3	rs11750438	5	TAG
NPR3	rs16890250	5	TAG
NPR3	rs700925	5	TAG
NPR3	rs6889608	5	TAG
NPR3	rs1173747	5	TAG
NPR3	rs11740580	5	TAG
NPR3	rs1698027	5	TAG
NPR3	rs696836	5	TAG
NPR3	rs3811954	5	TAG
NPR3	rs1421811	5	TAG
NPR3	rs3792758	5	TAG
NPR3	rs696831	5	TAG
NPR3	rs1060559	5	TAG
NPR3	rs6864434	5	TAG
NPR3	rs13359080	5	TAG
NPR3	rs13180728	5	TAG
NPY	rs16139	7	NS
NPY	rs16479	7	PRO

NPY	rs16148	7	PRO
NPY	rs16147	7	PRO
NPY	rs5574	7	TAG
NPY	rs16478	7	TAG
NPY	rs16131	7	TAG
NPY	rs16135	7	TAG
NPY2R	rs4333136	4	PRO
NPY2R	rs17376798	4	PRO
NPY2R	rs12507396	4	PRO
NPY2R	rs6857715	4	PRO
NPY2R	rs2234759	4	PRO
NPY2R	rs1047214	4	TAG
NQO1	rs1800566	16	NS
NQO1	rs4986998	16	NS
NQO1	rs2917669	16	TAG
NQO1	rs689453	16	TAG
NQO1	rs2917670	16	TAG
NR3C1	rs33391	5	NS
NR3C1	rs1800445	5	NS
NR3C1	rs6192	5	NS
NR3C1	rs6190	5	NS
NR3C1	rs11750172	5	TAG
NR3C1	rs2963151	5	TAG
NR3C1	rs4128428	5	TAG
NR3C1	rs33388	5	TAG
NR3C1	rs12655166	5	TAG
NR3C1	rs10482672	5	TAG
NR3C1	rs4244032	5	TAG
NR3C1	rs2963155	5	TAG
NR3C1	rs13182800	5	TAG
NR3C1	rs4912905	5	TAG
NR3C1	rs7701443	5	TAG
NR3C1	rs12656106	5	TAG
NR3C1	rs9324924	5	TAG
NR3C1	rs9324921	5	TAG
NTRK2	rs1047856	9	NS
NTRK2	rs2275857	9	NS
NTRK2	rs1075108	9	NS
NTRK2	rs1212171	9	PRO
NTRK2	rs1187321	9	PRO
NTRK2	rs1187323	9	PRO
NTRK2	rs7036165	9	TAG
NTRK2	rs1187362	9	TAG
NTRK2	rs1025743	9	TAG
NTRK2	rs17087884	9	TAG
NTRK2	rs10512156	9	TAG
NTRK2	rs9314735	9	TAG
NTRK2	rs11140793	9	TAG

NTRK2	rs7026337	9	TAG
NTRK2	rs7864328	9	TAG
NTRK2	rs10119181	9	TAG
NTRK2	rs1443440	9	TAG
NTRK2	rs4578034	9	TAG
NTRK2	rs920776	9	TAG
NTRK2	rs10868232	9	TAG
NTRK2	rs11795386	9	TAG
NTRK2	rs3739804	9	TAG
NTRK2	rs1627784	9	TAG
NTRK2	rs10780688	9	TAG
NTRK2	rs1187352	9	TAG
NTRK2	rs17087700	9	TAG
NTRK2	rs12238351	9	TAG
NTRK2	rs17087753	9	TAG
NTRK2	rs12001219	9	TAG
NTRK2	rs1187326	9	TAG
NTRK2	rs995861	9	TAG
NTRK2	rs17087840	9	TAG
NTRK2	rs4361832	9	TAG
NTRK2	rs1596360	9	TAG
NTRK2	rs2034107	9	TAG
NTRK2	rs763623	9	TAG
NTRK2	rs7019212	9	TAG
NTRK2	rs1662695	9	TAG
NTRK2	rs1187283	9	TAG
NTRK2	rs10868238	9	TAG
NTRK2	rs1822420	9	TAG
NTRK2	rs1545285	9	TAG
NTRK2	rs4486281	9	TAG
NTRK2	rs2378672	9	TAG
NTRK2	rs2289656	9	TAG
NTRK2	rs984430	9	TAG
NTRK2	rs1867283	9	TAG
NTRK2	rs11140803	9	TAG
NTRK2	rs12378021	9	TAG
NTRK2	rs1439050	9	TAG
NTRK2	rs6559836	9	TAG
NTRK2	rs9969765	9	TAG
NTRK2	rs17418241	9	TAG
NTRK2	rs7048015	9	TAG
NTRK2	rs10512159	9	TAG
NTRK2	rs1778933	9	TAG
NTRK2	rs1187274	9	TAG
NTRK2	rs2277192	9	TAG
NTRK2	rs17087710	9	TAG
NTRK2	rs17087959	9	TAG
NTRK2	rs13295599	9	TAG

NTRK2	rs3739570	9	TAG
NTRK2	rs4504715	9	TAG
NTRK2	rs12338909	9	TAG
NTRK2	rs1443445	9	TAG
NTRK2	rs11140771	9	TAG
OGT	rs1804763	X	NS
OGT	rs11796215	X	TAG
P4HA2	rs3211283	5	NS
P4HA2	rs3805683	5	TAG
P4HA2	rs154483	5	TAG
P4HA2	rs154484	5	TAG
P4HA2	rs283763	5	TAG
P4HA2	rs7733814	5	TAG
P4HA2	rs156030	5	TAG
P4HA2	rs157578	5	TAG
P4HA2	rs17618604	5	TAG
PBEF	rs1319501	7	PRO
PBEF	rs3801270	7	TAG
PBEF	rs1319313	7	TAG
PBEF	rs3801272	7	TAG
PBEF	rs3801266	7	TAG
PCK2	rs2229660	14	NS
PCK2	rs10132601	14	NS
PCK2	rs3021119	14	NS
PCK2	rs17101262	14	NS
PCK2	rs4982856	14	PRO
PCK2	rs1951634	14	TAG
PCK2	rs2759407	14	TAG
PCK2	rs2071586	14	TAG
PCK2	rs9783666	14	TAG
PCSK1	rs6235	5	NS
PCSK1	rs1050622	5	NS
PCSK1	rs6232	5	NS
PCSK1	rs1799904	5	NS
PCSK1	rs271920	5	TAG
PCSK1	rs4869284	5	TAG
PCSK1	rs17386243	5	TAG
PCSK1	rs6230	5	TAG
PCSK1	rs3792747	5	TAG
PIG8	rs1727165	11	PRO
PIG8	rs3748256	11	PRO
PIG8	rs11021319	11	PRO
PIG8	rs1622515	11	PRO
PIG8	rs35604386	11	NS
PIG8	rs644799	11	NS/S
PIG8	rs4753701	11	TAG
PIG8	rs16922552	11	TAG
PIG8	rs7902	11	TAG

PIG8	rs571413	11	TAG
PIK3CB	rs3729782	3	NS
PIK3CB	rs3729778	3	NS
PIK3CB	rs3729696	3	NS
PIK3CB	rs361072	3	PRO
PIK3CB	rs9878820	3	TAG
PIK3CB	rs693293	3	TAG
PIK3CB	rs10513055	3	TAG
PIK3R1	rs3730089	5	NS
PIK3R1	rs3730091	5	NS
PIK3R1	rs16897558	5	TAG
PIK3R1	rs16897561	5	TAG
PIK3R1	rs2431166	5	TAG
PIK3R1	rs6861401	5	TAG
PIK3R1	rs34300	5	TAG
PIK3R1	rs10515070	5	TAG
PIK3R1	rs12657050	5	TAG
PIK3R1	rs34306	5	TAG
PIK3R1	rs34303	5	TAG
PIK3R1	rs6881033	5	TAG
PIK3R1	rs6863799	5	TAG
PIK3R1	rs3730082	5	TAG
PIK3R1	rs831125	5	TAG
PIK3R1	rs10072475	5	TAG
PIK3R1	rs1823023	5	TAG
PIK3R1	rs4122269	5	TAG
PIK3R1	rs12652661	5	TAG
PIK3R1	rs3756668	5	TAG
PIK3R1	rs17317833	5	TAG
PIK3R1	rs17318918	5	TAG
PIK3R1	rs1550805	5	TAG
PIK3R1	rs251406	5	TAG
PIK3R1	rs1043526	5	TAG
PIK3R1	rs12659907	5	TAG
PIK3R1	rs173702	5	TAG
PIK3R1	rs3730084	5	TAG
PIK3R1	rs251402	5	TAG
PIK3R1	rs831123	5	TAG
PIK3R1	rs1445760	5	TAG
PIK3R2	rs10413655	19	NS
PIK3R2	rs3736328	19	PRO
PIK3R2	rs2267922	19	TAG
PIK3R2	rs273269	19	TAG
PLIN	rs8179072	15	NS
PLIN	rs8179071	15	NS
PLIN	rs3743373	15	NS
PLIN	rs6496589	15	NS
PLIN	rs894160	15	TAG

PLIN	rs1052700	15	TAG
POMC	rs28932472	2	NS
POMC	rs28932471	2	NS
POMC	rs7565427	2	TAG
POMC	rs7565877	2	TAG
POMC	rs934778	2	TAG
POMC	rs3769671	2	TAG
POMC	rs6713532	2	TAG
PON2	rs7493	7	NS
PON2	rs17876152	7	NS
PON2	rs12026	7	NS
PON2	rs11545942	7	NS
PON2	rs13306699	7	NS
PON2	rs17166875	7	TAG
PON2	rs1639	7	TAG
PON2	rs2237585	7	TAG
PON2	rs730365	7	TAG
PON2	rs7803148	7	TAG
PON2	rs7802018	7	TAG
PON2	rs10259688	7	TAG
PON2	rs4729189	7	TAG
PON2	rs10487133	7	TAG
PPARG	rs1805192	3	NS
PPARG	rs1800571	3	NS
PPARG	rs28936407	3	NS
PPARG	rs13095716	3	TAG
PPARG	rs11709077	3	TAG
PPARG	rs1175543	3	TAG
PPARG	rs2028759	3	TAG
PPARG	rs12490265	3	TAG
PPARG	rs7645903	3	TAG
PPARG	rs1373641	3	TAG
PPARG	rs17793693	3	TAG
PPARG	rs7626560	3	TAG
PPARG	rs12629751	3	TAG
PPARG	rs3856806	3	TAG
PPARG	rs4135275	3	TAG
PPARG	rs2972164	3	TAG
PPARG	rs2120825	3	TAG
PPARG	rs4135268	3	TAG
PPARGC1A	rs3736265	4	NS
PPARGC1A	rs17847360	4	NS
PPARGC1A	rs8192678	4	NS
PPARGC1A	rs17847349	4	NS
PPARGC1A	rs2970870	4	PRO
PPARGC1A	rs17576121	4	PRO
PPARGC1A	rs2970869	4	PRO

PPARGC1A	rs2932977	4	TAG
PPARGC1A	rs4697046	4	TAG
PPARGC1A	rs3755863	4	TAG
PPARGC1A	rs16874268	4	TAG
PPARGC1A	rs16874194	4	TAG
PPARGC1A	rs4550905	4	TAG
PPARGC1A	rs6850464	4	TAG
PPARGC1A	rs7437482	4	TAG
PPARGC1A	rs4452416	4	TAG
PPARGC1A	rs3774909	4	TAG
PPARGC1A	rs2970849	4	TAG
PPARGC1A	rs10002521	4	TAG
PPARGC1A	rs9996943	4	TAG
PPARGC1A	rs7665116	4	TAG
PPARGC1A	rs7674429	4	TAG
PPARGC1A	rs4697426	4	TAG
PPARGC1A	rs12374310	4	TAG
PPARGC1A	rs4361373	4	TAG
PPARGC1A	rs3774902	4	TAG
PPARGC1A	rs12374408	4	TAG
PPARGC1A	rs3796407	4	TAG
PPARGC1A	rs11941854	4	TAG
PPARGC1A	rs7682765	4	TAG
PPARGC1A	rs10002477	4	TAG
PPARGC1A	rs13117172	4	TAG
PPARGC1A	rs3821952	4	TAG
PPARGC1A	rs2970872	4	TAG
PPARGC1A	rs2946385	4	TAG
PRKCSH	rs10406672	19	NS
PRKCSH	rs11557488	19	NS
PRKCSH	rs3211439	19	NS
PRKCSH	rs160841	19	TAG
PRKCSH	rs313624	19	TAG
PTEN	rs532678	10	TAG
PTEN	rs926091	10	TAG
PTEN	rs2299939	10	TAG
PTEN	rs1234220	10	TAG
PTEN	rs11202596	10	TAG
PTEN	rs2736627	10	TAG
PTPN1	rs6020611	20	TAG
PTPN1	rs1885176	20	TAG
PTPN1	rs2230604	20	TAG
PTPN1	rs6020608	20	TAG
PTPN1	rs13045716	20	TAG
PTPN1	rs10485614	20	TAG
PTPN1	rs6512652	20	TAG
PYY	rs1058046	17	NS
PYY	rs9907468	17	TAG

PYY	rs1642598	17	TAG
PYY	rs1859223	17	TAG
PYY	rs1618809	17	TAG
RBP4	rs11546955	10	NS
RBP4	rs3758539	10	PRO
RBP4	rs3758538	10	PRO
RBP4	rs11187545	10	TAG
RBP4	rs7094671	10	TAG
RBP4	rs7079946	10	TAG
RETN	rs1862513	19	PRO
RETN	rs3745367	19	TAG
RHO	rs28933395	3	NS
RHO	rs28933993	3	NS
RHO	rs29001653	3	NS
RHO	rs29001566	3	NS
RHO	rs2625955	3	PRO
RHO	rs2855557	3	TAG
SCARB1	rs10396213	12	NS
SCARB1	rs5891	12	NS
SCARB1	rs5890	12	NS
SCARB1	rs10773105	12	TAG
SCARB1	rs7135223	12	TAG
SCARB1	rs838894	12	TAG
SCARB1	rs10846748	12	TAG
SCARB1	rs7137797	12	TAG
SCARB1	rs10846745	12	TAG
SCARB1	rs4765622	12	TAG
SCARB1	rs11057864	12	TAG
SCARB1	rs838900	12	TAG
SCARB1	rs745529	12	TAG
SCARB1	rs10773111	12	TAG
SCARB1	rs11615630	12	TAG
SCARB1	rs9919713	12	TAG
SCARB1	rs7139401	12	TAG
SCARB1	rs12581963	12	TAG
SCARB1	rs701106	12	TAG
SCARB1	rs4765181	12	TAG
SCARB1	rs10744182	12	TAG
SCARB1	rs12580803	12	TAG
SCARB1	rs10773109	12	TAG
SCARB1	rs11057869	12	TAG
SCARB1	rs10773107	12	TAG
SCARB1	rs838905	12	TAG
SCARB1	rs4765615	12	TAG
SCARB1	rs11057851	12	TAG
SCD1	rs2234970	10	NS
SCD1	rs1054412	10	NS
SCD1	rs11599710	10	PRO

SCD1	rs11557927	10	TAG
SCD1	rs3793768	10	TAG
SCD1	rs3829160	10	TAG
SCD1	rs3071	10	TAG
SCD1	rs7849	10	TAG
SCD1	rs1502593	10	TAG
SCD1	rs3978768	10	TAG
SCD1	rs10883463	10	TAG
SERPINE1	rs6092	7	NS
SERPINE1	rs2227669	7	NS
SERPINE1	rs13306846	7	NS
SERPINE1	rs2227631	7	PRO
SERPINE1	rs7242	7	TAG
SERPINE1	rs1050813	7	TAG
SERPINE1	rs2227714	7	TAG
SERPINE1	rs2227667	7	TAG
SERPINE1	rs2227692	7	TAG
SH3D19	rs7691584	4	TAG
SH3D19	rs10776522	4	TAG
SH3D19	rs6818900	4	TAG
SH3D19	rs13120989	4	TAG
SH3D19	rs11099786	4	TAG
SH3D19	rs17505752	4	TAG
SH3D19	rs2407406	4	TAG
SHC1	rs8191981	1	NS
SHC1	rs4845401	1	TAG
SLC2A4	rs2654185	17	PRO
SLC2A4	rs5415	17	PRO
SLC2A4	rs222847	17	TAG
SLC2A4	rs5435	17	TAG
SMARCA2	rs4741636	9	NS
SMARCA2	rs7020514	9	NS
SMARCA2	rs1803765	9	NS
SMARCA2	rs3793510	9	NS
SMARCA2	rs2296212	9	NS
SMARCA2	rs6475507	9	TAG
SMARCA2	rs1572743	9	TAG
SMARCA2	rs4741641	9	TAG
SMARCA2	rs3793495	9	TAG
SMARCA2	rs6475520	9	TAG
SMARCA2	rs2066111	9	TAG
SMARCA2	rs3793503	9	TAG
SMARCA2	rs10964457	9	TAG
SMARCA2	rs7875236	9	TAG
SMARCA2	rs6475422	9	TAG
SMARCA2	rs3793485	9	TAG
SMARCA2	rs12003289	9	TAG

SMARCA2	rs4741637	9	TAG
SMARCA2	rs7875344	9	TAG
SMARCA2	rs16937852	9	TAG
SMARCA2	rs13300103	9	TAG
SMARCA2	rs3793508	9	TAG
SMARCA2	rs7853086	9	TAG
SMARCA2	rs1112533	9	TAG
SMARCA2	rs16937844	9	TAG
SMARCA2	rs7864163	9	TAG
SMARCA2	rs10123771	9	TAG
SMARCA2	rs10757167	9	TAG
SMARCA2	rs7035608	9	TAG
SMARCA2	rs10811409	9	TAG
SMARCA2	rs2376305	9	TAG
SMARCA2	rs4741640	9	TAG
SMARCA2	rs13301640	9	TAG
SMARCA2	rs10965055	9	TAG
SMARCA2	rs7862805	9	TAG
SMARCA2	rs2376310	9	TAG
SMARCA2	rs6475412	9	TAG
SMARCA2	rs7032394	9	TAG
SMARCA2	rs10811530	9	TAG
SMARCA2	rs10811426	9	TAG
SMARCA2	rs10964501	9	TAG
SMARCA2	rs7858891	9	TAG
SMARCA2	rs3793504	9	TAG
SMARCA2	rs10757185	9	TAG
SMARCA2	rs1125205	9	TAG
SMARCA2	rs1572745	9	TAG
SMARCA2	rs10757188	9	TAG
SMARCA2	rs7859695	9	TAG
SMARCA2	rs3793492	9	TAG
SMARCA2	rs7021747	9	TAG
SMARCA2	rs17439127	9	TAG
SMARCA2	rs12380390	9	TAG
SMARCA2	rs3793483	9	TAG
SMARCA2	rs6475524	9	TAG
SMARCA2	rs12551628	9	TAG
SMARCA2	rs4373572	9	TAG
SMARCA2	rs10116703	9	TAG
SMARCA2	rs10965011	9	TAG
SMARCA2	rs10964680	9	TAG
SMARCA2	rs7860173	9	TAG
SMARCA2	rs10738558	9	TAG
SMARCA2	rs10965088	9	TAG
SMARCA2	rs10811627	9	TAG
SMARCA2	rs10811361	9	TAG
SMARCA2	rs1886261	9	TAG

SMARCA2	rs12345838	9	TAG
SMARCA2	rs10964528	9	TAG
SMARCA2	rs7868484	9	TAG
SMARCA2	rs17725419	9	TAG
SMARCA2	rs13283799	9	TAG
SMARCA2	rs10811347	9	TAG
SMARCA2	rs3829074	9	TAG
SMARCA2	rs10964691	9	TAG
SMARCA2	rs10122060	9	TAG
SMARCA2	rs12345422	9	TAG
SMARCA2	rs10965086	9	TAG
SMARCA2	rs7033143	9	TAG
SMARCA2	rs7040968	9	TAG
SMARCA2	rs1547635	9	TAG
SMARCA2	rs10757230	9	TAG
SMARCA2	rs10811539	9	TAG
SMARCA2	rs7860079	9	TAG
SMARCA2	rs7861119	9	TAG
SMARCA2	rs2147263	9	TAG
SMARCA2	rs10964621	9	TAG
SMARCA2	rs12005110	9	TAG
SMARCA2	rs10491697	9	TAG
SMARCA2	rs10733369	9	TAG
SMARCA2	rs3793479	9	TAG
SMARCA2	rs2275419	9	TAG
SMARCA2	rs12378008	9	TAG
SMARCA2	rs16937675	9	TAG
SMARCA2	rs7021817	9	TAG
SMARCA2	rs10114878	9	TAG
SOS1	rs8192671	2	NS
SOS1	rs297152	2	TAG
SOS1	rs963828	2	TAG
SOS1	rs1377864	2	TAG
SOS1	rs10204958	2	TAG
SREBF1	rs3181513	17	NS
SREBF1	rs17855792	17	NS
SREBF1	rs1737957	17	NS
SREBF1	rs2228461	17	NS
SREBF1	rs2229590	17	NS
SREBF1	rs13306744	17	NS
SREBF1	rs11541608	17	NS
SREBF1	rs1889018	17	TAG
STAT5B	rs28706683	17	NS
STAT5B	rs2277619	17	NS
STAT5B	rs7209222	17	TAG
STAT5B	rs9900213	17	TAG
STAT5B	rs17500235	17	TAG
STAT5B	rs6503691	17	TAG

STEAP4	rs34741656	7	NS
STEAP4	rs1981529	7	NS
STEAP4	rs9655959	7	TAG
STEAP4	rs17350471	7	TAG
STEAP4	rs43132	7	TAG
STEAP4	rs4727156	7	TAG
STEAP4	rs10263111	7	TAG
TCF1	rs1169288	12	NS
TCF1	rs2464196	12	NS
TCF1	rs1169293	12	TAG
TCF1	rs1169302	12	TAG
TCF1	rs2071190	12	TAG
TCF1	rs3999413	12	TAG
TCF1	rs1169286	12	TAG
TCF1	rs12427353	12	TAG
TGFBR2	rs764522	3	PRO
TGFBR2	rs3087465	3	PRO
TGFBR2	rs17025864	3	NS
TGFBR2	rs28934568	3	NS
TGFBR2	rs17854016	3	NS
TGFBR2	rs35719192	3	NS
TGFBR2	rs1050833	3	NS
TGFBR2	rs3773632	3	TAG
TGFBR2	rs1872978	3	TAG
TGFBR2	rs12493607	3	TAG
TGFBR2	rs3773661	3	TAG
TGFBR2	rs13083813	3	TAG
TGFBR2	rs13061018	3	TAG
TGFBR2	rs1864616	3	TAG
TGFBR2	rs1551762	3	TAG
TGFBR2	rs6770038	3	TAG
TGFBR2	rs3773645	3	TAG
TGFBR2	rs995435	3	TAG
TGFBR2	rs2372212	3	TAG
TGFBR2	rs9310940	3	TAG
TGFBR2	rs1346907	3	TAG
TGFBR2	rs11466531	3	TAG
TGFBR2	rs4522809	3	TAG
TGFBR2	rs17025785	3	TAG
TGFBR2	rs11129420	3	TAG
TGFBR2	rs11924422	3	TAG
TGFBR2	rs12490899	3	TAG
TGFBR2	rs3773651	3	TAG
TGFBR2	rs2276767	3	TAG
TGFBR2	rs9858487	3	TAG
TGFBR2	rs2043136	3	TAG
TGFBR2	rs1036095	3	TAG
TGFBR2	rs13086588	3	TAG

TGFBR2	rs3773644	3	TAG
TGFBR2	rs11466536	3	TAG
TGFBR2	rs304839	3	TAG
TGFBR2	rs6792117	3	TAG
TGFBR2	rs9843143	3	TAG
TGFBR2	rs9790292	3	TAG
TGFBR2	rs9843942	3	TAG
TGFBR2	rs3773663	3	TAG
TGFBR2	rs9831477	3	TAG
TGFBR2	rs2082224	3	TAG
TMEPAI	rs6092522	20	TAG
TMEPAI	rs157094	20	TAG
TMEPAI	rs6025728	20	TAG
TMEPAI	rs157088	20	TAG
TMEPAI	rs157106	20	TAG
TMEPAI	rs13044132	20	TAG
TMEPAI	rs6025722	20	TAG
TMEPAI	rs203372	20	TAG
TMEPAI	rs157091	20	TAG
TMEPAI	rs169409	20	TAG
TMEPAI	rs62779	20	TAG
TMEPAI	rs3795105	20	TAG
TMEPAI	rs157103	20	TAG
TMEPAI	rs4811903	20	TAG
TMEPAI	rs7269897	20	TAG
TNF	rs4645843	6	NS
TNF	rs11574936	6	NS
TNF	rs1799964	6	PRO
TNF	rs1800630	6	PRO
TNF	rs1800629	6	PRO
TNF	rs3093662	6	TAG
TNFRSF1B	rs1061622	1	NS
TNFRSF1B	rs5746026	1	NS
TNFRSF1B	rs17879042	1	NS
TNFRSF1B	rs5746032	1	NS
TNFRSF1B	rs652625	1	PRO
TNFRSF1B	rs5746059	1	TAG
TNFRSF1B	rs590977	1	TAG
TNFRSF1B	rs683240	1	TAG
TNFRSF1B	rs976881	1	TAG
TNFRSF1B	rs1061624	1	TAG
TNFRSF1B	rs5745984	1	TAG
TNFRSF1B	rs1201157	1	TAG
TNFRSF1B	rs235219	1	TAG
TNFRSF1B	rs1061628	1	TAG
TNFRSF1B	rs496888	1	TAG
TNFRSF1B	rs5746014	1	TAG
TNFRSF1B	rs5746016	1	TAG

TNFRSF1B	rs597519	1	TAG
TNFRSF1B	rs1061631	1	TAG
TNFRSF1B	rs816050	1	TAG
TNMD	rs932437	X	PRO
TNMD	rs11798018	X	PRO
TSC22D3-DSIPI	rs12010379	X	TAG
UBE2H	rs12532959	7	TAG
UBE2H	rs7801603	7	TAG
UBE2H	rs1725077	7	TAG
UBE2H	rs1471876	7	TAG
UBE2H	rs2280680	7	TAG
UBE2H	rs17558874	7	TAG
UBE2H	rs11760945	7	TAG
UBE2H	rs10215972	7	TAG
UBE2H	rs17559441	7	TAG
UBE2H	rs2727479	7	TAG
UBE2H	rs1723728	7	TAG
UBE2H	rs3817530	7	TAG
UBE2H	rs17559596	7	TAG
UCP1	rs2270565	4	NS
UCP1	rs3811790	4	PRO
UCP1	rs6536991	4	TAG
UCP1	rs6822807	4	TAG
UCP1	rs7688743	4	TAG
UCP1	rs2071416	4	TAG
UCP1	rs1800661	4	TAG
UCP2	rs11549044	11	NS
UCP2	rs659366	11	PRO
UCP2	rs2735572	11	TAG
UCP3	rs8179179	11	NS
UCP3	rs17848372	11	NS
UCP3	rs2229707	11	NS
UCP3	rs17848368	11	NS
UCP3	rs8179180	11	NS
UCP3	rs1800849	11	PRO
UCP3	rs3781907	11	TAG
UCP3	rs2075577	11	TAG
VLDLR	rs6149	9	NS
VLDLR	rs6146	9	NS
VLDLR	rs1454626	9	PRO
VLDLR	rs7852409	9	PRO
VLDLR	rs11789583	9	TAG
VLDLR	rs4740698	9	TAG
VLDLR	rs2375994	9	TAG
VLDLR	rs11791537	9	TAG
VLDLR	rs10812380	9	TAG
VLDLR	rs2242103	9	TAG
VLDLR	rs1545567	9	TAG

VLDLR	rs2290465	9	TAG
VLDLR	rs7032549	9	TAG
ZA20D2	rs1322482	9	TAG
ZA20D2	rs909172	9	TAG
ZA20D2	rs17554656	9	TAG
ZA20D2	rs11143274	9	TAG
