



**Facultad de Medicina
Departamento de Pediatría**

Relación de los niveles de resistina y de sus variantes genéticas con parámetros metabólicos en niños

TESIS DOCTORAL

Lorena Ortega Moreno
Licenciada en Biología

Directores:

Dra. Carmen Garcés Segura y Prof. Leandro Soriano Guillén

**Laboratorio de Lípidos
IIS-Fundación Jiménez Díaz**

La presente tesis doctoral ha sido realizada en el Laboratorio de Lípidos del IIS-Fundación Jiménez Díaz y dirigida por los doctores Carmen Garcés Segura y Leandro Soriano Guillén.

Los estudios de esta tesis doctoral han contado con la financiación de la Fundación Conchita Rábago y el Instituto de Salud Carlos III a través del proyecto FIS PI11/00344.

A mi abuela y a mis padres

Agradecimientos

Quiero en primer lugar dar las gracias al Profesor Manuel de Oya que hizo posible el estudio Cuatro Provincias y a quien me hubiera encantado conocer.

Mi más sentido agradecimiento a mi directora de tesis la doctora Carmen Garcés por haber hecho posible mi sueño, por sus innumerables correcciones que me han hecho aprender a escribir una tesis doctoral, por su paciencia a la hora de explicarme todas mis dudas y por todo lo que he aprendido durante este tiempo.

Gracias a mi director de tesis el Profesor Leandro Soriano por sus consejos durante la realización de la tesis y por sus explicaciones relacionadas con la Pediatría.

Agradecer a la Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz la concesión de una beca sin la cual no hubiera sido posible mi trabajo aquí ni la realización de esta tesis doctoral.

A Alicia, mi compi de laboratorio, por haber compartido conmigo dos años llenos de buenos y de malos momentos, por haberme escuchado y aconsejado, por su modo de ser tan alegre y por las risas que hemos pasado juntas.

A Pía por haberme introducido en el mundo lipídico y haber hecho posible la medición de las adipoquinas. Y también gracias a Luis por sus buenos consejos.

A Teresa por contestar siempre a todas mis preguntas acerca de la pediatría y por su compañerismo y afecto.

Gracias a Gema de micro por su constante buen humor y optimismo que consigue motivarte a seguir adelante.

Mil gracias a Diana por brindarme su cariño, su apoyo y su comprensión cuando lo he necesitado.

A Irene por ser tan amable siempre y a Arancha por su fuerza y sobre todo por su honestidad, un valor que cada día admiro más y que es difícil de encontrar.

Gracias a Marta, Adela y Ana por ser tan buenas compañeras y por el apoyo recibido.

Gracias a la gente del IMMA en el CEU por su acogida tan cariñosa y por hacerme sentir bien en todo momento. Especialmente gracias a Pilar por ayudarme con las muestras y tenerlas siempre a punto y a Ricardo por ayudarme en los experimentos y a amenizarme los días allí. Gracias a Cira por

ser capaz de solucionar cualquier problema técnico y no técnico y por su inestimable ayuda en los experimentos.

Gracias a Esther Ramiro, la secretaria de Pediatría, por su simpatía y eficacia resolviendo todos mis trámites administrativos.

Muchas gracias a Pili, mi amiga desde hace doce años y mi compañera de laboratorio desde hace uno, por estar ahí, por darme ánimos, por tu empatía y tu apoyo infinito dentro y fuera del laboratorio, y sobre todo por tu amistad auténtica e incondicional.

Gracias a todos mis amigos biólogos: Julia, Bea, Rochi, Vero, Alba, Gonzalo, ¡¡pichones sois los mejores!! Nadie os gana en buena gente, simpatía y en saber escuchar y darme ánimos, sois mi familia; me habéis ayudado siempre en todos estos años a ser mejor persona; vuestra confianza en mí me ha ayudado a superarme y a sentir que puedo con todo, amigos como vosotros no hay demasiados y me siento muy afortunada de teneros a mi lado siempre. Gracias por quererme tanto y hacerme sentir acompañada y segura. Gracias por vuestro apoyo.

Gracias a Berni, mi compañero en la vida, mi amigo, mi confidente, mi todo. Gracias por escucharme, animarme y aguantarme tantas cosas, por tu inestimable ayuda y tus consejos, por tus correcciones en la presentación de la tesis, por estar conmigo siempre, por confiar en mí, por tu apoyo sin condiciones y por hacerme mejor persona cada día a tu lado.

Gracias a mi familia. A mi abuela, que hoy se hubiera sentido muy orgullosa de mí, siempre te llevo conmigo allá donde vaya. A mis padres: sin vosotros yo no hubiera conseguido nada, os debo todo lo que soy, gracias por vuestro apoyo continuo. A mi tía Almudena que fue quien me dio la idea de estudiar biología y que siempre me ha instado a estudiar, a conocer y a aprender enseñándome que “la ley del mínimo esfuerzo” no es válida y que hay que luchar y sacrificarse para poder conseguir lo que uno quiere.

A mi tía Argentina por estar a mi lado, y a mis primos Vicente, Laura, Dudu y Jessy por ayudarme siempre. A Vicente y Dudu por ser mis hermanos y haberme apoyado desde que tengo uso de razón, por saber que puedo confiar en vosotros y por ayudarme siempre a sentirme bien.

ABREVIATURAS

c-HDL: colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad.

3'UTR: región 3' no traducible de un gen.

Abs260: absorbancia a 260nm.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADSF: factor secretado por el tejido adiposo.

AGL: ácidos grasos libres.

Akt: proteína kinasa.

Apo AI: apolipoproteína AI.

ApoB; ApoE: apolipoproteínas B y E.

ARNm: ácido ribonucleico mensajero.

c-LDL: colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad.

CT: colesterol total.

DCN: decorina.

DHEA-S: dehidroepiandrosterona-sulfato.

DM2: diabetes *mellitus* tipo 2.

DSP: procesador digital de señales.

EDTA-K₃: ácido etilendiaminotetraácetico.

ELISA: enzimoimmunoensayo.

FIZZs: región de zona inflamatoria (*found in inflammatory zones*).

GH/IGF-1: hormona del crecimiento/factor de crecimiento tipo insulínico tipo 1.

GSK3: proteína kinasa glucógeno sintasa 3.

HepG2: línea celular hepática humana.

HOMA-IR: *homeostasis model of assessment-insulin resistance*.

IL-6: interleuquina-6.

IMC: índice de masa corporal.

IOTF: *International Obesity Task Force*.

IRMA: ensayo inmunoradiométrico.

MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos tipo 1.

NF- κ B: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.

RBP4: *retinol binding protein-4*.

RELM: molécula similar a resistina (*resistin-like molecules*).

RETN: gen de la resistina humana.

RIA: radioinmunoensayo.

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real.

SHBG: globulina transportadora de hormonas sexuales.

SNPs: polimorfismos de un sólo nucleótido.

TG: triglicéridos.

TNF- α : factor de necrosis tumoral- α .

VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad.

Δ DCN: isoforma proteolítica de la decorina.

DCN: decorina.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
1. Influencia hormonal en las alteraciones asociadas con la obesidad.....	2
2. El tejido adiposo como órgano endocrino.....	5
3. El tejido adiposo como órgano secretor de adipoquinas.....	6
4. Tejido adiposo, hormonas sexuales y secreción de adipoquinas.....	9
5. Adipoquinas y factores de riesgo cardiovascular.....	10
6. Resistina.....	12
6.1 Resistina y variables antropométricas.....	14
6.2 Resistina, inflamación y resistencia a la insulina.....	16
6.3 Resistina y perfil lipídico.....	18
7. Resistina y polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs) del gen <i>RETN</i>	19
7.1 Polimorfismos del gen <i>RETN</i> asociados a obesidad.....	23
7.2 Polimorfismos del gen <i>RETN</i> , resistencia a la insulina y niveles lipídicos.....	24
HIPÓTESIS.....	29
OBJETIVOS.....	30
MATERIAL Y MÉTODOS.....	31
1. SELECCIÓN DE LA MUESTRA.....	33
1.1 Población.....	33

1.2 Tamaño muestral.....	33
1.3 Procedimiento de muestreo.....	34
2. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA.....	35
3. DETERMINACIONES ANTROPOMÉTRICAS.....	37
4. DETERMINACIONES LIPÍDICAS.....	38
5. DETERMINACIONES DE INSULINA, ÍNDICE HOMA-RI Y ÁCIDOS GRASOS LIBRES.....	39
6. DETERMINACIONES DE NIVELES DE HORMONAS SEXUALES.....	41
7. DETERMINACIONES DE NIVELES DE RESISTINA.....	41
8. DETERMINACIONES GENÉTICAS.....	44
8.1 Obtención y cuantificación del ADN.....	44
8.2 Determinaciones de los polimorfismos (SNPs) estudiados.....	46
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	49
10. LIMITACIONES DE ESTE ESTUDIO.....	50
RESULTADOS.....	51
1. DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN.....	53
1.1 Características antropométricas de la población.....	53
2. NIVELES DE RESISTINA EN LA POBLACIÓN Y ALTERACIONES METABÓLICAS.....	56
2.1 Relación de los niveles de resistina con las variables e índices antropométricos y con la composición corporal.....	58
2.2 Relación de los niveles de resistina con hormonas sexuales.....	59

2.3 Relación de los niveles de resistina con el perfil lipídico.....	60
2.4 Relación de los niveles de resistina y las variables relacionadas con la resistencia a la insulina.....	62
3. ESTUDIO DE SNPs (polimorfismos de un sólo nucleótido) EN EL GEN DE LA RESISTINA (<i>RETN</i>).....	62
3.1 Análisis del polimorfismo situado en la posición -420 (C/G) del gen <i>RETN</i> : rs1862513.....	63
3.1.1 Frecuencias genotípicas y alélicas del SNP rs1862513.....	63
3.1.2 Relación del SNP rs1862513 con los niveles de resistina.....	64
3.1.3 Relación del SNP rs1862513 con las variables antropométricas.....	65
3.1.4 Relación del SNP rs 1862513 con las variables lipídicas y con las variables relacionadas con resistencia a la insulina....	69
3.2 Análisis del polimorfismo situado en la posición 3' de la región 3' de UTR (C/T) del gen <i>RETN</i> : rs10401670.....	72
3.2.1 Frecuencias genotípicas y alélicas del SNP rs10401670.....	72
3.2.2 Relación del SNP rs10401670 con los niveles de resistina.....	72
3.2.3 Relación del SNP rs10401670 con las variables antropométricas.....	73
3.2.4 Relación del SNP rs 10401670 con las variables lipídicas y con las variables relacionadas con resistencia a la insulina.....	78
4. ANÁLISIS DE <i>TRACKING</i>	81

DISCUSIÓN.....	83
CONCLUSIONES.....	97
BIBLIOGRAFÍA.....	99
ANEXO I.....	123

INTRODUCCIÓN

La aparición de los procesos patológicos que conducen a la aterosclerosis y posterior enfermedad cardiovascular comienzan en la infancia (Holman *et al.* 1985, Haust 1990, Napoli *et al.* 1999). Estudios realizados empleando métodos ecográficos no invasivos han detectado lesiones ateroscleróticas en las arterias coronarias en el 17% de los individuos menores de 20 años estudiados (Tuzcu *et al.* 2001). Estos procesos patológicos se asocian con la presencia de factores de riesgo cardiovascular ya en edades tempranas (Berenson *et al.* 1998, McGill y McMahan 1998, Beauloye *et al.* 2007), factores de riesgo que se consideran predictivos de enfermedad cardiovascular en el individuo adulto (Berenson *et al.* 1989, Barker 2003, Barker 2004, Baker *et al.* 2007).

Entre los factores de riesgo más consistentemente asociados con la aparición de procesos ateroscleróticos y con la enfermedad cardiovascular está la obesidad (Abate 2000, McGill *et al.* 2002). La obesidad infantil, además de aumentar el riesgo de padecer obesidad en la edad adulta (Bouchard 1997, Whitaker *et al.* 1997, Kaufer y Ariza 1998), se asocia con la aparición de factores de riesgo cardiovascular a edades tempranas (Berenson *et al.* 1993, Garcés y de Oya 2007, Short *et al.* 2009, Bridger 2009) y se relaciona con la enfermedad cardiovascular en el adulto (Baker *et al.* 2007). Entre los factores de riesgo cardiovascular asociados a la obesidad que se observan en las primeras décadas de la vida se encuentran la intolerancia a la glucosa (Chu *et al.* 1998, Rizk y Yousef 2012), la hiperinsulinemia (Shea *et al.* 2003), la resistencia a la insulina (Sinha *et al.* 2002), la diabetes tipo 2 (Dietz 2001, Rocchini 2002), la dislipemia (Friedland *et al.* 2002) y la hipertensión arterial (Williams *et al.* 1992, Sorof *et al.* 2004).

1. Influencia hormonal en las alteraciones asociadas con la obesidad

La asociación de la obesidad con las alteraciones metabólicas enumeradas anteriormente depende del sexo y de la edad del individuo (Lauer *et al.* 1988, Chu *et al.* 1998, Glowinska *et al.* 2003, Carroll *et al.* 2005), es decir, parece depender del estadio de desarrollo del sujeto, sugiriendo que existe una modulación hormonal sobre los factores de riesgo que conducen a enfermedad cardiovascular. El estudio Cuatro Provincias (estudio 4P) en niños de 6 a 8 años de edad muestra que las alteraciones en los niveles de lípidos asociadas a la obesidad en el niño prepuberal presentan patrones diferentes respecto a los observados en el adulto, y diferencias importantes entre niños y niñas (Garcés *et al.* 2005), de modo que los ácidos grasos libres, considerados el nexo de unión de la obesidad con la resistencia a la insulina en la edad adulta (Boden 1997), están significativamente disminuidos en las niñas obesas prepuberales respecto a las no obesas de la población del estudio y no presentan diferencias entre niños obesos y no obesos (Garcés *et al.* 2005). Además, en este estudio, se ha observado que la asociación de sobrepeso con niveles disminuidos de colesterol-HDL (c-HDL) y de Apo-AI está presente solamente en los niños prepuberales con los niveles más altos de dehidroepiandrosterona sulfato (DHEA-S) (Garcés *et al.* 2007) sustentando la importancia de la influencia hormonal. Parece que es a partir de la edad de 8 años cuando los niveles de DHEA-S se relacionan con los niveles de lípidos (Garcés *et al.* 2007).

Se cree, por tanto, que la modulación hormonal puede tener una importancia capital en la historia natural de los factores de riesgo asociados al niño obeso que va a

determinar no sólo la aparición de estos factores de riesgo sino las diferencias entre sexos que tan importantes van a ser en el futuro.

La relación de los niveles hormonales con alteraciones lipídicas en adultos se ha constatado en algunos estudios observacionales que asocian niveles bajos de testosterona con niveles disminuidos de c-HDL en varones (Dorfman y Shipley 1956, Haffner *et al.* 1993, Zmuda *et al.* 1997, Van Pottelbergh *et al.* 2003), y en estudios que relacionan el incremento de testosterona con un aumento de triglicéridos y una disminución del c-HDL en mujeres pre y postmenopáusicas (Haffner *et al.* 1993). Además, en estudios caso-control realizados en hombres, se ha visto que el estradiol podría influir sobre los factores de riesgo de enfermedad coronaria ya que los hombres que presentaban enfermedad cardiovascular tenían mayores concentraciones de estradiol que los controles (Callou de Sá *et al.* 2011, Zheng *et al.* 2012).

En adolescentes también se ha documentado la asociación de los niveles hormonales con el perfil lipídico. Así, parte de los cambios en los niveles lipídicos en adolescentes varones se asocian a la testosterona (Kirkland *et al.* 1987, Morrison *et al.* 2003), que correlaciona de modo negativo con el c-HDL (Arslanian y Suprasonsin 1997) y también con la Apo B (Morrison *et al.* 2003), y el aumento de los niveles de c-HDL en mujeres jóvenes está relacionado con la producción de estrógenos (Srinivasan *et al.* 1985, Gorbach *et al.* 1989).

El paralelismo de la evolución de los niveles lipídicos y los niveles hormonales se ha constatado a nivel poblacional observándose que en situación prepuberal las concentraciones de colesterol total, triglicéridos y colesterol-LDL (c-LDL) son más altas en las niñas que en los niños y las concentraciones de c-HDL son más bajas en las niñas; sin embargo, cuando se llega a la pubertad, en los varones se produce un

descenso de c-HDL mientras que en las niñas se produce un aumento (López-Martínez *et al.* 1996).

Por otra parte, también existe una relación entre los niveles hormonales y las variables antropométricas en edad infantil (Wabitsch *et al.* 1995, Van Hooff *et al.* 2000, De Simone *et al.* 2001, Reinehr *et al.* 2005, Vedhuis *et al.* 2005, Bond *et al.* 2006), como se observa en el estudio de De Ridder *et al.* donde los cambios en la distribución de la masa grasa en niñas se relacionan con los niveles de testosterona y con los niveles de la fracción de estradiol no unida a SHBG (globulina transportadora de hormonas sexuales) (De Ridder *et al.* 1992). También en el estudio con niños prepuberales de Garnett *et al.* en 2004 las concentraciones de estradiol son predictivas del porcentaje de grasa (Garnett *et al.* 2004). En el estudio Cuatro Provincias se ha observado una correlación significativa de los niveles de testosterona con el peso en varones (Garcés *et al.* 2008).

Así mismo, durante la pubertad el metabolismo de la glucosa se ve influenciado por las acciones de las hormonas. Se sabe que el incremento de la resistencia a la insulina en adolescentes es un proceso fisiológico ligado al estado de maduración (Cook *et al.* 1993, Hannon *et al.* 2006, Xu *et al.* 2012), debido en parte a un incremento de GH/IGF-1 característico de la pubertad (Hannon *et al.* 2006, Brufani *et al.* 2009), relacionado a su vez con el incremento de la secreción de hormonas esteroideas observado durante la pubertad (Cook *et al.* 1993).

Se ha documentado un dimorfismo sexual en la sensibilidad a la insulina a lo largo de la pubertad (Brufani *et al.* 2009). Así, las adolescentes obesas son más insulinoresistentes que los adolescentes obesos, y la disminución de la sensibilidad a la insulina en las niñas ocurre en estadios de desarrollo más tempranos que en los niños

(Brufani *et al.* 2009). El incremento de la resistencia a la insulina en púberes con normopeso se puede transformar en un proceso patológico en adolescentes con sobrepeso u obesidad aumentando el riesgo de padecer diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) en edades puberales (Siervogel *et al.* 2003, Ball *et al.* 2005, Hannon *et al.* 2006), aunque hay datos discordantes sobre el patrón evolutivo de la resistencia a la insulina en adolescentes obesos (Guzzaloni *et al.* 2002, Ball *et al.* 2005). En los obesos puberales, según se avanza en el estado de desarrollo puberal se va disminuyendo la sensibilidad a la insulina deteriorándose la funcionalidad de las células β pancreáticas (Ball *et al.* 2005). Pinhas-Hamiel *et al.* en 1996 estudiaron casos de adolescentes obesos en los que la diabetes tipo 2 en las niñas comenzaba un año antes que en los niños, sugiriendo una influencia del estado de desarrollo puberal, relacionado a su vez con niveles hormonales (Pinhas-Hamiel *et al.* 1996).

2. El tejido adiposo como órgano endocrino

Los mecanismos biológicos que pudieran explicar las asociaciones de la obesidad con alteraciones metabólicas no han sido totalmente clarificados todavía (Van Gaal *et al.* 2006). Se sabe que la obesidad se caracteriza por un exceso de tejido adiposo (Tanti *et al.* 2013). El tejido adiposo lo constituyen la matriz estromo-vascular y los adipocitos. En esa matriz estromo-vascular se encuentran diferentes células como preadipocitos, monocitos y macrófagos (Wisse 2004), que junto a los adipocitos, son capaces de secretar citoquinas (Hajer *et al.* 2008) y adipoquinas (Trayhurn y Wood 2004, Xu *et al.* 2012) con propiedades inflamatorias intrínsecas (Maury y Brichard 2010). Además, los adipocitos expresan receptores de catecolaminas y de péptidos producidos por el hipotálamo relacionándose así con el sistema nervioso central (Kershaw y Flier 2004).

En el tejido adiposo se expresan más de 8000 genes cuyos productos están involucrados en inflamación, metabolismo lipídico, homeostasis de la glucosa y sensibilidad a la insulina (Sethi y Vidal-Puig 2007). Por tanto, todas estas características y funciones del tejido adiposo hacen que se considere como un auténtico órgano endocrino (Kershaw y Flier 2004, Álvarez-Castro *et al.* 2011). El tejido adiposo tiene, por tanto, un papel importante en el metabolismo de la glucosa, y el exceso de tejido adiposo se asocia a anomalías en la glucemia (Hajer *et al.* 2008), elevación plasmática de ácidos grasos libres (Maury y Brichard 2010), y disminución del c-HDL (Abate 2000).

3. El tejido adiposo como órgano secretor de adipocinas

Algunas de las moléculas producidas por el tejido adiposo son el TNF- α , IL-6, componentes del sistema renina-angiotensina-aldosterona y adipocinas como resistina leptina, adiponectina, adiposina, omentina y visfatina (Ahima y Flier 2000, Konrad *et al.* 2007, Hajer *et al.* 2008, Martos-Moreno *et al.* 2013).

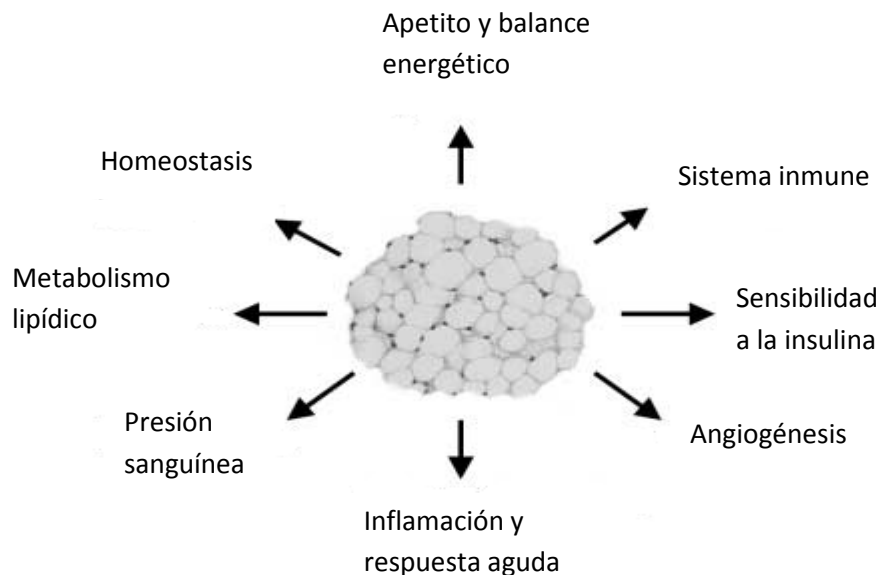
Las adipocinas son, por tanto, proteínas secretadas y sintetizadas por los adipocitos del tejido adiposo (Trayhurn y Wood 2004), aunque no todas son exclusivas de los adipocitos ya que también otras células pueden secretar algunas de las adipocinas como, por ejemplo, las células endoteliales y los macrófagos, entre otros, que secretan resistina (Gharibeh *et al.* 2010).

Una de las primeras adipocinas identificadas fue la adiposina a mediados de los años 80 (Cook *et al.* 1985, Cook *et al.* 1987); sin embargo no fue hasta 1994 con el descubrimiento de la leptina (Zhang *et al.* 1994) cuando los adipocitos comenzaron a considerarse células endocrinas (Trayhurn y Wood 2004).

Las adipocinas son un factor clave en la regulación del metabolismo (Xu *et al.* 2012). Así pues, entre las funciones fisiológicas de las adipocinas se encuentran la homeostasis energética y vascular (Trayhurn y Wood 2004), pudiendo intervenir en funciones inmunitarias (Maury y Brichard 2010), en el transporte de glucosa (Fuente-Martín 2012) en la función endotelial (Ouchi *et al.* 1999) o en la producción de triglicéridos (Rubin *et al.* 2011), así como relacionarse con los ácidos grasos (Taube *et al.* 2012).

En la figura 1 se esquematizan algunas de las funciones más importantes de las adipocinas.

Figura 1. Funciones de las adipocinas secretadas por los adipocitos (adaptación de Trayhurn *et al.* 2004).



La patogénesis de la obesidad comienza con una serie de cambios metabólicos, endocrinos e histológicos del tejido adiposo (Hausman *et al.* 2001, Wellen *et al.* 2003, Coppack 2005), produciéndose una inflamación del tejido adiposo caracterizada por la

hipertrofia (aumento de tamaño) (Hausman *et al.* 2001, Spalding *et al.* 2008) e hiperplasia (aumento del número) de los adipocitos (Spalding *et al.* 2008). El aumento del tamaño del adipocito genera una serie de alteraciones en la secreción de proteínas y de adipoquinas (Skurk *et al.* 2007, Hajer *et al.* 2008, Lafontan y Girard 2008, Hansen *et al.* 2010, Maury y Brichard 2010, Boscaro *et al.* 2012) dando lugar a la aparición de los factores de riesgo cardiovascular (Wellen *et al.* 2003, Trayhurn y Wood 2004, Ferrante 2007, Gustafson *et al.* 2007, Esteve *et al.* 2009, Maury y Brichard 2010, Rubin *et al.* 2011) y metabólico (Hansen *et al.* 2010) asociados a obesidad.

Por lo tanto, la obesidad es un estado de inflamación crónica debida a cambios en las funciones de los adipocitos y de los macrófagos (Iacobellis *et al.* 2005), y se ha asociado con la acumulación de macrófagos en el tejido adiposo (Weisberg *et al.* 2003). La expansión del tejido adiposo produce hipoxia, lo que hace que se secreten citoquinas que estimulen los factores angiogénicos propios de este tejido (Trayhurn y Wood 2004) y, por ello, en la obesidad existe una disfunción del tejido adiposo aumentando también la secreción de algunas adipoquinas que son pro-aterogénicas, pro-inflamatorias y pro-diabéticas (Hajer *et al.* 2008).

Las concentraciones en plasma de algunas adipoquinas dependen del sexo (Esteve *et al.* 2009), y parece ser que variaciones en las adipoquinas circulantes durante la pubertad pudieran relacionarse con el desarrollo de las gónadas (Martos-Moreno *et al.* 2006). Además, la secreción de adipoquinas varía en función de la distribución de la grasa corporal y ésta difiere según el sexo. El tejido adiposo se puede clasificar según su localización en central o androide y en periférico o ginoide, y según su anatomía en visceral o subcutáneo (Boscaro *et al.* 2012). La diferenciación entre estos dos tipos de acumulación adiposa tiene gran importancia desde el punto de vista clínico para poder

valorar el grado de riesgo metabólico y cardiovascular. La obesidad central está ligada a las complicaciones metabólicas y cardiocirculatorias vinculadas a la resistencia a la insulina que pueden dar lugar al síndrome metabólico (Tfayli y Arslanian 2008). De modo que el perímetro abdominal (circunferencia de la cintura), que se utiliza para valorar la acumulación central de la grasa, se considera un indicador del riesgo cardiometabólico asociado a la obesidad (Lee *et al.* 2006).

El tejido adiposo visceral tiene mayor actividad de la lipoproteína lipasa que el subcutáneo, lo que hace que acumule más triglicéridos. Las diferencias metabólicas entre el tejido adiposo subcutáneo y visceral conciernen a su diferente respuesta a la lipólisis inducida por catecolaminas (Lafontan y Girard 2008). El tejido adiposo subcutáneo tiene una gran densidad de receptores α_{2A} -adrenérgicos mientras que el visceral tiene mayor densidad de receptores β -adrenérgicos, lo que explica la gran eficacia lipolítica de las catecolaminas y la pobre respuesta antilipolítica que ejerce la insulina en el tejido adiposo visceral. Esto hace que el exceso de ácidos grasos libres llegue por la vena portal al hígado produciendo daño hepático (Lafontan y Girard 2008).

4. Tejido adiposo, hormonas sexuales y secreción de adipoquinas

El tejido adiposo se relaciona con actividad de hormonas sexuales (De Maddalena *et al.* 2012). Los andrógenos se relacionan con el tejido adiposo visceral y los estrógenos con el tejido adiposo subcutáneo. El exceso de tejido adiposo visceral es el que se relaciona con alteraciones metabólicas y cardiovasculares (Hajer *et al.* 2008, Lafontan y Girard 2008, Boscaro *et al.* 2012). La distinta distribución de la grasa corporal entre los dos sexos comienza cuando se inicia la pubertad, que es cuando se produce la maduración sexual, y por tanto, los cambios hormonales en el individuo (Brufani *et al.*

2009). En estudios recientes se ha corroborado que la leptina correlaciona positivamente con la circunferencia de la cintura y la masa grasa (Shoppen *et al.* 2010). Asimismo, durante la pubertad existe un descenso de los niveles de adiponectina que es más acentuado en niños que en niñas. Esta disminución de los niveles de adiponectina en los niños parece ser que se relaciona con el incremento de los niveles de andrógenos (Xu *et al.* 2012) ya que los niveles de adiponectina correlacionan inversamente con la concentración de andrógenos (testosterona en particular) (Böttner *et al.* 2004, Tsou *et al.* 2004, Xu *et al.* 2012). Aparte de la adiponectina, también los niveles de adipoquinas como la leptina se han relacionado con la expresión androgénica (De Maddalena *et al.* 2012). En el caso de la leptina existe dimorfismo sexual en su síntesis y transporte, y las hormonas sexuales contribuyen a estas diferencias entre sexos (Loomba-Albrecht y Styne 2009), por tanto, los menores niveles de leptina observados en hombres se podrían explicar, al menos en parte, por la inhibición que ejercen los andrógenos circulantes (Horlick *et al.* 2000).

5. Adipoquinas y factores de riesgo cardiovascular

Así pues, el exceso de tejido adiposo visceral se relaciona con la resistencia a la insulina, la elevación plasmática de triglicéridos y el aumento de los niveles de c-LDL (Lafontan y Girard 2008), por lo que la disfunción del tejido adiposo aumenta el riesgo de padecer diabetes tipo 2 (Hajer *et al.* 2008) y enfermedad cardiovascular. Un sujeto con un índice de masa corporal (IMC) normal y exceso de tejido adiposo visceral tiene mayor riesgo de padecer síndrome metabólico que un sujeto obeso con menor acumulación de tejido adiposo visceral (Lafontan y Girard 2008).

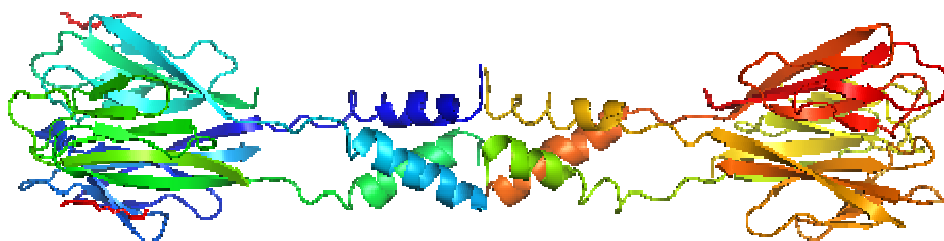
En la obesidad, las concentraciones anómalas de adipoquinas circulantes son marcadores de riesgo de enfermedades relacionadas con ella, como es la diabetes *mellitus* tipo 2 (Van Gaal *et al.* 2006). Estas alteraciones en las concentraciones séricas de adipoquinas son detectables en un estado prediabético y reflejan una disfunción del tejido adiposo (Tönjes *et al.* 2010) ya que, como se ha explicado anteriormente, los adipocitos hipertrofiados desarrollan un desequilibrio en la secreción de adipoquinas pro- y anti-inflamatorias (Esteve *et al.* 2009). Así, algunos autores han propuesto a las adipoquinas como biomarcadores de obesidad (Leoni *et al.* 2010).

Las adipoquinas que se relacionan con la resistencia a la insulina están asociadas también con otros factores de riesgo cardiovascular y esta asociación podría depender del grado de adiposidad en el individuo, como sugiere Rubin *et al.* (Rubin *et al.* 2011). Adipoquinas como la leptina y la adiponectina participan en la relación del tejido adiposo con la resistencia a la insulina (Xu *et al.* 2012). De esta forma, parece ser que la obesidad central ejerce un efecto sobre la relación de la adiponectina con la resistencia a la insulina (Xu *et al.* 2012). Además, concentraciones elevadas de adiponectina en plasma se relacionan con bajas concentraciones de triglicéridos (Rubin *et al.* 2011). También adipoquinas como el RBP4 se han relacionado con la resistencia a la insulina (Esteve *et al.* 2009). Se ha propuesto a la leptina como biomarcador de resistencia a la insulina en edades puberales y a los niveles de adiponectina como predictores de resistencia a la insulina asociada a obesidad en la pubertad ya que la adiponectina es un indicador independiente de HOMA-IR en niños con sobrepeso y obesos y también en niñas con sobrepeso, pero no lo es en adolescentes con normopeso (Xu *et al.* 2012). Otras adipoquinas como la visfatina se han asociado con diabetes *mellitus* tipo 2 (Chen M-P *et al.* 2006), y se ha observado un aumento de los niveles de visfatina según se va produciendo el deterioro de las células β en la diabetes (López-Bermejo *et al.* 2006).

6. Resistina

La resistina es una hormona polipeptídica de 12,5 KDa formada por 114 aminoácidos (Steppan *et al. Proc Natl Acad Sci USA* 2001) en ratones y por 108 aminoácidos en humanos (Steppan *et al. Nature* 2001, Gnacinska *et al.* 2009) perteneciente a la familia de proteínas FIZZs (del inglés *found in inflammatory zones*) que tienen el dominio C-terminal rico en cisteínas (Kim *et al.* 2001, Holcomb *et al.* 2000, McTernan *et al.* 2006). Esta característica del C-terminal también se encuentra en otras tres proteínas denominadas RELM- α , RELM- β y RELM- δ (del inglés *resistin-like molecules*) (Steppan *et al. Proc Natl Acad Sci USA* 2001, Gerstmayer *et al.* 2003). En la figura 2 se representa la estructura de la resistina en un modelo murino, en azul se representa el extremo N-terminal y en rojo el C-terminal rico en cisteínas (Patel *et al.* 2004).

Figura 2. Estructura de la resistina en modelo murino. (*pfam.sanger.ac.uk- Patel et al 2004*).



Esta adipoquina fue descubierta por tres grupos independientemente (Steppan y Lazar 2004, Gnacinska *et al.* 2009). Holcomb *et al* en el año 2000 la denominaron FIZZ3 (del inglés *found in inflammatory zone 3*) y la definieron como una secuencia relacionada con FIZZ1 la cual es inducida durante inflamación pulmonar (Holcomb *et al.* 2000). En el año 2001, Kim *et al* definieron a la resistina como un factor secretado por el tejido adiposo (ADSF) (Kim *et al.* 2001). Y por último, la resistina como tal fue

descubierta en el año 2001 por el grupo de Mitchell A. Lazar a partir de sus estudios en ratones en los que descubrieron que el gen de la resistina se expresaba durante la diferenciación de los adipocitos, demostrando que la proteína resistina es específicamente secretada por ellos (Steppan *et al. Nature* 2001). Como curiosidad, se decidió el nombre de resistina porque se observó que contribuía a la aparición de resistencia a la insulina en ratones con exceso de tejido adiposo (Steppan *et al. Nature* 2001).

En roedores la resistina deriva del tejido adiposo (Steppan *et al. Nature* 2001), y en humanos se secreta en macrófagos, monocitos, células del tejido adiposo, bazo, médula ósea (Patel *et al.* 2003), en pulmón, islotes pancreáticos y en tejido placentario (Kim *et al.* 2001, Fain *et al.* 2003, Yura *et al.* 2003, Minn *et al.* 2003). La resistina también se encuentra expresada en células madre mesenquimales de la médula ósea, en los osteoblastos y en los osteoclastos y parece ser que tiene un papel importante en el remodelado óseo (Thommesen *et al.* 2006), de modo que la resistina podría considerarse un factor importante en el desarrollo de comorbilidades asociadas a la obesidad y en enfermedades óseas debido a que los adipocitos y los osteoblastos derivan del mismo ancestro, las células madre mesenquimales (Beckers *et al.* 2013).

La acción de la resistina está regulada por insulina, glucosa y hormona del crecimiento, pero su función en humanos todavía no está bien esclarecida (Li *et al.* 2009); al principio se la asoció con obesidad y con resistencia a la insulina (Lee *et al.* 2003), ya que en ratones obesos se encontraba elevada (Steppan *et al. Proc Natl Acad Sci USA* 2001). En estudios con ratas se observó que la resistina está influenciada por el género, la maduración gonadal y por hormonas tiroideas (Nogueiras *et al.* 2003), lo que sugería que la resistina podría explicar la disminución de la sensibilidad a la insulina

característica de la pubertad actuando como enlace entre las hormonas esteroideas y la sensibilidad a la insulina.

6.1 Resistina y variables antropométricas

Estudios recientes asocian la concentración plasmática de resistina humana con obesidad y con factores de riesgo cardiovascular que se relacionan con ella incluyendo hiperinsulinemia y dislipemia e hipertensión (Asano *et al.* 2010), y se la ha relacionado con enfermedad cardiovascular en mujeres (Pischon *et al.* 2005); sin embargo los datos que hay en la literatura son contradictorios.

Algunos estudios afirman que en humanos obesos la cantidad de ARNm en el tejido adiposo visceral que expresa resistina es superior a la de humanos con normopeso (Steppan y Lazar 2004), que la resistina se encuentra elevada en obesos (Degawa-Yamauchi *et al.* 2003) y que correlaciona de forma positiva con índices de obesidad como el IMC (índice de masa corporal) (Fujinami *et al.* 2004, Vilarrasa *et al.* 2005, Aquilante *et al.* 2008, Asano *et al.* 2010); sin embargo en otros estudios atestiguan que los niveles de resistina en obesos no difieren de los casos con normopeso o control (Lee *et al.* 2003, Heilbronn *et al.* 2004), y varios estudios no encuentran relación de los niveles de resistina con el IMC (Savage *et al.* 2001, Heilbronn *et al.* 2004, Burnett *et al.* 2005, Won *et al.* 2009, De Luis *et al.* 2009). Como puede leerse en la revisión de Dyck *et al.* (Dyck *et al.* 2006), un gran número de estudios no han conseguido demostrar la relación de la obesidad con la concentración de resistina circulante.

En niños algunos estudios apuntan a que no existen diferencias entre obesos y normopeso en cuanto a niveles de resistina (Gerber *et al.* 2005, Reinehr *et al.* 2006), aunque otros estudios sí relacionan características de la obesidad en adolescentes con

niveles elevados de resistina en plasma (Makni *et al.* 2013). Algunos autores sostienen que las concentraciones de resistina en niños son mayores en el sexo femenino que en el sexo masculino (Gerber *et al.* 2005, Reinehr *et al.* 2006, Martos-Moreno *et al.* 2006). En cuanto a la edad del individuo, en niños, hay indicios de que la resistina correlaciona de forma negativa con ella (Gerber *et al.* 2005), aunque en este aspecto también hay controversias (Reinehr *et al.* 2006, Martos-Moreno *et al.* 2011).

Los diferentes resultados obtenidos referentes a los estudios de resistina en humanos, tanto en niños como en adultos, pueden deberse al empleo de distintas metodologías y a que no se ha tenido en cuenta la composición corporal de masa grasa (Won *et al.* 2009). Hay estudios en adultos que sí han considerado la masa grasa del individuo y que han encontrado una asociación de los niveles de resistina con la masa grasa (Degawa-Yamauchi *et al.* 2003, Yannakoulia *et al.* 2003, Won *et al.* 2009, De Luis *et al.* 2010). Vozarova de Courten *et al.* en su estudio con indios Pima en 2004 concluyó que concentraciones elevadas de resistina predecían elevaciones en el porcentaje de masa grasa corporal (Vozarova de Courten *et al.* 2004); sin embargo en otros casos no se ha encontrado ninguna relación de los niveles de resistina con el porcentaje de masa grasa en adultos (Lee 2003 *et al.*, Silha 2003 *et al.*, Heilbronn *et al.* 2004).

Las diferencias entre sexos en la relación de la resistina con distintas variables antropométricas podrían tener que ver con los distintos depósitos de grasa situados en zonas diferentes del cuerpo según sea el sexo del individuo, aunque parece ser que más que la distribución de grasa es la cantidad de masa total la que se relaciona con la resistina en adultos (De Luis *et al.* 2009) y en niños (Ortega *et al.* 2013).

6.2 Resistina, inflamación y resistencia a la insulina

La resistina se ha asociado también con marcadores de inflamación (Konrad *et al.* 2007), correlacionando positivamente con factores pro-inflamatorios en adultos con aterosclerosis, con enfermedad renal, con inflamación del tracto respiratorio y con artritis reumatoide (Axelsson *et al.* 2006, Bo *et al.* 2005, Reilly *et al.* 2005, Senolt *et al.* 2007, Aquilante *et al.* 2008). La resistina induce disfunción endotelial, facilita la producción de moléculas de adhesión y promueve la proliferación de células del músculo liso (Burnett *et al.* 2005), y parece ser que interviene en el principio de la aterogénesis al estar relacionada con procesos inflamatorios (Piestrzeniewicz *et al.* 2008). En esta línea, se ha observado que la resistina se encuentra presente en lesiones ateroscleróticas en humanos y en ratones, y en éstos se ha visto que en las aortas dañadas, los niveles de ARNm que expresa resistina aumentan progresivamente según se desarrolla la enfermedad de aterosclerosis (Burnett *et al.* 2005). La resistina es por tanto considerada como marcador inflamatorio de aterosclerosis en humanos (Reilly *et al.* 2005). En humanos sanos, los niveles de resistina circulante correlacionan significativamente con los niveles circulantes de la quimoquina inflamatoria MCP-1 que es un activador de macrófagos en las placas de ateroma, así que la concentración de resistina se asocia a los niveles de MCP-1 que existen en circulación (Aquilante *et al.* 2008).

La obesidad es un estado de inflamación, por eso, en humanos, el aumento de la expresión de resistina en el tejido adiposo se debe a la infiltración de macrófagos que producen resistina, más que a los adipocitos propios del tejido adiposo (Curat *et al.* 2006). Estos hallazgos evidencian que la resistina se asocia con estados de inflamación

incluso en personas con bajo riesgo cardiovascular (Aquilante *et al.* 2008). Además, en estudios con roedores, se ha comprobado que la resistina estimula la producción de citoquinas inflamatorias como IL-6 y TNF- α vía NF- κ B, (Bockarewa *et al.* 2005, Jiang *et al.* 2013), y se ha observado en células acinares del páncreas de rata que la sobreproducción de resistina en estados de obesidad daña a las células pancreáticas activándose la vía NF- κ B y aumentando el riesgo de pancreatitis (Jiang *et al.* 2013).

Hay estudios que relacionan a la resistina con niveles de insulina (Asano *et al.* 2010) y algunos han observado una correlación positiva entre resistina circulante y resistencia a la insulina (Smith *et al.* 2003), así como que la resistina se encuentra elevada en pacientes diabéticos tipo 2 (Fujinami *et al.* 2004, Youn *et al.* 2004, Hasegawa *et al.* 2005); sin embargo otros estudios no han hallado correlación significativa entre la resistina y la resistencia a la insulina (Nagaev y Smith 2001, Savage *et al.* 2001, Janke *et al.* 2002, Degawa-Yamauchi *et al.* 2003, Heilbronn *et al.* 2004).

En estudios con animales, la resistina influye en el metabolismo de la glucosa hepática (Banerjee *et al.* 2004), y parece ser determinante en la resistencia a la insulina hepática inducida por una dieta rica en grasa (Muse *et al.* 2004); pero, como ya se ha dicho anteriormente, en humanos existen controversias al relacionar a la resistina con la resistencia a la insulina, (Heilbronn *et al.* 2004), ya que, al igual que en los estudios que relacionan a la resistina con la obesidad, no se ha tenido en cuenta el porcentaje de masa grasa corporal (Won *et al.* 2009). Parece que en lo que sí coinciden la mayoría de estudios es en la relación de la resistina con la resistencia a la insulina en el hígado, ya que en experimentos con células hepáticas humanas HepG2 se ha observado que la

resistina produce resistencia a la insulina al inhibir la fosforilación de Akt y de GSK3, aumentándose así la gluconeogénesis hepática (Sheng *et al.* 2008, Li *et al.* 2013).

6.3 Resistina y perfil lipídico

En cuanto a una posible relación de la resistina con niveles de lípidos, algunos grupos han observado asociación entre los niveles de resistina y niveles de c-HDL y de triglicéridos (Asano *et al.* 2010); sin embargo los distintos estudios son contradictorios. Hay autores que sostienen que en el adulto la resistina correlaciona de modo positivo con los triglicéridos y de forma negativa con el c-HDL y con la Apo-AI (Norata *et al.* 2007), y otros que obtienen una correlación positiva con el c-HDL y negativa con el c-LDL (Owecki *et al.* 2010). En adultos existen diferencias en el patrón de correlación de los niveles de resistina plasmática con las variables metabólicas entre hombres y mujeres (Utzschneider *et al.* 2005, Norata *et al.* 2007, Aquilante *et al.* 2008, De Luis *et al.* 2009). De hecho, en algunos estudios la asociación de la resistina con variables como c-HDL solamente ocurre en mujeres (Norata *et al.* 2007, Aquilante *et al.* 2008), mientras que otros estudios han encontrado una asociación negativa de la resistina con el c-HDL solamente en hombres (Chen *et al.* 2005), y otros investigadores han obtenido correlaciones negativas de los niveles de resistina con c-HDL independientemente del sexo (Asano *et al.* 2010).

Los resultados de los estudios que relacionan a la resistina con el perfil lipídico en niños son escasos y, al igual que en el caso de los adultos, no son del todo homogéneos (Al-Daghri *et al.* 2010, Boyraz *et al.* 2013). Algunos trabajos recientes relacionan a la resistina con el síndrome metabólico en niños (Boyraz *et al.* 2013, Makni *et al.* 2013),

observando que los niveles de resistina de los niños obesos con síndrome metabólico correlacionan de modo muy significativo con las variables marcadoras de riesgo cardiovascular (circunferencia de la cintura, índice cintura-cadera, niveles de triglicéridos, etc) que presentan valores aumentados respecto a los del grupo de obesos y a los del grupo control (Makni *et al.* 2013).

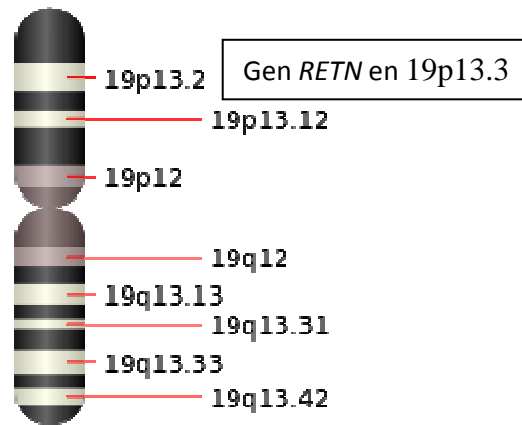
7. Resistina y polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs) del gen *RETN*

El estudio de los polimorfismos de un sólo nucleótido del gen de la resistina ha sido importante para intentar clarificar un poco más la relación entre los niveles de resistina e inflamación y adiposidad (Nussbaum *et al. Thompson y Thompson*, 2008).

El gen que codifica la resistina humana se denomina *RETN* y se localiza en la posición 13.3 del brazo corto del cromosoma 19 (19p13.3), (figura 3) (Cepica *et al.* 2002).

Alrededor del 70% de la variación en las concentraciones de resistina plasmática se puede explicar por factores genéticos (Menzhagui *et al.* 2006, Pantsulaia *et al.* 2007), y en el gen de la resistina se han descrito numerosos SNPs tanto en la región promotora del gen como en sus intrones, así como en la región 3'UTR (Conneely *et al.* 2004, Kunnari *et al.* 2005, Hivert *et al.* 2009, Asano *et al.* 2010).

Figura 3. Esquema del cromosoma 19 humano (<http://ghr.nlm.nih.gov> adaptado).



Existen variantes dentro o próximas al gen *RETN* que influyen en la abundancia de su ARNm (Tejero *et al.* 2008).

La posible influencia de SNPs, situados en la región promotora del gen *RETN*, sobre las concentraciones de resistina plasmática podría deberse a las distintas afinidades por los sitios de unión de los factores de transcripción en función de las diferentes secuencias (Chung *et al.* 2005). Puede ser que variantes de regiones no codificantes del gen *RETN* alteren los niveles de ARNm o su traducción, y por tanto, se vean modificados los niveles de resistina (Wang *et al.* 2002).

El SNP más estudiado del gen *RETN* es el rs1862513 (-420C>G) en la región promotora 5', situado en la posición -420 y consistente en un cambio de bases entre una C y una G, siendo el alelo G el menos frecuente (Cho *et al.* 2004, Kunnari *et al.* 2005). Este polimorfismo altera la actividad transcripcional del gen *RETN* y se asocia con niveles aumentados del ARNm del gen de la resistina en tejido adiposo abdominal (Menzhagui *et al.* 2006). La actividad del promotor del gen *RETN* es mayor en presencia del alelo minoritario G del SNP rs1862513 que en presencia del alelo C

(Smith *et al.* 2003, Osawa *et al.* 2004, Cho *et al.* 2004), lo que se traduce en que el alelo G de este polimorfismo podría estar fuertemente asociado a niveles de resistina circulantes (Lau y Muniandy 2011). El genotipo de menor frecuencia, GG, se ha asociado con mayores niveles de resistina en plasma (Smith *et al.* 2003, Cho *et al.* 2004, Osawa *et al.* 2004, Osawa *et al.* 2005, Osawa *et al.* 2007) ya que hace aumentar el ARNm de la resistina en el tejido graso abdominal (Smith *et al.* 2003), aunque hay estudios que no observan esta asociación (Chen *et al.* 2010).

Se ha visto que la frecuencia del alelo G del SNP rs1862513 es diferente entre caucásicos (32%) y mongoles (37%) (Wen *et al.* 2013). Varios grupos han estudiado este SNP en población asiática observando que se relaciona con la concentración de resistina plasmática (Asano *et al.* 2010, Cho *et al.* 2004, Osawa *et al.* 2007, Lau y Muniandy 2011), y se ha observado además que la asociación de este polimorfismo con los niveles de resistina en plasma se ha encontrado en población japonesa pero no en población caucásica (Hivert *et al.* 2009, Onuma *et al.* 2010).

Las frecuencias de otros SNPs del gen *RETN* también parece ser diferente dependiendo de la raza étnica, así como su influencia sobre la concentración de resistina en plasma (Asano *et al.* 2010). Esta posibilidad la contemplaron Asano *et al.* al comparar los resultados de su población japonesa con los resultados de la cohorte de *Framingham Offspring Study* de Hivert *et al.* compuesta por europeos (Hivert *et al.* 2009). Comparando entre ambos estudios el SNP rs3745368 de la región 3'UTR del gen *RETN*, Asano *et al.* observaron que el alelo minoritario A de este polimorfismo era más frecuente en población europea que en asiática (Asano *et al.* 2010).

El extremo 3'UTR de cualquier gen humano es muy importante ya que interviene en la formación del extremo 3' del ARNm, en su regulación y en su traducción; este

extremo 3' de un ARNm procesado consiste en una cola de poli A (Chen J-M *et al.* 2006). Los SNPs del gen *RETN* situados en regiones 3'UTR pueden afectar a la poliadenilación del ARNm de la resistina afectando así a su traducción, y por tanto a la concentración de resistina en plasma (Asano *et al.* 2010). Un ejemplo de SNP situado en esta región que se relaciona con la concentración de resistina en plasma es el SNP rs10401670 (C/T) (Hivert *et al.* 2009) en el que la presencia del alelo de menor frecuencia se relaciona con mayores niveles de resistina circulante (Hivert *et al.* 2009).

Otros SNPs situados en el extremo 3' de *RETN* como el SNP rs4804765 o el SNP rs1423096, se han asociado también con niveles de resistina en sangre en población caucásica (Hivert *et al.* 2009).

Hay autores que afirman que es la combinación del alelo minoritario G del SNP rs1862513 con el alelo A minoritario del SNP rs34861192 la que hace aumentar la actividad transcripcional del promotor del gen *RETN*, debido a que ambos SNPs se encuentran en desequilibrio del ligamiento (Azuma *et al.* 2004).

En algunas poblaciones se ha observado que la actividad promotora del gen *RETN* podría ser importante en la patogénesis de la obesidad, de la diabetes o de enfermedad cardiovascular ya que regula la concentración de resistina en plasma (Cho *et al.* 2004, Menzhagui *et al.* 2006, Hussain *et al.* 2011), de modo que polimorfismos situados en esta región promotora podrían relacionarse con estas enfermedades metabólicas. Hussain *et al.* en su estudio caso-control con 40 familias paquistaníes con historia de enfermedad coronaria, observó que el alelo minoritario del SNP rs1862513 se transmitía con una mayor frecuencia de padres a hijos afectados por la enfermedad (Hussain *et al.* 2011).

7.1 Polimorfismos del gen *RETN* asociados a obesidad

Existen variantes del gen de la resistina que se han relacionado con obesidad (Smith *et al.* 2003, Conneely *et al.* 2004), como por ejemplo los SNPs +156C>T y +298G>A (Conneely *et al.* 2004); sin embargo, esta asociación no está del todo clara. Beckers *et al.* en su estudio publicado en 2008 con los SNPs rs1862513 y rs3745369 no encontraron ninguna asociación con la obesidad (Beckers *et al.* 2008). En general, los estudios que relacionan SNPs del gen *RETN* con variables antropométricas son controvertidos, ya que hay estudios que no encuentran asociación de variantes génicas con el índice de masa corporal (Wang *et al.* 2002) y otros que sí la encuentran, como por ejemplo el de Mattevi *et al.* en el que observan que el SNP rs1862513 se asocia además a la circunferencia de la cintura en mujeres descendientes de europeos (Mattevi *et al.* 2004), o el estudio de Engert *et al.* en el que se observa que el alelo minoritario del SNP rs34861192 se asocia con un mayor IMC (Engert *et al.* 2002).

El polimorfismo rs1862513 se ha relacionado con el IMC en población japonesa, encontrando una asociación estadística entre el genotipo GG y un menor IMC (Hishida *et al.* 2013); sin embargo en varones de raza blanca, el genotipo de menor frecuencia, GG, se ha asociado con un mayor IMC y mayor porcentaje de masa grasa (Smith *et al.* 2003). En el estudio realizado por Engert *et al.* (Engert *et al.* 2002), con individuos francocanadienses, también el alelo G se asociaba con un mayor IMC, y en varones además se asociaba a mayor grasa corporal y a mayor circunferencia de la cintura (Engert *et al.* 2002); sin embargo, Beckers *et al.* no encontraron ninguna asociación de este SNP con el IMC (Beckers *et al.* 2008). El grupo de Beckers *et al.* han obtenido resultados variables en el estudio de SNPs del gen *RETN* y el IMC, de modo que no

hallaron relación del SNP rs3745369 con el IMC en su estudio de 2008 (Beckers *et al.* 2008), pero en un estudio posterior, encontraron asociación de otro polimorfismo, el SNP rs3745367 con el IMC, siendo el alelo minoritario de este SNP el que se asocia con un mayor IMC, y con otros parámetros antropométricos como son la circunferencia de la cintura y el porcentaje de masa grasa (Beckers *et al.* 2013).

En niños solamente hemos encontrado un estudio que relacione el SNP rs1862513 con obesidad (Cieslak *et al.* 2011), sin haber encontrado otros estudios sobre polimorfismos del gen *RETN* en población infantil.

7.2 Polimorfismos del gen *RETN*, resistencia a la insulina y niveles lipídicos

Existen variantes del gen de la resistina que se relacionan con la resistencia a la insulina (Smith *et al.* 2003, Conneely *et al.* 2004), así como con la sensibilidad a la insulina (Wang *et al.* 2002). Respecto a la asociación del SNP rs18562513 con la diabetes *mellitus* tipo 2 existen controversias entre distintos grupos. La forma GG del SNP rs1862513 se ha asociado con diabetes tipo 2 en algunos estudios (Osawa *et al.* 2004), pero no así en otros (Chen *et al.* 2010).

Se ha observado que los portadores del genotipo GG varones tienen niveles de glucemia significativamente superiores a los de los portadores de los otros dos genotipos (Kunnari *et al.* 2005), y hay estudios que asocian al genotipo GG con el comienzo temprano de la DM2 (Ochi *et al.* 2007). Sin embargo, otros estudios en población japonesa, han observado que el genotipo GG puede disminuir el riesgo de padecer DM2 (Hishida *et al.* 2013).

En el estudio de Wen *et al* en 2013 no se encontró asociación alguna entre el SNP rs1862513 y el riesgo de padecer DM2, así como tampoco encontraron relación alguna del SNP con el riesgo de diabetes el grupo de Lau *et al* en su estudio de 2013 en hombres malasios (Wen *et al.* 2013, Lau y Muniandy 2013). Otros SNPs del gen *RETN*, el SNP +156C>T y el +298G>A, se han relacionado con resistencia a la insulina en humanos (Conneely *et al.* 2004). SNPs en la región promotora 5' del gen *RETN*, como el -394 C/G, muestran relación con la sensibilidad a la insulina, presentando una mayor frecuencia en pacientes diabéticos que en controles (Wang *et al.* 2002).

En cuanto a la asociación de SNPs del gen de la resistina con perfil lipídico, estudios del SNP rs1862513 han observado que, en general, individuos portadores de GG tienen mayores niveles medios de c-LDL, c-HDL y de triglicéridos que los portadores de CC o de CG, asociándose así el genotipo GG a una mayor frecuencia de enfermedad cardiovascular y al SNP rs1862513 a aterogénesis (Kunnari *et al.* 2005).

SNPs de la región 3', como el SNP +1084G>A, también se han relacionado con niveles del colesterol-HDL, de modo que los portadores de GG tienen bajas concentraciones en plasma de c-HDL (Conneely *et al.* 2004). Estos descubrimientos sugieren que las variantes del gen de la resistina pueden afectar directamente al metabolismo del c-HDL. Hay estudios que postulan que niveles de Apo A-I también pueden verse afectados por el gen *RETN*, como el polimorfismo EX4-44G>A situado en la posición 3'UTR (Duman *et al.* 2007).

Otros autores no han obtenido resultados que asocien SNPs de *RETN* con el perfil lipídico (Cho *et al.* 2004, Gouni-Berthold *et al.* 2005, Tang *et al.* 2007, Asano *et al.* 2010).

Los estudios en niños de polimorfismos del gen *RETN* son muy escasos. En población infantil el único estudio que hemos encontrado de polimorfismos en el gen de la resistina es el de Cieslak *et al* (Cieslak *et al.* 2011), y este grupo no estudia perfil lipídico ni resistencia a la insulina.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Los niveles de resistina y los polimorfismos de su gen podrían estar relacionados con la obesidad y con las alteraciones metabólicas asociadas a ella en población infantil, pudiendo contribuir a explicar los cambios observados en la sensibilidad a la insulina en las distintas edades.

OBJETIVOS

1. Caracterizar los niveles de resistina plasmática en niños de 6 a 8 años y en niños de 12 a 16 años en función del sexo y de la categoría de peso.
2. Estudiar la asociación de los niveles de resistina con variables antropométricas, el perfil lipídico y con variables relacionadas con la resistencia a la insulina de acuerdo al sexo y a la edad.
3. Caracterizar las frecuencias de los polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs) del gen de la resistina, rs1862513 y rs10401670.
4. Estudiar la asociación de estos polimorfismos con niveles de resistina, variables antropométricas, variables lipídicas y con variables relacionadas con la resistencia a la insulina en función del sexo y la edad.
5. Analizar la relación de los niveles de resistina con hormonas sexuales.
6. Analizar la predictibilidad de los niveles de resistina a los 12-16 años en función de los niveles de resistina a los 6-8 años (estudio de *tracking*).

MATERIAL Y MÉTODOS

1. SELECCIÓN DE LA MUESTRA

1.1. Población

La población integrante de nuestro estudio la constituyen los niños del Estudio Cuatro Provincias (4P). Este estudio fue diseñado para evaluar diferentes factores de riesgo cardiovascular en niños de cuatro provincias españolas con distintas tasas de mortalidad cardiovascular (Garcés y de Oya 2007) e incluye niños de 6 a 8 años de edad en un primer corte y de 12 a 16 años de edad en un segundo corte del estudio, escolarizados en las provincias de Madrid, Orense, Cádiz y Murcia. Se excluyeron del estudio a los niños que presentaban cualquier tipo de patología renal y/o hepática, así como a los niños con algún tipo de enfermedad metabólica o endocrina.

El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité Ético del Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz. El conjunto de la investigación cumple las salvaguardias éticas de la Delegación de Helsinki, y sus posteriores actualizaciones, y la legislación española sobre investigación clínica en humanos.

1.2. Tamaño muestral

Los niveles de resistina se determinaron en 420 niños de 6 a 8 años lo que permite caracterizar a la variable con un nivel de confianza del 95% y un error (α) del 4,8%. En los niños de 12 a 16 años, la variable resistina se determinó en 712 niños, permitiendo caracterizar a la variable con un nivel de confianza del 95% y un error del 3,6% en este caso.

Para el análisis de los polimorfismos rs1862513 y rs10401670 calculamos el tamaño muestral necesario para distintos niveles de confianza asumiendo que las diferencias entre los valores esperados y los observados no superan el 5%. La prevalencia del alelo minoritario para el polimorfismo rs1862513 es del 30% de acuerdo a datos en otras poblaciones caucásicas, así pues el tamaño muestral necesario para obtener un nivel de confianza del 90% con un error del 5% es de 228 individuos, para un nivel de confianza del 95% es de 323 y para un nivel del 99% es de 558. En nuestro estudio tenemos genotipados a 1269 niños, cifra que supera el tamaño muestral para un nivel de confianza del 99%.

La prevalencia del alelo minoritario para el polimorfismo rs10401670 es del 40% de acuerdo a datos en otras poblaciones caucásicas. El tamaño muestral necesario para obtener un nivel de confianza del 90% con un error del 5% es de 260 individuos, para un nivel de confianza del 95% es 363 y para un 99% es de 637 individuos. En nuestro estudio hemos conseguido genotipar a 1251 niños superando el nivel de confianza del 99%.

1.3. Procedimiento de muestreo

Se trata de un estudio transversal, en el que los niños se seleccionaron mediante un muestreo aleatorio, estratificado y por conglomerados, en el que las unidades de análisis de referencia eran los centros públicos, concertados o privados de las provincias participantes. El muestreo tuvo dos etapas. En la primera, se seleccionaron los centros escolares, a partir de los datos de la Delegación Provincial de Educación que incluían el total de los colegios de cada provincia participante. En la segunda, se seleccionaron los alumnos.

Inicialmente, en un primer corte del estudio, se estudiaron niños de edades comprendidas entre 6 y 8 años de los colegios seleccionados.

Tras siete años, en un segundo corte, se volvieron a estudiar los niños incluidos en el primer corte del estudio que aceptaron participar, incorporando nuevos niños de edades similares y de los mismos colegios, hasta completar el tamaño muestral necesario para el estudio.

2. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

Los colaboradores de las distintas provincias (Prof. Ángel Gil en Madrid, Dr. Ovidio Fernández en Orense, Dr. Alipio Mangas y Dr. Alfonso Macías en Cádiz y Dr. Jacinto Fernández, y Prof. Alberto Torres en Murcia) se encargaron de solicitar la autorización a la Delegación Provincial de Educación y al responsable del Área de Salud o equivalentes autonómicos. Una vez obtenido este permiso contactamos con las direcciones y asociaciones de padres de alumnos de los centros elegidos y se les explicó el sentido y finalidad del estudio. Recibida la autorización por parte del colegio realizamos una presentación oral ante los padres de los niños seleccionados como candidatos al estudio, donde les entregamos una carta informativa y una autorización que tenían que firmar para que sus hijos participaran en el estudio.

A los colegios se desplazaron cinco ATS para realizar las extracciones, y un equipo de campo entrenado en la toma de medidas físicas a los niños y que se encargaba así mismo de la manipulación y correcto almacenaje de las muestras de sangre hasta su llegada al laboratorio de referencia.

Para ser incluido en el estudio, cada niño tenía que acudir con la autorización firmada por el padre, madre o responsable legal. Así mismo, no se incluyeron en el estudio niños afectados de patología crónica, cuadros sindrómicos y/o que recibieran tratamiento médico crónico. También se descartaron aquellos niños y niñas diagnosticados de pubertad precoz. La extracción se llevó a cabo a primera hora de la mañana y tras 12 horas de ayuno. A cada niño se le extraía, con material desechable, sangre por venopunción en dos tubos Venoject[®] (Terumo), uno vacío de 7 ml y otro de 3 ml conteniendo EDTA-K₃ como anticoagulante.

Desde el momento de la extracción hasta su traslado al laboratorio para su análisis, las muestras permanecieron en hielo.

Las muestras se centrifugaron durante 20 minutos a 3000 rpm y 4°C. Tras la centrifugación del tubo que contiene el anticoagulante, se obtenía, en la fracción inferior, las células que se trasvasaron a un tubo de vidrio reforzado que se congelaba a -70°C para posteriormente extraer el ADN. Se recogió la fracción superior (plasma) del tubo que contenía EDTA y la fracción superior (suero) del tubo sin EDTA. El plasma y el suero se alicuotaron para las determinaciones bioquímicas.

En las provincias de Orense, Cádiz y Murcia las muestras se centrifugaron inmediatamente después de la extracción y las células, y el plasma y suero eran guardados en criotubos, congelándolas a -70°C hasta su transporte en nieve carbónica a nuestro laboratorio en Madrid. Las muestras se almacenaron en el Biobanco del IIS-Fundación Jiménez Díaz (RD90/0076/00101).

3. DETERMINACIONES ANTROPOMÉTRICAS

De cada niño se recogieron las medidas de la talla, el peso, y las circunferencias de la cadera y de la cintura y a partir de estos datos se calcularon el IMC, el IMC Z-score, el índice cintura/cadera y el dato de circunferencia de cintura Z-score. Las medidas se realizaron con los niños vestidos con ropa ligera y sin zapatos.

El peso se midió hasta el último 0,1 kg con una balanza electrónica digital homologada y la talla se midió hasta el último milímetro con un estadiómetro portátil. El IMC (índice de masa corporal) se obtuvo mediante la fórmula: $\text{peso}(\text{kg})/\text{talla}(\text{m}^2)$ y el IMC Z-score se calculó de acuerdo a valores de referencia según el sexo y la edad en población infantil española (Carrascosa *et al.* 2008). Nuestra población fue categorizada en función de su IMC, sexo y edad en niños con normopeso, con sobrepeso u obesidad de acuerdo a los puntos de corte propuestos por Cole *et al* en una síntesis de estudios internacionales y asumidos por el IOTF (*International Obesity Task Force*) (Cole *et al.* 2000).

Hemos considerado el término exceso de peso como el conjunto formado por los escolares con sobrepeso u obesidad.

La circunferencia de la cintura (cm) se midió en la línea media entre el margen costal inferior y la cresta ilíaca a nivel de la espina ilíaca anteroposterior (con estimación de 0,5cm). La circunferencia de la cadera (cm) se determinó a nivel de los trocánteres mayores. A partir de ambas medidas se determinó el índice cintura/cadera. El Z-score de la circunferencia de la cintura se calculó de acuerdo a valores de

referencia en función del sexo y de la edad en población infantil de referencia (Fernández *et al.* 2004).

El peso en kg de la masa grasa y el porcentaje de la masa grasa corporal se midieron con un analizador de la composición corporal (Tanita TBF-300M, Arlington Heights, IL) a través de la impedancia bioeléctrica que indica la resistencia intrínseca del cuerpo al paso de corriente eléctrica. El músculo actúa como conductor de la corriente mientras que el tejido adiposo actúa como resistencia al paso de corriente. Para que el aparato pueda realizar estas medidas hay que introducir previamente los datos de sexo, edad y talla del sujeto. El aparato es capaz de medir un porcentaje de grasa corporal entre el 1 y el 75%.

4. DETERMINACIONES LIPÍDICAS

Las determinaciones lipídicas fueron realizadas en el Servicio de Bioquímica-Investigación del Hospital Ramón y Cajal en Madrid, a cargo del Dr. Miguel Ángel Lasunción.

El plasma recogido se utilizó para las siguientes determinaciones lipídicas:

- El colesterol total (CT) se valoró mediante técnica enzimática colesterol esterasa/colesterol oxidasa (Menarini) y posterior medición directa por absorción a 500 nm (Allain *et al.* 1974).

- La medición del c-HDL se determinó en el sobrenadante que resultó al precipitar, añadiendo al plasma ácido fosfotúngstico-cloruro de magnesio (Assmann *et al.* 1983), las lipoproteínas que contienen Apo B y Apo E (LDL y VLDL) (Burstein *et*

al. 1970), del plasma total. Tras la precipitación, el c-HDL se determinó en el sobrenadante mediante la misma técnica enzimática que el CT.

- Los triglicéridos (TG) se determinaron mediante método enzimático lipasa/oxidasa (Menarini) (Buccolo y David 1973).

- El c-LDL se calculó mediante la fórmula de Friedewald (Friedewald *et al.* 1972):

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

Siempre que el valor de TG fuese inferior a 300 mg/dl.

- Las determinaciones de la Apo-AI y la Apo B se realizaron por métodos inmunoquímicos con anticuerpos específicos para la parte proteica de la molécula (Marcovina *et al.* 1993).

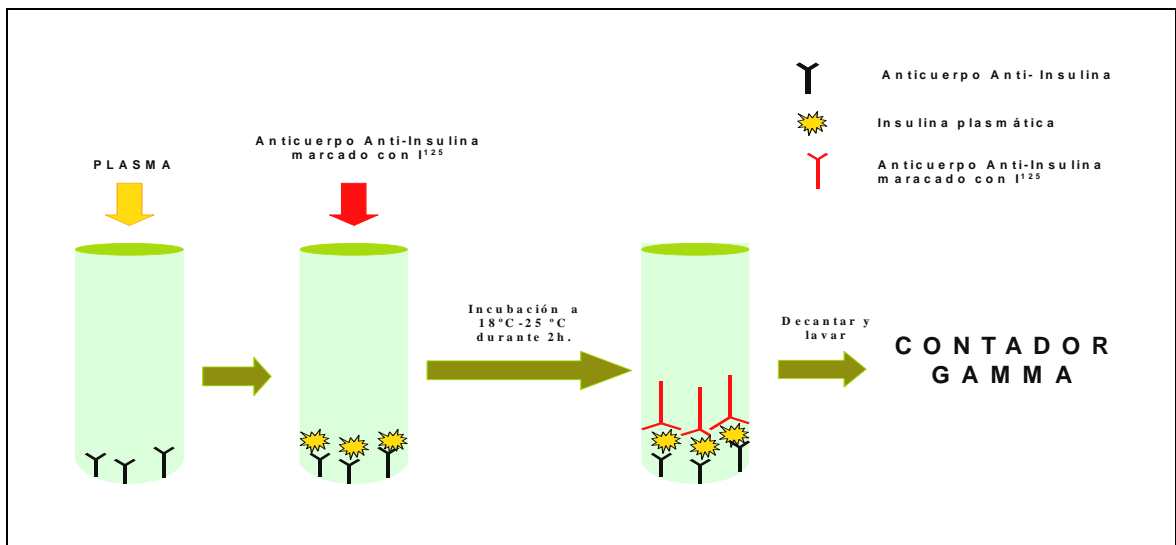
Todas las determinaciones lipídicas se llevaron a cabo en un autoanalizador Array-1000. La variabilidad analítica se evaluó mediante un control comercial (Precinorm y Precipath de Roche). Los coeficientes de variación interensayo fueron de 1,4% para el colesterol, 1,7% para los TG, 5,5% para la Apo AI y de 4,8% para la Apo B.

5. DETERMINACIONES DE INSULINA, ÍNDICE HOMA-RI Y ÁCIDOS GRASOS LIBRES

La medición de la insulina se realizó mediante un ensayo inmunoradiométrico (IRMA) de dos lugares de unión (Bio-Rad). El IRMA es un ensayo no competitivo en el

que el analito analizado se une a dos anticuerpos entre los que queda comprendido a modo de “sandwich”. El primer anticuerpo monoclonal se encuentra fijado a la pared interna de los tubos. El otro anticuerpo también monoclonal se marca radiactivamente con I^{125} para que pueda ser detectado. El analito presente en las muestras problema, los estándares y los controles se une a ambos anticuerpos formando un complejo tipo “sandwich”. El reactivo que no se haya unido se elimina mediante decantación y lavado de los tubos. El I^{125} emite una radiación tipo gamma, la cantidad de esta radiación se cuantifica en un contador gamma y de este modo se obtiene la concentración de insulina que contiene el suero de cada individuo (figura 4).

Figura 4. Determinación de la insulina mediante IRMA.



Una vez determinados los valores de glucosa e insulina calculamos el índice HOMA como marcador de resistencia a la insulina (Homeostasis Model Assesment of Insulin Resistance) mediante la siguiente fórmula:

$$\text{HOMA-IR} = \text{insulina (mU/L)} \times \text{glucosa (mmol/L)} / 22.5$$

Los ácidos grasos libres (AGL) se determinaron mediante el kit ACS/ACOD Method para la determinación cuantitativa de ácidos grasos libres en suero (Waco Nefac test kit, Wako Chemicals USA, Inc.).

6. DETERMINACIONES DE NIVELES DE HORMONAS SEXUALES

La medición de SHBG se llevó a cabo mediante el ensayo IRMA descrito en el apartado anterior. La medición de las hormonas dehidroepiandrosterona-sulfato (DHEA-S), testosterona y estradiol se realizó mediante una técnica de radioinmunoensayo (RIA, DSL), que consiste en la competición por una cantidad fija de lugares de unión al anticuerpo entre un antígeno radiactivo marcado con I^{125} y un antígeno no radiactivo. La cantidad de hormona marcada con I^{125} unida al anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración de hormona sin marcar presente en plasma. La separación del antígeno libre y el unido a anticuerpos se realiza mediante decantación de los tubos recubiertos de anticuerpos. El I^{125} emite una radiación tipo gamma, la cantidad de esta radiación se cuantifica en un contador gamma y de este modo se obtiene la concentración de la hormona que contiene el plasma de cada individuo.

7. DETERMINACIONES DE NIVELES DE RESISTINA

Los niveles de resisitina se determinaron mediante ensayos Bio-Plex[®] (Bio-Plex Pro[™] Human Diabetes Standard 10-Plex; Bio-Rad, Hercules, CA, USA), que permiten la detección simultánea de múltiples analitos en un mismo pocillo en placas de 96 pocillos. Las determinaciones se realizarán en un equipo Luminex 200 System

(Luminex corporation, Invitrogen; Caramillo, CA, USA), (figura 5). Este equipo se sustenta en tres tecnologías:

- Una tecnología que emplea microesferas marcadas fluorescentemente (xMAP) que permite la detección simultánea de hasta 100 moléculas distintas en un sólo pocillo de una placa de 96. Las microesferas xMAP son partículas de poliestireno altamente uniformes que se han entrecruzado durante la polimerización para obtener estabilidad física y térmica.
- Un citómetro de flujo con dos láseres de fibra óptica para medir las distintas moléculas ancladas a la superficie de las microesferas.
- Un procesador digital de señales (DSP) de alta velocidad que controla los datos de la fluorescencia.

En cada kit del ensayo Bio-Plex[®] (Bio-Plex Pro[™] Human Diabetes), encontramos 10 clases de beads o microesferas, cada uno de ellos con diferentes proporciones de dos fluorocromos en su interior, que al ser excitados por el láser del equipo de análisis, emiten diferentes señales lo que permite identificar las moléculas por separado.

El ensayo de la técnica de Luminex es similar al de un ELISA. Los anticuerpos (anticuerpos de captura) dirigidos contra el biomarcador deseado (molécula diana), se unen covalentemente a las microesferas magnéticas marcadas con fluorescencia. Las microesferas reaccionan con la muestra que contiene el biomarcador de interés. Después de varios lavados para eliminar la proteína no unida, se añade a la reacción un anticuerpo específico de detección biotinilado que se une a otro epítipo del biomarcador (en un sitio diferente al del anticuerpo de captura). Se añade el complejo estreptavidina-ficoeritrina que se une a los anticuerpos de detección biotinilados en la

superficie de las microesferas. La ficoeritrina actúa como un indicador de fluorescencia o reporter.

El análisis de los datos obtenidos por el sistema de Luminex (que es un láser dual) se recogen por un sistema lector de flujo que lee la placa. El contenido de los pocillos se llevan al lector. Los láseres y las fibras ópticas asociadas detectan la fluorescencia interna de cada microesfera para identificar el ensayo particular, es decir, para discriminar qué tipo de biomarcador está analizando. También detectan la señal fluorescente en la superficie de la microesfera, esto le señala el nivel de biomarcador que existe en la muestra. La intensidad de la fluorescencia indica la cuantificación relativa de biomarcador (molécula diana) que hay en las muestras. Un procesador digital de señales (DSP), da salida a los datos, que son analizados y presentados como intensidad de fluorescencia (FI) y concentración en el software Bio-Plex Manager™ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Las concentraciones de cada adipocina se calculan a partir de las curvas patrón generadas a partir de las concentraciones de los estándares de los calibradores, para cada adipocina, incluidos en cada ensayo de acuerdo al protocolo del kit (Bio-Plex Pro™ Human Diabetes Standard 10-Plex; Bio-Rad).

El rango de detección del ensayo Bio-Plex Pro human diabetes para la resistina se encuentra entre 2,3 y 4739 pg/ml, la sensibilidad del ensayo (límite de detección) es de 1,3 pg/ml, y la precisión expresada como coeficientes de variación intra e inter-ensayo es del 3% y del 4% respectivamente.

Figura 5. *Equipo Luminex 200 System.*



8. DETERMINACIONES GENÉTICAS

8.1. Obtención y cuantificación del ADN

El ADN se obtuvo de glóbulos blancos de sangre periférica utilizando un tampón de fuerza iónica baja que rompe la pared celular por ósmosis, permitiendo la obtención de los núcleos y de éstos el material genético.

Los aproximadamente 3 ml de células que se obtuvieron después de separar el plasma de la muestra, se distribuyeron en tubos de polipropileno de 50 ml, se llenaron con tampón Montreal-Baltimore Express 1, se equilibraron, si fue necesario, con el mismo tampón, se taparon y se mezclaron.

Se centrifugaron en una centrífuga de alta velocidad Beckman Avanti J-25 (rotor JA-20), durante 15 minutos a 13000 rpm y a 4°C. Una vez terminada la centrifugación se decantaron, cuidando de no arrastrar el precipitado. Este precipitado se resuspendió en 4 ml de tampón Montreal 2, vertiendo los 4 ml en un homogeneizador, se homogeneizó la muestra hasta obtener una solución homogénea que se depositó otra vez en el tubo de 50 ml. Se añadieron 100 µl de dodecil sulfato sódico-sal disódica (SDS) 20 % (Genaxis), se mezcló y se incubó unos minutos en baño a 65°C, se añadieron 150

μ l de proteinasa K 10 mg/ml (Promega), dejándolo incubar toda la noche en baño a 65°C con agitación.

Tras la digestión con SDS y proteinasa K se precipitaron las proteínas añadiendo al lisado de 4 ml, 1,5 ml de solución saturada de NaCl, agitando, equilibrando los tubos y centrifugando durante 15 minutos a 10000 rpm a temperatura ambiente. Se recogió el sobrenadante con una pipeta Pasteur y se transfirió a otro tubo de vidrio con tapón. En el nuevo tubo se precipitó el ADN añadiendo dos volúmenes de etanol absoluto 100% (Merck) frío por uno de sobrenadante, se invirtió con suavidad hasta que se visualizó la hebra de ADN. Se recogió el ADN con una pipeta Pasteur y se transfirió a un eppendorf con 500 μ l de Tris-EDTA (TE) 1X, se dejó disolver el ADN durante toda la noche en un agitador orbital antes de cuantificar.

La concentración de ADN se midió utilizando un espectrofotómetro Beckman DU 640B.

Los ácidos nucleicos absorben a 260 nm y las proteínas a 280 nm, y con la medida de estas dos absorbancias podemos calcular la concentración de ambos. Para considerar que un ADN está suficientemente purificado, la relación Abs_{260}/Abs_{280} debe estar entre 1,8 y 2.

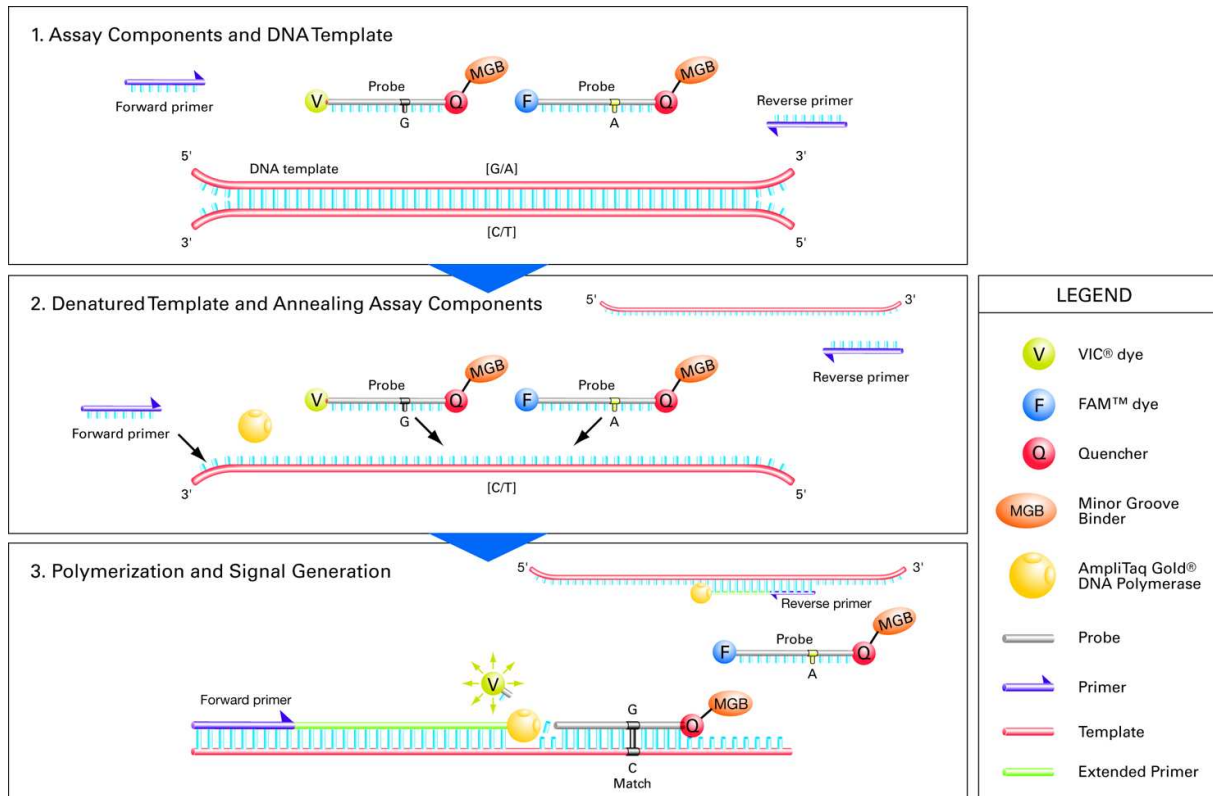
El programa nos midió la absorbancia a 260 nm, debida a los ácidos nucleicos, y a 280 nm debida a las proteínas, y en función de estos valores nos calculó la concentración tanto de proteínas como de ácidos nucleicos. Para calcular la concentración real de nuestra muestra, teníamos que multiplicar la concentración por el factor de dilución.

8.2. Determinaciones de los polimorfismos (SNPs) estudiados

Analizamos dos SNPs (polimorfismos de un sólo nucleótido) del gen de la resistina, el rs1862513 y el rs10401670. El SNP rs1862513 está situado en la posición -420 del gen *RETN* en la zona del promotor, y consiste en el cambio de una C por una G. Y el SNP rs10401670 se encuentra en la región 3'UTR del gen de la resistina, y consiste en un cambio de bases entre una C y una T. Estos polimorfismos se determinaron mediante la técnica PCR real time (RT-PCR) en un termociclador 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Para ello empleamos ensayos de discriminación alélica comercializados por Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Estos ensayos fueron el ID C_1394112_10 para el SNP rs1862513 C/G-420 y el ID C_1394125_10 para el SNP rs10401670 C/T de 3' de 3'UTR.

Los ensayos de discriminación alélica Taqman® (Applied Biosystems), llevan dos sondas para la detección, en cada caso, del alelo 1 y el alelo 2 marcadas con los fluorocromos VIC® y FAM™ respectivamente. En la figura 6 se esquematiza el desarrollo de la discriminación alélica y posterior amplificación que tiene lugar en la RT-PCR.

Figura 6. Esquema del protocolo de discriminación alélica y amplificación (*Allelic Discrimination Getting Started Guide. Applied Biosystems*).



Se emplearon 20ng de ADN 900 nM de oligonucleótidos, 200 nM de las sondas y Taqman® Genotyping master mix (Applied Biosystems) 2X. El software (SDS 2.2.2 Allelic Discrimination Software v1.4 (Applied Biosystems, Foster City, CA)) amplifica la señal de las sondas. Las condiciones de amplificación fueron las recomendadas por ABI: 40 ciclos que comienzan en una desnaturalización a 95°C durante 10 min, hibridación a 92 °C durante 15 segundos y posterior extensión a 60°C durante 1 min. Los genotipos fueron asignados automáticamente tras la detección de la fluorescencia de cada muestra con el software específico (SDS 2.2.2 Allelic Discrimination Software v 1.4 (Applied Biosystems, Foster City, CA)) como se muestra en las figuras 7 y 8.

Figura 7. Mapa de discriminación alélica del SNP rs1862513 del gen RETN. Los rombos representan el genotipo homocigoto para el alelo G, los triángulos el genotipo heterocigoto(CG) y los círculos a los individuos homocigotos para el alelo C. Los cuadros grises son los controles negativos (NTC).

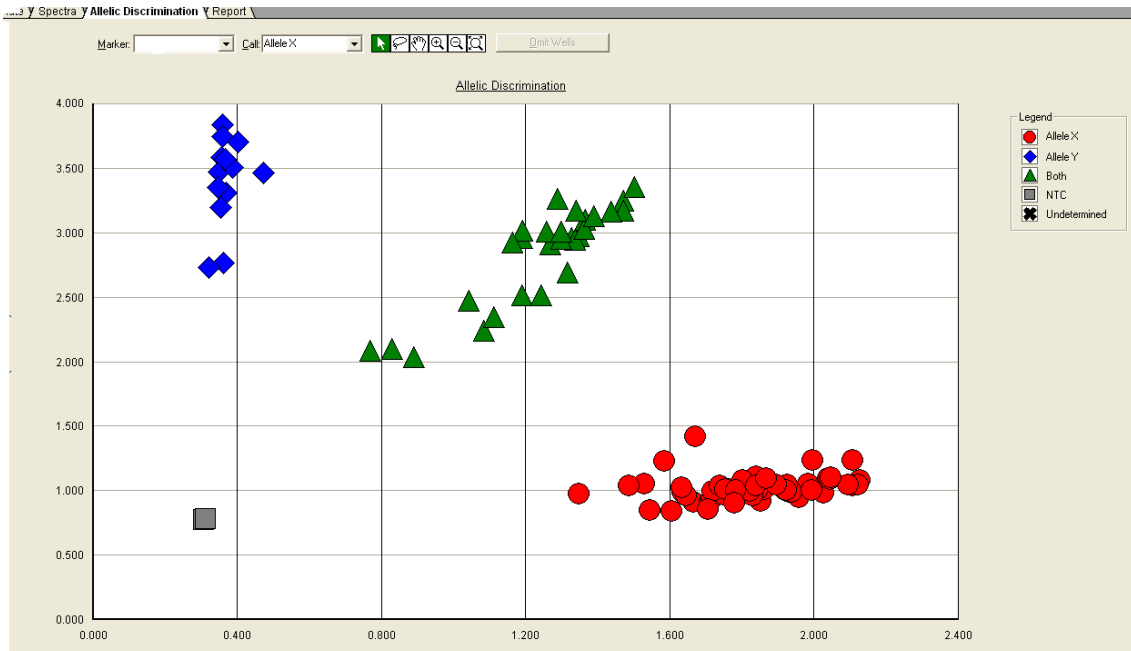
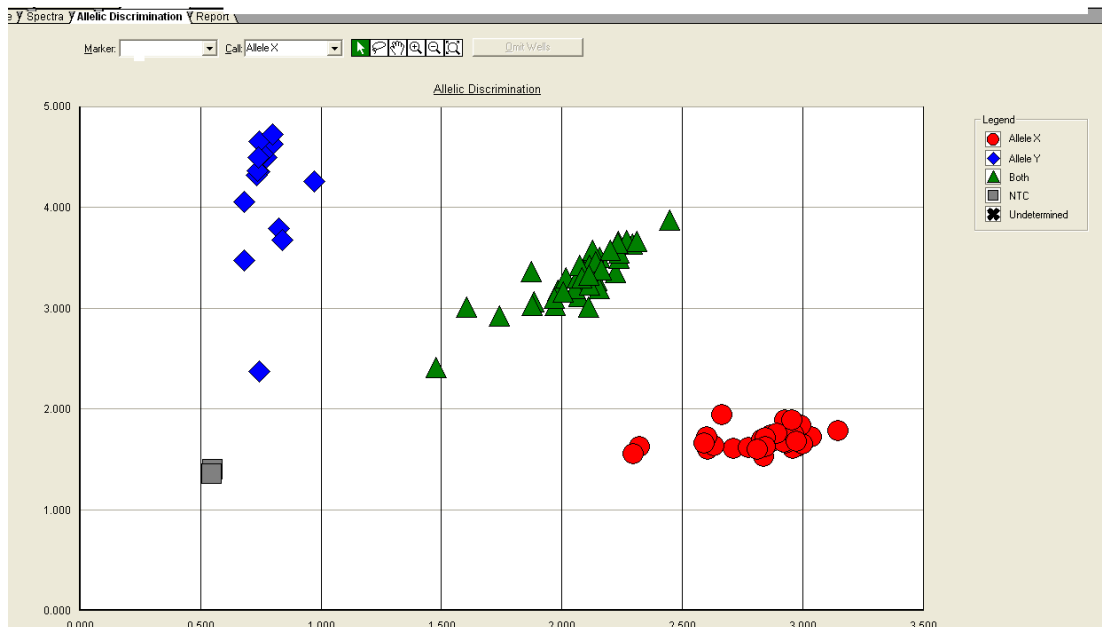


Figura 8. Mapa de discriminación alélica del SNP rs10401670 del gen RETN. Los rombos representan el genotipo homocigoto para el alelo T, los triángulos el genotipo heterocigoto(CT) y los círculos a los individuos homocigotos para el alelo C. Los cuadros grises son los controles negativos (NTC).



9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa SPSS versión 9.0. En la fase descriptiva se sistematizó la distribución de las variables de interés en nuestra población, de modo que se calcularon medias e intervalos de confianza para las variables cuantitativas y porcentajes para el caso de las variables cualitativas.

La normalidad de las variables se comprobó mediante el test de Kolgomorov-Smirnov.

Para el estudio comparativo de valores medios entre sexos y entre sujetos con normopeso, con sobrepeso u obesos se utilizó un test T de Student para las variables cuantitativas que eran paramétricas. Para las variables no paramétricas se empleó el test U-Mann Whitney. Se utilizó un test de ANOVA para comparar las variables bioquímicas, hormonales y antropométricas en función de las categorías de obesidad así como para comparar dichas variables en función de los distintos genotipos en la población total y en cada sexo. Cuando encontramos diferencias significativas, siendo las varianzas iguales, realizamos un post hoc de Tukey, y si las varianzas no fueran iguales realizamos un post hoc de Tamhane.

Las correlaciones entre variables antropométricas, hormonales y bioquímicas se determinaron mediante los coeficientes de correlación de Spearman para las variables no paramétricas o de Pearson para las paramétricas.

Las frecuencias de alelos y de genotipos se determinaron mediante el método de conteo y las diferencias de frecuencias se analizaron mediante un análisis de Chi Cuadrado.

El estudio del *tracking* de la resistina se realizó mediante el análisis de correlación de variables pareadas en ambas edades y realizando un análisis de regresión lineal múltiple considerando la variable resistina en la adolescencia como variable dependiente y la resistina a los 6-8 años como variable independiente.

10. LIMITACIONES DE ESTE ESTUDIO

La principal limitación de este estudio ha sido la ausencia de datos sobre los distintos estadios puberales de Tanner en niños y niñas. Para tratar de paliar, al menos en parte, esta limitación, se seleccionaron niños y niñas de 6 a 8 años en los que, según información transmitida por los padres, no estaban diagnosticados de pubertad precoz. Por tanto, se trataba de niños y niñas prepuberales. Por otra parte, el segundo corte se realizó entre los 12 y 16 años, asumiendo que la mayor parte de niños y niñas habrían comenzado la pubertad atendiendo a la distribución normal del desarrollo puberal de la población española.

Otra limitación de este estudio es que el estudio de la composición corporal mediante impedanciometría no se pudo realizar a todos los individuos incluidos en el estudio.

RESULTADOS

1. DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN

La población de nuestro estudio está formada por los niños integrantes del estudio 4P en los que conseguimos determinar niveles de resistina.

El tamaño de la población total en la que se obtuvo el dato de medida de la resistina en plasma es de 1132 niños; de los cuales 420 tienen edades comprendidas entre los 6 y los 8 años y 712 están entre los 12 y los 16 años. Se estudiaron dos polimorfismos (SNPs) del gen *RETN*, el rs1862513 (-420C>G) en la región del promotor del gen y el rs10401670 (C>T) en la región 3' de 3'UTR del gen. En el caso del SNP rs 1862513 se genotiparon un total de 1269 niños y en el caso del SNP rs 10401670 se genotiparon un total de 1251 niños. Niños formados, en los dos casos, por el grupo de niños de 6 a 8 años y el de 12 a 16 años que no habían participado en el estudio a los 6-8 años, es decir, que todos los niños genotipados son diferentes.

De los 1132 niños en los que se obtuvo el dato de la medida de la resistina en plasma se consiguieron genotipar a 1034 niños para el SNP rs186513 y a 1032 niños para el SNP rs10401670.

Un total de 108 niños participaron en ambos cortes del estudio.

1.1 Características antropométricas de la población

La tabla 1 muestra los valores medios de las variables antropométricas en el grupo de niños entre 6 y 8 años de nuestro estudio. No se observan diferencias significativas entre sexos para ninguna de las variables estudiadas.

Tabla 1. Valores medios [media, (IC al 95%)] de las variables antropométricas en los niños de 6 a 8 años.

	TOTAL n= 799	NIÑOS n= 385 (48,2%)	NIÑAS n=414 (51,8%)
Edad (años)	6,7 (6,7-6,8)	6,7 (6,6-6,8)	6,7 (6,6-6,8)
IMC (kg/m ²)	17,1 (16,9-17,3)	17,1 (16,9-17,4)	17,1 (16,8-17,3)
IMC Z-score	0,07 (0,003-0,15)	0,07 (-0,03-0,18)	0,07 (-0,03-0,18)

En la tabla 2 se muestran las características antropométricas de los adolescentes entre 12 y 16 años, y los datos sobre la composición corporal de aquéllos en los que fue posible recoger esta información. No se observan diferencias significativas entre los valores del IMC entre los dos sexos. La circunferencia de la cintura, el Z-score de la circunferencia de la cintura y el índice cintura/cadera son significativamente ($p=0,000$) mayores en los niños que en las niñas; sin embargo, la masa grasa corporal y el porcentaje de masa grasa son significativamente ($p=0,000$) superiores en las niñas que en los niños.

Tabla 2. Valores medios [media, (IC al 95%)] de las variables antropométricas en los niños de 12 a 16 años.

	TOTAL n=839	NIÑOS n= 394 (47,0%)	NIÑAS n=445 (53,0%)
Edad (años)	14,4 (14,3-14,4)	14,4 (14,2-14,5)	14,4 (14,3-14,5)
IMC (kg/m ²)	21,8 (21,5-22,1)	21,9 (21,5-22,3)	21,7 (21,4-22,0)
IMC Z-score	0,16 (0,09-0,23)	0,16 (0,05-0,27)	0,16 (0,06- 0,25)
Circunferencia cintura (cm)	74,7 (74,0-75,4)	77,3 (76,2-78,5)	72,4* (71,5-73,2)
Circ. cintura Z-score	0,20 (0,15-0,25)	0,29 (0,21-0,36)	0,13* (0,05-0,19)
Índice cintura/cadera	0,80 (0,79-0,80)	0,83 (0,82-0,83)	0,77* (0,77-0,78)
	TOTAL n=307	NIÑOS n=151 (49,2%)	NIÑAS n=156 (50,8%)
Masa grasa (kg)	14,7 (13,7-15,7)	12,5 (10,9-14,0)	16,8* (15,7-17,9)
Masa grasa (%)	22,6 (21,5-23,7)	16,9 (15,5-18,3)	28,2* (27,0-29,3)

*p<0,01. U-Mann Whitney

En la tabla 3 se muestra la prevalencia de normopeso, sobrepeso y obesidad en nuestra población clasificada de acuerdo a los puntos de corte propuestos *The International Obesity Task Force* (IOTF) para población infantil basados en una síntesis de de estudios internacionales (Cole *et al.* 2000). En el grupo de 12 a 16 años la prevalencia de sobrepeso y obesidad es significativamente (p=0,006) superior en los

niños que en las niñas; sin embargo, en el grupo de 6 a 8 años no hay diferencias significativas entre los dos grupos.

Tabla 3. Prevalencia de sobrepeso y obesidad en función de la edad y del sexo (n, %).

	6-8 años		12-16 años	
	NIÑOS(n=290)	NIÑAS(n=332)	NIÑOS(n=392)	NIÑAS(n=445)
Normopeso	216 (74,5%)	229 (69,0%)	264 (67,3%)	338 (76,0%)
Sobrepeso	47 (16,2%)	71 (21,4%)	99 (25,3%)*	88 (19,8%)
Obeso	27 (9,3%)	32 (9,6%)	29 (7,4%)	19 (4,3%)

$\chi^2_{(1)} * p < 0,05$

2. NIVELES DE RESISTINA EN LA POBLACIÓN Y ALTERACIONES METABÓLICAS

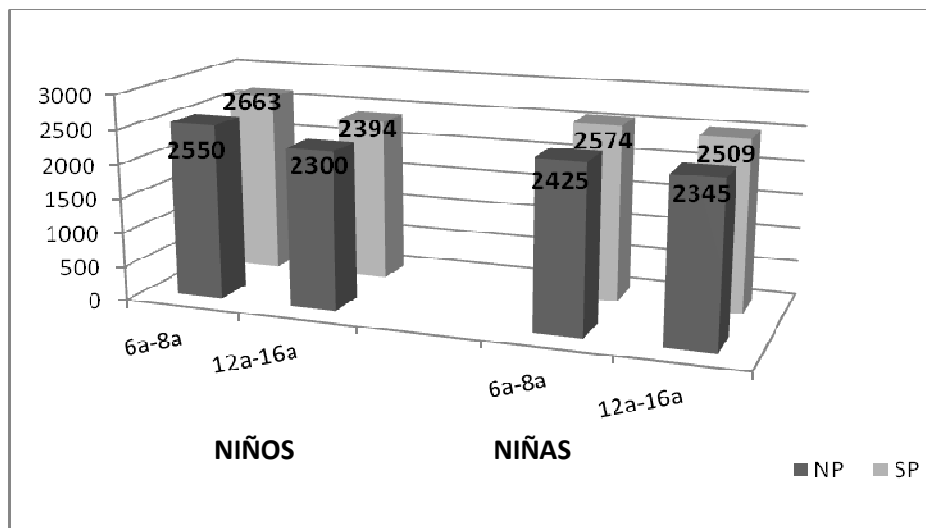
Los niveles medios de resistina (pg/ml) en cada grupo de edad y en cada sexo se muestran en la tabla 4. Los niveles medios de resistina no presentan diferencias significativas entre niños y niñas en ninguno de los grupos de edad y son significativamente más altos en el grupo de 6 a 8 años que en el grupo de 12 a 16 años.

Tabla 4. Niveles medios (pg/ml) de resistina [media, (IC al 95%)] en función del sexo.

	6-8 años (n=420)	12-16 años (n=712)
TOTAL	2593 (2511-2676)	2358 (2294-2423)
NIÑOS	2603 (2486-2720)	2336 (2245-2426)
NIÑAS	2584 (2465-2703)	2380 (2288-2472)

No obstante, es preciso remarcar que cuando se analizan los niveles de resistina (pg/ml) plasmática en función de la presencia de normopeso o de exceso de peso (sobrepeso u obesidad) (figura 9), no se observan diferencias significativas entre las niñas de 6 a 8 años y las niñas 12 a 16 años ni en el grupo con normopeso ni en el grupo con exceso de peso. En el grupo de los niños se observan pequeñas diferencias en los niveles medios de resistina plasmática entre los niños con normopeso de 6 a 8 años y los niños con normopeso de 12 a 16 años, pero no entre los niños con exceso de peso.

Figura 9. Niveles medios de resistina (pg/ml) de acuerdo a la presencia de normopeso (NP) o de exceso de peso (SP) y al sexo.



	6-8 años	
	Normopeso	Exceso de peso
Niños (117 NP/ 29 SP)	2550 (2384-2715)	2663 (2337-2990)
Niñas (108 NP/ 45 SP)	2425 (2256-2594)	2574 (2315-2833)
	12-16 años	
	Normopeso	Exceso de peso
Niños (236 NP/ 110 SP)	2300 (2192-2409)	2394 (2231-2556)
Niñas (288 NP/ 77 SP)	2345 (2240-2450)	2509 (2318-2700)

NP: normopeso; SP: exceso de peso

2.1 Relación de los niveles de resistina con las variables e índices antropométricos y con la composición corporal

Al evaluar la relación de los niveles medios de resistina (pg/ml) con las variables antropométricas mediante un análisis de correlación de Spearman (tabla 5), observamos que no existen correlaciones significativas ni en el grupo de los niños de 6 a 8 años ni en grupo de los niños adolescentes.

Sin embargo, cuando en el grupo de 12 a 16 años analizamos la correlación de la resistina con los índices antropométricos y con la composición corporal mediante un análisis de Spearman o de Pearson según el caso (tabla 6), encontramos correlaciones positivas y significativas de la resistina con el porcentaje de masa grasa en ambos sexos. Además, en el grupo de las niñas, la resistina correlaciona también de modo positivo y significativo con la masa grasa expresada en kg y la circunferencia de la cintura.

Tabla 5. Análisis de correlación de Spearman entre niveles de resistina (pg/ml) y variables antropométricas.

	6-8 años		12-16 años	
	Niños (n=154)	Niñas (n=163)	Niños (n=347)	Niñas (n=365)
IMC (kg/m ²)	,078	-,016	,084	,067
IMC Z-score	,068	,048	,063	,063

Tabla 6. Análisis de correlación de Spearman o de Pearson de los niveles de resistina (pg/ml) con los índices antropométricos y con la composición corporal en los niños y en las niñas de 12 a 16 años.

	Niños (12-16años) (n=134)	Niñas (12-16años) (n=143)
Circunferencia de cintura (cm)	,098	,173*
Circunferencia de cintura Z-score	,143	,148
Índice cintura/cadera	,041	-,046
Masa grasa (kg)	,161	,200*
Masa grasa (%)	,166*	,174*

*p<0.05

2.2 Relación de los niveles de resistina con hormonas sexuales

En el análisis de correlación de Spearman en el que se analiza la posible relación de los niveles de resistina (pg/ml) con los niveles de DHEA-S en plasma, en los niños prepuberales no se observan correlaciones significativas en ninguno de los sexos (tabla 7).

Tabla 7. Análisis de correlación de Spearman entre los niveles de resistina (pg/ml) y los niveles de DHEA-S en los niños de 6 a 8 años.

	Niños (n=207)	Niñas (n=213)
DHEA-S (µg/ml)	,119	,025

Tampoco se observan correlaciones significativas al analizar la relación de los niveles de resistina (pg/ml) con las concentraciones de hormonas sexuales circulantes en el grupo de edad entre 12 y 16 años (tabla 8).

Tabla 8. Análisis de correlación de Spearman o de Pearson (para testosterona en niños) entre niveles de resistina (pg/ml) y las hormonas sexuales en los niños entre 12 y 16 años.

	Niños (n=347)	Niñas (n=365)
DHEA-S (µg/ml)	-,005	,091
ESTRADIOL (ng/ml)	,095	-,007
TESTOSTERONA (ng/ml)	,018	,136**
SHBG (nmol/l)	-,039	-,047

*p<0,005

2.3 Relación de los niveles de resistina con el perfil lipídico

En la tabla 9 se representan las correlaciones de Spearman de los niveles medios de la resistina (pg/ml) con las variables lipídicas en los niños de 6 a 8 años y en los niños de 12 a 16 años. Las concentraciones de resistina correlacionan de forma negativa y significativa con los niveles de Apo-AI tanto en niños como en niñas.

Tabla 9. Correlaciones de Spearman de la resistina (pg/ml) con variables lipídicas.

	6-8 años		12-16 años	
	Niños(n=207)	Niñas(n=213)	Niños(n=347)	Niñas(n=365)
TG(mg/dl)	-,120	-,111	,044	,040
CT(mg/dl)	-,057	-,040	,057	-,013
c-HDL(mg/dl)	-,006	,099	-,080	-,033
ApoAI(mg/dl)	-,059	,072	-,106*	-,122*
c-LDL(mg/dl)	-,048	-,080	,101	-,018
ApoB(mg/dl)	,035	-,062	,091	,033

*p<0,05

En este grupo, al analizar los niveles de resistina (pg/ml) por terciles de la variable Apo-AI (tabla 10), se observa que los niveles de resistina van disminuyendo

progresivamente del tercil 1 al tercil 3, aunque la diferencia no alcanza una significación estadística.

Tabla 10. Niveles medios (pg/ml) de resistina [media, (IC a 95%)] por terciles de Apo-AI en los niños y en las niñas de 12 a 16 años.

NIÑOS			NIÑAS		
Tercil 1 (n=130)	Tercil 2 (n=109)	Tercil 3 (n=101)	Tercil 1 (n=101)	Tercil 2 (n=128)	Tercil 3 (n=123)
2371 (2225-2517)	2356 (2188-2524)	2251 (2084-2419)	2494 (2311-2677)	2371 (2212-2531)	2256 (2106-2405)

Al estudiar las correlaciones de la resistina con el perfil lipídico en los niños de 12 a 16 años con normopeso o con exceso de peso (tabla 11), se observa que la correlación negativa y significativa de la resistina con la variable Apo-AI ocurre únicamente en las niñas con normopeso.

Tabla 11. Correlaciones de Spearman de la resistina (pg/ml) con las variables lipídicas de acuerdo a la presencia de normopeso o de exceso de peso en los niños de 12 a 16 años.

	NIÑOS		NIÑAS	
	Normopeso (n=236)	Exceso de peso (n=110)	Normopeso (n=288)	Exceso de peso (n=77)
TG(mg/dl)	,002	,075	,034	,043
CT(mg/dl)	,002	,159	-,022	,018
c-HDL(mg/dl)	-,099	-,018	-,005	-,069
ApoAI(mg/dl)	-,118^a	-,021	-,123*	-,066
c-LDL(mg/dl)	,066	,168	-,049	,046
ApoB(mg/dl)	,055	,128	-,006	,131

*p<0,05; ^ap=0,07

2.4 Relación de los niveles de resistina y las variables relacionadas con la resistencia a la insulina

En la tabla 12 se muestran las correlaciones de los niveles de resistina (pg/ml) con las variables relacionadas con la resistencia a la insulina. Se observa que en los niños de 6 a 8 años existe una correlación positiva y significativa de la concentración de resistina con los niveles de ácidos grasos libres.

Tabla 12. Correlaciones de Spearman de la resistina (pg/ml) con variables relacionadas con la resistencia a la insulina.

	6-8 años		12-16 años	
	NIÑOS (n=207)	NIÑAS (n=213)	NIÑOS (n=347)	NIÑAS (n=365)
Glucosa(mg/dl)	-,060	,043	,018	,028
Insulina(μ U/ml)	-,119	-,072	-,065	-,027
HOMA-RI	-,113	-,063	-,056	-,026
AGL(mEq/l)	,140*	,040	,024	,020

*p<0,05

3. ESTUDIO DE SNPs (polimorfismos de un sólo nucleótido) EN EL GEN DE LA RESISTINA (RETN)

En nuestro estudio hemos analizado dos polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs) en el gen de la resistina (*RETN*) que son altamente prevalentes en las poblaciones en que se han estudiado anteriormente. Estos SNPs son el rs1862513 y el rs10401670.

El SNP rs1862513 se localiza en la región 5' del gen *RETN*, en la posición -420, y consiste en un cambio de bases de tipo transversión entre una citosina (C) y una guanina (G), siendo el alelo C el mayoritario en población caucásica.

El SNP rs10401670 se encuentra localizado en la región 3' de 3'UTR del gen *RETN* y consiste en un cambio de base entre las pirimidinas citosina (C) y timina (T). En este caso el alelo C es el mayoritario en población caucásica.

3.1. Análisis del polimorfismo situado en la posición -420 (C/G) del gen *RETN*: rs1862513

3.1.1 Frecuencias genotípicas y alélicas del SNP rs1862513

En la tabla 13 se muestran las frecuencias genotípicas y alélicas del SNP rs1862513 que ha sido determinado en un total de 1269 niños, total formado por los niños genotipados de 6 a 8 años y los genotipados de 12 a 16 años que no coincidían en los dos cortes. El alelo C tiene una frecuencia del 68% y el alelo G del 32%, siendo mayoritario el genotipo CC con una frecuencia del 46%.

Tabla 13. Frecuencias genotípicas y alélicas (%) del SNP rs1862513 en nuestra población.

CC (n=583)	CG (n=560)	GG (n=126)	C	G
46,0%	44,0%	10%	68%	32%

3.1.2 Relación del SNP rs1862513 con los niveles de resistina

En las tablas 14 y 15 se muestran los niveles plasmáticos medios de resistina (pg/ml) en cada genotipo del SNP rs1862513 en los niños de 6 a 8 años y en los niños de 12 a 16 años respectivamente. En ningún caso se observan diferencias significativas de los niveles plasmáticos de resistina entre los genotipos.

Tabla 14. Niveles de resistina (pg/ml), [media, (IC al 95%)] en cada genotipo del SNP rs1862513 en los niños de 6 a 8 años.

	CC	CG	GG
Total (n=341)	2719 (2581-2856)	2519 (2386-2652)	2552 (2193-2912)
Niños (n=164)	2842 (2633-3050)	2587 (2406-2769)	2375 (1914-2836)
Niñas (n=177)	2626 (2441-2811)	2448 (2249-2647)	2801 (2181-3420)

Tabla 15. Niveles de resistina (pg/ml), [media, (IC al 95%)] en cada genotipo del SNP rs1862513 en los niños de 12 a 16 años.

	CC	CG	GG
Total (n=693)	2329 (2235-2424)	2372 (2272-2473)	2476 (2263-2689)
Niños (n=336)	2347 (2216-2478)	2325 (2183-2467)	2405 (2075-2735)
Niñas (n=357)	2315 (2178-2452)	2422 (2279-2565)	2552 (2271-2834)

3.1.3 Relación del SNP rs1862513 con las variables antropométricas

En las tablas 16 y 17 se muestran las frecuencias genotípicas y alélicas del SNP rs1862513 en los niños con normopeso y en los que tienen exceso de peso (niños con sobrepeso u obesidad) a las edades de 6 a 8 años y de 12 a 16 años respectivamente, que, como se puede observar, no presentan diferencias significativas entre los grupos. Las frecuencias genotípicas y alélicas de acuerdo a la categoría de peso en función del sexo se muestran en las tablas 18 y 19 y tampoco muestran diferencias significativas entre los grupos.

Tabla 16. Frecuencias genotípicas (n, %) y alélicas (%) del SNP rs1862513 en los niños con normopeso o con exceso de peso de 6 a 8 años.

	Normopeso	Exceso de peso
CC	195 (43,8%)	84 (47,5%)
CG	207 (46,5%)	74 (41,8%)
GG	43 (9,7%)	19 (10,7%)
C	67,0%	68,4%
G	33,0%	31,6%

Tabla 17. Frecuencias genotípicas (n, %) y alélicas (%) del SNP rs1862513 en los niños con normopeso o con exceso de peso de 12 a 16 años.

	Normopeso	Exceso de peso
CC	285 (47,3%)	113 (48,1%)
CG	261 (43,4%)	99 (42,1%)
GG	56 (9,3%)	23 (9,8%)
C	69,0%	69,1%
G	31,0%	30,9%

Tabla 18. Frecuencias genotípicas (n, %) y alélicas (%) del SNP rs1862513 en los niños de 6 a 8 años de acuerdo al sexo y a la categoría de peso.

	Niños		Niñas	
	Normopeso	Exceso de peso	Normopeso	Exceso de peso
CC	90 (41,7%)	36 (48,6%)	105 (45,9%)	48 (46,6%)
CG	108 (50,0%)	30 (40,5%)	99 (43,2%)	44 (42,7%)
GG	18 (8,3%)	8 (10,8%)	25 (10,9%)	11 (10,7%)
C	67,7%	68,9%	67,5%	68,0%
G	33,3%	31,1%	32,5%	32,0%

Tabla 19. Frecuencias genotípicas (n, %) y alélicas (%) del SNP rs1862513 en los niños de 12 a 16 años de acuerdo al sexo y a la categoría de peso.

	Niños		Niñas	
	Normopeso	Exceso de peso	Normopeso	Exceso de peso
CC	114 (43,2%)	61 (47,7%)	171 (50,6%)	52 (48,6%)
CG	124 (47,0%)	53 (41,4%)	137 (40,5%)	46 (43,0%)
GG	26 (9,8%)	14 (10,9%)	30 (8,9%)	9 (8,4%)
C	66,7%	68,4%	71,1%	70,9%
G	33,3%	31,6%	28,9%	29,1%

Al realizar el análisis de la asociación del SNP con las variables antropométricas comparando las medias del IMC en función del genotipo del SNP rs1862513 por sexos en cada grupo de edad (tablas 20 y 21) tampoco se observan diferencias significativas entre estas medidas en ninguno de los casos.

Tabla 20. Valores medios (IC al 95%) de las variables antropométricas para cada genotipo del SNP rs1862513 en los niños de 6 a 8 años.

	NIÑOS			NIÑAS		
	CC (n=126)	CG (n=138)	GG (n=26)	CC (n=153)	CG (n=143)	GG (n=36)
IMC (kg/m ²)	17,3 (16,9-17,7)	16,9 (16,5-17,3)	17,5 (16,2-18,7)	17,1 (16,7-17,5)	17,0 (16,6-17,4)	17,1 (16,2-18,1)
IMC Z-score	0,14 (-0,01-0,29)	-0,004 (-0,15-0,14)	0,23 (-0,27-0,74)	0,09 (-0,05-0,24)	0,04 (-0,12-0,20)	0,12 (-0,25-0,50)

Tabla 21. Valores medios (IC al 95%) de las variables antropométricas para cada genotipo del SNP rs1862513 en los niños de 12 a 16 años.

	NIÑOS			NIÑAS		
	CC (n=175)	CG (n=178)	GG (n=40)	CC (n=223)	CG (n=183)	GG (n=39)
IMC (kg/m ²)	22,1 (21,4-22,7)	21,7 (21,2-22,3)	22,1 (21,1-23,1)	21,7 (21,2-22,1)	21,6 (21,1-22,1)	22,2 (20,6-23,8)
IMC Z-score	0,19 (0,01-0,36)	0,12 (-0,03-0,27)	0,25 (-0,03-0,52)	0,15 (0,02-0,28)	0,13 (-0,004-0,27)	0,33 (-0,14-0,81)

En los adolescentes de 12 a 16 años en los que disponemos de información sobre las medidas de la circunferencia de la cintura, del índice cintura/cadera y de la masa grasa corporal, tampoco se ha encontrado asociación del SNP con ninguno de estos parámetros (tabla 22).

Tabla 22. Valores medios (IC al 95%) de los índices antropométricos y de la masa grasa corporal para cada genotipo del SNP rs1862513 en los niños de 12 a 16 años.

	NIÑOS			NIÑAS		
	CC (n=175)	CG (n=178)	GG (n=40)	CC (n=223)	CG (n=183)	GG (n=39)
Circ. Cintura(cm)	77,7 (75,9-79,5)	76,9 (75,3-78,5)	77,7 (74,7-80,7)	71,8 (70,6-73,0)	72,9 (71,6-74,2)	73,2 (69,3-77,1)
Circ. Cintura Z-score	0,30 (0,19-0,42)	0,26 (0,15-0,36)	0,31 (0,09-0,53)	0,07 (-0,02-0,17)	0,18 (0,07-0,28)	0,19 (-0,07-0,46)
Índice cint/cadera	0,83 (0,82-0,84)	0,83 (0,82-0,84)	0,84 (0,81-0,86)	0,77 (0,76-0,78)	0,78 (0,77-0,79)	0,77 (0,75-0,80)
	CC (n=73)	CG (n=61)	GG (n=17)	CC (n=77)	CG (n=72)	GG (n=7)
Masa grasa(kg)	12,6 (10,3-14,8)	12,5 (9,9-15,2)	11,8 (7,5-16,1)	16,7 (15,1-18,3)	16,6 (15,1-18,2)	20,2 (10,5-29,9)
% Masa grasa	17,0 (15,1-18,9)	16,8 (14,4-19,2)	17,0 (12,2-21,8)	28,0 (26,4-29,6)	28,1 (26,5-29,7)	30,6 (20,9-40,3)

3.1.4 Relación del SNP rs1862513 con las variables lipídicas y con las variables relacionadas con resistencia a la insulina

En las tablas 23 y 24 se muestran los valores de las variables lipídicas para cada genotipo del SNP rs1862513 en función del sexo en los niños de 6 a 8 años y en los de 12 a 16 años respectivamente. En los varones de 12 a 16 años se observan diferencias significativas de los niveles de colesterol total entre los portadores del genotipo CG y los que portan GG (p=0,03). En los niños entre 6 y 8 años no se observan diferencias significativas en los niveles de las variables lipídicas en función del genotipo del polimorfismo en ninguno de los casos analizados.

Tabla 23. Valores medios (IC al 95%) de las variables lipídicas en función del genotipo del SNP rs1862513 en los niños y en las niñas de 6 a 8 años.

	NIÑOS			NIÑAS		
	CC (n=164)	CG (n=176)	GG (n=42)	CC (n=187)	CG (n=182)	GG (n=43)
CT (mg/dl)	185,2 (181,0-189,4)	183,2 (178,5-187,8)	186,3 (177,8-194,8)	185,4 (181,5-189,3)	184,8 (180,7-188,9)	178,1 (169,4-186,8)
TG (mg/dl)	69,9 (65,3-74,6)	72,2 (68,7-75,6)	75,8 (65,08-86,4)	75,5 (70,9-80,2)	71,2 (68,3-74,1)	70,2 (63,9-76,5)
c-HDL (mg/dl)	62,1 (60,2-63,9)	59,2 (57,2-61,2)	59,6 (55,2-64,1)	58,9 (57,2-60,6)	59,9 (57,9-61,9)	62,5 (57,0-67,9)
ApoAI (mg/dl)	140,1 (137,0-143,2)	138,5 (135,7-141,4)	138,2 (132,1-144,4)	136,6 (133,9-139,3)	136,3 (133,8-138,9)	140,3 (134,5-146,2)
c-LDL (mg/dl)	109,2 (104,9-113,5)	109,4 (104,9-114,0)	111,5 (104,1-119,0)	111,4 (107,7-115,0)	110,7 (106,8-114,6)	101,6 (93,7-109,5)
ApoB (mg/dl)	71,2 (68,9-73,5)	68,9 (66,8-71,1)	72,2 (67,7-76,7)	71,5 (69,4-73,6)	71,6 (69,3-73,8)	69,1 (64,8-73,4)

Tabla 24. Valores medios (IC al 95%) de las variables lipídicas en función del genotipo del SNP rs1862513 en los niños y en las niñas de 12 a 16 años.

	NIÑOS			NIÑAS		
	CC (n=173)	CG (n=178)	GG (n=40)	CC (n=219)	CG (n=183)	GG (n=39)
CT (mg/dl)	161,6 (157,5-165,6)	159,2 (155,2-163,3)	171,3 (160,3-182,2)	170,0 (166,1-173,8)	171,2 (167,1-175,2)	171,6 (160,8-182,5)
TG (mg/dl)	81,6 (76,0-87,2)	78,1 (73,0-83,2)	78,9 (69,3-88,5)	74,3 (70,9-77,6)	76,7 (72,4-81,0)	80,5 (72,9-88,0)
c-HDL (mg/dl)	49,4 (47,3-51,4)	49,8 (47,6-52,1)	53,9 (49,6-58,2)	55,2 (53,3-57,2)	54,0 (52,0-56,0)	53,0 (47,9-58,1)
ApoAI (mg/dl)	142,4 (138,9-145,9)	143,6 (139,6-147,5)	153,1 (142,0-164,2)	148,9 (145,7-152,1)	146,8 (143,1-150,5)	144,6 (136,6-152,6)
c-LDL (mg/dl)	95,9 (92,3-99,4)	93,6 (90,0-97,3)	102,5 (93,4-111,7)	99,9 (96,4-103,5)	101,6 (98,0-105,3)	102,6 (91,0-114,1)
ApoB (mg/dl)	69,4 (67,2-71,7)	68,0 (65,6-70,3)	74,2 (67,4-81,0)	70,3 (68,2-72,4)	71,4 (69,2-73,6)	71,3 (64,4-78,2)

ANOVA post hoc de Tukey

En las tablas 25 y 26 se muestran los valores medios de los niveles de la glucosa, insulina, índice HOMA-RI y de los ácidos grasos libres (AGL) para cada genotipo del SNP rs1862513 en función del sexo en los niños de 6 a 8 años y en los de 12 a 16 años respectivamente, observándose que en el grupo de los niños de 6 a 8 años (tabla 25), hay diferencias significativas ($p=0,03$) en los niveles medios de glucemia entre los portadores del genotipo CC y los portadores de GG.

Tabla 25. Valores medios (IC al 95%) de las variables relacionadas con resistencia a la insulina en función del genotipo del SNP rs1862513 en los niños de 6 a 8 años.

	NIÑOS			NIÑAS		
	CC (n=164)	CG (n=175)	GG (n=42)	CC (n=186)	CG (n=182)	GG (n=43)
Glucosa (mg/dl)	90,4 (89,1-91,7)	91,1 (89,9-92,4)	93,9 (91,3-96,5)	89,6 (87,2-92,0)	89,2 (87,9-90,5)	88,7 (86,9-90,5)
Insulina (μU/ml)	3,4 (3,0-3,8)	3,6 (3,2-4,0)	4,0 (3,0-4,9)	3,4 (3,0-3,8)	3,7 (3,2-4,2)	4,3 (3,0-5,6)
HOMA- IR	0,78 (0,68-0,87)	0,82 (0,72-0,91)	0,94 (0,69-1,18)	0,75 (0,66-0,83)	0,83 (0,71-0,96)	0,94 (0,66-1,23)
AGL (mEq/l)	0,70 (0,65-0,75)	0,71 (0,66-0,76)	0,67 (0,55-0,78)	0,75 (0,70-0,81)	0,73 (0,68-0,77)	0,65 (0,56-0,75)

ANOVA post hoc Tukey

Tabla 26. Valores medios (IC al 95%) de las variables relacionadas con la resistencia a la insulina en función del genotipo del SNP rs1862513 en los niños de 12 a 16 años.

	NIÑOS			NIÑAS		
	CC (n=173)	CG (n=178)	GG (n=40)	CC (n=219)	CG (n=182)	GG (n=39)
Glucosa (mg/dl)	94,1 (90,9-97,2)	92,5 (91,1-93,9)	92,2 (89,6-94,7)	89,3 (88,0-90,5)	88,5 (87,3-89,7)	89,8 (87,4-92,2)
Insulina (μU/ml)	8,8 (7,9-9,7)	8,6 (7,5-9,7)	8,4 (6,3-10,6)	8,9 (8,1-9,7)	8,2 (7,6-8,9)	8,8 (7,4-10,2)
HOMA-IR	2,16 (1,79-2,53)	1,94 (1,72-2,16)	1,91 (1,39-2,44)	1,95 (1,78-2,12)	1,81 (1,61-2,00)	1,92 (1,62-2,22)
AGL (mEq/l)	0,43 (0,39-0,46)	0,44 (0,41-0,47)	0,41 (0,36-0,45)	0,45 (0,43-0,48)	0,43 (0,40-0,46)	0,43 (0,36-0,49)

3.2. Análisis del polimorfismo situado en la posición 3' de la región 3' de UTR (C/T) del gen *RETN*: rs10401670

3.2.1 Frecuencias genotípicas y alélicas del SNP rs10401670

La tabla 27 muestra las frecuencias genotípicas y alélicas del SNP rs10401670 que se ha podido determinar en un total de 1251 niños, total formado por los niños prepuberales y adolescentes que se genotiparon exceptuando a los que coincidían en ambos grupos. Presenta una mayor frecuencia la forma heterocigota (CT). La frecuencia del alelo C es del 60% y la del alelo T del 40%.

Tabla 27. Frecuencias genotípicas y alélicas (%) del SNP rs10401670 en nuestra población.

CC (n=447)	CT (n=610)	TT (n=194)	C	T
35,8%	48,8%	15,4%	60,2%	39,8%

3.2.2 Relación del SNP rs10401670 con los niveles de resistina

En las tablas 28 y 29 se muestran los niveles plasmáticos medios de resistina (pg/ml) en cada genotipo del SNP rs10401670 en los niños de 6 a 8 años y en los niños de 12 a 16 años respectivamente. En los niños entre 6 y 8 años, la presencia del alelo T se asocia a niveles más elevados de resistina, de modo que tanto en el grupo total como en el grupo de las niñas se observan diferencias significativas de los valores medios de resistina en los homocigotos CC respecto a los genotipos CT y TT (tabla 28). En el

grupo de 12 a 16 años, aunque se observa esta misma tendencia, las diferencias no llegan a ser significativas (tabla 29).

Tabla 28. Niveles medios de resistina (pg/ml), [media, (IC al 95%)] en cada genotipo del SNP rs10401670 en los niños de 6 a 8 años.

	CC	CT	TT	p
Total (n=342)	2391 (2245-2538)	2698 (2566-2830)	2877 (2610-3145)	CC-CT** CC-TT**
Niños (n=165)	2450 (2217-2683)	2688 (2511-2866)	2872 (2471-3273)	NS
Niñas (n=177)	2346 (2154-2538)	2708 (2508-2908)	2884 (2506-3262)	CC-CT* CC-TT*

**p<0,01; *p<0,05. ANOVA post hoc de Tukey

Tabla 29. Niveles medios de resistina (pg/ml), [media, (IC al 95%)] en cada genotipo del SNP rs10401670 en los niños de 12 a 16 años.

	CC	CT	TT
Total (n=690)	2314 (2202-2427)	2364 (2271-2456)	2455 (2283-2626)
Niños (n=336)	2311 (2140-2481)	2342 (2219-2465)	2404 (2164-2644)
Niñas (n=354)	2317 (2166-2469)	2384 (2246-2522)	2511 (2259-2763)

3.2.3 Relación del SNP rs10401670 con las variables antropométricas

En las tablas 30 y 31 se muestran las frecuencias genotípicas y alélicas del SNP rs10401670 en los niños con normopeso y con exceso de peso de edades entre 6 y 8 años y entre 12 y 16 años respectivamente. Las tablas 32 y 33 muestran esto mismo pero en función del sexo también. En ningún caso las diferencias en la frecuencia de genotipos entre grupos alcanzan significación estadística.

Tabla 30. Frecuencias genotípicas (n, %) y alélicas (%) del SNP rs10401670 en los niños de 6 a 8 años con normopeso y en los que tienen exceso de peso.

	Normopeso	Exceso de peso
CC	166 (38,2%)	60 (34,3%)
CT	207 (47,7%)	89 (50,9%)
TT	61 (14,1%)	26 (14,9%)
C	62,1%	59,7%
T	37,9%	40,3%

Tabla 31. Frecuencias genotípicas (n, %) y alélicas (%) del SNP rs10401670 en los niños de 12 a 16 años con normopeso y en los que tienen exceso de peso.

	Normopeso	Exceso de peso
CC	203 (33,9%)	88 (37,6%)
CT	304 (50,8%)	105 (44,9%)
TT	91 (15,2%)	41 (17,5%)
C	59,4%	60,0%
T	40,6%	40,0%

Tabla 32. Frecuencias genotípicas (n, %) y alélicas (%) del SNP rs10401670 en los niños de 6 a 8 años de acuerdo al sexo y a la categoría de peso.

	Niños		Niñas	
	Normopeso	Exceso de peso	Normopeso	Exceso de peso
CC	78 (37,0%)	17 (23,0%)	88 (39,5%)	43 (42,6%)
CT	100 (47,4%)	43 (58,1%)	107 (48,0%)	46 (45,5%)
TT	33 (15,6%)	14 (18,9%)	28 (12,6%)	12 (11,9%)
C	60,7%	52,0%	63,5%	65,3%
T	39,3%	48,0%	36,5%	34,7%

Tabla 33. Frecuencias genotípicas (n, %) y alélicas (%) del SNP rs10401670 en los niños de 12 a 16 años de acuerdo al sexo y a la categoría de peso.

	Niños		Niñas	
	Normopeso	Exceso de peso	Normopeso	Exceso de peso
CC	93 (35,4%)	42 (32,8%)	110 (32,8%)	46 (43,4%)
CT	129 (49,0%)	61 (47,7%)	175 (52,2%)	44 (41,5%)
TT	41 (15,6%)	25 (19,5%)	50 (14,9%)	16 (15,1%)
C	59,9%	56,6%	59,0%	64,1%
T	40,1%	43,4%	41,0%	35,9%

Cuando se analizan las medias de las variables IMC y IMC Z-score en función del genotipo, en las niñas de 12 a 16 años (tabla 35), las medias del IMC y del IMC Z-score son significativamente ($p=0,02$ y $p=0,04$ respectivamente) superiores en las niñas portadoras del genotipo CC que en las que portan el genotipo CT. En el grupo de niños de 6 a 8 años no se observan diferencias significativas entre los genotipos en ninguna de las variables estudiadas (tabla 34).

Tabla 34. Valores medios (IC al 95%) de las variables antropométricas para cada genotipo del SNP rs10401670 en los niños de 6 a 8 años.

	NIÑOS			NIÑAS		
	CC (n=95)	CT (n=143)	TT (n=47)	CC (n=131)	CT (n=153)	TT (n=40)
IMC (kg/m ²)	16,9 (16,4-17,3)	17,3 (16,9-17,7)	17,4 (16,8-18,0)	17,03 (16,6-17,4)	17,1 (16,7-17,5)	16,7 (15,9-17,4)
IMC Z- score	-0,02 (-0,21-0,16)	0,13 (-0,02-0,29)	0,20 (-0,04-0,44)	0,07 (-0,09-0,23)	0,11 (-0,05-0,26)	-0,12 (-0,42-0,17)

Tabla 35. Valores medios (IC al 95%) de las variables antropométricas para cada genotipo del SNP rs10401670 en los niños de 12 a 16 años.

NIÑOS				
	CC (n=135)	CT (n=190)	TT (n=67)	p
IMC(kg/m ²)	21,6 (20,9-22,23)	21,9 (21,3-22,4)	22,8 (21,6-23,9)	NS
IMC Z-score	0,06 (-0,11-0,24)	0,14 (-0,004-0,29)	0,41 (0,11-0,72)	NS
NIÑAS				
	CC (n=156)	CT (n=219)	TT (n=66)	p
IMC(kg/m ²)	22,3 (21,7-22,8)	21,3 (20,8-21,8)	21,7 (20,9-22,5)	CC-CT*
IMC Z-score	0,30 (0,14-0,46)	0,06 (-0,07-0,19)	0,14 (-0,08-0,36)	CC-CT*

*p<0,05. ANOVA post hoc de Tukey

En el mismo sentido, al analizar la relación del SNP rs10401670 con los índices antropométricos y la composición corporal (tabla 36), se observa que en el grupo de las niñas el genotipo CC presenta unos valores medios de masa grasa y de porcentaje de masa grasa significativamente superiores a los que presenta el genotipo CT. En el grupo de los niños se observan valores significativamente más elevados del Z-score de la circunferencia de la cintura en el genotipo TT que los que presenta el genotipo CC.

Tabla 36. Valores medios (IC al 95%) de los índices antropométricos y de la masa grasa para cada genotipo del SNP rs10401670 en los niños de 12 a 16 años.

NIÑOS				
	CC (n=135)	CT (n=190)	TT (n=67)	P
Circ. Cintura (cm)	76,5 (74,7-78,3)	77,0 (75,4-78,5)	79,7 (76,5-83,0)	NS
Circ. Cintura Z-score	0,22 (0,11-0,34)	0,26 (0,15-0,35)	0,49 (0,28-0,69)	CC-TT*
Índice cint/cadera	0,83 (0,82-0,84)	0,82 (0,81-0,83)	0,84 (0,83-0,86)	NS
	CC (n=58)	CT (n=71)	TT (n=22)	P
Masa grasa (kg)	11,1 (9,2-13,1)	12,0 (9,7-14,3)	17,4 (11,5-23,4)	NS
%Masa grasa	15,8 (13,9-17,7)	16,6 (14,5-18,7)	20,8 (15,8-25,8)	NS
NIÑAS				
	CC (n=156)	CT (n=219)	TT (n=66)	P
Circ. Cintura (cm)	73,4 (71,8-75,0)	71,6 (70,5-72,7)	72,6 (70,1-75,1)	NS
Circ. Cintura Z-score	0,20 (0,07-0,32)	0,08 (-0,01-0,16)	0,13 (-0,05-0,30)	NS
Índice cint/cadera	0,77 (0,76-0,78)	0,78 (0,77-0,79)	0,78 (0,76-0,80)	NS
	CC (n=55)	CT (n=76)	TT (n=23)	P
Masa grasa (kg)	18,2 (16,2-20,1)	14,8 (13,5-16,0)	20,1 (16,3-23,9)	CC-CT* CT-TT*
%Masa grasa	29,5 (27,7-31,4)	26,4 (24,9-27,9)	30,5 (27,0-34,0)	CC-CT* CT-TT*

*p<0,05. ANOVA post hoc de Tukey y Tamhane

3.2.4 Relación del SNP rs10401670 con las variables lipídicas y con las variables relacionadas con resistencia a la insulina

En las tablas 37 y 38 se muestran los valores medios de las variables lipídicas para cada genotipo del SNP rs10401670 en los niños de 6 a 8 años y en los niños de 12 a 16 años respectivamente. Se observa que en el grupo de los varones de 12 a 16 años la presencia del alelo T se asocia a niveles mayores de colesterol total y c-LDL. En el caso de las niñas de 12 a 16 años, la presencia del alelo T parece asociarse con niveles mayores de c-HDL.

Tabla 37. Niveles medios (IC al 95%) de las variables lipídicas en función del genotipo del SNP rs10401670 en los niños y en las niñas de 6 a 8 años.

	NIÑOS			NIÑAS		
	CC (n=124)	CT (n=189)	TT (n=62)	CC (n=162)	CT (n=188)	TT (n=54)
CT (mg/dl)	186,9 (181,1-192,7)	183,5 (179,5-187,4)	184,3 (177,3-191,3)	184,9 (180,5-189,2)	184,4 (180,4-188,3)	185,5 (177,9-193,2)
TG (mg/dl)	72,7 (68,7-76,8)	72,2 (67,6-76,8)	67,9 (62,2-73,7)	74,1 (69,4-78,8)	72,9 (69,3-76,4)	70,0 (64,8-75,2)
c-HDL (mg/dl)	61,7 (59,4-64,0)	59,9 (58,0-61,9)	60,0 (56,8-63,2)	60,0 (57,8-62,3)	59,6 (57,8-61,5)	60,9 (57,7-64,1)
ApoAI (mg/dl)	142,2 (138,8-145,5)	138,3 (135,4-141,2)	136,8 (132,0-141,5)	137,0 (133,8-140,2)	137,3 (134,9 -139,7)	138,1 (133,8-142,4)
c-LDL (mg/dl)	110,7 (104,7-116,7)	109,1 (105,2-113,0)	110,4 (104,3-116,5)	110,0 (106,1-114,0)	110,2 (106,4-114,0)	110,6 (103,2-118,0)
ApoB (mg/dl)	70,2 (67,2-73,2)	70,5 (68,5-72,6)	70,5 (67,4-73,5)	71,3 (68,9-73,7)	71,3 (69,2-73,4)	71,5 (67,4-75,6)

Tabla 38. Niveles medios (IC al 95%) de las variables lipídicas en función del genotipo del SNP rs10401670 en los niños y en las niñas de 12 a 16 años.

NIÑOS				
	CC (n=134)	CT (n=190)	TT (n=66)	p
CT (mg/dl)	155,5 (150,9-160,1)	163,9 (159,9-168,0)	166,6 (159,5-173,6)	CC-CT* CC-TT*
TG (mg/dl)	82,2 (75,7-88,7)	79,4 (74,3-84,4)	75,5 (67,9-83,1)	NS
c-HDL (mg/dl)	48,6 (46,2-51,0)	50,4 (48,5-52,4)	51,6 (47,4-55,9)	NS
ApoAI (mg/dl)	140,8 (136,5-145,2)	146,6 (142,8-150,5)	143,2 (136,7-149,7)	NS
c-LDL (mg/dl)	90,4 (86,3-94,5)	97,6 (94,0-101,3)	99,8 (94,3-105,4)	CC-CT* CC-TT*
ApoB (mg/dl)	67,8 (65,2-70,4)	69,9 (67,5-72,3)	70,2 (65,9-74,5)	NS
NIÑAS				
	CC (n=155)	CT (n=217)	TT (n=65)	
CT (mg/dl)	168,4 (164,0-172,8)	172,8 (168,8-176,8)	168,9 (161,8-175,9)	NS
TG (mg/dl)	77,8 (73,6-82,0)	74,5 (70,9-78,0)	75,6 (68,4-82,8)	NS
c-HDL (mg/dl)	52,4 (50,3-54,5)	55,2 (53,2-57,2)	57,4 (53,8-61,0)	CC-TT*
ApoAI (mg/dl)	144,9 (141,4-148,5)	149,2 (145,7-152,6)	149,4 (142,8-156,1)	NS
c-LDL (mg/dl)	100,4 (96,4-104,5)	102,6 (98,8-106,3)	96,3 (90,0-102,6)	NS
ApoB (mg/dl)	71,9 (69,4-74,5)	70,6 (68,5-72,8)	69,0 (65,2-72,8)	NS

*p<0,05. ANOVA post hoc de Tamhane

Respecto a la posible asociación del SNP rs10401670 con las variables relacionadas con la resistencia a la insulina, no se observan diferencias significativas en ninguno de los grupos estudiados (tablas 39 y 40).

Tabla 39. Niveles medios (IC al 95%) de las variables que se relacionan con la resistencia a la insulina en función del genotipo del SNP rs10401670 en los niños de 6 a 8 años.

	NIÑOS			NIÑAS		
	CC (n=124)	CT (n=189)	TT (n=62)	CC (n=162)	CT (n=188)	TT (n=54)
Glucosa (mg/dl)	91,3 (89,8-92,8)	91,6 (90,4-92,8)	89,4 (87,2-91,7)	88,3 (86,9-89,7)	90,2 (87,8-92,5)	89,5 (87,4-91,5)
Insulina (μ U/ml)	3,4 (2,9-3,8)	3,7 (3,3-4,1)	3,7 (3,0-4,4)	3,4 (3,0-3,8)	3,6 (3,2-4,0)	4,1 (2,8-5,4)
HOMA-IR	0,77 (0,67-0,88)	0,84 (0,74-0,94)	0,84 (0,67-1,01)	0,74 (0,65-0,83)	0,79 (0,70-0,89)	0,94 (0,59-1,29)
AGL (mEq/l)	0,70 (0,64-0,76)	0,68 (0,64-0,72)	0,74 (0,63-0,84)	0,75 (0,69-0,80)	0,72 (0,67-0,77)	0,75 (0,66-0,84)

Tabla 40. Niveles medios (IC al 95%) de las variables que se relacionan con la resistencia a la insulina en función del genotipo del SNP rs10401670 en los niños de 12 a 16 años.

	NIÑOS			NIÑAS		
	CC (n=133)	CT (n=190)	TT (n=67)	CC (n=155)	CT (n=217)	TT (n=64)
Glucosa (mg/dl)	93,3 (89,3-97,4)	93,5 (92,2-94,8)	91,9 (90,0-93,8)	88,9 (87,5-90,3)	88,8 (87,6-89,9)	89,6 (87,5-91,7)
Insulina (μ U/ml)	9,5 (7,7-11,2)	8,3 (7,7-8,9)	8,1 (7,1-9,2)	8,9 (8,1-9,7)	8,6 (7,8-9,3)	8,1 (7,2-9,2)
HOMA-IR	2,3 (1,75-2,80)	1,93 (1,77-2,08)	1,83 (1,59-2,07)	1,93 (1,76-2,10)	1,89 (1,69-2,09)	1,77 (1,53-2,01)
AGL (mEq/l)	0,42 (0,39-0,45)	0,44 (0,41-0,47)	0,43 (0,37-0,50)	0,44 (0,41-0,47)	0,44 (0,42-0,47)	0,43 (0,38-0,47)

4. ANÁLISIS DE TRACKING

Tras haber analizado los resultados en los niños prepuberales y adolescentes se observó que había un total de 108 niños coincidentes en ambos grupos en los que se había realizado la medida de la resistina en plasma. Se procedió así a realizar el análisis de *tracking* para la variable resistina ya que, para correlaciones superiores o iguales a 0,3 y con nivel de significación del 95%, con ese tamaño muestral se obtendría una potencia estadística del 90%. El estudio de *tracking* se realizó mediante análisis de correlación de muestras pareadas y mediante un análisis de regresión lineal.

En la tabla 41 se observa que no existe correlación entre los niveles de resistina a ambas edades; sin embargo si se analiza la correlación de variables antropométricas se observa una correlación muy significativa entre los dos grupos de edad, lo que demuestra que nuestro tamaño muestral de 108 es suficiente para realizar el análisis de *tracking*.

Tabla 41. Coeficientes de correlación de muestras pareadas.

	Coeficiente de correlación (Niños 6-8años-Niños 12-16años)
Resistina (pg/ml)	,033
IMC (Kg/m ²)	,569***
IMC Z-score	,587***

*p<0,01

De modo similar, en un modelo de regresión lineal, en el que la variable dependiente es la concentración de resistina a los 12-16 años y la variable independiente es la concentración de resistina a los 6-8 años no se obtuvieron resultados significativos.

DISCUSIÓN

Los datos sobre los niveles de resistina en poblaciones sanas son escasos y contradictorios principalmente debido a las dificultades metodológicas. En nuestro estudio hemos determinado los niveles plasmáticos de resistina en niños españoles utilizando un inmunoensayo múltiple (Luminex). La técnica Luminex aporta una gran eficacia y sensibilidad, y en los últimos años se está consolidando como un método prometedor para la medición de adipocinas (Martos-Moreno *et al.* 2010, Martos-Moreno *et al.* 2011). Las ventajas de este método de medición frente a otros como las técnicas de ELISA o RIA son varias. Los inmunoensayos múltiples requieren volúmenes reducidos de muestras biológicas y permiten la valoración simultánea de varios parámetros en un sólo ensayo. La precisión de esta técnica es elevada ya que disminuye la variabilidad inter-ensayo, y presenta una elevada sensibilidad ya que los límites de detección para cada molécula son bastante bajos.

Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que presenta datos sobre los niveles de resistina en un número elevado de niños caucásicos sanos pertenecientes a dos grupos de edad: niños prepuberales de edades comprendidas entre los 6 y los 8 años, y adolescentes de 12 a 16 años. A pesar de que algunos estudios han descrito que los niveles de resistina son distintos dependiendo de la edad, y que existe una correlación entre la concentración de la resistina y la etapa puberal (Gerber *et al.* 2005), en nuestro estudio no hemos observado diferencias significativas en los niveles de resistina entre las niñas de 6 a 8 años y las adolescentes, observándose una pequeña diferencia entre los niveles plasmáticos de resistina entre la edad prepuberal y la adolescencia en los varones con normopeso. Li *et al.* (Li *et al.* 2009) describen una relación negativa de los niveles de resistina con la edad en niños asiáticos de ambos sexos; sin embargo, la

asociación se hace menos evidente al analizar la relación de la resistina con el estadio de desarrollo de Tanner, y desaparece cuando se excluyen del análisis a los niños con obesidad central (Li *et al.* 2009). Un estudio en niños españoles revela que no hay diferencias en los niveles de resistina en función del estadio puberal hasta la mitad de la pubertad, y que las concentraciones de resistina aumentan al alcanzar la pubertad (Martos-Moreno *et al.* 2006), sugiriendo una posible relación entre los niveles de resistina y los cambios en el contenido de grasa corporal en mujeres adultas (Martos-Moreno *et al.* 2006).

En nuestro estudio no hemos encontrado diferencias significativas entre sexos en los niveles de resistina en ninguno de los dos grupos de edad estudiados, hallazgo que coincide con los resultados del estudio de Martos-Moreno *et al.* en niños españoles (Martos-Moreno *et al.* 2006), y que difiere de los datos observados en otras poblaciones, donde sí observan diferencias significativas entre sexos en las concentraciones medias de resistina (Silha *et al.* 2003, Gerber *et al.* 2005, Li *et al.* 2009, Reinehr *et al.* 2006, Al-Daghri *et al.* 2010).

Se ha descrito que la resistina podría estar regulada por hormonas sexuales (Nogueiras *et al.* 2003), de hecho, en estudios con animales se observó que, en los adipocitos, la expresión del ARNm de la resistina estaba regulada por estrógenos (Huang *et al.* 2005), y en varones en edades puberales se ha descrito que existe asociación entre niveles de resistina y hormonas sexuales como la testosterona y la DHEA-S (Gerber *et al.* 2005). En nuestro estudio, sin embargo, no hemos encontrado asociaciones significativas entre las concentraciones de resistina y los niveles de hormonas sexuales. La asociación significativa que obtenemos en el grupo de niñas de

12 a 16 años entre los niveles de resistina y los niveles de testosterona es llamativa, aunque no podemos descartar que se trate de un artefacto estadístico.

Niveles de resistina y variables antropométricas

En nuestra investigación no hemos observado correlaciones significativas de los niveles de resistina con el IMC, ni diferencias significativas en los niveles de resistina entre niños con normopeso y niños con sobrepeso u obesidad. Los resultados en la literatura respecto a la asociación de resistina con las variables antropométricas o con presencia de obesidad en población infantil son contradictorios, existiendo estudios que tampoco encuentran correlación de los niveles de resistina con el IMC (Reinehr *et al.* 2006) ni diferencias en los niveles de resistina entre niños con normopeso y niños con sobrepeso u obesidad (Gerber *et al.* 2005, Reinehr *et al.* 2006), y estudios que demuestran correlaciones positivas de las concentraciones de resistina con parámetros relacionados con obesidad (Roth *et al.* 2011, Gherlan *et al.* 2012, Maggio *et al.* 2012).

En nuestro estudio, además de examinar esta relación de los niveles de resistina con el IMC, hemos analizado la asociación de las concentraciones de resistina con los perímetros de la cintura y de la cadera, y con la masa grasa corporal, aspectos pocas veces abordados en los estudios con niños caucásicos.

La circunferencia de la cintura es un parámetro utilizado habitualmente en la práctica clínica y en la investigación biomédica como un marcador de obesidad abdominal, y, por tanto, como medida indirecta de la masa grasa abdominal. En nuestra población, observamos una correlación positiva y significativa de los niveles de resistina con la circunferencia de la cintura en niñas de 12 a 16 años, aunque no con el índice cintura-cadera. Gerber *et al* también describieron una correlación de los niveles de resistina con la circunferencia de la cintura en niñas y tampoco encontraron relación

de los niveles de resistina con el índice cintura-cadera (Gerber *et al.* 2005). Otros autores (Li *et al.* 2009, Al-Daghri *et al.* 2010) han encontrado una correlación positiva de los niveles de resistina con ambos marcadores de obesidad central: circunferencia de cintura e índice cintura-cadera.

Se ha sugerido que la cantidad de grasa corporal se relaciona con los niveles de resistina en humanos (Won *et al.* 2009); sin embargo mientras que algunos estudios transversales en adultos han relacionado las concentraciones de resistina con la masa grasa (Degawa-Yamauchi *et al.* 2003, Yannakoulia *et al.* 2003, Vozarova de Courten *et al.* 2004), otros no han hallado asociación de los niveles de resistina con el porcentaje de grasa corporal (Lee *et al.* 2003, Silha *et al.* 2003). En nuestro estudio en niños de 12 a 16 años hemos encontrado una asociación entre los niveles de resistina con la masa grasa total y el porcentaje de masa grasa, especialmente en las niñas. En el estudio realizado por Li *et al.* (Li *et al.* 2009) en niños asiáticos también se encontró una correlación positiva entre el porcentaje de masa grasa y los niveles de resistina en ambos sexos. Hasta donde sabemos, no hay estudios en niños caucásicos que hayan incluido en sus análisis la evaluación de la asociación entre los niveles de resistina y la masa grasa corporal. Nuestros resultados, que muestran correlaciones significativas de la resistina con la masa grasa, pero no con el IMC en adolescentes, sugieren que, más que el propio índice de masa corporal, es la cantidad de masa grasa la que parece estar relacionada con las concentraciones de resistina circulantes. Se ha descrito que los niveles de expresión del ARNm de la resistina son elevados en el tejido adiposo abdominal (McTernan *et al.* 2002), pero parece que no existe una correlación entre el IMC y la expresión de la resistina (Savage *et al.* 2001).

En macrófagos existen elevados niveles de ARNm que expresa resistina (Patel *et al.* 2003). Estos macrófagos parece que se infiltran en el tejido adiposo abdominal (Curat *et al.* 2006) lo que contribuiría a explicar la correlación entre los niveles de resistina y la masa grasa que obtenemos en nuestros resultados así como los del grupo de De Luis *et al.* (De Luis *et al.* 2010).

La asociación de la masa de grasa corporal con los niveles de resistina ya en los niños tiene un significado importante en relación con el vínculo entre el tejido adiposo y la resistencia a la insulina y los procesos inflamatorios que pudieran desarrollarse en su vida adulta.

Niveles de resistina y variables lipídicas

Como se ha comentado previamente, la relación de los niveles de resistina con las variables lipídicas ha sido analizada en múltiples estudios en adultos (Jové *et al.* 2003, Burnett *et al.* 2005, Chen *et al.* 2005, Norata *et al.* 2007, Aquilante *et al.* 2008, De Luis *et al.* 2009, Owecki *et al.* 2010, Costandi *et al.* 2011, Uslu *et al.* 2012), y varios de estos estudios han encontrado una correlación de signo negativo entre los niveles de resistina y los de c-HDL (Shetty *et al.* 2004, Chen *et al.* 2005, Norata *et al.* 2007, Asano *et al.* 2010, Lau y Muniandy 2011).

En nuestra población, hemos encontrado una correlación negativa entre los niveles de resistina y los niveles de la apolipoproteína Apo-AI en el grupo con normopeso de 12 a 16 años, correlación que resultó ser más importante en las niñas. Esta asociación no la observamos ni en el grupo con sobrepeso de estas edades ni en los niños ni en las niñas prepuberales.

Los estudios que analizan la relación de niveles de resistina con el perfil lipídico en niños son escasos, de hecho, solamente hemos sido capaces de encontrar dos estudios que analicen este aspecto, el de Rubin *et al.* (Rubin *et al.* 2011) y el de Boyraz *et al.* (Boyraz *et al.* 2013), aunque ninguno de ellos estudia la relación de niveles de resistina con concentraciones de apolipoproteínas. Rubin *et al.* en su estudio sobre la asociación de adipoquinas con factores de riesgo cardiovascular (Rubin *et al.* 2011), incluyendo a 60 niños con normopeso y a 60 niños con sobrepeso entre 10 y 14 años no encontró asociación de los niveles de resistina con los niveles de c-HDL. Boyraz *et al.* en su estudio con niños obesos turcos entre 8 y 18 años encontró una correlación positiva entre los niveles de resistina y los niveles de c-HDL (Boyraz *et al.* 2013). Las diferencias de nuestros resultados con los del estudio de Boyraz *et al.* (Boyraz *et al.* 2013) pueden deberse a que ellos incluyeron niños de un rango de edad demasiado amplio, y como hemos comentado previamente, en adultos los niveles de resistina correlacionan de modo negativo con los niveles de c-HDL (Chen *et al.* 2005, Norata *et al.* 2007), y de Apo-AI (Norata *et al.* 2007). Atendiendo a nuestros resultados, podría pensarse que estas correlaciones negativas comienzan a darse en la etapa adolescente y no están presentes en edades previas.

En cuanto a los niveles de triglicéridos, en el grupo de 6 a 8 años hemos hallado una correlación negativa y significativa de los niveles de resistina con los niveles de triglicéridos que en el grupo de 12 a 16 años es positiva. En adultos hay estudios que encuentran una relación positiva de los niveles de triglicéridos con los niveles de resistina (Asano *et al.* 2010). De nuevo parece ser que en nuestra población adolescente empiezan a darse correlaciones que se ven constatadas en el individuo adulto.

Se ha descrito que el tratamiento con resistina estimula la expresión de ApoB en células hepáticas, de modo que la resistina podría tener un impacto directo sobre los lípidos hepáticos aumentando la producción de las apolipoproteínas ApoB aterogénicas (Costandi *et al.* 2011).

Niveles de resistina y variables relacionadas con la sensibilidad a la insulina

En nuestro trabajo, como ya se ha discutido previamente, hemos observado una relación entre los niveles de resistina y la masa grasa corporal; relación que apoyaría a la idea de que la resistina podría ser un enlace entre el aumento de la masa grasa y la resistencia a la insulina (Steppan *et al. Nature* 2001, Shuldiner *et al.* 2001) dado que la resistina actúa como molécula proinflamatoria (Utzschneider *et al.* 2005, McTernan *et al.* 2006) regulando la secreción de citoquinas proinflamatorias mediante la vía del NF- κ B (Bokarewa *et al.* 2005), y que las moléculas inflamatorias, junto a los ácidos grasos, interrumpen la cascada de señalización de la insulina (Petersen y Shulman 2006, Tanti *et al.* 2013).

En estudios previos con modelos murinos se ha comprobado que la obesidad y la resistencia a la insulina se asocian a un aumento en los niveles de resistina circulante (Steppan *et al. Nature et al.* 2001, Steppan y Lazar 2004, Muse *et al.* 2004), pero la molécula de la resistina humana no es completamente homóloga a la del ratón, ya que la humana carece de una de las tres isoformas que posee la del ratón, por ello en humanos la resistina podría tener un papel fisiológico diferente al que presenta en ratones (De Luis *et al.* 2010).

En este sentido, la relación estable de los niveles de resistina con la resistencia a la insulina en modelos murinos no lo es en estudios con humanos adultos. Algunos

estudios en humanos apoyan la relación de la resistina con la resistencia a la insulina, como es el caso del estudio de Lau *et al* en 2011 con controles adultos sanos y con adultos diabéticos, en el que encontraron una fuerte correlación de los niveles de resistina con los índices de resistencia a la insulina, con los niveles de glucemia y con los niveles de hemoglobina glicosilada en sangre, llegando a la conclusión de que la resistina sí podría jugar un importante papel en la regulación de la homeostasis de la glucosa y la sensibilidad a la insulina (Lau y Muniandy 2011), o el caso del estudio de Ohmori *et al* con adultos sanos y con enfermedad coronaria que también encontró una asociación de la resistina con niveles de insulina y con el índice HOMA-RI (Ohmori *et al.* 2005). Sin embargo, la mayoría de estudios en adultos no han conseguido establecer asociación de los niveles de resistina con la resistencia a la insulina (Savage *et al.* 2001, Janke *et al.* 2002, Degawa-Yamauchi *et al.* 2003, Heilbronn *et al.* 2004, De Luis *et al.* 2010). Tal y como ocurre en estos estudios en adultos, en nuestro estudio en niños no hay una asociación significativa de los niveles de resistina con las variables relacionadas con la resistencia a la insulina.

Los estudios publicados en niños a este respecto también son controvertidos, aunque hay un mayor número de estudios en los que no se observa relación de los niveles de resistina con la resistencia a la insulina en niños ni en adolescentes. Al igual que nosotros, Li *et al*, en su estudio con niños de 6 a 18 años de edad pertenecientes al estudio BCAMS, no encontraron asociación de los niveles de resistina con variables relacionadas con la resistencia a la insulina (glucemia, HOMA-RI, insulina) ni en el grupo de los prepuberales ni en el de los adolescentes (Li *et al.* 2009), así como tampoco la encontraron el grupo de Al-Daghri *et al* (Al-Daghri *et al.* 2010), ni el de Zou *et al* (Zou *et al.* 2007).

Celi *et al* observaron que los niños puberales con diabetes *mellitus* tipo 1 tenían sus niveles de resistina significativamente superiores a los de los puberales sanos, pero no hallaron relación de la resistina con ninguna variable que tuviera que ver con la diabetes (Celi *et al.* 2006), además hay que tener en cuenta que sus estudios fueron realizados con pacientes con diabetes tipo 1 cuya etiología es diferente a la del tipo 2.

Chen *et al*, sin embargo, sí encontraron una relación de los niveles de resistina con el índice HOMA-RI en niños y lo relacionaban con la aparición de aterosclerosis temprana (Chen *et al.* 2013).

Según nuestros resultados, y lo observado en la mayoría de estudios con niños, podemos concluir que la resistina no parece influir de un modo directo sobre la sensibilidad a la insulina en población infantil.

Relación de polimorfismos en el gen de la resistina con sus concentraciones plasmáticas y con variables metabólicas

En adultos, varios estudios han analizado la relación de SNPs del gen *RETN* con niveles de resistina en circulación (Engert *et al.* 2002, Azuma *et al.* 2004, Cho *et al.* 2004, Kunnari *et al.* 2005, Osawa *et al.* 2007, Hivert *et al.* 2009, Lau y Muniandy 2011, Onuma *et al.* 2013); sin embargo esta asociación no ha sido estudiada previamente en niños.

De las variantes del gen de la resistina (*RETN*) que en otras poblaciones se asocian a obesidad y a resistencia a la insulina, en nuestro estudio hemos seleccionado dos polimorfismos: el SNP rs10401670 y el SNP rs1862513. El polimorfismo rs10401670 se encuentra en la región 3'UTR del gen *RETN* y consiste en un cambio de bases entre

una C y una T. El SNP rs 1862513 se localiza en la región del promotor del gen *RETN*, en la posición -420, y consiste en un cambio de bases entre una C y una G.

Las frecuencias genotípicas y alélicas para estos SNPs en nuestra población son similares a las de otras poblaciones caucásicas (Hivert *et al.* 2009, Engert *et al.* 2002), y difieren de las descritas para población asiática (Asano *et al.* 2010, Wen *et al.* 2013).

En nuestro estudio el alelo minoritario T del SNP rs10401670 se asocia de modo significativo con niveles de resistina mayores en el grupo de 6 a 8 años de edad y la misma tendencia se observa en el grupo de 12 a 16 años pero sin alcanzar la significación estadística. En la literatura el único estudio que analiza el efecto del SNP rs10401670 es el realizado por Hivert *et al.* en población adulta, en el que obtienen resultados similares a los nuestros, es decir, encuentran una asociación del alelo minoritario con niveles elevados de resistina (Hivert *et al.* 2009).

En el caso del SNP rs1862513 (-420C>G) se ha observado que el alelo G se asocia a mayores niveles de resistina (Kunnari *et al.* 2004, Cho *et al.* 2004); sin embargo existen controversias respecto a ello (Hivert *et al.* 2009). Onuma *et al.* en su estudio de 2010, observó que el genotipo GG se asociaba a elevadas concentraciones de resistina en población japonesa pero no así en caucásicos (Onuma *et al.* 2010). En nuestro estudio no encontramos asociaciones significativas para este polimorfismo.

Recientemente se ha descubierto en ratones la existencia de una isoforma proteolítica de la decorina (Δ DCN) expresada en la superficie de células adipocitarias que funciona como receptor de la resistina (Daqing *et al.* 2011), y tal vez la decorina (DCN) pueda funcionar como receptor de la resistina en humanos (Onuma *et al.* 2013). Si realmente fuera un receptor de la resistina, las investigaciones futuras sobre él darán

más información acerca de los posibles genes y SNPs involucrados en la expresión de resistina.

Al estudiar la relación de los SNPs rs1862513 y rs10401670 con el IMC y el IMC Z-score no se ha encontrado ninguna asociación, con la excepción de una relación inconsistente en el caso del SNP rs10401670 con estas dos variables en las niñas de 12 a 16 años. Este resultado no podemos compararlo con otros, ya que el único estudio que analiza el efecto del SNP rs10401670 no estudia su relación con variables antropométricas (Hivert *et al.* 2009). Los estudios que analizan otros SNPs del gen de la resistina con variables antropométricas en adultos obtienen resultados contradictorios (Smith *et al.* 2003, Silha *et al.* 2003, Beckers *et al.* 2008, Beckeres *et al.* 2011, Beckers *et al.* 2013). El único estudio en niños que hay es un estudio en niños polacos en el que analizaron varios SNPs de la resistina en relación con obesidad sin encontrar ninguna asociación significativa (Cieslak *et al.* 2006).

Previamente hemos descrito el hallazgo de la asociación de los niveles de resistina con la masa grasa corporal. Sería interesante analizar, así mismo, la asociación de los SNPs del gen de la resistina con la masa grasa corporal, pero, lamentablemente, el número de niños en los que tenemos el dato de composición corporal es insuficiente para realizar el análisis en función del genotipo.

Uno de los resultados remarcables de esta tesis es la asociación del polimorfismo rs10401670 con el perfil lipídico en el grupo de edad entre 12 y 16 años. Concretamente se observa que el alelo minoritario T se asocia con niveles mayores de c-LDL en niños entre 12 y 16 años, y con niveles mayores de c-HDL en el grupo de las niñas. En niños no hemos encontrado estudios que analicen el efecto de los polimorfismos del gen de la resistina en el perfil lipídico y los resultados en adultos son contradictorios (Conneely *et*

al. 2004, Cho *et al.* 2004, Gouni-Berthold *et al.* 2005, Kunnari *et al.* 2005, Tang *et al.* 2007, Duman *et al.* 2007, Asano *et al.* 2010).

No hemos encontrado relación de los SNPs del gen *RETN* con variables relacionadas con la resistencia a la insulina en los niños de nuestro estudio. En el estudio de Hivert *et al.* (Hivert *et al.* 2009) en la cohorte del estudio *Framingham Offspring Study* se analiza la relación del SNP rs10401670 con variables relacionadas con la diabetes, obteniendo como resultado que el alelo T se asocia con mayores niveles de glucosa en sangre (Hivert *et al.* 2009).

A la vista de nuestros resultados, parece ser que el SNP rs10401670 se asocia con concentraciones de resistina y niveles de lípidos y que esta asociación depende del sexo y de la edad, apuntando a que pudiera haber una influencia hormonal en el efecto del polimorfismo.

Tracking de niveles de resistina

En estudios previos de *tracking* realizados en nuestra población se ha observado que variables como el peso y el IMC a los 6-8 años predicen el peso y el IMC en la adolescencia (Del Villar-Rubín *et al.* 2012). Así mismo, los niveles de la apolipoproteína Apo B en la adolescencia están determinados por los niveles de esta apolipoproteína en edad prepuberal (Del Villar-Rubín *et al.* 2013); sin embargo en nuestro estudio no hemos observado ninguna relación de los valores de resistina a los 12-16 años con los valores de resistina a los 6-8 años, lo que nos obliga a concluir que valores de resistina a los 6-8 años no predicen valores de esta misma variable en la adolescencia.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Los niveles medios de resistina no presentan dimorfismo sexual ni se relacionan con las hormonas sexuales.
2. En los niños de 12 a 16 años se observa una asociación significativa de los niveles de resistina con la masa grasa corporal en ambos sexos y con la circunferencia de la cintura en las niñas; sin embargo no se observa asociación de los niveles de resistina con el IMC en valor absoluto ni con el IMC Z-score. La resistina podría ser de utilidad como marcador de mayor contenido de masa grasa corporal.
3. Los niveles de resistina correlacionan negativamente con los niveles de Apo-AI en los niños y en las niñas de 12 a 16 años; sin embargo no parecen relacionarse con la sensibilidad a la insulina en edad infantil.
4. El alelo minoritario del SNP rs10401670 del gen de la resistina se relaciona con mayores concentraciones de resistina en plasma en los niños de 6 a 8 años. Así mismo, el SNP rs10401670 se asocia con c-HDL y con c-LDL en el grupo de niños de 12 a 16 años, siendo esta asociación diferente en función del sexo.
5. Los SNPs rs10401670 y rs1862513 del gen de la resistina no presentan asociaciones consistentes con las variables antropométricas ni con los niveles de insulina ni el índice HOMA-RI en ninguno de los grupos de edad estudiados.
6. Valores de resistina plasmática en edad prepuberal no predicen valores de resistina en la adolescencia.

BIBLIOGRAFÍA

Abate N. Obesity and cardiovascular disease. Pathogenic role of the metabolic syndrome and therapeutic implications. *J Diabetes Complications*. 2000. 14:154-174.

Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab*. 2000. 11:327-332.

Al-Daghri NM, Al-Attas OS, Alokail MS, et al. Relationship between resistin and aPAI-1 levels with insulin resistance in Saudi children. *Pediatr Int*. 2010. 52:551-556.

Allain C, Poons L, Chang C, et al. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem*. 1974. 20:470-475.

Álvarez-Castro P, Sangiao-Alvarellos S, Brandón-Sandá I, et al. Función endocrina en la obesidad. *Endocrinol Nutr*. 2011. 58:422-432.

Aquilante CL, Kosmiskib LA, Knutsen SD, et al. Relationship between plasma resistin concentrations, inflammatory chemokines, and components of the metabolic syndrome in adults. *Metabolism*. 2008. 57:494-501.

Arslanian S, Suprasongsin C. Testosterone treatment in adolescents with delayed puberty: changes in body composition, protein, fat, and glucose metabolism. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997. 82:3213-3220.

Asano H, Izawa H, Nagata K, et al. Plasma resistin concentration determined by common variants in the resistin gene and associated with metabolic traits in an aged Japanese population. *Diabetologia*. 2010. 53:234-246.

Assmann G, Shrlower H, Schmitz G. Quantification of high density lipoprotein cholesterol by precipitation with fosfotungstic acid/MgCl₂. *Clin Chem*. 1983. 29:2026-2030.

Axelsson J, Bergsten A, Qureshi AR, et al. Elevated resistin levels in chronic kidney disease are associated with decreased glomerular filtration rate and inflammation, but not with insulin resistance. 2006. *Kidney Int*. 69:596-604.

Azuma K, Oguchi S, Matsubara Y, et al. Novel resistin promoter polymorphisms: association with serum resistin level in Japanese obese individuals. *Horm Metab Res*. 2004. 36:564-570.

Baker JL, Olsen LW, Sorensen TI. Childhood body-mass index and the risk of coronary heart disease in adulthood. 2007. *N Engl J Med*. 357:2329-2337.

Ball GDC, Weigensberg MJ, Cruz ML, et al. Insulin sensitivity, insulin secretion and β -cell function during puberty in overweight Hispanic children with a family history of type 2 diabetes. *Int J Obes*. 2005. 29:1471-1477.

Banerjee RR, Rangwala SM, Shapiro JS, et al. Regulation of fasted blood glucose by resistin. *Science*. 2004. 303:1195-1198.

Barker DJ. Coronary heart disease: a disorder of growth. *Horm Res*. 2003. 59:35-41.

Barker DJ. The developmental origins of adult disease. *J Am Coll Nutr*. 2004. 23:588-595.

Beauloye V, Zech F, Tran HT et al. Determinants of early atherosclerosis in obese children and adolescents. 2007. *Clin Endocrinol Metab*. 92:3025-3032.

Beckers S, Peeters AV, Freitas FD, et al. Analysis of genetic variations in the resistin gene shows no associations with obesity in women. *Obesity*. 2008. 16:905-907.

Beckers S, De Freitas F, Zegers D, et al. Identification and functional characterization of a missense mutation in resistin in two patients with severe obesity and insulin resistance. *Eur J Endocrinol*. 2011. 164:927-936.

Beckers S, Zegers D, Van Camp JK, et al. Resistin polymorphisms show associations with obesity, but not with bone parameters in men: results from the Odense Androgen Study. *Mol Biol Rep*. 2013. 40:2467-2472.

Berenson GS, Srinivasan SR, Hunter SM, et al. Risk factors in early life as predictors of adult heart disease: The Bogalusa Heart Study. *Am J Med Sci*. 1989. 298:141-151.

Berenson GS, Srinivasan SR, Wattigney WA, et al. Obesity and cardiovascular risk in children. *Ann N Y Acad Sci*. 1993. 699:93-103.

Berenson GS, Srinivasan SR, Bao W, et al. Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults. *N Engl J Med*. 1998. 338:1650-1656.

Bo S, Gambino R, Pagani A, et al. Relationships between human serum resistin, inflammatory markers and insulin resistance. *Int J Obes*. 2005. 29:1315-1320.

Boden G. Role of fatty-acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes*. 1997. 46:3-10.

Bokarewa M, Nagaev I, Dahlberg L, et al. Resistin, an adipokine with potent proinflammatory properties. *J Immunol*. 2005. 174:5784-5795.

Bond LJ, Vella ET, Kiparissis Y, et al. Anthropometry and body composition do not predict bioavailable androgen or progesterone concentration in adolescent girls. *Am J Hum Biol.* 2006. 18:639-653.

Boscaro M, Giacchetti G, Ronconi V. Visceral adipose tissue: emerging role of gluco- and mineralocorticoid hormones in the setting of cardiometabolic alterations. *Ann NY Acad Sci.* 2012. 1264:87-102.

Böttner A, Kratzsch J, Müller G, et al. Gender differences of adiponectin levels develop during the progression of puberty and are related to serum androgen levels. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004. 89:4053-4061.

Bouchard C. Obesity in adulthood-the importance of childhood and parental obesity. *N Engl J Med.* 1997. 337:926-927.

Boyraz M, Cekmez F, Karaoglu A, et al. Relationship of adipokines (adiponectin, resistin and RBP4) with metabolic syndrome components in pubertal obese children. *Biomark Med.* 2013. 7:423-428.

Bridger T. Childhood obesity and cardiovascular disease. *Paediatr Child Health.* 2009. 14:177-182.

Brufani C, Tozzi A, Fintini D, et al. Sexual dimorphism of body composition and insulin sensitivity across pubertal development in obese Caucasian subjects. *Eur J Endocrinol.* 2009. 160:769-775.

Buccolo G, David H. Quantitative determination of serum triglycerides by use of enzymes. *Clin Chem.* 1973. 19: 476-82.

Burnett MS, Lee CW, Kinnaird TD, et al. The potential role of resistin in atherogenesis. *Atherosclerosis.* 2005.182:241-248.

Burstein M , Scholnick H, Morfin R. Rapid method for the isolation of lipoproteins from human plasma serum by precipitation with polyanions. *J Lipid Res.* 1970. 11:583-95.

Callou de Sá EQ, Feijó de Sá FC, e Silva Rde S, et al. Endogenous oestradiol but not testosterone is related to coronary artery disease in men. *Clin Endocrinol.* 2011. 75:177-183.

Carrascosa A, Fernández JM, Fernández A, et al. Spanish cross-sectional growth study. Part II. Height, weight and body mass index values from birth to adulthood. *An Pediatr (Barc).* 2008. 68:552-559.

Carroll MD, Lacher DA, Sorlie PD, et al. Trends in serum lipids and lipoprotein of adults, 1960-2002. *JAMA*. 2005. 294:1773-1781.

Celi F, Bini V, Papi E, et al. Circulating adipocytokines in non-diabetic and Type 1 diabetic children: relationship to insulin therapy, glycaemic control and pubertal development. *Diabet Med*. 2006. 23:660-665.

Cepica S, Rohrer GA, Masopust M, et al. Partial cloning, cytogenetic and linkage mapping of the porcine resistin (RSTN) gene. *Anim Genet*. 2002. 33:381-383.

Chen BH, Song Y, Ding EL, et al. Association of resistin promoter polymorphisms with plasma resistin levels and type 2 diabetes in women and men. *Int J Mol Epidemiol Genet*. 2010.183:167-174.

Chen CC, Li TC, Li CI, et al. Serum resistin level among healthy subjects: relationship to anthropometric and metabolic parameters. *Metabolism*. 2005. 54:471-475.

Chen J-M, Férec C, Cooper DN. A systematic analysis of disease-associated variants in the 3' regulatory regions of human protein-coding genes I: general principles and overview. *Hum Genet*. 2006.120:1-21.

Chen M-P, Chung F-M, Chang D-M, et al. Elevated plasma level of visfatin/Pre-B cell Colony-Enhancing Factor in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006. 91:295-299.

Chen XY, Zhang JH, Liu HM, et al. Association of serum resistin levels with metabolic syndrome and early atherosclerosis in obese Chinese children. *J Endocrinol Metab*. 2013. 26:855-860.

Cho YM, Youn B-S, Chung SS, et al. Common genetic polymorphisms in the promoter of resistin gene are major determinants of plasma resistin concentrations in humans. *Diabetologia*. 2004. 47:559-565.

Chu NF, Rimm EB, Wang DJ, et al. Clustering of cardiovascular disease risk factors among obese schoolchildren. *Am J Clin Nutr*. 1998. 67:1141-1146.

Chung SS, Choi HH, Kim KW, et al. Regulation of human resistin gene expression in cell systems: an important role of stimulatory protein 1 interaction with a common promoter polymorphic site. *Diabetologia*. 2005.48:1150-1158.

Cieslak J, Skorczyk A, Stachowiak M, et al. Polymorphisms in 50-flanking regions of genes encoding adiponectin, leptin, and resistin are not associated with obesity of Polish children and adolescents. *Mol Biol Rep*. 2011. 38:1793-1798.

Cole TJ, Bellizzi CB, Flegal KM, et al. Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *BMJ*. 2000. 320:1240-1243.

Conneely KN, Silander K, Scott LJ, et al. Variation in the resistin gene is associated with obesity and insulin-related phenotypes in Finnish subjects. *Diabetologia*. 2004. 47:1782-2788.

Cook KS, Groves DL, Min HY, et al. A developmentally regulated mRNA from 3T3 adipocytes encodes a novel serine protease homologue. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985. 82:6480-6484.

Cook KS, Min HY, Johnson D, et al. Adipsin: a circulating serine protease homolog secreted by adipose tissue and sciatic nerve. *Science*. 1987. 237:402-405.

Cook JS, Hoffman RP, Stene MA, et al. Effects of maturational stage on insulin sensitivity during puberty. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993. 77:725-730.

Coppack SW. Adipose tissue changes in obesity. *Biochem Soc Trans*. 2005. 33:1049-1052.

Costandi J, Melone M, Zhao A, et al. Human resistin stimulates hepatic overproduction of atherogenic ApoB-containing lipoprotein particles by enhancing ApoB stability and impairing intracellular insulin signaling. *Circ Res*. 2011. 108:727-742.

Curat CA, Wegner V, Sengenès C, et al. Macrophages in human visceral adipose tissue: increased accumulation in obesity and a source of resistin and visfatin. 2006. *Diabetologia*. 49:744-747.

Daquinag AC, Zhang Y, Amaya-Manzanares F, et al. An isoform of decorin is a resistin receptor on the surface of adipose progenitor cells. *Cell Stem Cell*. 2011. 9:74-86.

De Luis DA, Sagrado MG, Conde R, et al. Relation of resistin levels with cardiovascular risk factors and insulin resistance in non-diabetes obese patients. *Diabetes Res Clin Pract*. 2009. 84:174-178.

De Luis DA, Sagrado MG, Conde R, et al. Relation of resistin levels with cardiovascular risk factors, insulin resistance and inflammation in naïve diabetes obese patients. *Diabetes Res Clin Pract*. 2010. 89:110-114.

De Maddalena C, Vodo S, Petroni A, et al. Impact of testosterone on body fat composition. *J Cell Physiol*. 2012. 227:3744-3748.

De Ridder, Thijssen JH, Bruning PF, et al. Body fat mass, body fat distribution, and pubertal development: a longitudinal study of physical and hormonal sexual maturation of girls. *J Clin Endocrinol Metab*. 1992. 75:442-446.

De Simone M, Verrotti A, Iughetti L, et al. Increased visceral adipose tissue is associated with increased circulating insulin and decreased sex hormone binding globulin levels in massively obese adolescent girls. *J Endocrinol Invest.* 2001. 24:438-444.

Del Villar-Rubín S, Escorihuela R, García-Anguita A, Ortega L, Garcés C. Valoración de la evolución temporal del sobrepeso desde la edad prepuberal a la adolescencia. *An Pediatr (Barc).* 2012. 78:389-392.

Del Villar-Rubín S, Escorihuela R, Ortega-Senovilla H, et al. High tracking of apolipoprotein B levels from the prepubertal age to adolescence in Spanish children. *Acta Pediatr.* 2013. 102:e374-377.

Degawa-Yamauchi M, Bovenkerk JE, Juliar BE, et al. Serum resistin (FIZZ3) protein is increased in obese humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003. 88:5452-5455.

Dietz WH. Overweight and precursors of type 2 diabetes mellitus in children and adolescents. 2001. *J Pediatr.* 138:453-454.

Dorfman RI, Shipley RA. *Androgens.* Jhon Wiley and Sons, Inc., New York. 1956. P.116-128.

Duman BS, Cagatay P, Hatemi H, et al. Association of resistin gene 3'-untranslated region EX4-44G>A polymorphism with obesity-and insulin-related phenotypes in Turkish type 2 diabetes patients. *Rev Diabet Stud.* 2007. 4:49-55.

Dyck DJ, Heigenhauser GJF, Bruce CR. The role of adipokines as regulators of skeletal muscle fatty acid metabolism and insulin sensitivity. 2006. *Acta Physiol.* 186:5-16.

Engert JC, Vohl M-C, Williams SM, et al. 5' Flanking variants of resistin are associated with obesity. *Diabetes.* 2002. 51:1629-1634.

Esteve E, Ricart W, Fernandez-Real JM. Adipocytokines and insulin resistance. The possible role of lipocalin-2, retinol binding protein-4, and adiponectin. *Diabetes Care.* 2009. 32:S362-S367.

Fain JN, Cheema PS, Bahouth SW, et al. Resistin release by human adipose tissue explants in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003. 3:674-678.

Fernández JR, Redden DT, Pietrobelli A, et al. Waist circumference percentiles in nationally representative samples of African-American, European-American children and adolescents. *Pediatr.* 2004. 145:439-444.

Ferrante AW Jr. Obesity-induced inflammation: a metabolic dialogue in the language of inflammation. *J Intern Med.* 2007. 262:408-414.

Friedewald W, Levy R, Fredrickson D. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972. 18:499-502.

Friedland O, Nemet D, Gorodnitsky N, et al. Obesity and lipid profiles in children and adolescents. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2002. 15:1011-1016.

Fuente-Martín E, García-Cáceres C, Granado M, et al. Leptin regulates glutamate and glucose transporters in hypothalamic astrocytes. *J Clin Invest.* 2012. 122:3900-3913.

Fujinami A, Obayashi H, Ohta K, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for circulating human resistin: resistin concentrations in normal subjects and patients with type 2 diabetes. *Clin Chim Acta.* 2004. 339:57-63.

Garcés C, Gutiérrez-Guisado J, Benavente M, et al. Obesity in Spanish schoolchildren: relationship with lipid profile and with insulin resistance. *Obes Res.* 2005. 13:959-963.

Garcés C, Cano B, Lasunción MA, et al. Dehydroepiandrosterone sulfate and high-density lipoprotein-cholesterol in overweight children. *Obesity.* 2007. 15:1147-1154.

Garcés C, de Oya M. Cardiovascular risk factors in children. Main findings of the Four Provinces study. *Rev Esp Cardiol.* 2007. 60:517-524.

Garcés C, de Oya I, López-Simón L, et al. Hormone levels in 12-15 year old boys and girls in Spain. Relationship with anthropometric variables. *Clin Biochem.* 2008. 41:621-624.

Garnett SP, Höglér W, Blades B, et al. Relation between hormones and body composition, including bone, in prepubertal children. *Am J Nutr.* 2004. 80:966-972.

Gerber M, Boettner A, Seidel B, et al. Serum resistin levels of obese and lean children and adolescents: biochemical analysis and clinical relevance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005. 90:4503-4509.

Gerstmayer B, Küsters D, Gebel S, et al. Identification of RELM gamma, a novel resistin-like molecule with a distinct expression pattern. *Genomics.* 2003. 81:588-595.

Gharibeh MY, Al Tawallbeh GM, Abboud MM, et al. Correlation of plasma resistin with obesity and insulin resistance in type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab.* 2010. 36:443-9.

Gherlan I, Vladoiu S, Alexiu F, et al. Adipocytokine profile and insulin resistance in childhood obesity. *Maedica (Buchar)*. 2012. 7:205-213.

Glowinska B, Urban M, Koput A, et al. New atherosclerosis risk factors in obese, hypertensive and diabetic children and adolescents. *Atherosclerosis*. 2003. 167:275-286.

Gnacinska M, Malgorzewicz S, Stojek M, et al. Role of adipokines in complications related to obesity: a review. *Adv Med Sci*. 2009. 2:150-157.

Gorbach SL, Schaefer EJ, Woods M, et al. Plasma lipoprotein cholesterol and endogenous sex hormones in healthy young women. *Metabolism*. 1989. 38:1077-1081.

Gouni-Berthold I, Giannakidou E, Faust M, et al. Resistin gene 3'-untranslated region +62G>A polymorphism is associated with hypertension but not diabetes mellitus type 2 in a German population. *J Intern Med*. 2005. 258:518-526.

Gustafson B, Hammarstedt A, Andersson C, et al. Inflamed adipose tissue: a culprit underlying the metabolic syndrome and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007. 27: 2276–2283.

Guzzaloni G, Grugni G, Mazzilli G, et al. Comparison between beta-cell function and insulin resistance indexes in prepubertal and pubertal obese children. *Metabolism*. 2002. 51:1011-1016.

Haffner SM, Mykkänen L, Valdez RA, et al. Relationship of sex hormones to lipids and lipoproteins in nondiabetic men. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993. 77:1610-1615.

Hajer GR, Van Haeften TW, Visseren FL. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *Eur Heart J*. 2008. 29:2959-2971.

Hannon TS, Janosky J, Arslanian SA. Longitudinal study of physiologic insulin resistance and metabolic changes of puberty. *Pediatr Res*. 2006. 60:759-763.

Hansen D, Dendale P, Beelen M, et al. Plasma adipokine and inflammatory marker concentrations are altered in obese, as opposed to non-obese, type 2 diabetes patients. *Eur J Appl Physiol*. 2010. 109:397-404.

Hasegawa G, Ohta M, Ichida Y, et al. Increased serum resistin levels in patients with type 2 diabetes are not linked with markers of insulin resistance and adiposity. 2005. 42:104-109.

Hausman DB, DiGirolamo M, Bartness TJ, et al. The biology of white adipocyte proliferation. *Obes Rev*. 2001. 2:239-254.

Haust MD. The genesis of atherosclerosis in pediatric age-group. *Pediatr Pathol*. 1990. 10:253-271.

Heilbronn LK, Rood J, Janderova L, et al. Relationship between serum resistin concentrations and insulin resistance in nonobese, obese, and obese diabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004. 89:1844-1848.

Hishida A, Wakai K, Okada R, et al. Significant interaction between *RETN* -420 G/G genotype and lower BMI on decreased risk of type 2 diabetes mellitus (T2DM) in Japanese – the J-MICC Study. *Endocr J*. 2013. 60:237-243.

Hivert M-F, Manning AK, McAteer JB, et al. Association of variants in *RETN* with plasma resistin levels and diabetes-related traits in the Framingham Offspring Study. *Diabetes*. 2009. 58:750-756.

Holcomb IN, Kabakoff RC, Chan B, et al. *FIZZ1*, a novel cysteine-rich secreted protein associated with pulmonary inflammation, defines a new gene family. *EMBO J*. 2000. 19:4046-4055.

Holman RL, McGill HC, Strong JP, et al. The natural history of atherosclerosis. The early aortic lesions as seen in New Orleans in the middle of the 20th century. *Am J Pathol*. 1985. 34:209-235.

Horlick MB, Rosenbaum M, Nicolson M, et al. Effect of puberty on the relationship between circulating leptin and body composition. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000. 85:2509-18.

Huang SW, Seow KM, Ho LT, et al. Resistin mRNA levels are downregulated by estrogen in vivo and in vitro. *FEBS Letters*. 2005. 579:449-454.

Hussain S, Bibi S, Javed Q. Heritability of genetic variants of resistin gene in patients with coronary artery disease: A family-based study. *Clin Biochem*. 2011. 44:618-622.

Iacobellis G, Ribaldo MC, Zappaterreno A, et al. Prevalence of uncomplicated obesity in an Italian obese population. *Obes Res*. 2005. 13:1116–1122.

Janke J, Engeli S, Gorzelniak K, et al. Resistin gene expression in human adipocytes is not related to insulin resistance. *Obes Res*. 2002.10:1-5.

Jiang CY, Wang W, Tang JX, et al. The adipocytokine resistin stimulates production of proinflammatory cytokines TNF- α and IL-6 in pancreatic acinar cells via NF- κ B activation. *J Endocrinol Invest*. 2013. (Epub ahead of print).

Jové M, Planavila A, Cabrero A, et al. Reductions in plasma cholesterol levels after fenofibrate treatment are negatively correlated with resistin expression in human adipose tissue. *Metabolism*. 2003. 52:351-355.

Kaufer K, Ariza A. The epidemiology of overweight in children: relevance for clinical care. *Pediatrics*. 1998. 101:103-105.

Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004. 89:2548-2556.

Kim KH, Lee K, Moon YS, et al. A Cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation. *J Biol Chem*. 2001. 276:11252-11256.

Kirkland RT, Keenan BS, Probstfield JL, et al. Decrease in plasma high-density lipoprotein cholesterol levels at puberty in boys with delayed adolescence. Correlation with plasma testosterone levels. *JAMA*. 1987. 257:502-507.

Konrad A, Lehrke M, Schachinger V, et al. Resistin is an inflammatory marker of inflammatory bowel disease in humans. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2007. 19:1070-1074.

Kunnari A, Ukkola OY, Kesäniemi A. Resistin polymorphisms are associated with cerebrovascular patients disease in Finnish Type 2 diabetic. *Diabet Med*. 2005. 22:583-589.

Lafontan M, Girard J. Impact of visceral adipose tissue on liver metabolism. Part I: heterogeneity of adipose tissue and functional properties of visceral adipose tissue. *Diabetes Metab*. 2008. 34:317-327.

Lau CH, Muniandy S. Adiponectin and resistin gene polymorphisms in association with their respective adipokine levels. *Ann Hum Genet*. 2011. 75:370-382.

Lau CH, Muniandy S. Influence of adiponectin and resistin gene polymorphisms on quantitative traits related to metabolic syndrome among Malay, Chinese, and Indian men in Malaysia. *Biochem Genet*. 2013. 51:166-174.

Lauer R, Lee J, Clarke W. Factors affecting the relationship between childhood and adult cholesterol levels. The Muscatine Study. *Pediatrics*. 1988. 82:309-318.

Lee JH, Chan JL, Yiannakouris N, et al. Circulating resistin levels are not associated with obesity or insulin resistance in humans and are not regulated by fasting or leptin administration: cross-sectional and interventional studies in normal, insulin-resistant, and diabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003. 88:4848-4856.

Lee S, Bacha F, Gungor N, et al. Waist circumference is an independent predictor of insulin resistance in black and white youths. *J Pediatr*. 2006. 148:188-94.

Leoni MC, Valsecchi C, Mantelli M, et al. Impact of child obesity on adipose tissue physiology: assessment of adipocytokines and inflammatory cytokines as biomarkers of obesity. *Pediatr Rep.* 2010. 2:e19.

Li M, Fisette A, Zhao XY, Deng JY, et al. Serum resistin correlates with central obesity but weakly with insulin resistance in Chinese children and adolescents. *Int J Obes.* 2009. 33:424-9.

Li Y, Ding L, Hassan W, Abdelkader D, et al. Adipokines and hepatic insulin resistance. 2013. *J Diabetes Res.* 170532.

Loomba-Albrecht LA, Styne DM. Effect of puberty on body composition. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2009.16:10-15.

López-Bermejo A, Chico-Juliá B, Fernández-Balsells M, et al. Serum visfatin increases with progressive β -cell deterioration. *Diabetes.* 2006. 55:2871-2875.

López-Martínez D, Gil A, Porres A, et al. Lipoprotein profile in children and adolescents of the Autonomous Community of Madrid. *Med Clin (Barc).* 1996. 107:366-370.

Maggio AB, Wacker J, Montecucco F, et al. Serum resistin and inflammatory and endothelial activation markers in obese adolescents. *J Pediatr.* 2012. 161:1022-1027.

Makni E, Moalla W, Benezzeddine-Boussaidi L, et al. Correlation of resistin with inflammatory and cardiometabolic markers in obese adolescents with and without metabolic syndrome. *Obes Facts.* 2013. 6:393-404.

Marcovina S, Alberts J, Henderson O, et al. International Federation of Clinical Chemistry Standardization Project for measurement of apolipoproteins AI and BIII. Comparability of apolipoproteins AI values by use of international reference material. *Clin Chem.* 1993. 39:773-781.

Martos-Moreno GA, Barrios V, Argente J. Normative data for adiponectin, resistin, interleukin 6, and leptin/receptor ratio in a healthy Spanish pediatric population: relationship with sex steroids. *Eur J Endocrinol.* 2006. 155:429-434.

Martos-Moreno GA, Burgos-Ramos E, Canelles S, et al. Evaluation of a multiplex assay for adipokine concentrations in obese children. *Clin Chem Lab Med.* 2010. 48:1439-1446.

Martos-Moreno GA, Burgos-Ramos E, Canelles S, et al. Determinación de insulina y citocinas durante el desarrollo mediante inmunoensayo múltiple: implicaciones en pediatría. *An Pediatr* 2011. 74:356-362.

Martos-Moreno GA, Kopchick JJ, Argente J. Adipoquinas en el niño sano y con obesidad. *An Pediatr.* 2013. 78:189.e1-189.e15.

Mattevi VS, Zembruski VM, Hutz MH. A resistin gene polymorphism is associated with body mass index in women. *Hum Genet.* 2004. 115:208-212.

Maury E, Brichard SM. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol.* 2010. 314:1-16.

McGill HC Jr, McMahan CA. Determinants of atherosclerosis in the young. Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY) Research Group. *Am J Cardiol.* 1998. 82:30T-36T.

McGill HC Jr, McMahan CA, Herderick EE, et al. Obesity accelerates the progression of coronary atherosclerosis in young men. *Circulation.* 2002. 105:2712-2718.

McTernan CL, McTernan PG, Harte AL, et al. Resistin, central obesity and type 2 diabetes. *Lancet.* 2002. 359:46-47.

McTernan PG, Kusminski CM, Kumar S. Resistin. *Curr Opin Lipidol.* 2006. 17:170-175.

Menzhagui C, Coco A, Salvemini L, et al. Heritability of serum resistin and its genetic correlation with insulin resistance-related features in nondiabetic Caucasians. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006. 91:2792-2795.

Minn AH, Patterson NB, Pack S, et al. Resistin is expressed in pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003. 2:641-645.

Morrison JA, Barton BA, Biro FM, et al. Sex hormones and the changes in adolescent male lipids: longitudinal studies in a biracial cohort. *J Pediatr.* 2003. 142:637-642.

Muse ED, Obici S, Bhanot S, et al. Role of resistin in diet-induced hepatic insulin resistance. *J Clin Invest.* 2004. 114:232:239.

Nagaev I, Smith U. Insulin resistance and type 2 diabetes are not related to resistin expression in human fat cells or skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001. 285:561-564.

Napoli C, Glass CK, Witztum JL, et al. Influence of maternal hypercholesterolaemia during pregnancy on progression of atherosclerotic lesion in childhood: Fate of Early Lesion in Children (FELIC) study. *Lancet.* 1999. 354:1234-1241.

Nogueiras R, Gualillo O, Caminos E, et al. Regulation of resistin by gonadal, thyroid hormone, and nutritional status. *Obes Res.* 2003. 11:408-414.

Norata GD, Ongari M, Garlaschelli K, et al. Plasma resistin levels correlate with determinants of the metabolic syndrome. *Eur J Endocrinol.* 2007. 156:279-284.

Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Thompson&Thompson. *Genética en medicina.* 7ª edición. 2008. Ed. Elsevier. pp.184;196.

Ochi M, Osawa H, Hirota Y, et al. Frequency of the G/G genotype of resistin single nucleotide polymorphism at -420 appears to be increased in younger-onset type 2 diabetes. *Diabetes.* 2007. 56:2834-2838.

Ohmori R, Momiyama Y, Kato R, et al. Associations between serum resistin levels and insulin resistance, inflammation, and coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 2005. 46:379-380.

Onuma H, Tabara Y, Kawamura R, et al. A at single nucleotide polymorphism -358 is required for G at -420 to confer the highest plasma resistin in the general Japanese population. *Plos One.* 2010. 5:e9718.

Onuma H, Tabara Y, Kawamura R, et al. Plasma Resistin Is Associated With Single Nucleotide Polymorphisms of a Possible Resistin Receptor, the Decorin Gene, in the General Japanese Population. *Diabetes.* 2013. 62:649-52.

Ortega L, Riestra P, Navarro P, et al. Resistin levels are related to fat mass, but not to body mass index in children. *Peptides.* 2013. 49:49-52.

Osawa H, Yamada K, Onuma H, et al. The G/G genotype of a resistin single-Nucleotide polymorphism at -420 increases type 2 diabetes mellitus susceptibility by inducing promoter activity through specific binding of Sp1/3. *Am J Hum Genet.* 2004. 75:678-686.

Osawa H, Onuma H, Ochi M, et al. Resistin SNP-420 determines its monocyte mRNA and serum levels inducing type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005. 335:596-602.

Osawa H, Tabara Y, Kawamoto R, et al. Plasma resistin, associated with single nucleotide polymorphism -420, is correlated with insulin resistance, lower HDL cholesterol, and high-sensitivity C reactive protein in the Japanese general population. *Diabetes Care.* 2007. 30:1501-1507.

Ouchi N, Kihara S, Arita Y, et al. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte- derived plasma protein adiponectin. *Circulation.* 1999. 100:2473-2476.

Owecki M, Nikisch E, Micke A, et al. Serum resistin is related to plasma HDL cholesterol and inversely correlated with LDL cholesterol in diabetic and obese humans. *Neuro Endocrinol Lett.* 2010. 31:673-678.

Pantsulaia I, Livshits G, Treofimov S, et al. Genetic and environmental determinants of circulating resistin level in a community-based sample. *Eur J Endocrinol.* 2007. 156:129-135.

Patel L, Buckels AC, Kinghorn IJ, et al. Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003. 300:472-476.

Patel SD, Rajala MW, Rossetti L, et al. Disulfide-dependent multimeric assembly of resistin family hormones. *Science.* 2004. 304:1154-1158.

Petersen KF, Shulman GI. Etiology of insulin resistance. *Am J Med.* 2006. 119:10S-16S.

Piesterziewicz K, Łuczak K, Komorowski J, et al. Resistin increases with obesity and atherosclerotic risk factors in patients with myocardial infarction. *Metabolism.* 2008. 57:488-493.

Pinhas-Hamiel O, Dolan LM, Daniels SR, et al. Increase incidence of non-insulin-dependent diabetes mellitus among adolescents. *J Pediatr.* 1996. 128:608-615.

Pischon T, Bamberger CM, Kratzsch BC, et al. Association of plasma resistin levels with coronary heart disease in women. *Obes Res.* 2005. 13:1764-1771.

Reilly MP, Lehrke M, Wolfe ML, et al. Resistin is an inflammatory marker of atherosclerosis in humans. *Circulation.* 2005. 111:932-939.

Reinehr T, de Sousa G, Roth CL, Andler W. Androgens before and after weight loss in obese children. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005. 90:5588-5595.

Reinehr T, Roth CL, Menke T, et al. Resistin concentrations before and after weight loss in obese children. *Int J Obes.* 2006. 30:297-301.

Rizk NM, Yousef M. Association of lipid profile and waist circumference as cardiovascular risk factors for overweight and obesity among school children in Qatar. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2012. 5:425-432.

Rocchini A. Childhood obesity and a diabetes epidemic. *N Engl J Med.* 2002. 346:854-855.

Roth CL, Kratz M, Ralston, MM, et al. Changes in adipose-derived inflammatory cytokines and chemokines after successful lifestyle intervention in obese children. *Metabolism*. 2012. 60:445-452.

Rubin DA, McMurray RG, Hackney AC, et al. Relationship between Cardiovascular Risk Factors and Adipokines in Adolescents. *Horm Res Paediatr*. 2011;76:126-129.

Savage DB, Sewter CP, Klenk ES, et al. Resistin / Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor- γ action in humans. *Diabetes*. 2001. 50:2199-2202.

Schoppen S, Riestra P, García-Anguita A, et al. Leptin and adiponectin levels in pubertal children: relationship with anthropometric variables and body composition. *Clin Chem Lab Med*. 2010. 48:707-711.

Senolt L, Housa D, Vernerová Z, et al. Resistin in rheumatoid arthritis synovial tissue, synovial fluid and serum. *Rheum Dis*. 2007. 66:458-463.

Sethi JK, Vidal-Puig AJ. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *J. Lipid Res*. 2007. 48:1253-1262.

Shea S, Aymong E, Zybert P, et al. Obesity, fasting plasma insulin, and C-reactive protein levels in healthy children. *Obes Res*. 2003;11:95-103.

Sheng CH, Di J, Jin Y, et al. Resistin is expressed in human hepatocytes and induces insulin resistance. *Endocr*. 2008. 33:135-143.

Shetty GK, Economides PA, Horton ES, et al. Circulating adiponectin and resistin levels in relation to metabolic factors, inflammatory markers, and vascular reactivity in diabetic patients and subjects at risk for diabetes. *Diabetes Care*. 2004. 27:2450-2457.

Short KR, Blackett PR, Gardner AW, et al. Vascular health in children and adolescents: effects of obesity and diabetes. *Vasc Health Risk Manag*. 2009. 5:973-990.

Shuldiner AR, Yang R, Gong D-W. Resistin, obesity, and insulin resistance-the emerging role of the adipocyte as an endocrine organ. *N Engl J Med*. 2001. 345:1345-1346.

Siervogel RM, Demerath EW, Schubert C, et al. Puberty and body composition. *Horm Res*. 2003. 60:36-45.

Silha JV, Krsek M, Skrha JV, et al. Plasma resistin, adiponectin and leptin levels in lean and obese subjects: correlations with insulin resistance. *Eur J Endocrinol*. 2003. 149:331-335.

Sinha R, Fisch G, Teague B, et al. Prevalence of impaired glucose tolerance among children and adolescents with marked obesity. *N Engl J Med*. 2002. 346:802-810.

Skurk T, Alberti-Huber C, Herder C, et al. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007. 92:1023-1033.

Smith SR, Bai F, Charbonneau C, et al. A promoter genotype and oxidative stress potentially link resistin to human insulin resistance. *Diabetes*. 2003. 52:1611-1618.

Sorof JM, Lai D, Turner J, et al. Overweight, ethnicity and the prevalence of hypertension in school-aged children. *Pediatrics*. 2004. 113:475-482.

Spalding KL, Arner E, Westermark PO, et al. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*. 2008. 453:783-787.

Srinivasan SR, Sundaram GS, Williamson GD, et al. Serum lipoproteins and endogenous sex hormones in early life: observations in children with different lipoprotein profiles. *Metabolism*. 1985. 34:861-867.

Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. 2001. *Nature*. 409:307-312.

Steppan CM, Brown EJ, Wright CM, et al. A family of tissue-specific resistin-like molecules. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001. 98:502-506.

Steppan CM, Lazar MA. The current biology of resistin. *J Intern Med*. 2004. 255:439-447.

Tang NP, Wang LS, Yang L, et al. A polymorphism in the resistin gene promoter is related to increased C-reactive protein levels in patients with coronary artery disease. *Clin Chem Lab Med*. 2007. 45:1471-1475.

Tanti JF, Ceppo F, Jager J, et al. Implication of inflammatory signaling pathways in obesity-induced insulin resistance. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013. 3:181.

Taube A, Lambernd S, Van Echten-Deckert, et al. Adipokines promote lipotoxicity in human skeletal muscle cells. *Arch Physiol Biochem*. 2012. 118:92-101.

Tejero ME, Voruganti VS, Proffitt JM, et al. Cross-species replication of a resistin mRNA QTL, but not QTLs for circulating levels of resistin, in human and baboon. 2008. *Heredity*. 101:60-66.

Tfayli H, Arslanian S. Menstrual health and the metabolic syndrome in adolescents. *Ann N Y Acad Sci.* 2008. 1135:85-94.

Thommesen L, Stunes AK, Monjo M, et al. Expression and regulation of resistin in osteoblasts and osteoclasts indicate a role in bone metabolism. *J Cell Biochem.* 2006. 99:824-834.

Tönjes A, Fasshauer M, Kratzsch J, et al. Adipokine pattern in subjects with impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance in comparison to normal glucose tolerance and diabetes. *Plos One.* 2010. 5:e13911.

Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr.* 2004. 92:347-55.

Tsou P-L, Jiang Y-D, Chang C-C, et al. Sex-Related Differences Between Adiponectin and Insulin Resistance in Schoolchildren. *Diabetes Care.* 2004. 27:308-313.

Tuzcu EM, Kapadia SR, Tutar E, et al. High prevalence of coronary atherosclerosis in asymptomatic teenagers and young adults. Evidence from intravascular ultrasound. *Circulation.* 2001. 103:2705-2710.

Uslu S, Kebapçı N, Kara M, et al. Relationship between adipocytokines and cardiovascular risk factors in patients with type 2 diabetes mellitus. *Exp Ther Med.* 2012. 4:113-120.

Utzschneider KM, Carr DB, Tong J, et al. Resistin is not associated with insulin sensitivity or the metabolic syndrome in humans. *Diabetologia.* 2005. 48:2330-2333.

Van Gaal LF, Mertens IL, De Block CE. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature.* 2006. 444:875-880.

Van Hooff, Voorhorst FJ, Kaptein MBH, et al. Insulin, androgen, and gonadotropin concentrations, body mass index, and waist to hip ratio in the first years after menarche in girls with regular menstrual cycles, irregular menstrual cycles, or oligomenorrhea. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000. 85:1394-1400.

Van Pottelbergh I, Braeckman L, De Bacquer D, et al. Differential contribution of testosterone and estradiol in the determination of cholesterol and lipoprotein profile in healthy middle-aged men. *Atherosclerosis.* 2003. 166:95-102.

Veldhuis JD, Roemmich JN, Richmond EJ, et al. Endocrine control of body composition in infancy, childhood, and puberty. *Endocrin Rev.* 2005. 26:114-146.

Vozarova de Courten B, Degawa-Yamauchi M, Considine RV, et al. High serum resistin is associated with an increase in adiposity but not a worsening of insulin resistance in Pima Indians. *Diabetes*. 2004. 53:1279-1284.

Vilarrasa N, Vendrell J, Maravall J, et al. Distribution and determinants of adiponectin, resistin and ghrelin in a randomly selected healthy population. *Clin Endocrinol*. 2005. 63:329-335.

Wabitsch M, Hauner H, Heinze E, et al. Body fat distribution and steroid hormone concentrations in obese adolescent girls before and after weight reduction. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995. 80:3469-3475.

Wang H, Chu WS, Hemphill C, et al. Human resistin gene: molecular scanning and evaluation of association with insulin sensitivity and type 2 diabetes in Caucasians. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002. 87:2520-2524.

Weisberg SP, Mc Cann D, Desai M, et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest*. 2003. 112:1796-1808.

Wellen, KE, Hotamisligil GS. Obesity-induced inflammation changes in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003. 112:1785-1788.

Wen Y, Lu P, Dai L. Association between resistin gene 2420 C/G polymorphism and the risk of type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis. *Acta Diabetol*. 2013. 50:267-272.

Whitaker RC, Wright JA, Pepe MS, et al. Predicting obesity in young adulthood from childhood and parental obesity. *N Engl J Med*. 1997. 337:869-873.

Williams DP, Going SB, Lohman TG, et al. Body fatness and risk for elevated blood-pressure, total cholesterol and serum-lipoprotein ratios in children and adolescents. *Am J Public Health*. 1992. 82:358-363.

Wisse, BE. The inflammatory syndrome: the role of adipose tissue cytokines in metabolic disorders linked to obesity. *J Am Soc Nephrol*. 2004.15:2792-2800.

Won JC, Park CY, Lee WY, et al. Association of plasma levels of resistin with subcutaneous fat mass and markers of inflammation but not with metabolic determinants or insulin resistance. *J Korean Med Sci*. 2009. 24:695-700.

Xu L, Li M, Yin J, et al. Change of body composition and adipokines and their relationship with insulin resistance across pubertal development in obese and nonobese chinese children: The BCAMS Study. *Int J Endocrinol*. 2012. 2012:389108.

Yannakoulia M, Yiannakouris N, Blüher S, et al. Body fat mass and macronutrient intake in relation to circulating soluble leptin receptor, free leptin index, adiponectin,

and resistin concentrations in healthy humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003. 88:1730-1736.

Youn BS, Yu KY, Park HJ, et al. Plasma resistin concentrations measured by enzyme-linked immunosorbent assay using a newly developed monoclonal antibody are elevated in individuals with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004. 89:150-156.

Yura S, Sagawa N, Itoh H, et al. Resistin is expressed in the human placenta. *J Endocrinol Metab.* 2003. 3:1394-1397.

Zhang YY, Proenca R, Maffei M, et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homolog. *Nature.* 1994. 372:425-432.

Zheng H, Li Y, Dai W, et al. Role of endogenous estrogen on the incidence of coronary heart disease in men. *Angiology.* 2012. 63:591-596.

Zmuda JM, Cauley JA, Kriska A, et al. Longitudinal relation between endogenous testosterone and cardiovascular disease risk factors in middle-aged men. A 13 year follow-up of former Multiple Risk Factor Intervention Trial participants. *Am J Epidemiol.* 1997. 146:609-617.

Zou CC, Liang L, Hong F. Relationship between insulin resistance and serum levels of adiponectin and resistin with childhood obesity. *Indian Pediatr.* 2007. 44:275-279.

ANEXO I

PUBLICACIONES:

Artículos derivados de esta tesis:

Lorena Ortega, Pía Riestra, Pilar Navarro, Teresa Gavela-Pérez, Leandro Soriano-Guillén, Carmen Garcés. **Resistin levels are related to fat mass, but not to body mass index in children.** *Peptides*. 2013. 49:49-52.

Lorena Ortega, Pilar Navarro, Pía Riestra, Gavela-Pérez Teresa, Leandro Soriano-Guillén, Carmen Garcés. **Association of resistin polymorphisms with resistin levels and lipid profile in children.** En revision: *Molecular Biology Reports*. 2013.

Comunicaciones presentadas en congresos:

Resistin levels are related to fat mass, but not to body mass (IV International Congress on Abdominal Obesity, Seoul, Korea. Septiembre 2013). Lorena Ortega, Pía Riestra, Pilar Navarro, Tera Gavela-Pérez, Leandro Soriano-Guillén, Carmen Garcés. Lipid Research Laboratory, IIS-Fundación Jiménez Díaz, Madrid, España.

Otros trabajos publicados durante el desarrollo de esta tesis:

García-Anguita A, **Ortega L**, Garcés C. **Relationship between polymorphisms in the SULT2A1 gene and dehydroepiandrosterone sulfate levels in children.** *Experimental Biology and Medicine*. 2012. 238:163-166.

García-Anguita A, **Ortega L**, Garcés C. **Dehydroepiandrosterone-sulphate is related to free fatty acid levels in 12-to-16-year-old children.** *Hormone and Metabolic Research*, 45: 1-3. 2012.

Riestra P, García-Anguita A, **Ortega L**, Garcés C. **Relationship of adiponectin with sex hormone levels in adolescents.** *Hormone Research in Pediatrics*. 2012. 79:83-87.

S. del Villar-Rubín, R. Escorihuela, A. García-Anguita, **L. Ortega**, C. Garcés. **Valoración de la evolución temporal del sobrepeso desde la edad prepuberal a la adolescencia.** *An Pediatr (Barc)*.2012. 78:389-392.

Lorena Ortega, Alicia Garcia-Anguita, Pía Riestra, Leandro Soriano-Guillén, Henar Ortega, Miguel A. Lasunción, Manuel de Oya, Carmen Garcés. **Plasma non-**

esterified fatty acid levels in children and its relationship with sex steroids. En
revisión: *Steroids*. 2013.