



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN

**Asociación de las variantes rs17700144, rs17782313 del
gen del receptor de melanocortina 4, rs7799039 del gen
de leptina y rs1137101 del gen del receptor de leptina
con el estado de nutrición de niños escolares de
Hidalgo, México.**

T E S I S

Que para obtener el título de
Licenciada en Nutrición
P R E S E N T A

Alin Estrada Neria

Bajo la Dirección de:

Dra. Guadalupe López Rodríguez

Laboratorio de Nutrición Molecular. UAEH-ICSa

Co-Director:

Dra. María Elizabeth Tejero Barrera

Laboratorio de Nutrigenómica y Nutrigenética. INMEGEN-México.



Pachuca, Hidalgo, Mayo del 2014

CONTENIDO

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 7 |
| 1. MARCO TEÓRICO..... | 9 |
| 1.1 Definición de obesidad. | 9 |
| 1.2 Etiología. | 10 |
| 1.3 Factores de riesgo..... | 10 |
| 1.3.1 Factores culturales. | 10 |
| 1.3.2 Actividad física. | 10 |
| 1.3.3 Dieta..... | 11 |
| 1.3.5 Factores genéticos. | 11 |
| 1.4 Fisiología del apetito y la saciedad. | 12 |
| 1.4.1 Señales orexigénicas. | 13 |
| 1.4.2 Señales anorexigénicas..... | 13 |
| 1.5 Genética de la obesidad. | 14 |
| 1.5.1 Leptina (<i>LEP</i>). | 15 |
| Tabla 1.- Frecuencias genotípicas y alélicas de la variante rs7799039 del gen <i>LEP</i> en distintas poblaciones reportadas por el HapMap | 16 |
| Fuente: http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-perl/gbrowse/hapmap28_B36/ | 17 |
| 1.5.2 Receptor de leptina (<i>LEPR</i>)..... | 17 |
| Fuente: http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-perl/gbrowse/hapmap28_B36/ | 19 |
| 1.5.3 Receptor de Melanocortina 4 (<i>MC4R</i>). | 19 |
| Fuente: http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-perl/gbrowse/hapmap28_B36/ | 20 |
| Figura 5.- Representación gráfica de ubicación del gen | 21 |
| Fuente: http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-perl/gbrowse/hapmap28_B36/ | 22 |
| 2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN..... | 23 |
| 3. JUSTIFICACIÓN. | 24 |
| 4. OBJETIVOS | 25 |

| | |
|--|----|
| 4.1 Objetivo general. | 25 |
| 4.2 Objetivos específicos..... | 25 |
| 5. HIPÓTESIS..... | 26 |
| 6. DISEÑO METODOLÓGICO..... | 27 |
| 6.1 Diseño de estudio..... | 27 |
| 6.2 Lugar de estudio..... | 27 |
| 6.3 Tamaño de la muestra..... | 27 |
| 6.4 Esquema de muestreo. | 27 |
| 6.5 Criterios de selección. | 27 |
| 6.6 Criterios de inclusión. | 27 |
| 6.7 Criterios de exclusión. | 27 |
| 6.8 Criterios de eliminación. | 28 |
| 6.9 Medición de las variables del estudio. | 28 |
| 6.9.1 Obtención de la muestra de sanguínea. | 28 |
| 6.9.2 Identificación de los polimorfismos. | 28 |
| 6.9.2.1 Extracción de ADN. | 29 |
| 6.9.2.2 Genotipificación. | 29 |
| 6.9.2.3 Condición indígena..... | 30 |
| 6.9.3 Consideraciones éticas..... | 30 |
| 6.10 Análisis de resultados..... | 30 |
| 7. DISEÑO EXPERIMENTAL..... | 31 |
| 8. RESULTADOS..... | 32 |
| 8.1 Estado nutricional..... | 33 |
| Figura 7-. Distribución porcentual del indicador talla para la edad (T/E) en niños escolares de Hidalgo..... | 34 |
| 8.2 Frecuencias de alelos..... | 34 |
| Tabla 7. Frecuencia de SNP del gen <i>MC4r</i> por tipo de escuela, condición Indígena y sexo..... | 35 |
| Tabla 8. Frecuencias de alelos de dos SNPs del gen de receptor leptina y leptina..... | 36 |
| 8.3 Frecuencias genotípicas..... | 37 |

| | |
|--|----|
| 8.4 Frecuencias genotípicas y alélicas por estado de nutrición | 39 |
| 9. DISCUSIÓN..... | 41 |
| 10. CONCLUSIONES..... | 43 |
| ANEXOS | 44 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|-------------------------------|
| Figura 1. Circuitos de melanocortina regulados por leptina que influyen en la homeostasis de energía y del peso corporal. Figura tomada de Spiegelman BM, Cell 2001;104:531-543. | 15 |
| Figura 2. Representación gráfica de ubicación del gen leptina de la variante rs7799039..... | 16 |
| Figura 3. Representación gráfica de ubicación del gen receptor de leptina de la variante rs1137101..... | 18 |
| Figura 4. Representación grafica de ubicación del gen receptor de melanocortina 4 de la variante rs17782313. | 20 |
| Figura 5. Representación grafica de ubicación de gen receptor de melaocortina 4 de la variante rs 17700144. | 21 |
| Figura 6. Distribución porcentual del indicador IMC en los niños escolares, Hidalgo. Se presentan los porcentajes de niños con bajo peso (BP), Peso Normal (NP), sobrepeso (SP) y obesidad (OB) de acuerdo al IMC..... | 33 |
| Figura 7. Distribución porcentual del indicador talla para la edad (T/E) en niños escolares de Hidalgo..... | 34 |
| Figura 8. Verificación de las muestras de ADN en gel de agarosa.¡Error! Marcador no definido. | |
| Figura 9. Cuantificación de muestras de ADN en el equipo NanoDrop ® TM 1000.. .. | ¡Error! Marcador no definido. |
| Figura 10. Cuantificación y resultados de muestras de ADN en el equipo NanoDrop ® TM 1000..... | ¡Error! Marcador no definido. |
| Figura 11. Placas con muestras de ADN. | ¡Error! Marcador no definido. |

- Figura 12.** Ejemplo de localización de muestras de ADN en placas..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 13.** Funcionamiento del equipo termociclador (PCR System 9700, Applied Biosystem).....**¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 14.** Equipo termociclador (PCR System 9700, Applied Biosystem) **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 15.** Representación gráfica de los polimorfismos mediante el programa SDS 2.2.2**¡Error! Marcador no definido.**

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Frecuencias genóticas y alélicas de la variante rs7799039 del gen leptina en distintas poblaciones reportadas por el HapMap..... | 16 |
| Tabla 2. Frecuencias genóticas y alélicas de la variante rs1137101 del gen receptor de leptina en poblaciones de acuerdo a lo reportado por el HapMap..... | 18 |
| Tabla 3. Frecuencias genóticas y alélicas de la variante rs7799039 del gen receptor de melanocortina 4 en poblaciones de acuerdo a lo reportado por el HapMap..... | 20 |
| Tabla 4. Frecuencias genóticas y alélicas rs17700144 del gen receptor de melanocortina 4 en poblaciones de acuerdo a lo reportado por el HapMap..... | 22 |
| Tabla 5. Variables descriptivas de los escolares por tipo de escuela, Hidalgo | 32 |
| Tabla 6. Frecuencias de alelos de dos SNPs del gen <i>MC4R</i> | 35 |
| Tabla 7. Frecuencia de SNPs del gen <i>MC4R</i> por tipo de escuela, condición Indígena y sexo..... | 35 |
| Tabla 8. Frecuencias de alelos de dos SNPs del gen de <i>LEP</i> , <i>LEPR</i> | 36 |
| Tabla 9. Frecuencia alélicas de SNPs en el gen <i>LEP</i> y <i>LEPR</i> , por tipo de escuela, condición indígena y sexo. Hidalgo | 37 |
| Tabla 10. Frecuencias genotipo de dos SNPs del gen de <i>LEP</i> , <i>LEPR</i> | 38 |
| Tabla 11. Frecuencias por genotipo de SNPs de el gen <i>LEP</i> , <i>LEPR</i> y <i>MC4R</i> , por condición indígena y sexo. | 38 |

Tabla 12. Descripción de frecuencias genóticas de acuerdo al estado nutricional de los niños escolares.40

ABREVIATURAS

| | |
|-------------|---|
| ADN | Ácido desoxirribonucleico. |
| CART | El transcrito relacionado con la cocaína y la anfetamina. |
| CDI | Comisión nacional para el Desarrollo de los pueblos Indígenas |
| CONAFE | Consejo Nacional para el Fomento Educativo. |
| ENSANUT | Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. |
| ENSE | Encuesta Nacional en Escolares. |
| HAP-MAP | Mapa de Haplotipos. |
| IMC | Índice de Masa Corporal. |
| INMEGEN | Instituto Nacional de Medicina Genómica |
| INSP | Instituto Nacional de Salud Pública. |
| <i>LEP</i> | Leptina. |
| <i>LEPR</i> | Receptor de Leptina |
| <i>MC4R</i> | Receptor de Melanocortina cuatro. |
| ng | Nano gramos. |
| OMS | Organización Mundial de la Salud. |
| PCR | Reacción en Cadena de la Polimerasa. |

| | |
|---------------|---|
| PENUTEH | Perfil Nutricional de Escolares de Hidalgo. |
| POMC | Proopiomelanocortina. |
| SNP | Polimorfismo de un Solo Nucleótido. |
| T/E | Talla para la Edad. |
| α -MSH | Hormona Alfa Estimulante de Melanocitos. |
| μ g | Microgramos. |

RESUMEN

La contribución genética es un factor no modificable para el desarrollo de obesidad, se ha descrito que representa un riesgo del 25-40% en los sujetos con antecedentes heredofamiliares de obesidad. Genes como la leptina (*LEP*) y el receptor de melanocortina 4 (*MC4R*) han sido involucrados en la señalización hipotalámica de saciedad, regulando el metabolismo, ritmos neuroendocrinos y el balance energético del organismo. Variaciones en la secuencia de estos genes, pueden modificar la función de la proteína y alterar la señalización de saciedad y de esta manera favorecer la ganancia de peso. **Objetivo General:** Establecer la asociación de polimorfismos de un solo nucleótido en los genes de *LEP*, *LEPR* y *MC4R* con el estado de nutrición de niños escolares del estado de Hidalgo, México. **Diseño de estudio:** La presente investigación es un estudio transversal, probabilístico y analítico. El estudio se realizó en niños de 1ero, 3ero y 6to año de primaria pertenecientes a los 84 municipios del Estado de Hidalgo. **Metodología:** Se seleccionaron 750 escolares de escuelas generales públicas, privadas indígenas y CONAFE del ciclo escolar 2010-2011. El estado de nutrición se evaluó mediante técnicas antropométricas estandarizadas, se midió peso y talla para calcular el IMC y el indicador talla/edad así como la circunferencia de cintura para identificar obesidad abdominal. En ayuno se tomó una muestra de sangre venosa para extraer el ADN utilizando el kit de Qiagen®; en el ADN genómico se identificaron los SNPs rs7799039 (*LEP*), rs1137101 (*LEPR*), rs17782313 y rs17700144 (*MC4R*) con

sondas TaqMan® empleando un equipo de PCR System 9700, Applied Biosystem®.

Resultados: De las 4 variantes estudiadas se observó que el genotipo AG de la variante rs17700144 se asoció con obesidad abdominal ($p=0.023$) y con el IMC ($p=0.008$). Se observó que el genotipo TT para rs17700144 y GG para rs 17782313 del gen *MC4R* se presentaron de forma exclusiva en la población indígena de Hidalgo. **Conclusiones:** Las variantes asociadas con obesidad en población caucásica (*LEP*, *LEPR*, y rs7782313 de *MC4R*) no mostraron estar relacionadas con indicadores de obesidad en niños de Hidalgo ya que se identificó una gran proporción de población indígena con genotipos únicos. **Palabras clave:** SNPs, leptina ,receptor de melanocortina 4, sobrepeso, Obesidad .

SUMMARY

The genetic contribution is a non-modifiable factor for the developing of obesity, has been described which represents a risk of 25-40% in the subjects with family obesity. Genes as leptin (*LEP*) and melanocortin receptor 4 (*MC4R*) have been involved in hypothalamic satiety signaling, metabolism regulating, neuroendocrine rhythms and energy balance in the body. Variants of these genes may alter the function of protein and affect satiety signaling and thereby promoting weight gain. **The general objective** was to establish the association of single nucleotide polymorphisms (SNPs) of *LEP*, *LEPR* and *MC4R* with nutritional status of school children in the state of Hidalgo, Mexico. Study Design: This research was a cross-sectional study, probabilistic and analytical. The study was conducted in school children of 1st, 3rd and 6th degree belonging to the 84 municipalities of the state of Hidalgo. **Methodology:** We selected 750 students of general schools public, private and indigenous (CONAFE) of 2010-2011. The nutritional status was assessed using standardized anthropometric techniques, weight and height were measured to calculate BMI and height/age and waist circumference to identify abdominal obesity. Sample of venous blood was used to extract DNA using the Qiagen kit, in genomic DNA we identified the SNPs rs7799039 (*LEP*), rs1137101 (*LEPR*), rs17782313 and rs17700144 (*MC4R*) with TaqMan probes on a equipment PCR System 9700, Applied Biosystems®. **Results:** Of the 4 variants studied was observed that the AG genotype of rs17700144 (*MC4R*) gene are

associated with abdominal obesity ($p=0.023$) and BMI ($p=0.008$). It was observed that the TT genotype of rs17700144 and GG genotype of rs 17782313 (*MC4R*) gene had exclusive presence in Hidalgo indigenous population. **Conclusions:** The only variant that showed association with overweight and obese was rs17700144 (AG genotype).

Keywords: SNPs, leptin, melanocortin 4 receptor, Overweight, Obesity.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Definición de obesidad.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la obesidad como una condición con un exceso de grasa corporal en donde la salud y el bienestar se ven afectados adversamente¹. El sobrepeso y la obesidad infantil constituyen el problema de nutrición más importante en el mundo², las prevalencias de sobrepeso y obesidad además de la desnutrición y muchos otros indicadores sociales presentan una amplia variabilidad entre los países y a escala sub nacional. En México, de acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT 2006), en niños de 5 a 11 años de ambos sexos se encontró una prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad del 26.0%, los estados con las más altas prevalencias con sobrepeso u obesidad en los escolares fueron Baja California Norte (41.7%), Yucatán (38.1%) y Tamaulipas (38%), registrando el estado de Hidalgo una prevalencia por debajo de la media nacional del 18.1% (INSP, 2007), cifra que se incrementó más tarde en la Encuesta Nacional de Salud en Escolares (ENSE) 2008 (22.3%) y una prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad en niños de 5 a 11 años de ambos sexos del 30.3%. Es evidente que los escolares del Estado de Hidalgo además de sus similares en otras entidades de México, se encuentran en transición nutricional³, en la última década en este grupo de edad se ha observado un importante descenso de

las prevalencias de desnutrición crónica (talla baja) y los datos disponibles indican un incremento acelerado del sobrepeso y obesidad. Los últimos datos obtenidos de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT 2012) se encontró que en los niños en edad escolar ambos sexos, de 5 a 11 años presentaron una prevalencia Nacional combinada de sobrepeso y obesidad de 34.4%, 19.8% para sobrepeso y 14.6% para obesidad; al analizarse las tendencias puede observarse que las cifras de sobrepeso y obesidad en escolares no han aumentado en los últimos seis años (2006 a 2012).

1.2 Etiología.

En su origen se involucran factores sociales, fisiológicos, metabólicos, moleculares, genéticos y ambientales, que determinan un trastorno metabólico que conduce a una excesiva acumulación de grasa corporal para el valor esperado según el sexo, talla, y edad⁴. Estos factores son necesarios revisar para evaluar su papel en la etiología de la obesidad⁵.

1.3 Factores de riesgo.

1.3.1 Factores culturales.

Los cambios en el estilo de vida, como son la disminución de la actividad física y los hábitos en la dieta son unos de los principales elementos que contribuyen al desarrollo de la obesidad, produciendo un desequilibrio entre la ingesta y el gasto energético⁶.

1.3.2 Actividad física.

La inactividad física es un factor clave en el desarrollo de la obesidad, ya que la mayoría de las actividades que realizan los niños son ligeras y forman parte de la rutina diaria⁷. Además, el sedentarismo es producto del esquema de las condiciones de la vida urbana como el incremento del transporte público, el uso de la

computadora, el aumento de horas frente al televisor y el jugar videojuegos. En la población mexicana se estimó que por cada hora de televisión incrementa 12% el riesgo de obesidad en niños de 9 a 16 años, en los cuales se encontró que dedican en promedio 4.1 ± 2.2 horas/día a ver televisión o jugar videojuegos⁸. Estas actividades reducen el gasto de energía ya que se requiere menor cantidad de energía para ver televisión, que para otras actividades intensas como caminar o jugar a la pelota, sumado al hecho de que se ha observado un incremento de la ingestión de energía al aumentar el consumo de alimentos entre comidas, comer mientras se ve la televisión, así como ingerir productos alimenticios con un alto valor calórico durante programas infantiles⁹.

1.3.3 Dieta.

La obesidad es causada por un balance energético positivo en el consumo de calorías¹⁰. proveniente de alimentos altos en grasa, azúcares simples, consumo excesivo de bebidas gaseosas y bocadillos¹¹ y a una disminución del consumo de verduras, vegetales y fibra¹², estas prácticas dietéticas pueden producir riesgos al presentar complicaciones de salud costosas en la vida adulta¹³.

1.3.4 Factores sociales.

Este factor tiene una gran repercusión sobre el desarrollo psicológico y la adaptación social del niño¹⁴. El contacto social con personas obesas, podría influir en el aumento de peso por la adopción de conductas específicas como la imitación en hábitos y consumo de alimentos¹⁵ como son las dietas altas en lípidos, hidratos de carbono refinados y aumento en el consumo de alimentos industrializados¹⁶.

1.3.5 Factores genéticos.

Está documentado que la contribución genética es una causa más para el desarrollo de obesidad^{17, 18}, algunas personas son capaces de mantener un balance entre la ingesta y el gasto de energía, mientras que otras no. ¿Qué es lo que marca la diferencia entre los dos tipos de personas? La respuesta en gran parte pudiera

atribuirse a la variación genética entre los individuos. Se ha descrito que existe un riesgo de descendencia para el desarrollo de obesidad; si los dos padres son obesos la probabilidad es 70% de que el hijo lo sea; si solo uno de los padres es obeso, la probabilidad de que el hijo lo sea será del 40%, y si los padres están dentro del peso normal, existe solo un 8% de probabilidad que el hijo la desarrolle¹⁹

La obesidad puede ser ocasionada por mutaciones que producen alteraciones en un gran número de vías metabólicas de señalización, lo cual indica que la acumulación de grasa corporal es regulada por procesos que implican una gran cantidad de interacciones las cuales incluyen tanto señales neuronales, hormonales y vías neuropeptídicas²⁰.

1.4 Fisiología del apetito y la saciedad.

La sensación de hambre se asocia con un gran deseo de consumir alimentos. El apetito es el deseo del alimento, a menudo muy concreto y ayuda a determinar la calidad de la alimentación²¹. Si la búsqueda y el consumo suficiente del alimento surten efecto aparece una sensación de saciedad. Estas sensaciones dependen de factores ambientales, culturales y también de elementos fisiológicos que regulan centros concretos del encéfalo. Nuestro organismo es una maquinaria de combustión interna y requiere el consumo de alimentos como fuente de energía para cubrir los requerimientos diarios, la sensación de apetito es vital para inducir la ingesta de nutrimentos en forma de carbohidratos, grasas y proteínas. La sensación opuesta al apetito es la saciedad y ella, es inducida una vez que los requerimientos energéticos del organismo han sido satisfechos. De otra forma, la sensación de apetito sería constante²².

El balance entre los estados de apetito y saciedad, está regulado por el hipotálamo y pérdidas en el equilibrio pueden inducir obesidad o caquexia. El hipotálamo ventromedial recibe por vía endocrina (asa aferente), la información periférica sobre el balance energético. Dicha información es procesada en los núcleos hipotalámicos, periventricular y lateral y emite por vía paracrina (asa intra hipotalámica), información

a otras zonas del hipotálamo, al sistema límbico y/o al sistema nervioso periférico con el fin de equilibrar el estado energético de nuestro organismo²³.

1.4.1 Señales orexigénicas.

Un balance energético negativo por ayuno, induce la síntesis y secreción de grelina por las células P/D1 del estómago. Esta hormona alcanza su pico al inicio de la ingesta alimenticia y declina en el transcurso de la misma. Por vía endocrina estimula a los receptores en el núcleo ventromedial y con ello estimula la síntesis y secreción de Neuro-Péptido-Y o (NPY) y el péptido relacionado a Agutí (AGRP), ambas moléculas por vía paracrina estimulan a los receptores de melanocortina 3 y 4 del núcleo para ventricular y con ello incrementa la sensación de apetito²³.

1.4.2 Señales anorexigénicas.

Un balance energético positivo por la ingesta aguda y/o crónica de alimentos, induce la síntesis y secreción de insulina y leptina y colecistocinina. La leptina es una hormona sintetizada y secretada por el adipocito, su síntesis y secreción son estimuladas principalmente por la insulina, alcanza su pico máximo cuando el depósito almacenado de triglicéridos en tejido adiposo es suficiente y declina con el ayuno prolongado. Por vía endocrina cruza la barrera hematoencefálica, estimula a los receptores de leptina en el núcleo ventromedial y con ello favorece la síntesis y secreción de la hormona estimulante de melanocitos (α -MSH) y el transcrito relacionado con la cocaína y la anfetamina (CART), estas moléculas por vía paracrina estimulan a los receptores de melanocortina 3 y 4 del núcleo lateral y así inducen la sensación anorexígena de saciedad²³.

La insulina es una hormona sintetizada y secretada por la célula β pancreática, su síntesis y secreción son estimuladas por las incretinas (hormonas gastrointestinales), alcanza su nivel máximo con la ingesta de disacáridos, especialmente sucrosa, y declina con el ayuno, aun siendo breve. Por vía endocrina, al igual que la leptina, cruza la barrera hematoencefálica, estimula a los receptores

específicos de insulina en el núcleo ventromedial y con ello favorece la síntesis y secreción de α -MSH y CART, la activación de receptores melanocortina 3 y 4 del núcleo lateral y la saciedad. En forma también similar a la leptina, bloquea la sensación hedónica del comer e incrementa, vía simpática el gasto energético en reposo, equilibrando el balance energético positivo en el corto plazo²⁴.

La acción de la insulina y la leptina se complementan, la primera equilibra el balance energético positivo en el corto plazo y estimula la síntesis y producción de la segunda para mantener dicho equilibrio en el mediano y largo plazo. La zona medio ventral del hipotálamo se le conoce como la responsable de disminuir el apetito, y constituye un verdadero centro de regulación de la adiposidad. Actualmente se sabe que el factor al que Kennedy (1953) hacía referencia en la teoría lipostática es la hormona leptina, descubierta hace poco tiempo en roedores e identificada en los rumiantes²⁴.

1.5 Genética de la obesidad.

El análisis de las vías fisiológicas relacionadas con la obesidad se ha centrado en el estudio de los genes relacionados a la señalización hipotalámica de saciedad, así como genes de las rutas metabólicas de transporte, almacenamiento y oxidación de lípidos. Está bien establecido que mutaciones en genes que codifican para proteínas relacionadas a la regulación del apetito son responsables de desórdenes mendelianos en los cuales la obesidad es el fenotipo más obvio. El estudio de los genes asociados a la obesidad ha permitido identificar mutaciones en receptores de la señalización de saciedad, tal como el gen receptor de la melanocortina 4, el cual es vital para la unión de α -MSH y la proteína orexigenica AGRP este descubrimiento fue seguido por la identificación de mutaciones mono génicas recesiva en un gen que codifica para la leptina y para su receptor, todas estas mutaciones resultan en un fenotipo de ingesta excesiva de alimentos²⁵. (Figura 1)

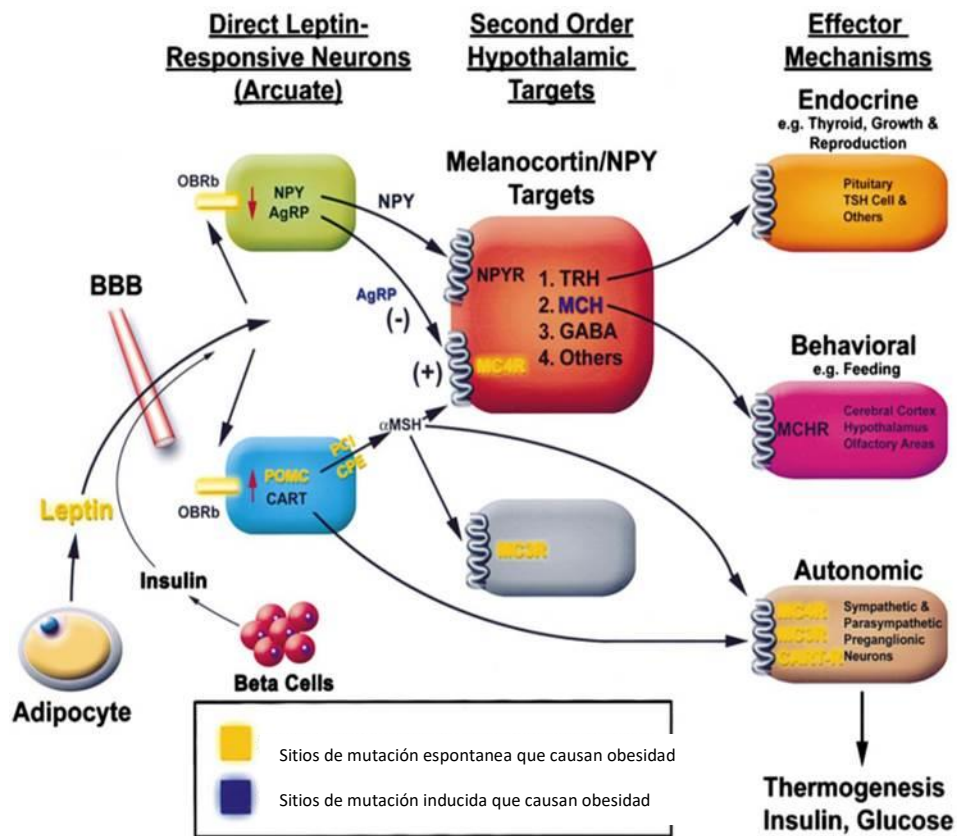


Figura 1. Circuitos de melanocortina regulados por leptina que influyen en la homeostasis de energía y el peso corporal. Figura tomada de Spiegelman BM, Cell. 2001;104:531-543.

1.5.1 Leptina (*LEP*).

La leptina es una hormona producida en el tejido adiposo, y es muy importante en la regulación del apetito, ganancia de peso, actividad ovárica, crecimiento y desarrollo de la glándula mamaria, reparto de nutrientes entre la madre y el feto durante la gestación, incremento del metabolismo energético y el anabolismo muscular. La leptina, es sintetizada principalmente en el adipocito y codificada por el gen *LEP*²⁶. Es una proteína de 167 aminoácidos, y producto del gen *ob* expresado predominantemente por los adipocitos, pero también en niveles más bajos en el epitelio gástrico y placenta. Las mutaciones de este gen *ob* producen ratones obesos *ob/ob*, que presentan hiperfagia, obesidad y diabetes tipo 2²⁷.

Los niveles de leptina circulante reflejan los almacenes de energía y el agudo balance de energía. Una pequeña proporción de humanos tienen una absoluta o relativa deficiencia de leptina, pero la mayoría de los animales y humanos obesos

tienen una elevada concentración de leptina en plasma, lo cual resulta paradójico y nos sugiere que estos pacientes pueden tener además resistencia a la leptina. Similarmente, la deficiencia de leptina en humanos, tanto en niños como en adultos es causa severa de obesidad e hipogonadismo²⁸.

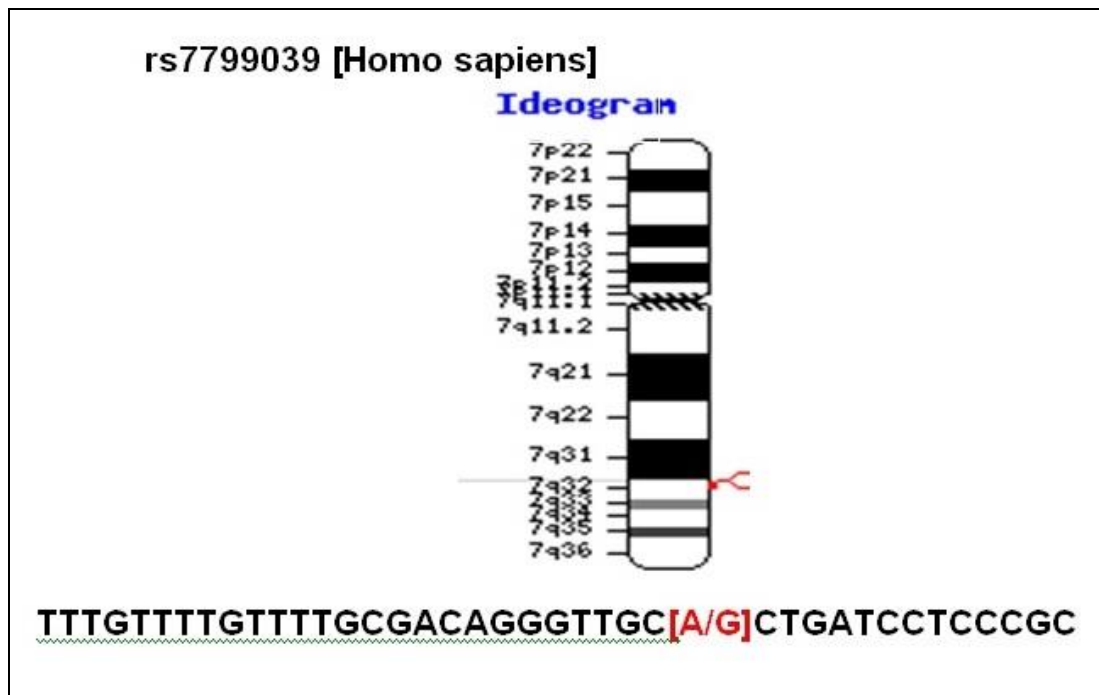


Figura 2.- Representación gráfica de ubicación del gen *LEP* de la variante rs7799039.

Se han descrito dos polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en el gen de la leptina, el rs2167270 (*LEP* A19G) y el rs7799039 (*LEP* G2548A), estos SNPs han sido asociados a obesidad en distintas poblaciones mostrando riesgos relativos de 0.98 (0.79-1.20) y 1.14 (1.01-1.29) respectivamente²⁹. El SNP rs7799039 se encuentra ubicado en el brazo largo (q) del cromosoma 7 (Figura 2) en la posición 127878783. El cambio de una guanina por una adenina produce que se modifique la expresión del gen de la leptina en el tejido adiposo³⁰. La frecuencia genotípica del SNP rs7799039 en poblaciones continentales se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1.- Frecuencias genotípicas y alélicas de la variante rs7799039 del gen *LEP* en distintas poblaciones reportadas por el HapMap

| <i>LEP</i> rs7799039 | | Genotipo | | | | Alelo | |
|-------------------------|--------|----------|------|------|-----|-------|------|
| Base de datos | País | Casos | AA | AG | GG | A | G |
| HAPMAP-MEX | MEXICO | 100 | 0.14 | 0.46 | 0.4 | 0.37 | 0.63 |

| | | | | | | | |
|------------|-----------------|-----|-------|-------|-------|-------|-------|
| HAPMAP-MKK | KENIA | 278 | 0 | 0.259 | 0.741 | 0.129 | 0.871 |
| HAPMAP-CEU | EUROPA-NORTE | 226 | 0.018 | 0.46 | 0.522 | 0.248 | 0.752 |
| HAPMAP-CHB | CHINA | 86 | 0.605 | 0.326 | 0.07 | 0.767 | 0.233 |
| HAPMAP-JPT | JAPON | 172 | 0.558 | 0.407 | 0.035 | 0.762 | 0.238 |
| HAPMAP-YRI | YORUBIA-NIGERIA | 226 | 0 | 0.027 | 0.973 | 0.013 | 0.987 |
| HAPMAP-GIH | GUARAJATI-TEXAS | 176 | 0.295 | 0.409 | 0.295 | 0.5 | 0.5 |

Fuente:http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-perl/gbrowse/hapmap28_B36/

1.5.2 Receptor de leptina (*LEPR*)

El receptor de leptina es una proteína de membrana homóloga al receptor de la familia de las citocinas clase 1. Existen diferentes isoformas del receptor generadas por un proceso de corte y empalme alternativo o procesamiento postraduccional, la isoforma 1 es una proteína de 1165 aa, el gen del receptor de leptina se encuentra en el brazo corto (p) del cromosoma 1.(Figura 3) La unión de la leptina a la forma larga de su receptor en el hipotálamo promueve la dimerización del receptor de leptina (*LEPR*), que activa a cinasas llamadas JAK2 que promueven su autofosforilación y la fosforilación de residuos de tirosina en el receptor de leptina. Esto conduce a la activación de factores de transcripción (STAT3), que se dimerizan y se translocan al núcleo promoviendo la expresión de péptidos anorexigénicos (POMC y CART)³¹. Polimorfismos en el receptor de la leptina compromete la unión de la leptina y por lo tanto se reduce la expresión de POMC y CART y como consecuencia se favorece la producción de moléculas orexigenicas como NPY y AGRP. En el receptor de la leptina (*LEPR*) se han identificado 4 SNPs, el LepR Gln223Arg (rs1137101), *LEPR* Lys109Arg (rs1137100), *LEPR*Lys656Asn (rs8179183) y *LEPR* Pro1019Pro (rs6258900)²⁹.

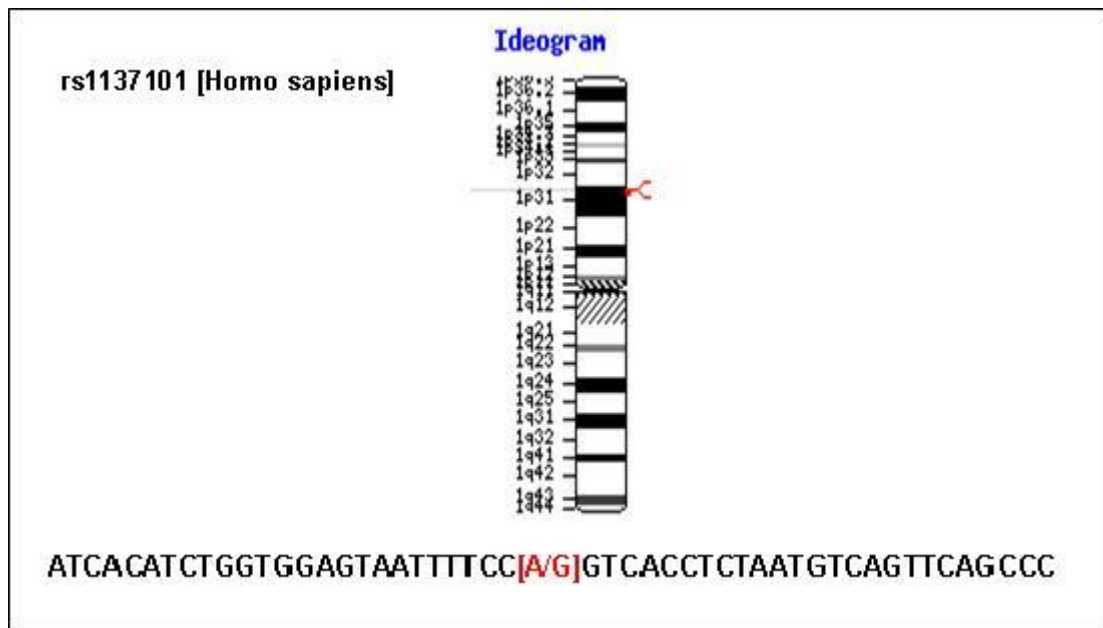


Figura 3.- Representación gráfica de la ubicación del gen *LEPR* de la variante rs1137101.

Mutaciones funcionales en el gen del receptor de leptina resultan en la producción de un receptor truncado que se ha mostrado que causa obesidad y diabetes en roedores y humanos^{32,33}. Sin embargo, tales mutaciones son extremadamente raras en humanos y no han mostrado ser responsables de estas enfermedades; es controversial que polimorfismos comunes en el gen *LEPR* puedan modificar la función de la proteína y producir variaciones en los niveles de leptina y en el peso corporal³⁴. En la Tabla 2 se describen las frecuencias genotípicas del gen *LEPR*. Menores concentraciones de leptina fueron reportadas en mujeres obesas homocigotas para el alelo Q del rs1137101³⁵.

Tabla 2.-Frecuencias genotípicas y alélicas de la variante rs1137101 del gen *LEPR* en poblaciones de acuerdo a lo reportado por el HapMap.

| <i>LEPR</i> rs1137101 | | | Genotipo | | | Alelo | |
|--------------------------|--------------|-------|----------|-------|-------|-------|-------|
| Base de datos | País | Casos | AA | AG | GG | A | G |
| HAPMAP-MEX | MEXICO | 100 | 0.28 | 0.52 | 0.2 | 0.54 | 0.46 |
| HAPMAP-MKK | KENIA | 286 | 0.252 | 0.573 | 0.175 | 0.538 | 0.462 |
| HAPMAP-CEU | EUROPA-NORTE | 224 | 0.259 | 0.536 | 0.205 | 0.527 | 0.473 |
| HAPMAP-CHB | CHINA | 90 | 0.022 | 0.178 | 0.8 | 0.111 | 0.889 |

| | | | | | | | |
|------------|----------------|-----|-------|-------|-------|-------|-------|
| HAPMAP-JPT | JAPON | 164 | 0.012 | 0.305 | 0.683 | 0.165 | 0.835 |
| HAPMAP-YRI | ORUBIA-NIGERIA | 216 | 0.111 | 0.583 | 0.306 | 0.403 | 0.597 |
| HAPMAP-GIH | GUARA-TEXAS | 176 | 0.25 | 0.534 | 0.216 | 0.517 | 0.483 |

Fuente: http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-perl/gbrowse/hapmap28_B36/

1.5.3 Receptor de Melanocortina 4 (*MC4R*).

Los receptores de melanocortinas pertenecen a una familia de 5 miembros (*MC1R-MC5R*). El *MC4R* es una proteína de 322 aminoácidos codificada por un solo exón en la región 18q22; se expresa en regiones del cerebro relacionadas con el apetito, tiene una amplia distribución en el sistema nervioso central expresándose abundantemente en los núcleos hipotalámico para ventricular y ventromedial, así como el área hipotalámica lateral. Las mutaciones en *MC4R* causantes de obesidad en humanos, parecen desencadenar un síndrome de obesidad debido a hiperfagia, que ha sido evaluada a través de test de comida, donde se estimó que la ingesta calórica de portadores de mutaciones en *MC4R* era tres veces superior³¹.

En humanos han sido descritos 5 SNPs del gen de *MC4R* asociados a obesidad; estas variantes son rs2229616 (V103I), rs55820871 (I251L), rs17782313 (C/T), rs17700144 (A/G) y rs12970134 (G/A)³⁶.

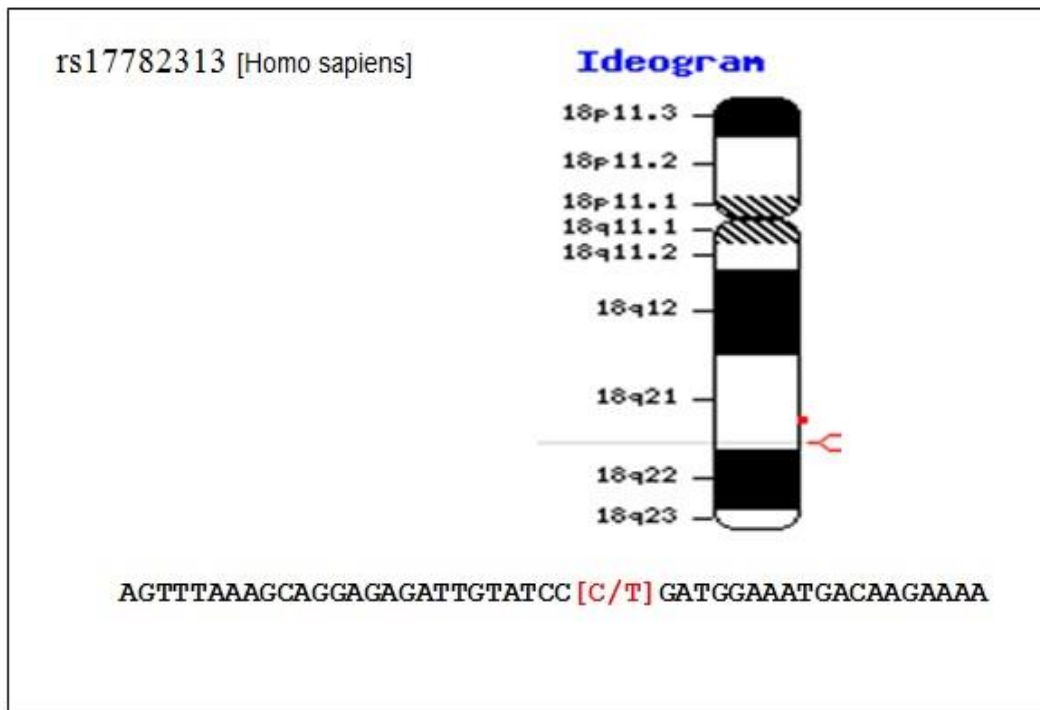


Figura 4.- Representación gráfica de ubicación del gen *MC4R* de la variante rs17782313.

El rs17782313 tiene una frecuencia genotípica diversa entre distintas poblaciones (Tabla 3) se encuentra ubicado a 188 Kb río arriba del gen *MC4R* (Figura 4) y no está en desequilibrio de ligamiento con el V103I o I25IL del *MC4R*, es un SNP que se encuentra en el brazo largo (q) del cromosoma 18 (578551097 pb).

Tabla 3.- Frecuencias genotípicas y alélicas de la variante rs7799039 del gen receptor de melanocortina 4 en poblaciones de acuerdo a lo reportado por el HapMap.

| MC4R rs7782313 | | | Genotipo | | | Alelo | |
|-------------------|-------------------|-------|----------|--------|--------|-------|-------|
| Base de datos | País | Casos | CC | CT | TT | C | T |
| HAPMAP-MEX | MEXICO | 98 | 0.041 | 0.204 | 0.755 | 0.143 | 0.857 |
| HAPMAP-MKK | KENIA | 286 | 0.042 | 0.0329 | 0.0629 | 0.206 | 0.794 |
| HAPMAP-CEU | EUROPA-NORTE | 226 | 0.035 | 0.46 | 0.504 | 0.285 | 0.735 |
| HAPMAP-HCB | CHINA | 90 | 0 | 0.0289 | 0.0711 | 0.144 | 0.856 |
| AFD-EUR-PANEL | EUROPEA-AMERICANA | 46 | 0 | 0.435 | 0.565 | 0.217 | 0.783 |
| AFD-AFR-PANEL | AFICANA-AMERICANA | 46 | 0.043 | 0.348 | 0.609 | 0.217 | 0.783 |
| AFD-CHN-PANEL | ASIA | 48 | 0 | 0.5 | 0.5 | 0.25 | 0.75 |

Fuente: http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-perl/gbrowse/hapmap28_B36/

El rs17700144 (figura 5) se encuentra también en el brazo largo del cromosoma 18 (57811982 pb). Los SNPs se han asociado a obesidad en diferentes estudios que incluían población infantil y adulta; los SNPs V103I y I251L reducen el riesgo de obesidad en un ~20% y ~50% respectivamente, variantes comunes que se encuentra 188 kb (rs17782313 y rs17700144) río arriba del gen de MC4R incrementan el riesgo de obesidad en ~14%³⁶.

La frecuencia genotípica del alelo A del SNP rs17700144 es de 0.13 en población Mexicana de los Ángeles semejante a la encontrada en población Europea-Americana (0.174), pero mucho mayor a lo registrado en nativos de Kenia (0.017) (Tabla 4).

En relación a lo antes descrito se considera que la presencia de SNPs en genes asociados a obesidad pudiera ser un factor determinante de la ganancia de peso en

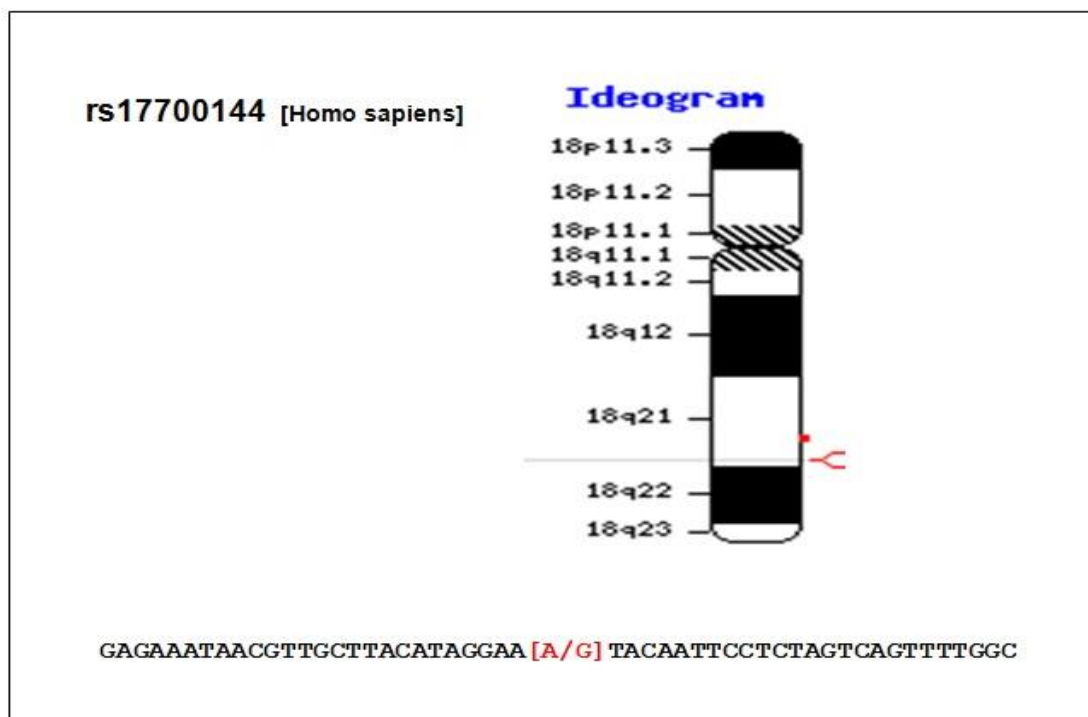


Figura 5.- Representación gráfica de ubicación del gen *MC4R* de la variante rs 17700144.

los primeros años de vida, lo cual se asocia a enfermedades crónicas en la edad adulta. Por esta razón se decidió estudiar las variantes tipos SNP de los genes de leptina (*LEP*), receptor de leptina (*LEPR*) y receptor de melanocortina 4 (*MC4R*) en niños en edad escolar del Estado de Hidalgo.

Tabla 4.- Frecuencias genotípicas y alélicas rs17700144 del gen *MC4R* en poblaciones de acuerdo a lo reportado por el HapMap.

| MC4R rs17700144 | | Genotipo | | | | Alelo | |
|----------------------------|-------------------|-----------------|-----------|-----------|-----------|--------------|----------|
| Base de datos | País | Casos | AA | AG | GG | A | G |
| HAPMAP-MEX | MEXICO | 100 | 0.04 | 0.18 | 0.78 | 0.13 | 0.87 |
| HAPMAP-MKK | KENIA | 286 | 0 | 0.035 | 0.965 | 0.017 | 0.983 |
| HAPMAP-CEU | EUROPA-NORTE | 226 | 0.018 | 0.46 | 0.522 | 0.248 | 0.752 |
| HAPMAP-CHB | CHINA | 82 | 0 | 0.098 | 0.902 | 0.049 | 0.951 |
| AFD-EUR-PANEL | EUROPEA-AMERICANA | 46 | 0 | 0.348 | 0.652 | 0.174 | 0.826 |
| AFD-AFR-PANEL | AFICANA-AMERICANA | 46 | 0 | 0.087 | 0.913 | 0.043 | 0.957 |
| AFD-CHN-PANEL | ASIA | 44 | 0 | 0.091 | 0.909 | 0.045 | 0.955 |

Fuente: http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-perl/gbrowse/hapmap28_B36/

2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.

El incremento en el consumo de energía y la disminución en el gasto, o una combinación de ambos, lleva a un balance positivo de energía y un aumento importante de peso en la población³⁷. La incidencia de sobrepeso y obesidad ha aumentado rápidamente en los últimos años y se ha convertido en una epidemia nacional y mundial³⁸. El sobrepeso y la obesidad son hoy en día, problemas de salud pública en países desarrollados y en vías de desarrollo.

En México la epidemia del sobrepeso y la obesidad es un problema de gran magnitud en todos los grupos de edad; en la actualidad, México ocupa el primer lugar de prevalencia mundial de obesidad. Esta alta prevalencia de sobrepeso y obesidad representa un problema de salud pública prioritario que exige la implementación de una política nacional que reconozca el origen multifactorial del problema. Se ha estudiado ampliamente las causas de la obesidad en la población mexicana, donde se ha identificado a la alta ingesta de grasa y carbohidratos así como una reducción en la actividad física como los principales factores externos que producen obesidad, pero poco se conoce de la susceptibilidad genética de las poblaciones o grupos étnicos en México.

Existen suficientes evidencias que indican que la acumulación de grasa corporal tiene una base genética, no sólo en los casos evidentes de formas monogénicas de obesidad, sino también en la obesidad común. En el mundo se han descrito más de 430 genes, marcadores genéticos o regiones cromosómicas ligadas a rasgos relacionados con obesidad, sin embargo, en México es muy limitada la información de las variantes genéticas asociadas al sobrepeso u obesidad e inclusive al normo peso; por lo tanto es necesario conocer la frecuencia de genes que participan en la regulación del hambre y saciedad. Por esta razón nos propusimos estudiar la frecuencia alélica de los genes de leptina, receptor de leptina ³⁹ y receptor de melanocortina 4, quienes en otras poblaciones han mostrado estar asociados a obesidad ⁴⁰. Debido a que no existen estudios de la predisposición genética en niños del estado de Hidalgo, surge la siguiente pregunta ¿cuál es la frecuencia alélica de los genes leptina, receptor de leptina y melanocortina 4 en niños escolares con normo peso, sobrepeso y obesidad?, considerando el ambiente obesogénico en el cual se desarrollan estos niños.

3. JUSTIFICACIÓN.

Estudios recientes, demuestran que la incidencia y prevalencia de la obesidad han aumentado de manera progresiva durante los últimos seis decenios y de modo alarmante en los últimos 20 años, hasta alcanzar cifras de 10 a 20% en la infancia, 30 a 40% en la adolescencia y hasta 60 a 70% en los adultos ⁴¹. De acuerdo a la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006 (ENSANUT-2006) se encontró que el incremento más alarmante fue en la prevalencia de obesidad en el niño (77%) comparado con las niñas (47%). En el estado de Hidalgo se encontró una prevalencia del 26% de obesidad; los resultados señalan la urgencia de aplicar medidas preventivas para controlar la obesidad en los escolares, debido a que es una de las poblaciones más afectadas.

El equilibrio entre la ingesta y el gasto de energía determinan el peso corporal en humanos. Se ha descrito que los niños escolares mexicanos en los últimos años han incrementado su ingesta de alimentos de alta densidad energética, además que han reducido la actividad física. Sin embargo la interacción entre estos factores ambientales y la carga genética de los niños ha sido poco estudiada.

La leptina, el receptor de leptina y el receptor de melanocortina 4, son genes que están involucrados en la regulación de la ingesta de energía, y los polimorfismos en estos genes han mostrado estar asociados a una mayor ingesta de energía lo que produce ganancia de peso y obesidad.

Por esta razón, es necesario contribuir y continuar con estudios que identifiquen y caractericen los genes involucrados con la obesidad así como estudiar los mecanismos moleculares implicados en su patogenia. La información resultante de este estudio, permitirá identificar a los individuos susceptibles, con el fin de proponer estrategias para prevenir la obesidad y reducir así los riesgos que esta produce.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general.

Establecer la asociación de polimorfismos de un solo nucleótido en los genes de leptina, receptor de leptina y receptor de melanocortina 4 con el estado de nutrición de niños escolares del estado de Hidalgo, México.

4.2 Objetivos específicos.

1. Evaluar el estado nutricional de los niños de 1ero, 3ero y 6to año de primaria de escuelas generales públicas, generales privadas, indígenas y CONAFE-Hidalgo.
2. Identificar las variantes genotípicas del rs17700144, rs17782313 del gen y rs1137101 del gen *LEPR* y rs7799039 del gen *LEP*, en el ADN de niños de 1ero, 3ero y 6to años de primaria, mediante un ensayo de discriminación alélica con sondas TaqMan®.
3. Determinar la frecuencia genotípica las variantes del rs17700144, rs17782313 del gen *MC4R* y rs1137101 del gen *LEPR* y rs7799039 del gen *LEP*, en el ADN de niños de 1ero, 3ero y 6to años de primaria.
4. Asociar la presencia de polimorfismos las variantes genotípicas del rs17700144, rs17782313 del gen *MC4R* y rs1137101 del gen *LEPR* y rs7799039 del gen *LEP*, con el estado nutricional de los niños de 1ero, 3ero y 6to año de primaria.

5. HIPÓTESIS

Los genotipos de riesgo de las variantes rs17700144 (AA), rs17782313 (CC) del gen *MC4R*, y el rs1137101 (GG) del gen *LEPR* y el rs7799039 (AA) del gen *LEP*, son más frecuentes en escolares del estado Hidalgo con sobrepeso y obesidad .

6. DISEÑO METODOLÓGICO.

6.1 Diseño de estudio.

La presente investigación es un estudio transversal, probabilístico, descriptivo y analítico.

6.2 Lugar de estudio.

El estudio se realizó en una muestra probabilística de niños de 1ero, 3ero y 6to año de primaria pertenecientes a los 84 municipios del Estado de Hidalgo.

6.3 Tamaño de la muestra.

Se seleccionaron de forma aleatoria a 750 escolares de escuelas generales públicas, privadas, indígenas y centros CONAFE que estaban inscritos en el ciclo escolar 2010-2011.

6.4 Esquema de muestreo.

El método de muestreo fue probabilístico, porque todos los escolares tenían la misma probabilidad conocida y distinta de cero de ser seleccionados y bietápico por que primero se seleccionaron las escuelas y después los escolares inscritos en el ciclo escolar 2010-2011 de 1ro, 3ro y 6to de primaria.

6.5 Criterios de selección.

Estar cursando educación primaria en los grados de 1ero, 3ero y 6to año de primaria y tener edad entre 6-12 años de escuelas públicas, privadas, indígenas y centros CONAFE para el ciclo escolar 2010-2011.

6.6 Criterios de inclusión.

Haber sido previamente seleccionado en la muestra, no tener ningún impedimento físico o médico para participar en el estudio, y que el padreo o tutor hubiera aceptado participar a través de una carta de consentimiento informado y tener la aprobación verbal de los niños.

6.7 Criterios de exclusión.

Presentar una discapacidad física, no contar con el consentimiento informado firmado por el padre o tutor o que los niños no acepten participar en el estudio.

6.8 Criterios de eliminación.

Que los datos registrados no puedan ser verificables, debido a que no se realizó una adecuada validación durante el proceso de toma de muestra o el levantamiento de la información.

6.9 Medición de las variables del estudio.

El estado de nutrición se evaluó mediante técnicas antropométricas estandarizadas con personal capacitado, el cual tomó peso, talla y circunferencia de cintura utilizando equipo estandarizado y calibrado. El peso se midió con una báscula portátil marca SECA® modelo 813 con capacidad de 200kg y precisión de 100g. La talla se midió con un estadiómetro portátil marca SECA® modelo 213, con precisión de 1mm y con capacidad de 2.20 metros. La circunferencia de cintura se midió con una cinta de fibra de vidrio marca SECA®, con una escala de 0 a 150 cm y con precisión de 1mm. Para la realización de las mediciones se siguieron los criterios establecidos en el manual de procedimientos del proyecto PENUTEH. Ver en Anexos.

Con las mediciones de peso y talla se calculó el Z de IMC en los niños de acuerdo a los parámetros de la OMS 2007, y con la edad y sexo se construyó el indicador Talla/Edad. Con la circunferencia de cintura se catalogaron a los niños en obesidad abdominal si tenían si su perímetro era mayor al percentil 97 de acuerdo a la edad y sexo⁴².

6.9.1 Obtención de la muestra de sanguínea.

La muestra de sangre se obtuvo por punción intravenosa en el brazo, al niño se le solicitó un ayuno mínimo de 6 horas, los niños del turno matutino presentaban ayuno nocturno y los niños del turno vespertino tenían ayuno desde las 8:00 am. Las muestras fueron tomadas por una enfermera previamente capacitada, la cual inmediatamente después de tomar la muestra en un tubo tipo Vacutainer® (K2 EDTA 7.2 mg) se conservaba en refrigeración a 4°C (sangre total).

6.9.2 Identificación de los polimorfismos.

6.9.2.1 Extracción de ADN.

La purificación de ADN se hizo a partir de 2.0 mL sangre total, se utilizó el QIAamp Midi Kit de Quiagen®. La cuantificación de ADN de las muestras se realizó con el espectrofotómetro NanoDrop TM 1000, utilizando la fórmula para ADN de doble cadena a una longitud de onda de 260 – 280nm. Para verificar la integridad del ADN se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 1%. Para especificaciones ver anexo.

6.9.2.2 Genotipificación.

La Genotipificación se realizó mediante un ensayo de discriminación alélica con sondas TaqMan®. Con una concentración final de 15 ng, utilizando con sondas TaqMan® en placas de 96 pocillos.

A una muestra de ADN de 15 ng se le adicionó una mezcla de 5 µL de reactivos compuestos por TaqMan® Genotyping Master Mix, la sonda TaqMan® prediseñadas por Applied Biosystem® para las variantes seleccionadas (ver secuencia abajo), agua libre de DNAsas, la mezcla se colocó en un termociclador (PCR System 9700, Applied Biosystem®, la PCR se corrió con el siguiente programa: 95°C/10 min., 92°C/15 seg., 60°C/1 min. y 4°C/infinito por 40 ciclos. La discriminación alélica se realizó con la lectura de fluorescencia emitida por cada uno de los pocillos utilizando el PCR System 9700, los datos se procesaron en el programa SDS 2.3 (Applied Biosystem®). Para especificaciones ver anexo.

Las secuencias descritas por el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) de las variantes:

rs17782313 del gen *MC4R*

GTTTAAAGCAGGAGAGATTGTATCC[**C/T**]GATGGAAATGACAAGAAAAGCTTCA

rs17700144 del gen *MC4R*

AGAAATAACGTTGCTTACATAGGAA[**A/G**]TACAATTCCTCTAGTCAGTTTTGGC

rs1137101 del gen *LEPR*

ATCACATCTGGTGGAGTAATTTTCC[**A/G**]GTCACCTCTAATGTCAGTTCAGCCC

rs7799039 del gen *LEP*

TTGTTTTGTTTTGCGACAGGGTTGC[**A/G**]CTGATCCTCCCGCCTCAGTCTCCCT

6.9.2.3 Condición indígena.

Para determinar la condición indígena de los niños evaluados, se utilizó una adaptación de la metodología de la Comisión Nacional para el Desarrollo de los Pueblos Indígenas (CDI), en el cual se considera indígena a todo miembro del hogar en el cual el escolar, el jefe o la cónyuge, o los padres del jefe de familia o de la cónyuge, hablen una lengua indígena, más los familiares que hablan lengua indígena pero no residen en el hogar. Se consideró no indígena a todos los miembros de hogares donde el escolar, jefe de familia, cónyuge, padres del jefe o cónyuge no hablan una lengua indígena.

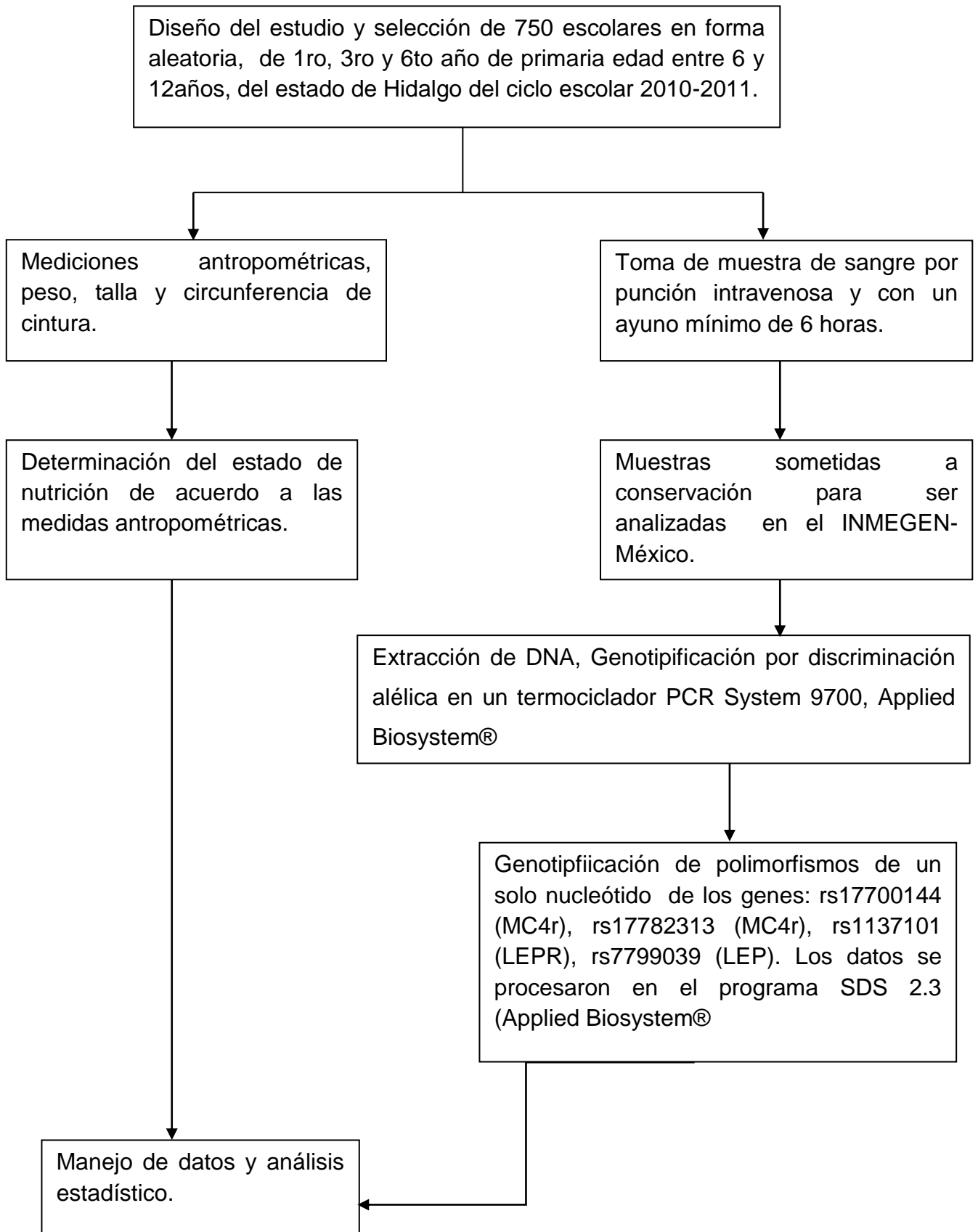
6.9.3 Consideraciones éticas.

El proyecto de investigación fue aprobado por el Comité de ética del ICSa- Área académica de Medicina, el cual se rige por principios de la investigación médica en seres humanos (declaración de Helsinki). En todos los casos se dio a conocer riesgos y beneficios a los participantes; fue requisito indispensable contar con la firma del consentimiento informado para realizar cualquier tipo de consulta o evaluación del menor.

6.10 Análisis de resultados.

Se analizaron las variables dependientes para conocer su distribución utilizando la prueba Kolmogorov-Sirnov y la F de Fisher. Una vez probada la normalidad de las distribuciones se procedió a estimar medidas de tendencia central, se estimaron porcentajes y frecuencias de las variables paramétricas y no paramétricas. Se realizó una prueba de ANOVA con post test de Bonferroni para determinar diferencias entre grupos. Se aplicó una prueba de X^2 para determinar diferencias entre las proporciones. Todos los datos se procesaron en el software SPSS 17,0. Se considerara un nivel de significancia estadística con un valor de $p < 0.05$.

7. DISEÑO EXPERIMENTAL



8. RESULTADOS

Se seleccionaron 750 niños de 143 escuelas quienes, en el ciclo escolar 2010-2011, estaban cursando el 1er, 3er y 6to años de educación primaria de escuelas públicas, privadas, indígenas y centros CONAFE del estado de Hidalgo. Los datos de la tabla 5 muestran el sexo, edad y variables antropométricas por tipo de escuela a la que pertenecían los escolares evaluados, también se observa que los niños de escuelas privadas tienen en promedio mayor peso, talla y puntajes Z para los indicadores P/T e IMC.

Tabla 5.- Variables descriptivas de los escolares por tipo de escuela, Hidalgo.

| Variable | Pública | Privada | Indígena | CONAFE | Total |
|----------------------|--------------|---------------|---------------|---------------|--------------|
| Sexo | | | | | |
| Niños | 164 | 37 | 105 | 69 | 375 |
| Niñas | 194 | 42 | 88 | 51 | 375 |
| Edad | | | | | |
| Niños | 8.7 ± 2.2 | 8.4 ± 2.2 | 8.6 ± 2.1 | 8.3 ± 1.9 | 8.6 ± 2.1 |
| Niñas | 8.7 ± 2.1 | 8.6 ± 2.1 | 8.4 ± 2.2 | 8.2 ± 1.9 | 8.6 ± 2.1 |
| Peso (Kg) | | | | | |
| Niños | 30.8 ± 10.5 | 34.7 ± 15.4* | 26.4 ± 8.2* | 27.1 ± 8.9* | 29.3 ± 10.6 |
| Niñas | 29.8 ± 10.3 | 35.1 ± 12.1* | 27.5 ± 9.9* | 27.3 ± 8.9* | 29.5 ± 10.5 |
| Talla (cm) | | | | | |
| Niños | 130.1 ± 12.8 | 132.0 ± 15.8* | 125.4 ± 12.1* | 126.3 ± 12.9* | 128.3 ± 13.1 |
| Niñas | 129.9 ± 13.8 | 133.6 ± 15.1* | 125.6 ± 13.8* | 125.9 ± 12.2* | 128.7 ± 13.9 |
| Cir Cint (cm) | | | | | |
| Niños | 60.7 ± 9.5* | 63.6 ± 12.9* | 56.9 ± 6.7* | 57.1 ± 7.2* | 59.3 ± 9.1 |
| Niñas | 58.7 ± 8.8* | 62.7 ± 9.8* | 57.4 ± 7.5* | 57.5 ± 7.6* | 58.7 ± 8.6 |
| IMC (Z) | | | | | |
| Niños | 0.5 ± 1.3* | 1.0 ± 1.3* | -0.07 ± 1.1* | 0.02 ± 1.0* | 0.3 ± 1.3 |
| Niñas | 0.2 ± 1.1* | 0.9 ± 1.3* | 0.1 ± 1.1* | 0.1 ± 1.0* | 0.2 ± 1.1 |
| Talla/Edad(Z) | | | | | |
| Niños | -0.5 ± 0.9* | -0.07 ± 1.1* | -1.2 ± 1.1* | -0.9 ± 1.2* | -0.7 ± 1.1 |
| Niñas | -0.5 ± 0.9* | -0.06 ± 0.8* | -1.1 ± 0.9* | -0.9 ± 0.9* | -0.7 ± 0.9 |

El símbolo * Indica diferencias significativas ($p < 0.05$) entre grupos para la prueba ANOVA con post test de Bonferroni.

8.1 Estado nutricional.

Con las mediciones de peso y talla se calculó el IMC en los niños evaluados, el cual se utilizó para clasificar a los niños en bajo peso, peso normal, sobrepeso y obesos de acuerdo a los criterios de la OMS. Con la talla y edad se construyó el indicador Talla/Edad y con la circunferencia de cintura se catalogaron a los niños en obesidad abdominal si su perímetro era mayor al percentil 97 de acuerdo a la edad y sexo.

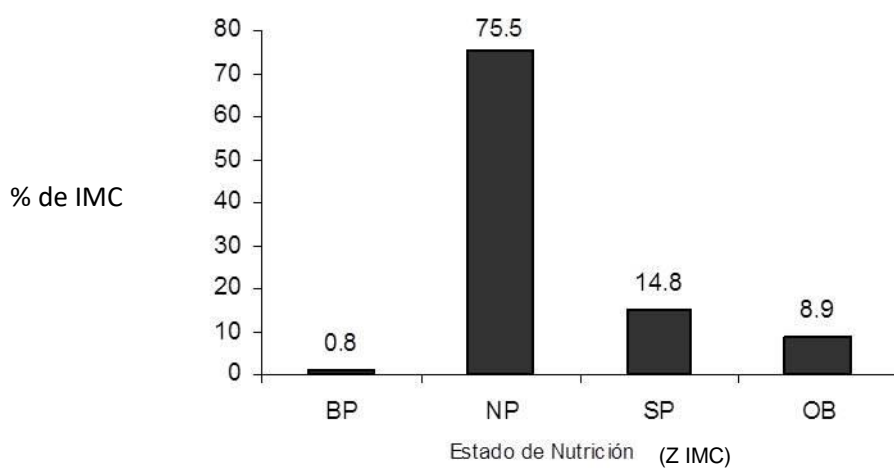


Figura 6.- Distribución porcentual del indicador IMC en los niños escolares, Hidalgo. Se presentan los porcentajes de niños con bajo peso (BP), Peso Normal (NP), Sobrepeso (SP) y Obesidad (OB) de acuerdo al IMC.

De acuerdo al indicador de Índice de Masa Corporal (IMC) de los niños evaluados se encontró que el 75.5 % de escolares están en normo peso y los escolares con sobrepeso y obesidad suman el 23.7 %, en cuanto al bajo peso se observó un mínimo porcentaje de 0.8%, lo que indica que la desnutrición persiste pero en una muy pequeña porción de la población escolar (Figura 6).

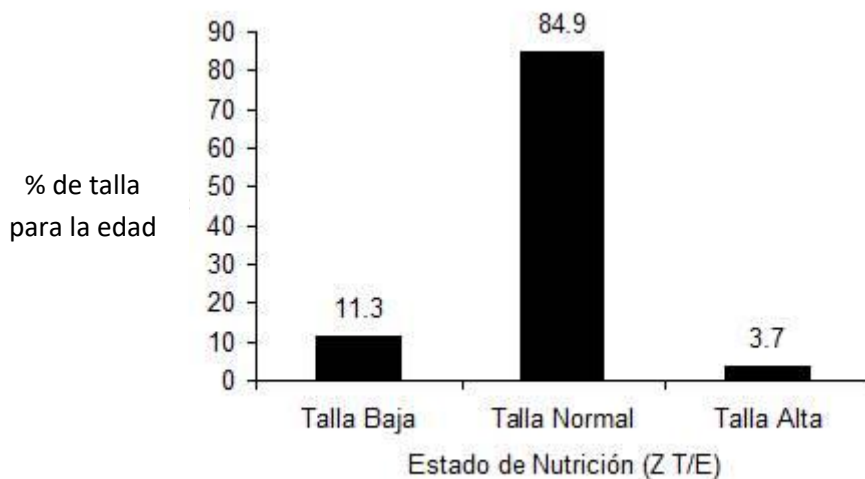


Figura 7- Distribución porcentual del indicador talla para la edad (T/E) en niños escolares de Hidalgo.

En cuanto al indicador de Talla para la Edad se observa en el gráfico 2 que el 84.9% de escolares se encuentra en talla normal y el 11.3% en talla baja y en menor porcentaje el 3.7% presenta talla alta, lo que indica que la desnutrición crónica en los niños de Hidalgo ha disminuido en los últimos años, sin embargo, no se ha erradicado. (Figura 7)

Al evaluar el perímetro de cintura se encontró que un 4% de los escolares presenta riesgo de obesidad abdominal y el 96 % se encuentra en parámetros normales de acuerdo a los indicadores percentilares para el perímetro de cintura en niños de acuerdo a su edad y sexo.

8.2 Frecuencias de alelos.

Se analizaron dos variantes del gen del Receptor de Melanocortina 4, las cuales fueron rs17782313(C/T) y rs 17700144 (A/G) que se encuentran en la región promotora del gen *MC4R*. Al realizar la discriminación alélica del rs 17781313 se identificaron homocigotos para C , homocigotos para el alelo T y heterocigotos C/T, en el rs17700144 se identificaron homocigotos para el alelo A y G así como heterocigotos A/G; la frecuencia de los alelos se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Frecuencias de alelos de dos SNPs del gen *MC4R*.

| | <i>MC4R</i> rs17782313 (C/T) | <i>MC4R</i> rs 17700144 (A/G) |
|---|---|--|
| C | 0.037 | A 0.030 |
| T | 0.963 | G 0.970 |

La frecuencia de los alelos C del rs 17782313 y A del rs17700144 se encontraron en muy baja frecuencia en la población estudiada, por lo que los alelos T del rs17782313 y G del rs17700144 se mantienen presentes en la mayoría de los niños estudiados.

Debido a que la población de estudio fue heterogénea, la cual incluía niños de zonas urbanas y rurales, indígenas y población de diversos estratos socioeconómicos se analizó la frecuencia de alelos por tipo de escuela así como por su condición indígena. Los datos de las frecuencias son presentados en la tabla 7, en esta se observa que existen diferencias entre el tipo de escuela y la frecuencia de los alelos siendo los niños de escuelas privadas los que presentan con mayor frecuencia el alelo de riesgo tanto para el rs17782313 como para el 17700144, en las escuelas indígenas se presentó la menor frecuencia de los alelos antes mencionados.

Al describir las frecuencias de los alelos en los niños indígenas y no indígenas se observa una diferencia significativa por la menor frecuencia del alelo C y T para las dos variantes tipo SNPs del gen de *MC4R* en los niños indígenas (Tabla 7).

Tabla 7. Frecuencia de SNP del gen *MC4r* por tipo de escuela, condición Indígena y sexo.

| | <i>MC4R</i> rs17782313 | | <i>MC4R</i> rs17700144 | |
|------------------------|---|-------|---|-------|
| | C | T | A | G |
| Tipo de escuela | | | | |
| Pública | 0.045 | 0.955 | 0.036 | 0.964 |
| Privada | 0.068 | 0.932 | 0.055 | 0.945 |
| Indígena | 0.008 | 0.992 | 0.005 | 0.995 |
| CONAFE | 0.04 | 0.96 | 0.037 | 0.963 |

| Idioma | | | | |
|---------------|--------|-------|--------|-------|
| Indígena | 0.010* | 0.99 | 0.007* | 0.993 |
| No indígena | 0.060* | 0.94 | 0.048* | 0.952 |
| Sexo | | | | |
| Niños | 0.039 | 0.961 | 0.032 | 0.968 |
| Niñas | 0.035 | 0.965 | 0.029 | 0.971 |

*p<0.001 para la prueba X².

Se identificaron también los alelos de dos SNPs; en el gen de *LEP* (rs7799039) y otro de *LEPR* (rs1137101). El SNP del gen *LEP* se encuentra en una región codificante en el gen, el cambio del nucleótido A/G ocasiona que en la secuencia de la proteína leptina se cambie el aminoácido glicina por una Alanina en la posición 2548 (G2548A); para *LEPR* el SNP se encuentra en una región no codificante, en el promotor del gen que presenta el cambio de un nucleótido A/G.

La frecuencia general de los alelos A y G en el gen *LEPR* y del gen *LEP* se describen en la tabla 8, en esta tabla se observa que la frecuencia de los alelos A y G de los dos SNPs descritos está distribuida en proporciones semejantes para el rs1137101, mientras el alelo G de G2548A tiene mayor frecuencia que el alelo A para en el rs7799039.

Tabla 8. Frecuencias de alelos de dos SNPs del gen de receptor leptina y leptina.

| | <i>LEPR</i>-rs1137101 (Gln223Arg) | | <i>LEP</i>-rs 7799039 (G2548A) |
|---|--|---|---|
| A | 0.539 | A | 0.393 |
| G | 0.461 | G | 0.607 |

De la misma manera que se analizó la frecuencia de estos alelos en población indígena y no indígena, así como por tipo de escuela y sexo, en las variantes de leptina y respetos de leptina se describen también las frecuencias alélicas para cada

SNP, estos datos son presentados en la tabla 9. Los resultados muestran que las frecuencias de los alelos entres los tipos de escuela, la condición de indígena y el sexo son semejantes en los dos SNPs evaluados.

Tabla 9. Frecuencia alélicas de SNPs en el gen leptina y receptor de leptina, por tipo de escuela, condición indígena y sexo. Hidalgo

| | LEPR rs1137101 | | LEP rs7799039 | |
|----------------|---------------------------|-------|--------------------------|-------|
| | A | G | A | G |
| Escuela | | | | |
| Pública | 0.54 | 0.46 | 0.392 | 0.608 |
| Privada | 0.535 | 0.465 | 0.486 | 0.514 |
| Indígena | 0.552 | 0.448 | 0.402 | 0.598 |
| CONAFE | 0.521 | 0.479 | 0.319 | 0.681 |
| Idioma | | | | |
| Indígena | 0.533 | 0.467 | 0.396 | 0.604 |
| No indígena | 0.55 | 0.45 | 0.394 | 0.606 |
| Sexo | | | | |
| Niños | 0.544 | 0.456 | 0.392 | 0.608 |
| Niñas | 0.535 | 0.465 | 0.395 | 0.605 |

8.3 Frecuencias genotípicas.

Las frecuencias de los genotipos en las 4 variantes tipo SNP, que se estudiaron se presentan en la tabla 10.

En el análisis de genotipos para el gen de *MC4R* en el SNP rs17782313 (C/T) se observó que el genotipo CC se encuentra en menor frecuencia y el fenotipo TT es el que más abunda en la población estudiada, y la frecuencia del genotipo CT es también baja. Lo que muestra que la mayoría de la población es homocigota para TT. En cuanto a la variante rs17700144 (A/G) se observa que el genotipo con mayor

frecuencia es GG y en muy poca frecuencia se encontró al genotipo AA por consiguiente el genotipo AG se encuentra en frecuencia también muy baja, observándose que en la mayoría de la población es homocigoto GG.

Tabla 10. Frecuencias genotípicas de los SNPs del gen *LEPR*, *LEP* y del gen *MC4R*.

| MC4R rs17782313 (C/T) | | MC4R rs17700144 (A/G) | | LEPR rs1137101 (A/G) | | LEP rs7799039 (G2548A) | |
|------------------------------------|-------|------------------------------------|-------|-----------------------------------|-------|-------------------------------------|-------|
| CC | 0.004 | AA | 0.002 | AA | 0.290 | AA | 0.162 |
| TT | 0.930 | GG | 0.940 | GG | 0.212 | GG | 0.375 |
| CT | 0.066 | AG | 0.058 | AG | 0.498 | AG | 0.463 |

En el análisis del genotipo para el gen *LEPR* rs1137101 (A/G), se encontró que los genotipos AA y GG se encuentran en frecuencias parecidas, mientras el genotipo AG casi se presenta en la mitad de la población. En cuanto al gen leptina rs7799039 (G2548A) se observó una menor frecuencia en el genotipo AA y se encontró el doble de frecuencia del genotipo GG, por lo tanto el genotipo AG fue el que representó la mayor frecuencia. Los datos de frecuencia de genotipos por condición indígena y sexo se muestran en la tabla 11.

Tabla 11.- Frecuencias por genotipo de SNPs de el gen leptina, receptor de leptina y receptor de melanocortina 4, por condición indígena y sexo.

| | MC4R rs17782313 | MC4R rs17700144 | LEPR rs1137101 | LEP rs7799039 |
|--------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|-------------------------|
| Idioma | | | | |
| Indígena | CC 0.000 * | AA 0.000 * | AA 0.272 | AA 0.160 |
| | TT 0.979 | GG 0.986 | GG 0.206 | GG 0.367 |
| | CT 0.021 | AG 0.014 | AG 0.523 | AG 0.473 |
| No indígena | CC 0.008 * | AA 0.003 * | AA 0.310 | AA 0.161 |
| | TT 0.889 | GG 0.902 | GG 0.210 | GG 0.373 |
| | CT 0.104 | AG 0.096 | AG 0.480 | AG 0.466 |
| Sexo | | | | |
| Niños | CC 0.003 | AA 0.000 | AA 0.280 | AA 0.150 |
| | TT 0.930 | GG 0.936 | GG 0.200 | GG 0.370 |
| | CT 0.070 | AG 0.064 | AG 0.520 | AG 0.480 |
| Niñas | CC 0.006 | AA 0.003 | AA 0.290 | AA 0.170 |
| | TT 0.930 | GG 0.950 | GG 0.230 | GG 0.380 |
| | CT 0.060 | AG 0.050 | AG 0.480 | AG 0.450 |

* Indica un valor de probabilidad de $p < 0.001$ para la prueba X^2 entre los grupos.

En la tabla 11 se observa que los genotipos para los 2 SNPs del gen del *receptor de melanocortina 4* tienen distinta frecuencia si los niños pertenecían a un hogar indígena cuando se compraron con los de hogar no indígena, las frecuencias de los genotipos GG para el rs 17700144 y TT para el rs17782313 se presentaron con más frecuencia en los niños indígenas y estos genotipos fueron casi únicos en los indígenas los cuales pertenecían principalmente a las etnias Nahuatl (127 niños) y en menor cantidad a la Hñahñu (29 niños). Esta característica dada por la condición indígena no se presentó en los SNPs de *LEP* y de *LEPR*.

8.4 Frecuencias genotípicas y alélicas por estado de nutrición.

En la siguiente tabla se describe las frecuencias genotípicas y alélicas de acuerdo a los indicadores de Circunferencia de cintura, T/E y el IMC de los niños evaluados en este estudio. Los resultados muestran que la variante rs17700144 de *MC4R* existen genotipos (AG) que se encuentran asociados con el riesgo de obesidad abdominal según el parámetro de circunferencia de cintura y con sobrepeso y obesidad según el IMC. Se observa además que la variante rs1137101 de *LEPR* se presenta una diferencia estadística entre los genotipos (Tabla 8).

Se realizaron pruebas de X^2 por sexo para los cuatro SNPs observándose que no existen diferencias significativas en las frecuencias de los genotipos.

El riesgo relativo de los niños obesos con el genotipo AG del SNP rs17700144 fue de 2.83 (1.16-6.90) intervalo de confianza al 95%, no se observó un riesgo significativo para este genotipo en los niños con sobrepeso.

Tabla 12. Descripción de frecuencias genotípicas de acuerdo al estado nutricional de los niños escolares.

| | rs17782313 | | | rs17700144 | | | rs1137101 | | | rs 7799039 | | |
|-----------------|-----------------------|------|-------|------------------------|-------|-------|------------------------|-------|-------|-----------------------|-------|-------|
| | MC4R | | | MC4R | | | LEPR | | | LEP | | |
| | CC | TT | CT | AA | GG | AG | AA | GG | AG | AA | GG | AG |
| Cir Cint | | | | | | | | | | | | |
| Sin riesgo | 0.004 | 0.93 | 0.066 | 0.002 | 0.946 | 0.052 | 0.284 | 0.213 | 0.503 | 0.158 | 0.377 | 0.465 |
| Con riesgo | 0 | 0.85 | 0.015 | 0 | 0.84 | 0.16 | 0.391 | 0.217 | 0.392 | 0.28 | 0.32 | 0.4 |
| | X ² =0.073 | | | X ² =0.023* | | | X ² =0.234 | | | X ² =0.969 | | |
| T/E | | | | | | | | | | | | |
| Talla baja | 0 | 0.95 | 0.05 | 0 | 0.975 | 0.025 | 0.273 | 0.121 | 0.606 | 0.127 | 0.354 | 0.519 |
| Talla normal | 0.005 | 0.93 | 0.065 | 0.002 | 0.938 | 0.06 | 0.291 | 0.223 | 0.486 | 0.16 | 0.379 | 0.461 |
| Talla alta | 0 | 0.89 | 0.11 | 0 | 0.929 | 0.071 | 0.318 | 0.273 | 0.409 | 0.308 | 0.346 | 0.346 |
| | X ² =0.395 | | | X ² =0.230 | | | X ² =0.171 | | | X ² =0.364 | | |
| IMC | | | | | | | | | | | | |
| Bajo Peso | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0.6 | 0 | 0.4 | 0 | 0.333 | 0.667 |
| Normal | 0.004 | 0.94 | 0.056 | 0.002 | 0.954 | 0.044 | 0.273 | 0.197 | 0.53 | 0.167 | 0.367 | 0.465 |
| Sob y Ob | 0.006 | 0.9 | 0.094 | 0 | 0.902 | 0.098 | 0.336 | 0.273 | 0.391 | 0.152 | 0.4 | 0.448 |
| | X ² =0.104 | | | X ² =0.008* | | | X ² =0.049* | | | X ² =0.447 | | |

Cir.Cint= Circunferencia de cintura, Sin riesgo= Niños con Cir Cin < al percentil 97 y Con riesgo = Obesidad abdominal que presentan circunferencia de cintura > al percentil 97. T/E= Talla para la Edad. IMC= Índice de Masa Corporal, Sob y Ob = niños que presentan Sobrepeso y Obesidad. * Indica un valor de probabilidad de p<0.05 para la prueba X² entre los grupos.

9. DISCUSIÓN.

En este trabajo de tesis se identificó las frecuencias de los SNPs rs17700144 y rs1778213 del gen de *MC4R*, estos SNPs se encuentran en la región promotora del gen, por lo que los efectos sobre el gen *MC4R* lo que sugiere pueden estar relacionados con su transcripción^{43, 44}.

Las frecuencias observadas del SNPs rs17700144 en los niños escolares del estado de Hidalgo fueron cercanas a las reportadas en el HapMap para un grupo de Mexicanos residentes de USA (HapMap-Mex), es importante mencionar que las poblaciones que presentan homocigotos para el genotipo AA son escasas en el Mundo. Para la variante del SNPs rs1778213 la frecuencia del homocigoto para el genotipo CC fue distinta con la reportado en el HapMap-Mex, debido a que en los sujetos de HapMap-Mex se informa de un mayor número de heterocigotos para el genotipo CT y menor número de homocigotos para el genotipo GG, esto puede explicarse debido a la heterogenicidad población estudiada donde existió un grupo importante de niños indígenas.

Con las frecuencias genotípicas para el rs7799039 del gen Leptina y el rs1137101 del gen receptor de leptina se observaron frecuencias parecidas a las reportadas en una población de adultos Mexicanos. Para el rs7799039 la frecuencia genotípica es similar con lo reportado en el HapMap-Mex, en el estudio antes mencionado así como en los niños estudiados en esta tesis se encontró con mayor frecuencia el genotipo AG, esto contrasta a lo reportado para población europea y asiática, en quienes el genotipo AA es el dominante.

Para el rs1137101 se observa en el HapMap-Mex una frecuencia genotípica con mayor proporción en el genotipo AG y el alelo que predomina es A; para el caso de nuestro estudio se encontró una similitud con lo reportado por el HapMap-Mex.

En estudios realizados en Alemania y Francia se reporta que en niños y adolescentes hay una fuerte asociación en el alelo A del SNP rs17700144 del Gen de *MC4R* con obesidad, pero menor asociación en adultos, presentando un odds ratio de 1.44 y 1.14 respectivamente⁴⁵, estos resultado son semejantes a los reportados por otros autores⁴⁶; en nuestro estudio encontramos una mayor

frecuencia del genotipo AG en los niños con sobrepeso y obesidad (0.098) en comparación con los niños de peso normal (0.044) esto nos muestra que los niños que son portadores del alelo A tienen mayor riesgo de presentar sobrepeso y obesidad por lo que nuestros resultados son similares a lo reportado en niños y adolescentes de otras poblaciones.

En un estudio en niños Europeos de 7 a 11 años en quienes se identificó el SNP rs17782313 del gen *MC4R* se encontró un mayor promedio en el IMC si los niños portaban el genotipo CC, el promedio de IMC fue menor para los genotipos CT y TT respectivamente⁴⁶; sin embargo en nuestro estudio no encontramos una asociación significativa para los genotipos CC y CT posiblemente por la escasa frecuencia del alelo C en la población estudiada, dado a que se observa que el alelo C no se presentó en la población indígena y esta represento un grupo importante en este estudio del 43%.

En el gen *LEPR* en el SNP rs1137101 no fue asociado con obesidad en niños y adolescentes Brasileños, en este estudio se encontró una mayor frecuencia del alelo A⁴⁷, resultados que son similares a los encontrados en los niños estudiados en esta tesis, sin embargo nosotros encontramos una asociación significativa entre el alelo A y sobrepeso y obesidad. En México se realizó un estudio en adolescentes donde se describe que el IMC no tuvo una asociación importante con el SNP rs1137101 pero si con los niveles de leptina y con el porcentaje de grasa corporal.⁴⁸ Un estudio realizado en Turquía con pacientes obesos no encontró ninguna relación entre el polimorfismo y el IMC⁴⁹. Otros estudios si han informado la asociación de este SNP con el riesgo de tener obesidad⁵⁰⁻⁵². Los estudios antes descritos no nos dan una referencia homogénea de la asociación de este SNP con la presencia de obesidad, por lo tanto no podemos justificar nuestros resultados.

En el polimorfismo rs 7799039 del gen de la *LEP* no encontramos una asociación el estado nutricional, estos resultados son semejantes a lo publicado en un estudio de niños⁵³. En un estudio en España no se encontró la asociación de este SNP⁵⁴ solamente se ha reportado asociación del rs 7799039 en mujeres adultas con obesidad extrema⁵⁵ y en una población nativa de Taiwán⁵⁶.

10. CONCLUSIONES.

De acuerdo a los datos obtenidos en este estudio concluimos:

1.-De las variantes rs17700144, rs 17782313 del gen de *MC4R* observamos una frecuencia genotípica y alélica cercana a las reportadas por el HapMap-Mex, esto puede explicarse ya que en este estudio se incluyó a población indígena.

2.-En niños no indígenas el genotipo AG de la variante rs17700144 del gen de *MC4R* presentó asociación con sobrepeso y obesidad así como con obesidad abdominal en los niños del estado de Hidalgo.

3.-No se encontró asociación con las variantes rs7799039 del gen *LEPR* y rs1137101 del gen de *LEP* con el estado de nutrición de los niños obesos.

4.- Para el indicador talla para la edad no se encontró ninguna asociación con las variantes estudiadas en los niños.

ANEXOS



COMITÉ VIDA SANA HIDALGO

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA NIÑOS DE LA SUBMUESTRA

Con el objetivo de evaluar el estado de nutrición, consumo de alimentos, aptitud física, indicadores bioquímicos, genéticos, psicosociales y variables relevantes asociadas a la mala nutrición en escolares y sus madres en el estado de Hidalgo, se desarrolla el presente estudio de investigación titulado:

PERFIL NUTRICIONAL EN ESCOLARES DE HIDALGO 2010 (PENUTEH)

Procedimientos:

Al aceptar participar en el estudio a su hijo (a) y a usted se le medirá el peso, talla y circunferencia de cintura; se le harán algunas preguntas sobre los antecedentes de salud del niño (a) y su alimentación, la forma de cómo su hijo se traslada de la casa a la escuela y se le realizará una prueba de caminata al niño (a); y se le preguntará sobre el ingreso económico y accesibilidad a los alimentos en la familia. A usted se le pedirá que identifique imágenes para que exprese lo que piensa de su cuerpo y se le harán algunas preguntas sobre sus conductas alimentarias y se les solicitará una muestra de orina y sal. Al niño (a) se le tomará la presión arterial y una muestra de sangre venosa con un volumen de 10 ml esta sangre se utilizará para medir la cantidad de grasa en la sangre (triglicéridos y colesterol) e insulina, se determinará si tiene anemia y se extraerá el DNA para identificar polimorfismos de un solo nucleótido y otras pruebas genéticas con el objetivo de conocer si su hijo (a) tiene riesgo de desarrollar alguna enfermedad crónica no transmisibles como la diabetes, obesidad, hipertensión y enfermedades del corazón. Los resultados del estudio permitirán implementar programas de atención para erradicar la desnutrición y/o revertir el incremento de niños con sobrepeso y obesidad, evitando así que desarrollen en la edad adulta alguna enfermedad.

Beneficio en participar en la investigación.

- ❖ Obtendrá información acerca del estado de nutrición de su hijo (a) y de usted y algunas medidas de prevención para el desarrollo de enfermedades crónico/degenerativas.
- ❖ Conocerá si existe algún riesgo de salud del niño (a) como presión arterial alta, obesidad, diabetes, colesterol alto, malos hábitos de alimentación, menor rendimiento físico.
- ❖ El estudio no pone en riesgo la salud y la vida del niño (a), debido a que todos los procedimientos serán realizados por personal capacitado.
- ❖ No recibirá compensación económica por su participación, ni le causara gasto alguno.

Posibles riesgos y molestias.

El niño (a) podrá presentar algunas molestias relacionadas con la punción como dolor e irritación en el sitio de la punción. **Todos los resultados de los exámenes se le enviarán a su centro de salud que les corresponda en donde recibirán recomendaciones en caso necesario.**

Participación Voluntaria / Abandono

Si usted acepta que su hijo (a) participe en este estudio, y en determinado momento decide el abandono de este, se puede retirar sin perjuicio alguno para usted o su familia.

Preguntas:

Si tiene alguna duda, comentarios, quejas como participante en la investigación, favor de comunicarse con el **Lic. Armando Amezcua González**, Sistema Estatal DIF, Sub-dirección de Evaluación, TEL: 01-771-71-731-00 Ext. 3020 y al correo electrónico: armandocean@hotmail.com o con el **Dr. Marcos Galván García**, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, en la ciudad de Pachuca, Instituto de Ciencias de la Salud al correo electrónico: mgalvan73@hotmail.com.

Confidencialidad

Las opiniones e ideas que exprese durante la entrevista serán anónimas. Se entiende por anónimo a la condición en que ni el mismo investigador puede relacionar a una persona con la información obtenida.

CONSENTIMIENTO PARA PARTICIPAR EN EL ESTUDIO DE INVESTIGACION:

Los investigadores y personal del COMITÉ VIDA SANA HIDALGO, me han explicado y dado a conocer en qué consiste el estudio, los posibles riesgos y beneficios de mi participación y la de mi hijo/a, así como de tener la libertad de abandonar este estudio en el momento que yo crea conveniente.

Me doy por enterado/a que los resultados obtenidos en el estudio serán para beneficio de los escolares de Hidalgo, y que serán usados solo para fines científicos y en la elaboración de programas de intervención por las instituciones públicas.

Mpio: _____ Hgo. A ____ de _____ de _____

Nombre del niño: _____ Folio: _____

Nombre del padre o tutor _____

Firma del padre tutor _____

Nombre y Firma del investigador: _____

INSTRUCCIONES PARA LAS MADRES

Sra. madre de familia o tutor

Del niño(a): _____

Se le solicita que el día __/__/__ coloque la primera orina de la mañana de su hijo en un frasco de vidrio pequeño (pueden ser de comida para bebe, mayonesa, café, etc.) previamente lavado y (Lavar el frasco con abundante agua y jabón, posteriormente hervirlo durante 5 a 10 min, dejarlo secar y usarlo)

De la misma manera se le solicita que en una bolsita de plástico limpia coloque 10 cucharadas soperas de sal de mesa, de la que esté utilizando para cocinar en este momento y llévela a la escuela el día que se le cita.

El niño(a) debe presentarse en ayuno (no debe comer por la mañana) si es del turno matutino y si va a la escuela en el turno de la tarde (vespertino) debe desayunar por la mañana, pero no haber comido a medio día. Debe presentarse usted con su hijo.

MANUAL DE MEDICIONES ANTROPOMÉTRICAS UTILIZADO EN EL PERFIL NUTRICIONAL EN ESCOLARES (PENUTEH 2010).

Los lineamientos para la colocación del material antropométrico, ubicación del lugar, y toma de mediciones antropométricas, fueron establecidos en el protocolo de procedimientos para la toma de mediciones antropométricas, elaborado por el Comité de Vida sana del PENUTEH-2010, el cual cuenta con información de referencias estándar mundiales para la correcta aplicación de las técnicas antropométricas.

Medición de peso:

El Evaluador 1, le solicita al niño que se quite el exceso de ropa y se asegura de que no tenga accesorios que impidan una buena medición. El evaluador 2 solicita al niño suba a la báscula sin zapatos y se mantenga quieto en el centro con el peso del cuerpo distribuido equitativamente sobre ambos pies. Antes de hacer la medición asegúrese que el niño esté erguido y con los brazos adosados a ambos lados del cuerpo y sin apoyo en ningún lugar. Una vez que se establezca un punto de equilibrio entre el peso del sujeto y la marca de la báscula, el evaluador 1 procede a la lectura del peso.

Medición de talla:

La medición de la talla requiere en particular de la colaboración de dos profesionales para asegurar la correcta posición del niño.

El evaluador 1 Colocará al niño de pie, descalzo y con el mínimo de ropa sobre el estadiómetro, en el caso de las niñas verificar que se retiren los adornos de su cabeza (diademas, broches, colas de caballo, etc.)

Se arrodillará al lado izquierdo del niño, sólo apoyando la rodilla izquierda en el suelo. Le dirá al niño que mire al frente y verificará que la cabeza esté bien alineada. Apoyará su mano izquierda bajo el mentón del niño y lo cerrará gradualmente. No cubra la boca ni las orejas del niño. Debe asegurarse de que los hombros estén al mismo nivel, que los brazos estén relajados al costado del niño y que la cabeza, hombros y glúteos estén bien apoyados en la tabla posterior. Con la mano derecha

deslizará la escuadra apoyándola sobre la cabeza, asegurando que tome contacto con el cuero cabelludo.

El evaluador 2: Colocará en el suelo la hoja de registro y los lápices y se arrodillará apoyando ambas rodillas en el lado derecho del niño.

Se asegurará de que el niño tenga la planta de los pies plana y en el centro del estadiómetro. Para ello ubicará un tapete con la posición ideal de los pies bajo el estadiómetro de pared. Los talones y las rodillas deben estar relativamente juntos. Ubicará su mano derecha sobre los tobillos del niño y su mano izquierda, sobre las rodillas del niño para asegurarse que ambos estén en contacto con la tabla posterior y vigilando que el niño no se ponga de puntillas para la medición, en el caso. Verificará que las piernas del niño estén totalmente extendidas y que los talones y los gemelos están en contacto con la tabla posterior. Cuando el niño esté correctamente ubicado le avisará al Evaluador 1. Finalmente, el evaluador 1 y evaluador 2 verificarán que la posición sea la correcta antes de realizar la medición. El evaluador 1, lee el dato tres veces y toma el valor que sea similar en dos mediciones.

Medición de circunferencia de cintura

Cintura en el niño: el niño debe estar de pie, con el peso equilibrado entre ambas piernas. El Evaluador 1, debe ubicarse delante del niño e identificar el punto medio entre la última costilla y la cresta ilíaca derecha, Para localizar con mayor facilidad este punto medio, se le pide al niño que levante sus manos, posteriormente que baje sus manos y las coloque cruzadas sobre su pecho, esto con el fin de no obstruir la parte de la cintura para la medición. El Evaluador 1 debe verificar que la cinta esté en un plano horizontal por delante y por los lados. El extremo con el cero de la cinta debe quedar bajo el valor de medición. La cinta debe mantenerse firme, pero no apretada. La medición debe realizarse al final de una espiración normal.

Registro de información de circunferencia de cintura:

Una vez verificada la correcta posición del niño y la correcta técnica de medición, el Evaluador 1 dice en voz alta el valor de la medición para que sea escuchada por el Evaluador 2.

El Evaluador 2 repite en voz alta el valor escuchado.

El evaluador 1 confirma el valor diciendo: "correcto"

El evaluador 2 anotará en la hoja de registro el valor de la medición.

El evaluador 1 se mantiene en la misma ubicación hasta que el evaluador 2 repita el valor escuchado y verifica que corresponde a lo mismo que él midió.

Extracción ADN

Purificación de ADN de sangre entera.

Se utilizó el QIAMamp Midi Kit (Spin protocolo).

Este protocolo es para la purificación de ADN genómico de hasta 2 ml de sangre total.

- No se utilizaron más de 2×10^7 células blancas de la sangre.
- Todo los pasos de centrifugación se llevaron a cabo a temperatura ambiente (15-25°C). No se utilizó un rotor de ángulo fijo.
- Se preparó un baño de agua de 70°C para su uso.

Procedimiento:

1. Se pipetearon 100 μ l de la proteasa QIANGEN (proteína K) en la parte inferior de un tubo para centrifuga de 15 ml.
2. Se añadieron 0.3-1 ml de sangre y se mezcló brevemente. Se llevó el volumen de la muestra hasta 1 ml con PBS, antes de ser agregado al tubo de centrifuga.
3. Se añadieron 1.2 ml de Buffer AL, y se mezcló bien invirtiendo el tubo 15 veces, seguido de agitación vigorosa por al menos 1 minuto.

Se invirtieron múltiples tubos simultáneamente por la unión de ellos en un rack con cualquier otro estante vacío e invirtiendo juntos.

Para garantizar la adecuada lisis, la muestra se mezcló completamente con Buffer AL a ceder una solución homogénea.

NOTA: No se agregó la proteasa QIANGEN directamente al Buffer AL, sino que se aplicaba a las paredes del tubo.

4. Se incubo el tubo a 70°C durante 10 minutos.

El rendimiento del ADN alcanza un máximo después de la lisis durante 10 minutos a 70°C, pero una incubación más larga no afectó negativamente el rendimiento.

5. Se añadió 1 ml de etanol (96-100%) a la muestra y se mezcló por inversión del tubo 10 veces, seguido de una agitación vigorosa adicional.
A fin de garantizar unión eficaz, fue esencial que la muestra se mezclara a fondo después de la adición de etanol para producir una solución homogénea.
6. Se transfirió con cuidado todo en un tubo de centrifuga de 15ml, teniendo cuidado de no humedecer la llanta.
Se cerró la tapa y se centrifugo a 4000 rpm durante 5 minutos.
NOTA: Se limpió cualquier derrame de la rosca del tubo de centrifuga de 15 ml antes de volver a insertar la columna QIAamp Midi.
7. Se retiró la columna QIAamp Midi, se desechó el filtrado, y se colocó en su lugar la columna QIAamp Midi en el tubo de centrifuga de 15 ml.
NOTA: Se limpió cualquier derrame de la rosca del tubo de centrifuga de 15 ml antes de volver la columna QIAamp Midi.
8. Con cuidado, sin humedecer el borde, se añadieron 2 ml de tampón AW1 a la columna QIAamp Midi. Se cerró la tapa y centrifugar a 6000 rpm durante 3 minutos.
NOTA: No se tiro el flujo continuo en esta etapa.
9. Con cuidado y sin humedecer el borde, se añadió 2 ml de tampón AW2 a la columna QIAamp Midi. Se cerró la tapa y se centrifugo a 6000 rpm durante 15 minutos.
10. Se colocó la columna QIAamp Midi en un tubo de centrifuga de 15 ml limpio y se desechó el tubo de colección que contiene el filtrado.
NOTA: Se utilizó un pañuelo de papel mojado para limpiar cualquier derrame de la columna QIAamp Midi antes de la inserción en el tubo de centrifuga de 15 ml.
11. Se pipetearon 200 µl de Buffer AE, equilibrada a temperatura ambiente (15-25°C), directamente en la membrana de la columna QIAamp Midi y se cerró la tapa. Se incubo a temperatura ambiente durante 5 minutos y se centrifugo a 6000 rpm durante 2 minutos.
12. Se pipetearon 100 µl de Buffer AE, equilibrado a temperatura ambiente (15-25°C), directamente en la membrana de la columna QIAamp Midi y se cerró la

tapa. Se incubo a temperatura ambiente durante 5 minutos y se centrifugo a 6000 rpm durante 2 minutos.

Para el almacenamiento a largo plazo del ADN, se eludió en Buffer AE y se almacenó en alícuotas a -20°C para la posterior identificación de polimorfismos de un solo nucleótido en las mismas y se tomó una alícuota para verificar la calidad del ADN contenido.

Caracterización de las muestras de ADN por electroforésis

La electroforésis en gel de agarosa se realizó para verificar la integridad del ADN.

- a) Preparación del gel de agarosa al 1%: se mezclaron 5gr de agarosa grado biología molecular + 500 ml de TAE 1x y se calentó la mezcla por 3 min en horno de microondas.
- b) Se vació la solución en un molde con dos peines de 51 pozos, uno en la parte superior y otro a la mitad. La solución se dejó gelificar y el gel en su molde se colocó en una cámara de electroforesis.
- c) Se adicionaron 2.6 litros de TAE 1X y 6.6 μl de bromuro de etidio.
- d) Se cargaron en pozos independientes 10 μl de cada muestra (ADN de trabajo 50 ng/ μl) previamente mezclados con buffer de carga de Sigma y un marcador de peso molecular (4 μl)
- e) La electroforésis se dejó correr a 100 volts durante una hora.

VERIFICACION DE INTEGRIDAD DE ADN.

Después de correr las muestras, se removió el gel de agarosa con las muestras de la cámara de electroforesis y se verificó la calidad de las mismas en un transluminador M26 EPICHEMI DARKROOM 140562, por medio del programa Labworks 4.6.

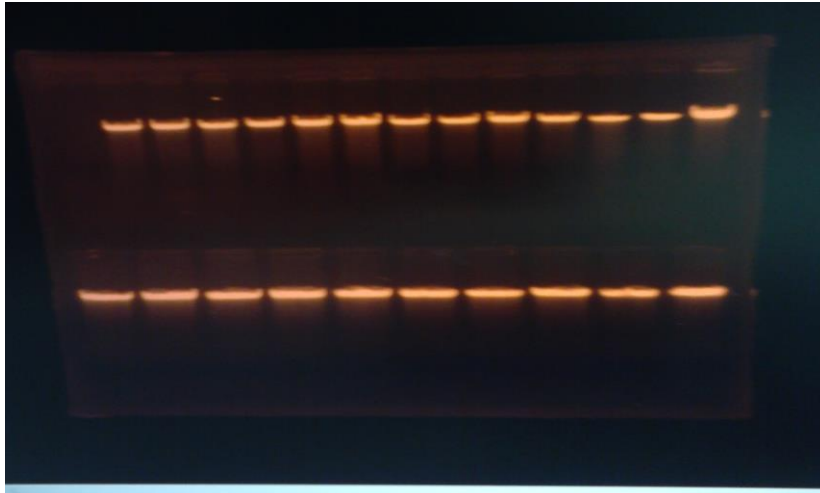


Figura 8.- Verificación de las muestras de ADN en gel de agarosa.

Determinación de la concentración de ADN



Figura 9.- Cuantificación de muestras de ADN en el equipo NanoDrop® TM 1000.

La cuantificación de ADN de las muestras se realizó con el espectrofotómetro de muestras pequeñas (2 μ l), utilizando los parámetros para ADN de doble cadena a una longitud de onda de 260 – 280nm:

- a) Inicialización del equipo. Efectuar la lectura de 2 μ l de agua grado biología molecular.
- b) Blanqueo: limpiar el NanoDrop® TM 1000 con un Kimwipe®, colocar 2 μ l de buffer AE Limpiar el NanoDrop® TM 1000 con un Kimwipe® y colocar 2 μ l de

cada una de las muestras que contiene el ADN, automáticamente los datos de las lecturas se almacenan en el disco duro de la computadora adaptada al equipo.

c) Repetir la lectura con la misma muestra del ADN.

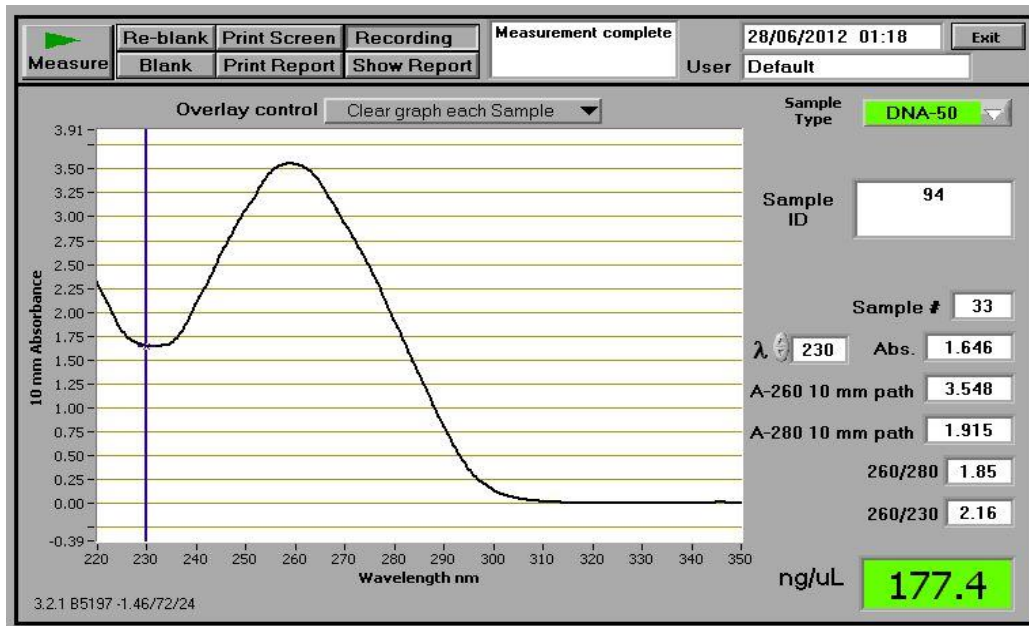


Figura 10.- Cuantificación y resultados de muestras de ADN en el equipo NanoDrop® TM 1000.

Preparación de diluciones de trabajo.

El análisis genómico de muestras de DNA mediante ensayos de discriminación alélica con sondas TaqMan® requiere de cantidades específicas de DNA (15ng/ensayo), por lo tanto todas las muestras deben de ser ajustadas a un volumen y concentración específico antes de proceder a la preparación de placas. A partir del DNA extraído en la etapa anterior se realizaron diluciones para preparar las soluciones de DNA de trabajo a una concentración de 3ng/μl, para reducir errores, depositaremos 5 μl en cada pozo de la placa para tener una concentración final de 15ng/ μl en el pozo. Para determinar la concentración y volumen se tomaron los

datos de las lecturas obtenidos en el espectrofotómetro, las cuales están expresadas en ng/ μ l, y se utilizó la fórmula $(C1) (V1) = (C2) (V2)$

Dónde:

C1 = es la concentración Inicial (lectura emitida por el espectrofotómetro).

V1 = volumen de DNA stock fijado de acuerdo a la concentración.

C2 = Concentración de tubo de trabajo (50 ng/ μ l).

V2 = Volumen final de la solución.

Genotipificación mediante ensayo de discriminación alélica con sondas TaqMan®

- a) Se agregaron 220 μ l de Master Mix y 290 μ l de agua libre de DNAsas en un microtubo de 0.6 ml.
- b) De la mezcla del inciso a) se tomaron 63 μ l y se colocaron en cada tubo de una tira de 8 tubos para PCR.
- c) De cada tubo de la tira de PCR se tomaron 5 μ l con una pipeta multicanal 1-10 μ l y se vaciaron en cada columna de una placa de 96 pozos, cambiando puntas para cada una de las columnas.

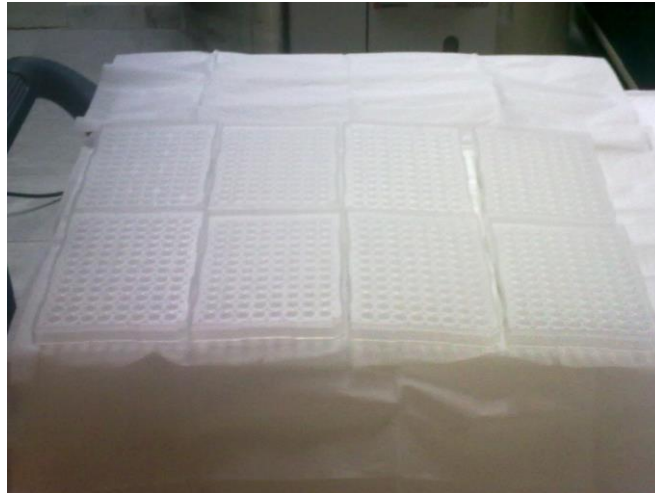


Figura 11.- Placas con muestras de ADN.

En la placa se colocaron 2 blancos (NTC) distribuidos para corroborar que los resultados son fidedignos. La placa quedó como sigue:

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|------|-----|-----|------|------|-----|------|------|-----|-----|-----|-----|
| A | NTC | 839 | 583 | 845 | 485 | 574 | 54 | 600 | 140 | 202 | 601 | 500 |
| B | 499 | 629 | 735 | 909 | 647 | 43 | 331 | 747 | 405 | 453 | 427 | 88 |
| C | 370 | 446 | 452 | 195 | 1403 | 466 | 571 | 77 | 227 | 307 | 551 | 60 |
| D | 709 | 625 | 589 | 491 | 276 | 277 | 931 | 1405 | 306 | 891 | 554 | 129 |
| E | 951 | 611 | 343 | 330 | 82 | 237 | 487 | 807 | 711 | 332 | 190 | 677 |
| F | 779 | 794 | 812 | 1114 | 568 | 661 | 337 | 51 | 964 | 817 | 374 | 488 |
| G | 1104 | 627 | 105 | 447 | 1018 | 598 | 1008 | 566 | 108 | 659 | 387 | 953 |
| H | 866 | 626 | 138 | 630 | 672 | 591 | 295 | 531 | 842 | 435 | 726 | NTC |

Figura 12.- Ejemplo de localización de muestras de ADN en placas.

- d) Se cubrió la placa con un sellador óptico, se centrifugó a 2000 rpm por un minuto y se colocó en un termociclador (PCR System 9700, Applied Biosystem), la PCR se corrió con el siguiente programa: 95 °C/10 min., 92°C/15 seg., 60°C/1 min. y 4 °C/infinito por 40 ciclos.



Figura 13.- Funcionamiento del equipo termociclador (PCR System 9700, Applied Biosystem).

e) La lectura de fluorescencia para la discriminación alélica se realizó en un termociclador con sistema de detección para RT-PCR.

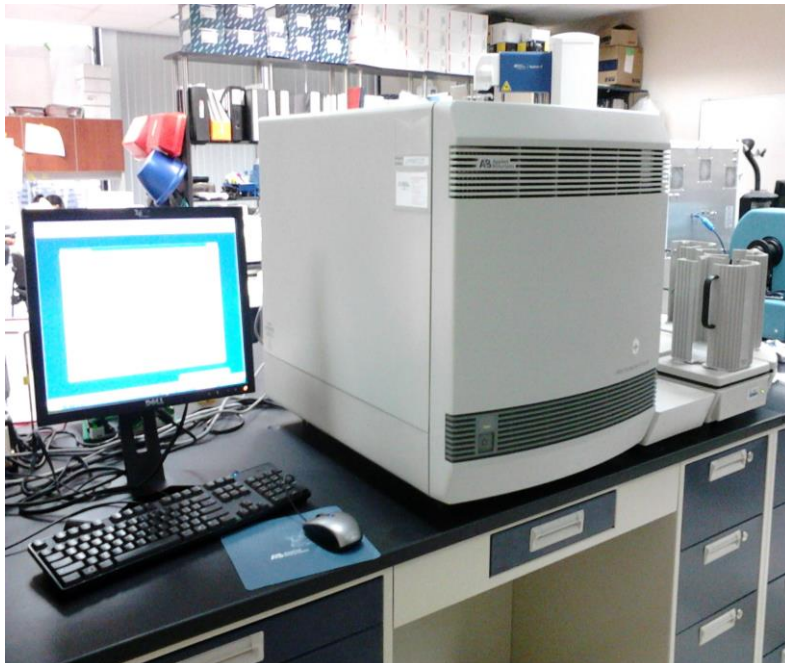


Figura 14.- Equipo termociclador (PCR System 9700, Applied Biosystem)

- f) Los datos de las lecturas se respaldaron en el disco duro de la computadora adaptada al equipo con el software SDS 2.3, los resultados se obtienen como gráficos de discriminación alélica DA y de tiempo real TR como los que se presentan a continuación.

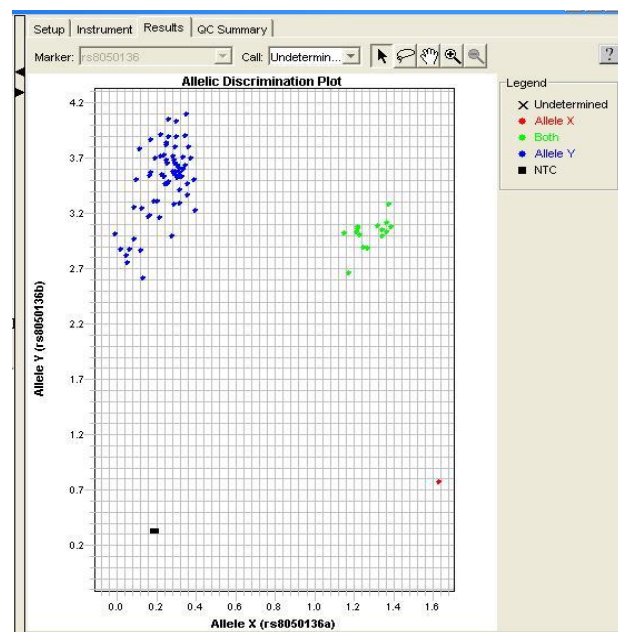
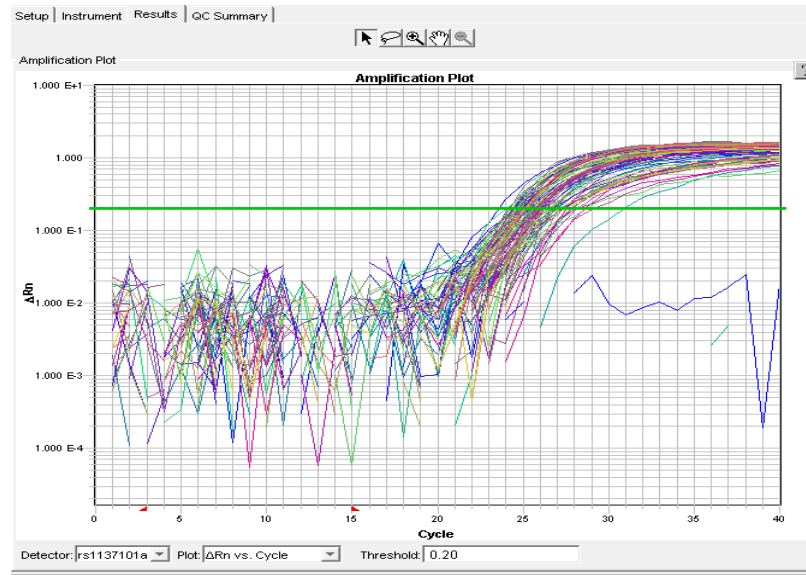


Figura 15.- Representación gráfica de los polimorfismos mediante el programa SDS 2.2.2

BIBLIOGRAFIA

1. Amundson DE, Djurkovic S, Matwiyoff GN. The obesity paradox. *Crit Care Clin* 2010; **26**(4): 583-96.
2. Lobstein T, Baur L, Uauy R. Obesity in children and young people: a crisis in public health. *Obes Rev* 2004; **5 Suppl 1**: 4-104.
3. Bonvecchio A, Safdie M, Monterrubio EA, Gust T, Villalpando S, Rivera JA. Overweight and obesity trends in Mexican children 2 to 18 years of age from 1988 to 2006. *Salud Publica Mex* 2009; **51 Suppl 4**: S586-94.
4. Azcona C, Sierrasesumaga L. Endocrine complications in children and adolescents with cancer. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2005; **18 Suppl 1**: 1163-7.
5. Rivera JA, Barquera S, Campirano F, Campos I, Safdie M, Tovar V. Epidemiological and nutritional transition in Mexico: rapid increase of non-communicable chronic diseases and obesity. *Public Health Nutr* 2002; **5**(1A): 113-22.
6. Martorell R, Khan LK, Hughes ML, Grummer-Strawn LM. Obesity in Latin American women and children. *J Nutr* 1998; **128**(9): 1464-73.
7. Galaviz KI, Tremblay MS, Colley R, Jauregui E, Lopez y Taylor J, Janssen I. Associations between physical activity, cardiorespiratory fitness, and obesity in Mexican children. *Salud Publica Mex* 2012; **54**(5): 463-9.
8. Hernandez B, Gortmaker SL, Colditz GA, Peterson KE, Laird NM, Parra-Cabrera S. Association of obesity with physical activity, television programs and other forms of video viewing among children in Mexico city. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* 1999; **23**(8): 845-54.
9. Lissner L, Lanfer A, Gwozdz W, et al. Television habits in relation to overweight, diet and taste preferences in European children: the IDEFICS study. *Eur J Epidemiol* 2012; **27**(9): 705-15.
10. Hill JO, Melanson EL, Wyatt HT. Dietary fat intake and regulation of energy balance: implications for obesity. *J Nutr* 2000; **130**(2S Suppl): 284S-8S.
11. Hernandez B, Gortmaker SL, Colditz GA, Peterson KE, Laird NM, Parra-Cabrera S. Association of obesity with physical activity, television programs and other forms of video viewing among children in Mexico city. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999; **23**(8): 845-54.
12. Boeing H, Bechthold A, Bub A, et al. Critical review: vegetables and fruit in the prevention of chronic diseases. *Eur J Nutr* 2012; **51**(6): 637-63.
13. Jimenez-Cruz A, Bacardi-Gascon M, Jones EG. Consumption of fruits, vegetables, soft drinks, and high-fat-containing snacks among Mexican children on the Mexico-U.S. border. *Arch Med Res* 2002; **33**(1): 74-80.
14. Obesity: The Prevention, Identification, Assessment and Management of Overweight and Obesity in Adults and Children. London; 2006.
15. Christakis NA, Fowler JH. The spread of obesity in a large social network over 32 years. *N Engl J Med* 2007; **357**(4): 370-9.
16. Wells JC. Obesity as malnutrition: the dimensions beyond energy balance. *Eur J Clin Nutr* 2013.
17. Demerath EW. The genetics of obesity in transition. *Coll Antropol* 2012; **36**(4): 1161-8.
18. Hamann A, Matthaei S. Regulation of energy balance by leptin. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1996; **104**(4): 293-300.
19. Allison DB, Kaprio J, Korkeila M, Koskenvuo M, Neale MC, Hayakawa K. The heritability of body mass index among an international sample of monozygotic twins reared apart. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* 1996; **20**(6): 501-6.

20. Bjorntorp P. Thrifty genes and human obesity. Are we chasing ghosts? *Lancet* 2001; **358**(9286): 1006-8.
21. Wadikar DD, Premavalli KS. Appetite control and obesity. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2012; **52**(10): 949-56.
22. Wadikar DD, Premavalli KS. Appetite control and obesity. *Critical reviews in food science and nutrition* 2012; **52**(10): 949-56.
23. Suzuki K, Jayasena CN, Bloom SR. Obesity and appetite control. *Experimental diabetes research* 2012; **2012**: 824305.
24. Suzuki K, Simpson KA, Minnion JS, Shillito JC, Bloom SR. The role of gut hormones and the hypothalamus in appetite regulation. *Endocrine journal* 2010; **57**(5): 359-72.
25. Mutch DM, Clement K. Genetics of human obesity. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism* 2006; **20**(4): 647-64.
26. Wolf G. Leptin: the weight-reducing plasma protein encoded by the obese gene. *Nutrition reviews* 1996; **54**(3): 91-3.
27. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; **372**(6505): 425-32.
28. Stanley S, Wynne K, McGowan B, Bloom S. Hormonal regulation of food intake. *Physiol Rev* 2005; **85**(4): 1131-58.
29. Yu Z, Han S, Cao X, Zhu C, Wang X, Guo X. Genetic polymorphisms in adipokine genes and the risk of obesity: a systematic review and meta-analysis. *Obesity (Silver Spring)* 2012; **20**(2): 396-406.
30. Hoffstedt J, Eriksson P, Mottagui-Tabar S, Arner P. A polymorphism in the leptin promoter region (-2548 G/A) influences gene expression and adipose tissue secretion of leptin. *Horm Metab Res* 2002; **34**(7): 355-9.
31. Santos JL. Leptin-melanocortin system, body weight regulation and obesity. *Rev Med Chil* 2009; **137**(9): 1225-34.
32. Takaya K, Ogawa Y, Hiraoka J, et al. Nonsense mutation of leptin receptor in the obese spontaneously hypertensive Koletsky rat. *Nat Genet* 1996; **14**(2): 130-1.
33. Clement K, Vaisse C, Lahlou N, et al. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* 1998; **392**(6674): 398-401.
34. Liu YJ, Rocha-Sanchez SM, Liu PY, et al. Tests of linkage and/or association of the LEPR gene polymorphisms with obesity phenotypes in Caucasian nuclear families. *Physiological genomics* 2004; **17**(2): 101-6.
35. Ben Ali S, Kallel A, Sediri Y, et al. LEPR p.Q223R Polymorphism influences plasma leptin levels and body mass index in Tunisian obese patients. *Arch Med Res* 2009; **40**(3): 186-90.
36. Loos RJF. The genetic epidemiology of melanocortin 4 receptor variants. *Eur J Pharmacol* 2011; **660**(1): 156-64.
37. Zemel MB, Donnelly JE, Smith BK, et al. Effects of dairy intake on weight maintenance. *Nutr Metab (Lond)* 2008; **5**: 28.
38. Stevens G, Dias RH, Thomas KJ, et al. Characterizing the epidemiological transition in Mexico: national and subnational burden of diseases, injuries, and risk factors. *PLoS Med* 2008; **5**(6): e125.
39. Dubern B, Clement K. Leptin and leptin receptor-related monogenic obesity. *Biochimie* 2012; **94**(10): 2111-5.
40. Gonzalez-Jimenez E, Aguilar Cordero MJ, Padilla Lopez CA, Garcia Garcia I. [Monogenic human obesity: role of the leptin-melanocortin system in the regulation of food intake and body weight in humans]. *Anales del sistema sanitario de Navarra* 2012; **35**(2): 285-93.
41. Wang Y, Lim H. The global childhood obesity epidemic and the association between socio-economic status and childhood obesity. *International review of psychiatry* 2012; **24**(3): 176-88.

42. Nawarycz LO, Krzyzaniak A, Stawinska-Witoszynska B, et al. Percentile distributions of waist circumference for 7-19-year-old Polish children and adolescents. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity* 2010; **11**(4): 281-8.
43. Lubrano-Berthelier C, Cavazos M, Le Stunff C, et al. The human MC4R promoter: characterization and role in obesity. *Diabetes* 2003; **52**(12): 2996-3000.
44. Vaisse C, Clement K, Durand E, Hercberg S, Guy-Grand B, Froguel P. Melanocortin-4 receptor mutations are a frequent and heterogeneous cause of morbid obesity. *J Clin Invest* 2000; **106**(2): 253-62.
45. Scherag A, Dina C, Hinney A, et al. Two new Loci for body-weight regulation identified in a joint analysis of genome-wide association studies for early-onset extreme obesity in French and German study groups. *PLoS Genet* 2010; **6**(4): e1000916.
46. Loos RJ, Lindgren CM, Li S, et al. Common variants near MC4R are associated with fat mass, weight and risk of obesity. *Nat Genet* 2008; **40**(6): 768-75.
47. Dias NF, Fernandes AE, Melo ME, et al. Lack of mutations in the leptin receptor gene in severely obese children. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2012; **56**(3): 178-83.
48. Guizar-Mendoza JM, Amador-Licona N, Flores-Martinez SE, Lopez-Cardona MG, Ahuatzin-Tremery R, Sanchez-Corona J. Association analysis of the Gln223Arg polymorphism in the human leptin receptor gene, and traits related to obesity in Mexican adolescents. *J Hum Hypertens* 2005; **19**(5): 341-6.
49. Mergen H, Karaaslan C, Mergen M, Deniz Ozsoy E, Ozata M. LEPR, ADBR3, IRS-1 and 5-HTT genes polymorphisms do not associate with obesity. *Endocr J* 2007; **54**(1): 89-94.
50. Yiannakouris N, Yannakoulia M, Melistas L, Chan JL, Klimis-Zacas D, Mantzoros CS. The Q223R polymorphism of the leptin receptor gene is significantly associated with obesity and predicts a small percentage of body weight and body composition variability. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; **86**(9): 4434-9.
51. Mattevi VS, Zembruski 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**(9): 1179-85.
52. Duarte SF, Francischetti EA, Genelhu-Abreu V, et al. p.Q223R leptin receptor polymorphism associated with obesity in Brazilian multiethnic subjects. *Am J Hum Biol* 2006; **18**(4): 448-53.
53. Cieslak J, Skorczyk A, Stachowiak M, et al. Polymorphisms in 5'-flanking regions of genes encoding adiponectin, leptin, and resistin are not associated with obesity of Polish children and adolescents. *Mol Biol Rep* 2011; **38**(3): 1793-8.
54. Portoles O, Sorli JV, Frances F, et al. Effect of genetic variation in the leptin gene promoter and the leptin receptor gene on obesity risk in a population-based case-control study in Spain. *Eur J Epidemiol* 2006; **21**(8): 605-12.
55. Hinuy HM, Hirata MH, Forti N, et al. Leptin G-2548A promoter polymorphism is associated with increased plasma leptin and BMI in Brazilian women. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2008; **52**(4): 611-6.
56. Wang TN, Huang MC, Chang WT, et al. G-2548A polymorphism of the leptin gene is correlated with extreme obesity in Taiwanese aborigines. *Obesity (Silver Spring)* 2006; **14**(2): 183-7.