

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**INFLUENCIA DE UN PROGRAMA DE SALUD EN LOS PARÁMETROS  
METABÓLICOS RELACIONADOS A CALIDAD DE SUEÑO EN  
ADOLESCENTES CON OBESIDAD Y SU ASOCIACIÓN GENÉTICA**

**POR**

**BRENDA JUANITA PEÑA CARRILLO**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN  
EN INMUNOBIOLOGÍA**

**JUNIO, 2017**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO**



**TESIS**

**INFLUENCIA DE UN PROGRAMA DE SALUD EN LOS PARÁMETROS  
METABÓLICOS RELACIONADOS A CALIDAD DE SUEÑO EN  
ADOLESCENTES CON OBESIDAD Y SU ASOCIACIÓN GENÉTICA**

**POR**

**BRENDA JUANITA PEÑA CARRILLO**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN  
EN INMUNOBIOLOGÍA**

**JUNIO, 2017**

INFLUENCIA DE UN PROGRAMA DE SALUD EN LOS PARÁMETROS  
METABÓLICOS RELACIONADOS A CALIDAD DE SUEÑO  
EN ADOLESCENTES CON OBESIDAD  
Y SU ASOCIACIÓN GENÉTICA

Comité de Tesis

---

Dr. José Alberto Valadez Lira  
Presidente

---

Dra. Itza Eloisa Luna Cruz  
Secretario

---

Dra. Cristina Rodríguez Padilla  
Vocal 1

---

Dra. Diana Elia Caballero Hernández  
Vocal 2

---

Dr. Juan Manuel Alcocer González  
Vocal 3

INFLUENCIA DE UN PROGRAMA DE SALUD EN LOS PARÁMETROS  
METABÓLICOS RELACIONADOS A CALIDAD DE SUEÑO  
EN ADOLESCENTES CON OBESIDAD  
Y SU ASOCIACIÓN GENÉTICA

Dirección de Tesis

---

Dr. José Alberto Valadez Lira

Director

---

Dr. Oswaldo Ceballos Gurriola

Asesor Externo

## **AGRADECIMIENTO A LA INSTITUCIÓN**

Este trabajo de investigación se llevó a cabo gracias al apoyo económico y de infraestructura del laboratorio de Inmunología y Virología.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Alberto Valadez por su apoyo y confianza en este proyecto de tesis y en mi estadía en el laboratorio. A mi comité de tesis por su tiempo y sugerencias para la mejora de este trabajo. Al Dr. Oswaldo Ceballos por su gran disponibilidad en lo necesario para realizar esta investigación.

Agradezco a la secundaria 24 Guillermo Prieto por darnos la oportunidad de trabajar con sus alumnos, buscando la mejora de la salud de los adolescentes. A todos los estudiantes y padres de familia que participaron en este proyecto. Gracias a mis compañeros Raúl y Marco por su apoyo en la implementación del programa de salud.

A mis compañeros del laboratorio L-2 por el apoyo y consejos desde el momento en el que ingresé.

A mis amigos y nuevos amigos que conocí en todo este transcurso de tiempo, con los que siempre conté cuando ya no sabía qué camino seguir, muchas gracias a Zyanya y Caro por sus ánimos.

Gracias a quienes siempre me animaron cuando más lo necesitaba, siempre echándome porras aunque me dijeran que no sabían ni de lo que hablaba, gracias por tu tiempo y tus palabras Lesly.

Gracias José Luis Arriaga por encaminarme en el deporte, que hasta ahora, se ha convertido en uno de mis más grandes placeres y desestrés durante este trabajo, por tu gran apoyo y paciencia en cualquier situación.

En general a todo aquel que me apoyó y motivó a seguir adelante en los momentos de estrés y desesperación.

Gracias a la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con registro de CVU: 516989.

El final y mi más grande agradecimiento es a mi familia que siempre me animó y motivo a seguir adelante, gracias Mamá, Papá, Kenzy y Dexmont.

## DEDICATORIA

Dedico este libro a las personas que más han influido en mi vida,  
dándome los mejores consejos, guiándome en cada paso y situación,  
y ayudándome a ser la persona que hasta ahora soy:

**Mi familia**

Brenda J. Peña Carrillo

# ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS .....	ii
DEDICATORIA .....	iii
ÍNDICE DE TABLAS .....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS .....	x
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1. Obesidad como enfermedad crónica .....	3
2.2. Epidemiología de la obesidad en México .....	4
2.3. Estrategias para la prevención y control de la obesidad .....	4
2.4. Impacto de la falta de sueño en el desarrollo de obesidad .....	7
2.5. Pérdida de sueño, metabolismo y sistema inmune.....	8
2.5.1 Cortisol.....	9
2.5.2 BDNF .....	9
2.5.3 TNF- $\alpha$ .....	10
2.5.1 VEGF .....	11
2.5.2 CRP .....	11
2.6 Polimorfismos genéticos .....	13
2.7 Polimorfismos genéticos involucrados en el ritmo circadiano .....	13
2.7.1 Polimorfismo en el gen <i>CLOCK</i> .....	15
2.7.2 Polimorfismo en los genes <i>PER2</i> y <i>PER3</i> .....	16
2.7.3 Polimorfismo en el gen <i>BDNF</i> .....	17

3.	JUSTIFICACIÓN .....	19
4.	HIPOTESIS.....	20
5.	OBJETIVO DEL TRABAJO.....	21
5.1.	Objetivo General .....	21
6.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	22
6.1.	Estrategia general .....	22
6.2.	Población participante.....	22
6.2.1.	Criterios de Inclusión .....	23
6.2.2.	Criterios de Exclusión.....	23
6.3.	Programa de Salud: .....	24
6.4.	Obtención de muestras para genotipificación .....	25
6.5.	Obtención de muestras de saliva y suero para análisis metabólicos .....	25
6.6.	Variables sobre composición corporal.....	25
6.6.1.	Peso corporal.....	26
6.6.2.	Estatura.....	26
6.7.	Análisis de variaciones en parámetros involucrados en la calidad de sueño ...	26
6.8.	Análisis de variaciones en indicadores metabólicos e inmunológicos involucrados en el sueño .....	27
6.8.1.	Cortisol.....	27
6.8.2.	BDNF .....	27
6.8.3.	TNF- $\alpha$ y VEGF .....	28
6.8.4.	CRP .....	28
6.9.	Extracción de ADN genómico para genotipificación .....	28
6.9.1.	Calidad del ADN genómico .....	29
6.10.	Genotipificación mediante diferentes técnicas de PCR .....	29

6.10.1.	Genotipificación mediante PCR-RFLP.....	29
6.10.2.	Genotipificación mediante PCR punto final .....	31
6.10.3.	Genotipificación mediante ARMS-PCR.....	31
6.10.4.	Electroforesis en gel de Agarosa.....	32
6.11.	Análisis estadístico.....	32
7.	RESULTADOS.....	34
7.1.	Agrupación de la población participante.....	34
7.2.	VARIABLES EN RESPUESTA AL PROGRAMA DE SALUD .....	34
7.2.1.	Composición corporal .....	36
7.2.2.	Parámetros involucrados en el sueño .....	37
7.2.3.	Indicadores metabólicos e inmunológicos involucrados en el sueño.....	39
7.3.	Genotipificación.....	41
7.3.1.	Genotipificación del gen <i>CLOCK</i> .....	41
7.3.2.	Genotipificación del gen <i>PER2</i> .....	42
7.3.3.	Genotipificación del gen <i>PER3</i> .....	43
7.3.4.	Genotipificación del gen <i>BDNF</i> .....	44
7.3.5.	Distribución de genotipos en la población .....	44
7.4.	VARIABLES EN RESPUESTA AL PROGRAMA DE SALUD AGRUPADAS POR GENOTIPO.....	48
7.4.1.	<i>CLOCK</i> T/C.....	48
7.4.2.	<i>PER2</i> C/G.....	49
7.4.3.	<i>PER2</i> G/A .....	51
7.4.4.	<i>PER3</i> 4/5 .....	52
7.4.5.	<i>BDNF</i> G/A.....	54
7.5.	VARIABLES EN RESPUESTA AL PROGRAMA DE SALUD Y SU ASOCIACIÓN CON EL GENOTIPO	55
7.6.	Asociación haplotípica .....	58

8. DISCUSIÓN .....	59
9. CONCLUSIONES .....	68
10. PERSPECTIVAS .....	69
11. BIBLIOGRAFÍA .....	74
12. RESUMEN BIBLIOGRÁFICO.....	82

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Variables involucradas en la calidad de sueño.....	26
Tabla 2. Indicadores involucrados en el sueño en respuesta a un programa de salud. ....	36
Tabla 3. Equilibrio Hardy-Weinberg .....	44
Tabla 4. Frecuencias genotípicas en la población de estudio.....	47
Tabla 5. Frecuencias alélicas en la población de estudio.....	48
Tabla 6. Análisis de covarianza ANCOVA .....	56
Tabla 7. Prueba de Epistasia.....	58

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Obstáculos en el reloj circadiano.....	12
Figura 2. Mecanismo molecular del reloj circadiano.....	14
Figura 3. Estrategia general.....	22
Figura 4. Población participante en el estudio. ....	24
Figura 5. Población final de estudio.....	34
Figura 6. Influencia de programa de salud en el IMC (kg/m <sup>2</sup> )..	37
Figura 7. Influencia de programa de salud en el TST (h). ....	38
Figura 8. Influencia de programa de salud en el WASO (min). ....	39
Figura 9. Influencia de programa de salud en los niveles de BDNF (pg/ml).....	40
Figura 10. Influencia de programa de salud en los niveles de TNF- $\alpha$ (pg/ml). ....	41
Figura 11. Gel muestra para el polimorfismo rs1801260. ....	42
Figura 12. Gel muestra para el polimorfismo rs2304672. ....	43
Figura 13. Gel muestra para el polimorfismo rs934945. ....	43
Figura 14. Gel muestra para el polimorfismo rs57875989. ....	43
Figura 15. Gel muestra para el polimorfismo rs6265. ....	44
Figura 16. Frecuencia de genotipos en la población. ....	46
Figura 17. Agrupación de polimorfismos del gen <i>CLOCK</i> T/C. ....	49
Figura 18. Agrupación del polimorfismo del gen <i>PER2</i> C/G. ....	50
Figura 19. Agrupación del polimorfismo del gen <i>PER2</i> G/A.....	52
Figura 20. Agrupación del polimorfismo del gen <i>PER3</i> 4/5.....	53
Figura 21. Agrupación del polimorfismo del gen <i>BDNF</i> G/A.....	55
Figura 22. IMC (kg/m <sup>2</sup> ) del grupo de adolescentes con Obesidad y sin Obesidad.....	57
Figura 23. TNF- $\alpha$ (pg/ml) del grupo de adolescentes con Obesidad y sin Obesidad. ....	57

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

AF	Actividad física
BDNF	Factor neurotrófico derivado de cerebro
CLOCK	Gen “circadian locomotor output cycles kaput”
CRP	Proteína C reactiva
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
IMC	Índice de masa corporal
IMSS	Instituto Mexicano de Seguro Social
OMS	Organización Mundial de la Salud
PER2	Gen period2
PER3	Gen period3
SAS	Síndrome de apnea del Sueño
SCN	núcleo supraquiasmático
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
TST	Tiempo total de Sueño
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
WASO	Tiempo despierto después del inicio de sueño

## RESUMEN

México ocupa el primer lugar de obesidad infantil a nivel mundial, lo que ocasiona una alta incidencia de enfermedades crónico degenerativas, diabetes y otras morbilidades, las cuales son consecuencia del síndrome metabólico temprano progresivo. A nivel nacional y estatal existen diferentes campañas como: PASOS, SPA, Vibra Nuevo León, entre otras, que se aplican de manera general a la población basándose en intervenciones de actividad física, control nutricional y psicológico, sin embargo en algunas poblaciones específicas no se han observado resultados favorables debido al seguimiento y el apego al programa, recientemente se han realizado investigaciones en las que se asocia la calidad de sueño y los trastornos metabólicos de la obesidad, sumado a la influencia de factores genéticos que se han relacionado con el ciclo de sueño/vigilia. Motivo por el cual, se planteó el objetivo de este estudio, que consistió en evaluar parámetros antropométricos, fisiológicos, metabólicos e inmunológicos involucrados en calidad de sueño en respuesta a un programa de salud con intervención de actividad física y orientación nutricional en adolescentes con obesidad y su asociación con polimorfismos en los genes *CLOCK*, *PER2*, *PER3* y *BDNF*. La población analizada consistió en 61 adolescentes de ambos sexos de una escuela secundaria, agrupados de acuerdo a los IMC en adolescentes con obesidad e implementación de programa de salud, adolescentes con obesidad sin programa de salud y adolescentes sin obesidad; el seguimiento del programa de salud se realizó en colaboración con la Facultad de Organización Deportiva (FOD) y la Facultad de Salud Pública y Nutrición (FaSPyN); las valoraciones fisiológicas del sueño se realizaron mediante monitores de actigrafía determinando latencia por día, eficiencia del sueño, tiempo total de sueño y número de irrupciones de sueño. Respecto a los parámetros metabólicos e inmunológicos se evaluaron mediante kits comerciales para detección de cortisol, BDNF, TNF- $\alpha$ , VEGF y CRP y la caracterización genética se llevó a cabo mediante técnicas de PCR para los genes *CLOCK*, *PER2*, *PER3* y *BDNF*. Se analizó la eficacia de un programa de salud piloto enfocado a la población vulnerable con obesidad mediante indicadores antropométricos, fisiológicos, metabólicos e inmunológicos logrando determinar parámetros y perfiles inmunológico-moleculares encontrando diferencias entre los genotipos de las poblaciones y la respuesta a la intervención.

## ABSTRACT

Mexico is the world's leading childhood obesity, causing a high incidence of chronic degenerative diseases, diabetes and other morbidities, which are a consequence of the early progressive metabolic syndrome. At national and state level, there are different campaigns such as: PASOS, SPA, Vibra Nuevo León, among others, which are generally applied to the population based on physical activity interventions, nutritional and psychological control, but these have not had good results, research has recently been carried out in which a great impact of sleep quality on the development of this epidemic has been attributed to the influence of the genetic factors that have been observed related to the sleep/wake cycle. The purpose of this study was to evaluate the physical, metabolic and immunological parameters involved in sleep quality in response to a health program with intervention of physical activity and nutritional counseling in adolescents with obesity and its association with polymorphisms in the *CLOCK*, *PER2*, *PER3* and *BDNF* genes. The analyzed population consisted of 61 adolescents of both sexes of a secondary school, grouped according to the BMI in adolescents with obesity and health program implementation, adolescents with obesity without health program and adolescents without obesity; The health program was monitored in collaboration with the Faculty of Sports Organization (FOD) and the Faculty of Public Health and Nutrition (FaSPyN); Sleep assessments were performed by means of actigraphy determining latency per day, sleep efficiency, total sleep time, WASO and number of sleep awakenings; the metabolic and immunological parameters were evaluated by commercial kits for detection of cortisol, BDNF, TNF- $\alpha$ , VEGF and CRP and the genetic characterization was carried out by PCR techniques for *CLOCK*, *PER2*, *PER3* and *BDNF* genes. As results it was observed that the implemented health program did not have a significant impact on the metabolic and immunological parameters involved with sleep quality, however the significant changes in certain subjects grouped on the basis of the genotype tell us that the variability of the indices of response in health programs may be due to genetic factors influencing sleep quality

## 1. INTRODUCCIÓN

La obesidad se ha convertido en un problema grave y creciente de salud pública a nivel mundial, siendo México el primer lugar con obesidad infantil. Actualmente existen diversas formas de tratar de combatir esta epidemia pero no se han obtenido buenos resultados. La importancia de disminuir esta enfermedad en niños y adolescentes radica en que cuando la obesidad se presenta desde etapas tempranas puede prevalecer hasta la vida adulta. Por lo tanto, la obesidad en estas edades representa un factor de riesgo para un número creciente de enfermedades crónicas en la etapa adulta como diabetes, hipertensión y enfermedades cardiovasculares (OMS 2012).

La Secretaría de Salud establece dos principales factores de riesgo para desarrollar obesidad los cuales se dividen en conductuales y biológicos. Entre los primeros se incluyen de manera importante alteraciones en la conducta alimentaria como largos períodos de ayuno, horarios de comida no establecidos, dietas altas en calorías (lípidos y carbohidratos), y un bajo consumo de vegetales y fibra, aunado a esto, se menciona la falta de actividad física, la cual ha sido sustituida por mayor tiempo dedicado a ver televisión, videojuegos y al uso de la computadora. En el caso de los factores biológicos se han realizado investigaciones en las que se ha atribuido un gran impacto de la calidad y cantidad de sueño en el desarrollo de esta epidemia, sumado a la influencia de factores genéticos que se han observado relacionados con el ciclo de sueño/vigilia (Méndez *et al.*, 2002).

El sueño es esencial para el bienestar, tratándose de un complejo fenómeno biofisiológico y conductual, considerándose de suma importancia en este último el aumento de tiempo a la exposición de luz causado por la prolongación de las jornadas de trabajo o las nuevas oportunidades de esparcimiento con las que se cuentan en la actualidad como la luz eléctrica, la televisión y la computadora, provocando desregularizaciones internas en el reloj circadiano generando desordenes en la calidad y cantidad de sueño como el insomnio o diversos trastornos como el SAS, entre otros (Young *et al.*, 2002). En efecto, la disminución de la calidad y de las horas de sueño se ha observado que resulta en cambios en los niveles de diversas hormonas, metabolitos y

factores involucrados en el sistema inmune causando un desequilibrio en los organismos y por consiguiente una ganancia en peso, desencadenando la obesidad, tales es el caso de variaciones en los niveles de cortisol, BDNF, TNF- $\alpha$ , VEGF, CRP, entre otras (Van Cauter y Knutson 2008).

En conjunto con este factor que puede influir en la calidad y cantidad del sueño se ha considerado la genética de cada individuo. El control de la expresión de los ritmos circadianos se realiza a través de los denominados “genes reloj”, estos genes codifican una serie de proteínas que generan mecanismos de autorregulación mediante bucles de retroalimentación transcripcional positivos y negativos, cabe destacar que dentro de estos genes se han encontrado variaciones que hacen que los individuos presenten características diferentes de respuesta en los ciclos de sueño/vigilia, actividades cardiovasculares, sistema endocrino, temperatura corporal, actividad renal, metabolismo, etc. estas variaciones asociadas al reloj circadiano conocidas como SNP's se han demostrado que tienen un gran impacto en el desarrollo de obesidad como consecuencia de una mala calidad y cantidad de sueño (Reppert y Weaver 2002), encontrando que individuos que se caracterizan por presentar genotipos dominantes diurnos, vespertinos o con características de pérdida del sueño, según sea el caso, tienden a tener un mayor grado de obesidad y un mayor IMC que las personas que no presentan los genotipos de riesgo dominantes (McClung 2007).

La finalidad de esta investigación es evaluar parámetros antropométricos, fisiológicos, metabólicos e inmunológicos relacionados a calidad de sueño en respuesta a un programa de salud con intervención de actividad física y orientación nutricional en adolescentes con obesidad y su asociación con polimorfismos genéticos.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Obesidad como enfermedad crónica

La Organización Mundial de la Salud define la obesidad como una acumulación excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud indicándose con un índice de masa corporal igual o superior a  $30 \text{ kg/m}^2$ . Esta enfermedad se ha convertido en un problema de salud pública a nivel mundial, principalmente en los países industrializados, por lo que este padecimiento no solamente ha afectado a poblaciones adultas sino también a los niños y adolescentes. Estudios recientes revelan que la obesidad va en ascenso, registrando que más de la mitad de la población tiene sobrepeso y un 15% padece obesidad (Peña y Bacallao 2001).

Se ha estimado que más de 2.8 millones de personas mueren cada año en todo el mundo a causa del sobrepeso y la obesidad. Para el año 2008 se estimó que el 10% de los hombres y el 14% de mujeres en el mundo eran obesos, que afectaba a 500 millones de hombres y mujeres mayores de 20 años, y en todas las regiones de la OMS era más frecuente en las mujeres que en los hombres. De entre 1980 y 2014, la prevalencia mundial de esta enfermedad se ha más que doblado estimándose que para el año 2014 alrededor del 13% de la población adulta mundial (11% de los hombres y un 15% de las mujeres) era obesa. Así mismo, se ha mencionado que las mayores cifras de este padecimiento se registraron en la Región de América (sobrepeso: 62%; obesidad: 26% en ambos sexos) (Contreras y Santiago 2011). En Latinoamérica la obesidad abdominal se define con una circunferencia de cintura  $>90 \text{ cm}$  en los varones y  $>80 \text{ cm}$  en mujeres (Méndez *et al.*, 2002).

Las principales alteraciones metabólicas ocasionadas por la obesidad, como la dislipidemia, inflamación, hipertrigliceridemia, resistencia a la insulina, disfunción endotelial e hipertensión arterial, se han asociado con un aumento en el riesgo de muerte debido al impacto que tienen en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y diabetes. Esto, considerando el impacto que representan dichas enfermedades como una de las causas más frecuentes de morbilidad y mortalidad a nivel mundial (Mente *et al.*, 2010).

## **2.2. Epidemiología de la obesidad en México**

Actualmente, México ocupa el primer lugar mundial en obesidad infantil y ésta enfermedad ha ido creciendo de forma alarmante en los últimos años. De acuerdo con datos de la ENSANUT 2012, 35% de los adolescentes tienen sobrepeso u obesidad. En el ámbito nacional esto representa alrededor de 6 325 131 individuos entre 12 y 19 años de edad, indicando que 1 de cada 10 presentan obesidad. Actualmente se ha reportado que esta epidemia ha ido en aumento con incremento de prevalencia del 2006 al 2012 pasando de 10.9 a 12.1% (11.0%) en el sexo femenino, y de 13 a 14.5% (11.5%) en varones. Recientemente, el IMSS menciona que la prevención de la obesidad debe iniciarse con el adecuado seguimiento de la mujer en el embarazo y la lactancia y con una orientación a la familia sobre hábitos alimentarios saludables, destacando, que los niños que son obesos a la edad de 12 años, tienen una probabilidad del 75% de ser obesos en edad adulta (Gutiérrez *et al.*, 2012).

## **2.3. Estrategias para la prevención y control de la obesidad**

Diversos estudios han demostrado que la práctica regular de ejercicio es uno de los principales factores que ayudan a prevenir, controlar y disminuir los índices de obesidad en la población, por lo que, para dar respuesta a este importante reto de salud pública se han implementado diversas acciones a nivel nacional, entre las cuales se pueden mencionar (Secretaría de Salud 2014):

- El Acuerdo Nacional de Salud Alimentaria. Estrategia contra el sobrepeso y la obesidad (ANSA, 2010). El ANSA tiene como principal objetivo revertir la epidemia de enfermedades no transmisibles, derivadas del sobrepeso y la obesidad, con acciones dirigidas especialmente a los menores de edad.
- Acuerdo mediante el cual se establecen los lineamientos generales para el expendio o distribución de alimentos y bebidas en los establecimientos de consumo escolar de los planteles de educación básica (Agosto 2010). Este Acuerdo incluye un Anexo Único donde se describen las características nutrimentales del tipo de alimentos y bebidas que facilitan una alimentación correcta, incluye alimentos preparados y procesados, promoviendo el consumo de verduras, frutas y agua simple potable

- Ley de ayuda alimentaria para los trabajadores (Enero 2011). Creada con el objetivo de “promover y regular la instrumentación de esquemas de ayuda alimentaria en beneficio de los trabajadores, con el propósito de mejorar su estado nutricional, así como de prevenir las enfermedades vinculadas con una alimentación deficiente y proteger la salud en el ámbito ocupacional”
- Consejo Nacional para la Prevención y Control de las Enfermedades Crónicas no Transmisibles (CONACRO, 2010). El consejo tiene como objetivo coadyuvar a establecer mecanismos interinstitucionales de prevención y control.
- Reformas al Artículo 3° Constitucional, Quinto transitorio Febrero 2013). “Prohibir en todas las escuelas los alimentos que no favorezcan la salud de los educandos”
- Programas Integrados de Salud (PREVENIMSS)
- Programa PrevenISSSTE (Octubre 2010). Con el objetivo de lograr la regresión del sobrepeso y la obesidad.

Dentro de las acciones que ha implementado el gobierno del estado de Nuevo León se pueden destacar:

- Programa de Alimentación Saludable y Actividad Física para la Prevención de la Obesidad y el Sobrepeso (PASOS). Con los objetivos de:
  - Impulsar el compromiso colaborativo, con alianzas estratégicas y acciones innovadoras entre el sector gubernamental, salud, educativo, social, empresarial y legislativo, en el marco del programa estatal.
  - Integrar la participación gubernamental, social y comunitaria para crear sinergia en el desarrollo de programas focales dirigidos a grupos específicos.
  - Mejorar la oferta y el acceso de alimentos saludables, así como los hábitos de selección, preparación y consumo alimentario, para incidir en un estado de nutrición óptima de la población.
  - Lograr que en todo Nuevo León se cuente con espacios y entornos saludables que favorezcan la alimentación adecuada y la actividad física de la población.

- Contar con un marco jurídico que dé sustentabilidad y permanencia a los elementos del Acuerdo Estatal para la Alimentación Saludable y la Actividad Física.
  - Evaluar el impacto de las acciones estratégicas a partir de un diagnóstico situacional realizado en la Encuesta Estatal de Salud y Nutrición cada cinco años.
- Programa de Salud para Aprender (SPA). Con el propósito de promover la salud integral de los escolares de educación básica mediante acciones de prevención, detección temprana de enfermedades, solución de problemas de salud y promoción de hábitos saludables, conjunto de acciones que desarrolladas en forma articulada, se traducirán en mejores indicadores de salud y una mayor calidad de vida.
  - Programa Vibra Nuevo León. Con el objetivo de aumentar el nivel de actividad física moderada en la población en cerca de 20% en un periodo de 10 años (2% anualmente).

El tiempo y tipo de las intervenciones de actividad física son un factor importante a considerar al implementar programas de ejercicio en niños y adolescentes, esto, con la finalidad de que exista una persistencia y continuidad en la práctica del ejercicio. Se busca que la disciplina deportiva, transmita una amplia experiencia de juego y de movimientos, sirviendo como preámbulo para la introducción de juegos deportivos específicos y como una alternativa para incrementar la actividad física desde una edad temprana. Por lo que Kröger *et al.*, (2003) menciona que el programa “taller balón” creado en Alemania pudiera aplicarse en niños con obesidad para lograr desarrollar en ellos algunas destrezas y habilidades, apego a la actividad física, disminución de la frustración por la falta de agilidad en el juego y el deporte y finalmente observar cambios en el peso corporal. Este programa de actividad física se ha implementado en México y al mismo tiempo en 10 Universidades públicas que pertenecen a la Asociación Mexicana de Instituciones Superiores de Cultura Física AMISCF A.C desarrollando habilidades como botar, agarrar, tirar, parar, pasar o lanzar una pelota formando parte de la motricidad diaria, con un vínculo natural a nuestra vida cotidiana (Lomas 2011).

El principal objetivo de las estrategias actuales es el aumento de actividad física moderada o vigorosa y el seguimiento de una alimentación saludable considerando el consumo de frutas, verduras y la disminución de bebidas azucaradas, sin embargo, se han observado variaciones en los resultados de la pérdida del IMC de cada programa implementado debido a los tiempos de seguimiento, cantidad y duración de las sesiones de actividad física. Además de esto, se debe considerar que los patrones de alimentación, actividad física y el balance energético se ven influidos por factores ambientales, genéticos y epigenéticos que modifican los requerimientos de energía y algunos procesos metabólicos relacionados con la acumulación en la obesidad (Rivera 2012). Recientemente se ha propuesto la falta de sueño como un factor más que puede contribuir a la pérdida de homeostasis corporal y desencadenante de obesidad ya que se ha reportado que cambios en la duración del sueño influyen en el peso corporal observando que pacientes con obesidad presentan promedios de TST (Tiempo total de sueño) más bajo por día (Vorona *et al.*, 2005).

#### **2.4. Impacto de la falta de sueño en el desarrollo de obesidad**

La falta de sueño generalmente, en adultos, hace referencia al sueño con una duración promedio más corta que la media necesaria por noche de 7 a 8 horas, el principal síntoma causado por esta disminución es la somnolencia diurna excesiva (Colten *et al.*, 2006). Además de este padecimiento la falta de sueño se ha sugerido que puede tener efectos en los sistemas cardiovascular, endocrino, inmunológico y nervioso, incluyendo:

- Obesidad en niños y adultos
- Diabetes y tolerancia a la glucosa
- Enfermedades cardiovasculares e hipertensión
- Ansiedad
- Depresión
- Uso de Alcohol

En un estudio prospectivo con duración de 13 años en el cual se analizaron aproximadamente 500 adultos de los 27 a los 40 años se observó que las personas con menor duración del sueño (menos de 6 horas) presentaron 7.5 veces más probabilidades de tener un IMC más elevado, aún después de controlar variables externas como

antecedentes familiares, niveles de actividad física y variables demográficas (Hasler *et al.*, 2004). Así mismo, el análisis de los datos del “Nurses Health Study” de alrededor de 80 000 mujeres mostró una asociación entre la duración del sueño y el IMC, reportando el IMC medio más bajo entre las personas que informaron dormir de 7-8 horas por noche (Patel *et al.*, 2004). Un estudio realizado en el Reino Unido recolectó información sobre la duración del sueño en personas de 38 meses de nacidos y evaluó los índices de obesidad a los 7 años de edad, observando que un sueño de <10.5 h y 10.5-11.4 h se encontró asociado con un incremento en el riesgo de obesidad a la edad de 7 años en comparación con duraciones de sueño >12 h por noche (Reilly *et al.*, 2005). Posteriormente en un estudio longitudinal con niños de Estados Unidos se observó una corta duración del sueño a los 9 años asociada significativamente con el incremento del riesgo de obesidad a los 12 años después de considerar variables como el género, etnia, educación maternal y cambios en el IMC (Lumeng *et al.*, 2007). En otro estudio realizado de igual manera con población americana se empleó un registro de actigrafía de 24 h para medir el sueño en 383 adolescentes de 11-16 años, considerando la obesidad con un IMC arriba del percentil 95 por sexo y edad aunado a un porcentaje de grasa arriba de 25% para hombres y 30% para mujeres, se encontró que cada hora extra de sueño es asociada con una reducción del riesgo de obesidad en un 80%, después de ajustar variables como la edad, sexo, madures sexual y etnia (Gupta *et al.*, 2002). Se ha planteado que la reducción del sueño puede afectar el metabolismo mediante un desequilibrio en el balance energético resultando en una ganancia de peso mediante 3 diferentes vías: aumento del apetito, mayor tiempo para comer y/o una disminución del gasto energético (Van Cauter y Knutson 2008).

### **2.5. Pérdida de sueño, metabolismo y sistema inmune**

La disminución de las horas de sueño se ha observado que resulta en cambios en los niveles de diversas hormonas, metabolitos y factores involucrados en el sistema inmune causando un desequilibrio en los organismos y por consiguiente una ganancia en peso, desencadenando la obesidad (Van Cauter y Knutson 2008).

### **2.5.1 Cortisol**

El cortisol es considerado como excelente marcador del ritmo circadiano y el principal mediador de la respuesta neuroendocrina al estrés, es una hormona cuya secreción es máxima por la mañana, al momento de despertar indica al organismo el inicio de la actividad diaria disminuyendo el sueño, posteriormente, los niveles disminuyen progresivamente hasta alcanzar sus valores mínimos al principio de la noche, antes de dormir y aumentan constantemente durante el sueño tardío (Born *et al.*, 1997). Se ha reportado que personas con un alto número de despertares por la noche, un bajo rango de calidad de sueño y una falta de sueño reparador presentan niveles de cortisol bajos por la mañana y pacientes con insomnio presentan niveles de cortisol por la mañana significativamente menores en comparación con pacientes sanos (Backhaus *et al.*, 2004). En un estudio con una población de mujeres se observó que los niveles máximos de cortisol en la mañana, los niveles de cortisol en la tarde/noche y las tasas de disminución de cortisol desde la mañana hasta la noche se vieron afectados por una restricción aguda del sueño (Omisade *et al.*, 2010), datos que concuerdan con los resultados obtenidos anteriormente en una población de participantes hombres (Leproult y Copinschi 1997). Esto, ha indicado que el apetito y la ingesta de alimentos pueden ser estimulados por la pérdida de sueño durante la tarde/noche del día debido a un desequilibrio en los niveles de cortisol por la falta de sueño prolongado desencadenando obesidad (Spiegel *et al.*, 2004).

### **2.5.2 BDNF**

El Factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) pertenece a la familia de las neurotrofinas, proteínas que se encuentran abundantes en diversas regiones del cerebro implicadas en trastornos del estado de ánimo, mostrando una regulación dependiente de la actividad de expresión y secreción, sus funciones neurotróficas están conectadas a diversas funciones fisiológicas en el cerebro, particularmente relevantes en la neuroplasticidad, memoria, y regulación del sueño. Estudios recientes han demostrado que BDNF juega un papel importante en la homeostasis del sueño observándose una disminución de los niveles séricos de esta proteína cuando existe una disminución de las horas de sueño (Cirelli 2006). En otro estudio se ha investigado la correlación de los

niveles de BDNF con el insomnio encontrando que los participantes que tienen síntomas de insomnio de manera recurrente presentan niveles menores de BDNF comparados con los controles sin problemas de sueño. Así mismo se ha relacionado una buena calidad de sueño con niveles más altos de BDNF en suero (Giese et al., 2013). Adicional del impacto directo de esta proteína sobre los patrones del sueño se ha demostrado que se encuentra involucrada con estrés, ansiedad y depresión, observando que tanto el estrés agudo como el crónico provocan una regulación disminuida en la expresión del BDNF, así como también se ha observado una disrupción en los niveles de BDNF en pacientes con depresión y víctimas de suicidio (Giese et al., 2013).

### **2.5.3 TNF- $\alpha$**

El Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) es una citocina pro-inflamatoria que hasta ahora se ha sugerido no sólo es importante en la función inmune, sino que también sirve como un importante regulador en el sistema endocrino, el metabolismo, la coagulación, la función cerebral y el sueño (Bruunsgaard 2005). Estudios experimentales han demostrado que una falta de sueño puede afectar los niveles de citocinas que son importantes en la regulación de los procesos inflamatorios, encontrándose que la privación del sueño altera las respuestas inmunes e induce un aumento en los niveles de marcadores inflamatorios como TNF- $\alpha$ . (Shearer *et al.*, 2001). Cabe mencionar, se ha observado una discrepancia en los resultados sobre el aumento de los niveles de TNF- $\alpha$  en el sueño, reportándose en otro estudio que la pérdida leve de sueño (2 h por noche, durante siete noches en hombres y mujeres sanos), causa en los hombres elevaciones de TNF- $\alpha$  como consecuencia de la restricción del sueño, mientras que en las mujeres no se mostraron estos cambios (Chennaoui *et al.*, 2011). Aunado a esto, Shearer et al., en el 2001 no encontró ningún aumento en TNF- $\alpha$  en donde participaron hombres que tenían sueño restringido a 2 horas por día, durante 4 días. Así como tampoco se observó una elevación de TNF- $\alpha$  después de 2 noches de privación total de sueño en participantes hombres sanos (Ruiz *et al.*, 2010)

### **2.5.1 VEGF**

Un estado de hipoxia en tejidos de mamíferos aumenta la expresión de factores pro-angiogénicos como los niveles del Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Gozal *et al.*, 2002). VEGF es considerado esencial para la angiogénesis durante el desarrollo embrionario, la cicatrización de heridas y el crecimiento tumoral, su expresión es estimulada principalmente por hipoxia mediante el factor inducible por hipoxia (HIF), el cual, es también responsable de la inducción de una variedad de otros genes sensibles a hipoxia, como los que codifican para la eritropoyetina y las enzimas glicolíticas. Se ha encontrado que la expresión génica mediada por HIF puede tener lugar en pacientes con Apnea obstructiva el sueño (AOS) como resultado de la hipoxia nocturna repetitiva, observándose que pacientes con AOS presentan una elevación de los niveles en suero de VEGF (Schulz *et al.*, 2001). Datos que concuerdan con los encontrados posteriormente por Gozal *et al.*, 2002 en dónde se presentaron niveles elevados de VEGF en 68 adultos y 48 niños diagnosticados clínicamente con OSA. Cabe mencionar, que se ha sugerido que la angiogénesis juega un papel importante en la enfermedad de Obesidad asociándose con una expansión del lecho capilar en los depósitos de grasa, encontrando la elevación de niveles de factores secretados por el tejido adiposo como VEGF (Silha *et al.*, 2005).

### **2.5.2 CRP**

En el caso de la Proteína C-Reactiva (CRP) ésta es una proteína pentamérica sintetizada principalmente por los hepatocitos con una vida media de 15 a 19 h y es considerada como el principal marcador de “la respuesta de fase aguda” en respuesta a estímulos inflamatorios en humanos (Morley y Kushner 1982). Diversos estudios han observado una elevación de CRP en pacientes sanos con privación de sueño parcial (4.2 h de sueño por día, durante 10 días) y total (88 horas sin dormir) planteando la posibilidad de que la privación de sueño, no tratada, contribuye a un proceso inflamatorio (Meier-Ewert *et al.*, 2004). Se ha observado que la combinación de niveles reducidos de leptina (hormona de la saciedad) con un aumento en los niveles de CRP en sujetos con privación de sueño podría implicar un mayor impacto negativo en el balance energético que el de una reducción de leptina por si sola. En conjunto, estos estudios indican que la duración del

sueño puede desempeñar un papel importante en la regulación de los niveles del hambre y el apetito (Knutson *et al.*, 2007). Observando una elevación de CRP en personas que presentan Obesidad (Chen *et al.*, 2006; Meier-Ewert *et al.*, 2004).

En conjunto con los cambios hormonales y metabólicos causados por una pérdida de sueño la genética juega un papel muy importante, ya que se han encontrado variaciones en los denominados “genes reloj” que hacen que los individuos presenten características diferentes de respuesta en los ciclos de sueño/vigilia, estas variaciones conocidas como polimorfismos genéticos han demostrado que tienen un gran impacto en el desarrollo de obesidad como consecuencia de su influencia en la mala calidad y cantidad de sueño (Figura 1) (Reppert y Weaver 2002).



**Figura 1.** Obstáculos en el reloj circadiano. En animales de experimentación, estas alteraciones se deben a mutaciones; Sin embargo, en humanos, las mutaciones son raras y estas alteraciones son causadas por variantes genéticas. Por lo tanto, estas variantes genéticas pueden asociarse directamente con la obesidad mediante diferentes comportamientos. Además, estas variantes genéticas interactúan con diferentes comportamientos para influir en la obesidad y la pérdida de peso. Se pueden considerar varias soluciones: (a) cambiando nuestros comportamientos, estos cambios están directamente relacionados con una disminución en la obesidad y un incremento en la pérdida de peso, o (b) a través de la genética mediante cambios en nuestro comportamiento como el dormir bien que puede interactuar con los SNP para producir una disminución de la obesidad y pérdida de peso. Tomada y modificada de López-Minguez *et al.*, 2016.

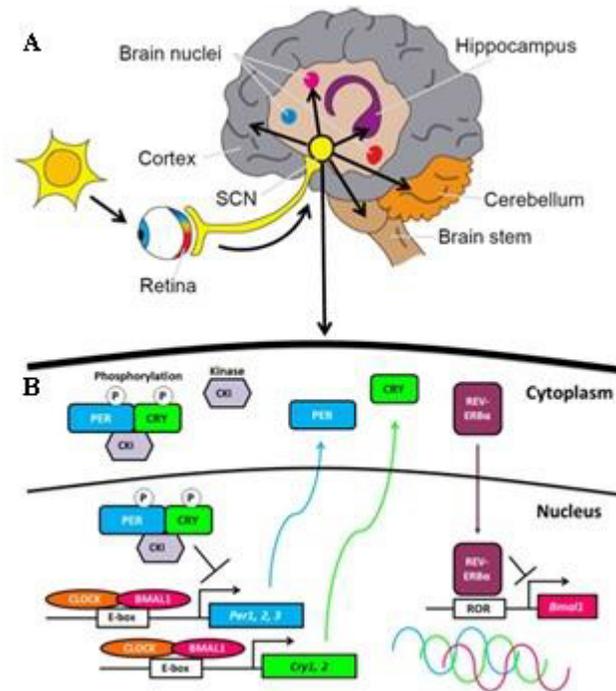
## 2.6 Polimorfismos genéticos

Debido a que el genoma humano no es una estructura pasiva, el ADN está expuesto a una gran cantidad de alteraciones que pueden dar como resultado la variación alélica entre individuos, diversidad entre la misma especie y la susceptibilidad o resistencia individual a distintas enfermedades o características. Estos cambios en el ADN dan lugar a lo que se conoce como polimorfismos genéticos. Un polimorfismo es considerado como tal cuando la frecuencia de sus alelos en la población es superior al 1%. Hay varios tipos de polimorfismos genéticos: Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), inserciones, deleciones, secuencias repetidas y/o re-arreglos cromosómicos, considerándose los SNP's como los más frecuentes. (Caratachea et al., 2007).

## 2.7 Polimorfismos genéticos involucrados en el ritmo circadiano

Los patrones y las alteraciones del sueño se han asociado con genes implicados en la regulación circadiana que conforman el denominado “Reloj circadiano” o “Reloj central”, éste se encuentra ubicado en el núcleo supraquiasmático (SCN) en el hipotálamo y consiste en un bucle de retroalimentación positivo y negativo que regula el ciclo de 24 h en ausencia de un estímulo ambiental (Ko y Takahashi 2006; Reppert y Weaver 2001). El núcleo de genes del reloj central incluye los genes *CLOCK*, *CRY1*, *PER1*, *PER2* y *PER3*, cuyos productos proteicos son componentes necesarios para la generación y regulación de los ritmos circadianos. Este bucle comienza durante el día en una dimerización entre la proteína *CLOCK* (“circadian locomotor output cycles kaput”) y la proteína *BMAL1* (“brain and muscle ARNT-like protein 1”). Este complejo se une a secuencias E-box (5'-CACGTG-3') o E'box (5'-CACGTT-3') en los promotores de muchos genes, incluyendo los genes *PER* y *CRY*, estas proteínas se traducen en el citoplasma y se fosforilan por CK1  $\epsilon$  y  $\delta$  y por GSK3 $\beta$ , esto lleva a cambios en su estabilidad, asociación y entrada a núcleo, al entrar en el núcleo reprimen la transcripción de sus propios genes (y otros) mediante la inhibición directa de *CLOCK/BMAL1*. Por lo tanto, el heterodímero *CLOCK/BMAL1* forma el componente positivo o transactivante, mientras que el complejo *PER/CRY* actúa como componente negativo o transinhibidor (Figura 2). Aunque el reloj circadiano central está ubicado en el SCN, estos y otros genes, se expresan por todo el cerebro y en otros órganos

funcionando como relojes periféricos que responden a estímulos luminosos (McClung 2007; Stuart 2011).



**Figura 2.** Mecanismo molecular del reloj circadiano. (A) Se localiza en el SCN del hipotálamo y genera ritmos circadianos internos en la expresión génica, secreción hormonal, metabólica y duración del sueño. La proyección directa desde la retina transfiere información sobre la luz/oscuridad al SCN, que sincroniza el ritmo circadiano incluyendo el ciclo de sueño/vigilia. (B) La transcripción y traducción del reloj circadiano se lleva a cabo en una retroalimentación positiva y negativa. Tomada y modificada de Hida *et al.*, 2012; Kondratova y Kondratov 2012.

En las últimas décadas ha ocurrido un progreso significativo en el estudio de las bases moleculares de los ritmos circadianos en mamíferos, reconociendo fenotipos circadianos humanos muy similares a los encontrados en animales. El primer reporte sobre la influencia de un gen del reloj circadiano en seres humanos fue reportado en 1998. En donde Katzenberg *et al.*, 1998 informaron que un polimorfismo en el gen *CLOCK* se asocia con alteraciones en el sueño y preferencia por actividades diurnas. Así mismo también se han reportado que otros genes del reloj central están asociados con fenotipos relacionados a la calidad y cantidad de sueño, se han encontrado variaciones en los genes *PER1*, *PER2*, *PER3* asociadas con trastornos del sueño y tendencias de preferencia en actividades diurnas o nocturnas, según sea el caso, sugiriendo una conexión con el funcionamiento normal del reloj circadiano (McClung 2007).

Así como se han reportado asociaciones con la calidad y cantidad de sueño directamente mediante genes en el reloj central también se han realizado investigaciones en las cuales se han planteado asociaciones de otros polimorfismos con alteraciones en el sueño, tal es el caso del gen *BDNF* en el cual una variación genética funcional de BDNF en los seres humanos afecta las oscilaciones lentas del cerebro durante el sueño (Bachmann *et al.*, 2012).

### **2.7.1 Polimorfismo en el gen *CLOCK***

El primer gen del reloj circadiano identificado en mamíferos fue el gen *CLOCK* localizado en el cromosoma 4, el cuál codifica a una proteína de conformación básica hélice-bucle-hélice que forma parte de la maquinaria molecular circadiana (Roenneberg y Merrow 2003). Una mutación en este gen ha sido asociada a tener un impacto en la regulación del sueño, encontrando que un cambio de base de una T por una C en la posición 3111 (rs1801260) presente en los portadores del alelo C incrementa el riesgo de padecer insomnio, disminución de la duración del sueño y el tener preferencia por realizar actividades nocturnas (Iwase *et al.*, 2002; Serretti *et al.*, 2003). Además de esto, se ha reportado que los portadores de este alelo C presentan alteraciones en los comportamientos alimenticios asociándose con una reducción en la efectividad de la pérdida de peso en un tratamiento dietético, inclusive se ha demostrado que el polimorfismo *CLOCK* 3111 T/C puede predecir el resultado en la pérdida de peso con estrategias dietéticas bajas en grasa en poblaciones sedentarias (Bandín *et al.*, 2013; Garaulet *et al.*, 2010a). Los mecanismos específicos que dirigen estos efectos aún no se encuentran bien establecidos, sin embargo, se ha descrito que estos podrían ser mediados por hormonas involucradas en el apetito (grelina y leptina) que también tienen un impacto en la regulación del sueño planteando que la duración del sueño corto lleva a un aumento de peso al aumentar el tiempo disponible para comer, así, como que el aumento de peso está relacionado con una disminución de gasto energético resultante de un aumento de fatiga por una falta de sueño (Garaulet *et al.*, 2011).

### 2.7.2 Polimorfismo en los genes *PER2* y *PER3*

Los genes *PER* pertenecen a la familia de genes *period* (Period circadian protein homolog 1, 2 y 3) que codifican para elementos relacionados con el reloj circadiano (Carpen *et al.*, 2005).

En el caso del gen *PER2*, éste se encuentra localizado en el cromosoma 2 y se ha observado que un polimorfismo C311G (rs2304672) en el exón 2 en la región 5' no traducida se encuentra asociado con trastornos en la duración del sueño siendo considerado como un gen candidato para detectar desordenes como ASPS (Síndrome de adelanto de la fase de sueño). Considerando que se encontró con mayor frecuencia el alelo 111G en una población de 484 voluntarios con preferencia por actividades diurnas en comparación con los voluntarios con preferencia por actividades vespertinas se ha sugerido que el ASPS o DSPS (Síndrome de retraso de la fase de sueño) pueden ser casos extremos de matutinidad o vespertinidad respectivamente (Carpen *et al.*, 2005). En conjunto con este polimorfismo se ha reportado otro SNP G3853A (rs934945) en el gen *PER2* que cambia una Gly/Glu en la posición 1244 también relacionado con preferencia por actividades diurnas y trastornos del sueño, observando que los portadores del alelo 3853G mostraron mayor preferencia por actividades diurnas que los participantes con el alelo 3853A, planteando la posibilidad de que disminuye la función o expresión de la proteína *PER2* y que este polimorfismo también podría indicarse como un posible marcador para ASPD (Lee *et al.*, 2011). Además de la relación de estos genotipos con el control del ritmo circadiano en el ciclo de sueño-vigilia se ha reportado que estos SNP's se encuentran involucrados en respuesta a tratamientos para combatir la obesidad, mostrando que los portadores del alelo G para el rs2304672 presentaron menor persistencia a una dieta, ingiriendo mayor número de bocadillos entre comidas, mayor estrés en el transcurso de la dieta, mayor ingesta de comida al estar aburridos y fueron quienes más se saltaron el desayuno en comparación con los portadores del genotipo CC; en el caso del SNP rs934945 también se encuentra asociado con medidas en la circunferencia de cintura y con síndrome metabólico, estos resultados indican que el gen *PER2* puede modular los comportamientos fenotípicos en la ingesta de comida,

afectando no solo a corto plazo la pérdida de peso sino también el mantenimiento de la pérdida de peso a largo plazo (Englund *et al.*, 2009; Garaulet *et al.*, 2010b).

La región codificante del gen *PER3* ubicado en el cromosoma 1 contiene un polimorfismo (rs 57875989) que consiste en un VNTR (número variable de repeticiones en tándem) en el exón 18, en esta región ocurre la inserción de 54 nucleótidos (3031-3084) o 18 aminoácidos ya sea 4 (*PER3*<sup>4</sup>) o 5 veces (*PER3*<sup>5</sup>) que se han visto asociados con trastornos del sueño, y preferencias circadianas diurnas o vespertinas. En el 2001 Ebisawa *et al* analizaron una población de 48 pacientes diagnosticados con DSPS (Síndrome de retraso de la fase de sueño) y 100 personas sanas, encontrando el alelo *PER3*<sup>4</sup> asociado con DSPS y con características en la población de vespertinidad y somnolencia, es decir, preferencia por actividades en la tarde. Posteriormente Archer *et al* y Pereira *et al* observaron el alelo *PER3*<sup>5</sup> asociado a características de matutinidad y preferencia por actividades a tempranas horas. Así mismo, basándose en electroencefalografías se ha sugerido que el polimorfismo VNTR contribuye a las diferencias en la estructura del sueño, de modo que la presión del sueño o somnolencia aumenta y disminuye más rápidamente en personas homocigotas para el alelo *PER3*<sup>5</sup> que para los portadores del alelo *PER3*<sup>4</sup> siendo éste considerado como un alelo de riesgo (Viola *et al.*, 2007).

### **2.7.3 Polimorfismo en el gen *BDNF***

El gen *BDNF* se encuentra localizado en el cromosoma 11p13 y está compuesto de 5 o más exones. Un polimorfismo en este gen (rs6265) se ha reportado que causa un cambio de una G por una A en el nucleótido 196 produciendo una sustitución de aminoácidos de una Val a Met en el codón 66 de la secuencia proBDNF. Estudios in vitro han sugerido que el alelo A (Met) afecta la secreción y el tráfico intracelular de los niveles de la proteína BDNF en suero causando desacoples en la calidad del sueño. Con la finalidad de investigar si el polimorfismo Val66Met afecta el EEG (Electroencefalograma) del sueño se compararon 11 portadores del alelo variante (genotipo val/met, 4 mujeres, 7 hombres) con 11 homocigotos val/val después de 40 horas de vigilia prolongada, encontrando que el sueño de ondas lentas, es decir, la fase del sueño en la que hay mayor relajación y un descanso más profundo fue más corta en los genotipos val/met que los

homocigotos val, indicando que el alelo A (Met) afecta los patrones regulares del sueño (Bachmann *et al.*, 2012).

Estos estudios anteriores muestran que los polimorfismos genéticos pueden estar relacionados con los patrones habituales de sueño teniendo un impacto en el desarrollo de obesidad, sin embargo, son pocos los estudios que analizan los efectos de la combinación de 2 o más genes, por lo que pudiera ser posible, que las combinaciones de polimorfismos en estos genes influyen en el fenotipo, y que un análisis combinado de los efectos de diferentes genes del reloj circadiano pudiera ser más preciso y más informativo que los análisis de un solo gen.

### 3. JUSTIFICACIÓN

La obesidad se ha convertido en un problema grave y creciente de salud pública a nivel mundial situando a México en el primer lugar con obesidad infantil. La obesidad presente desde etapas tempranas se sabe que puede prevalecer hasta la vida adulta por lo que se han implementado diversas formas de tratar de combatir esta epidemia a una edad temprana pero no se han obtenido buenos resultados; teniendo en cuenta esto, se ha propuesto la falta de sueño como un factor más que puede contribuir a la pérdida de homeostasis corporal y desencadenante de obesidad, ya que una disminución de las horas de sueño resulta en cambios fisiológicos y en los niveles de diversas hormonas, metabolitos y factores involucrados en el sistema inmune provocando una ganancia en el peso corporal. En conjunto con este factor se ha visto que la genética juega un papel muy importante, encontrando variaciones en los denominados “genes reloj” que hacen que los individuos presenten características diferentes de respuesta en los ciclos de sueño/vigilia, estas variaciones conocidas como polimorfismos genéticos han demostrado que tienen un gran impacto en el desarrollo de obesidad como consecuencia de su influencia en la mala calidad y cantidad de sueño.

En México existen pocos reportes del papel que tiene la genética en la calidad de sueño y sus repercusiones sobre la obesidad incluyendo análisis metabólicos, antropométricos y genéticos. Por lo que el aumento de este tipo de estudios multifactoriales que involucren la asociación de estos parámetros y la identificación de polimorfismos en la población mexicana es útil como estrategia de mejora, prevención y control de la calidad del sueño y el desarrollo de obesidad.

#### **4. HIPOTESIS**

Los polimorfismos en los genes *CLOCK*, *PER2*, *PER3* y *BDNF* se asocian con parámetros metabólicos e inmunológicos involucrados con la calidad del sueño e influyen en la respuesta a un programa de salud con intervención de actividad física y orientación nutricional en adolescentes con obesidad.

## 5. OBJETIVO DEL TRABAJO

### 5.1. Objetivo General

Evaluar parámetros antropométricos, fisiológicos, metabólicos e inmunológicos involucrados en calidad de sueño en respuesta a un programa de salud con intervención de actividad física y orientación nutricional en adolescentes con obesidad y su asociación con polimorfismos en los genes *CLOCK*, *PER2*, *PER3* y *BDNF*.

#### Objetivos específicos

- Caracterizar la población en grupos de adolescentes con Obesidad y adolescentes sin Obesidad mediante análisis antropométricos.
- Analizar variaciones en parámetros involucrados a calidad de sueño y obesidad en respuesta al programa de salud con actividad física y orientación nutricional (IMC, latencia por día, eficiencia del sueño, tiempo total de sueño, WASO y número de irrupciones de sueño).
- Analizar variaciones en indicadores metabólicos e inmunológicos en respuesta al programa de salud con actividad física y orientación nutricional (Cortisol, BDNF, TNF- $\alpha$ , VEGF y CRP).
- Determinar la asociación genotípica / haplotípica de los genes *CLOCK*, *PER2*, *PER3* y *BDNF* con las variaciones de los indicadores relacionados a calidad de sueño (IMC, latencia por día, eficiencia del sueño, tiempo total de sueño, WASO, número de irrupciones de sueño, Cortisol, BDNF, TNF- $\alpha$ , VEGF y CRP).

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1. Estrategia general



Figura 3. Estrategia general. Programa de salud aplicado a los grupos participantes. n=61

### 6.2. Población participante

Los adolescentes en este estudio pertenecieron a la escuela secundaria #24 “Guillermo Prieto” del Municipio de San Nicolás de los Garza, NL, de la cual, se contó con el apoyo y autorización de los directivos para participar en este proyecto (Anexo 1). La muestra fue seleccionada en base a la medición del percentil del IMC que determina a la población con obesidad, mediante las tablas del CDC (Centro para el control y prevención de enfermedades); de los seleccionados con obesidad se consideraron solo aquellos que cumplieron con los criterios de inclusión y fueron divididos en 3 grupos: Adolescentes con obesidad con implementación de un programa de salud,

adolescentes con obesidad sin programa de salud y adolescentes sin obesidad. (Figura 4).

### **6.2.1. Criterios de Inclusión**

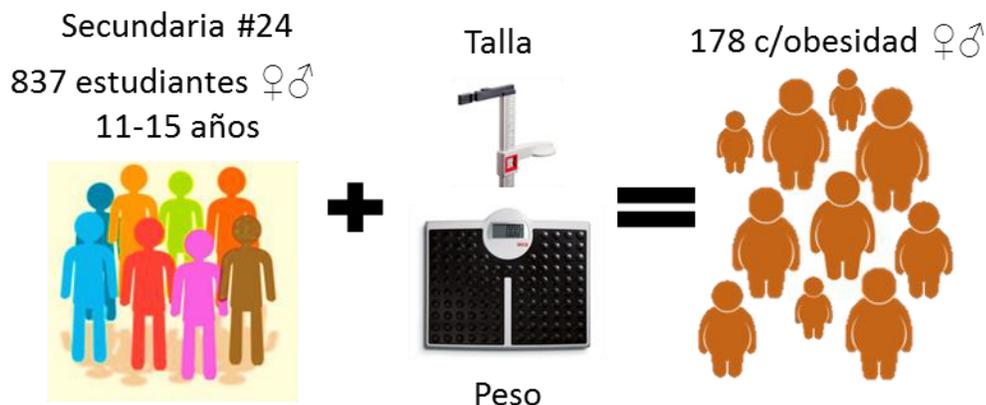
Los adolescentes que pudieron participar en el estudio fueron aquellos que:

- Presentaron un IMC superior al percentil 95 con base en las tablas del CDC
- Estuvieron inscritos en la institución en el periodo de la realización de este proyecto de investigación
- Edad entre 11 y 15 años al momento de llevarse a cabo el estudio
- Deseo propio por participar en el programa
- Cumplieron con una asistencia de al menos el 70% de las sesiones de Actividad Física (AF)
- Contaron con la autorización del padre o tutor para participar.

### **6.2.2. Criterios de Exclusión**

En este estudio se excluyeron los adolescentes que:

- Por prescripción médica no puedan participar
- Tuvieron una asistencia menor al 70% de las sesiones de AF
- No desearon estar en el programa
- No tuvieron el consentimiento del padre o tutor para participar



**Figura 4.** Población participante en el estudio. Se partió de las mediciones de peso y talla del total de alumnos de los 3 grados académicos que conforman la escuela Secundaria No. 24 con la finalidad de seleccionar a los adolescentes con obesidad.

Todos los participantes fueron informados de los procedimientos de investigación, requisitos, beneficios y riesgos antes de dar su consentimiento informado por escrito bajo los criterios de Helsinki (Anexo 2).

### **6.3. Programa de Salud: Intervención de actividad física y orientación nutricional**

El programa de salud aplicado al grupo experimental consistió en un periodo de 14 semanas con la colaboración de la Facultad de Organización Deportiva de la UANL y la Facultad de Salud Pública y Nutrición de la UANL.

Descripción del programa de intervención de actividad física “Taller balón” con orientación nutricional:

- Plan de ejercicio: duración de 14 semanas, 4 clases prácticas a la semana con 1 hora de duración; juegos y actividades utilizando pelotas de diferentes tipos y otros implementos deportivos.
- Orientación nutricional: 1 plática semanal de 1 hora enfocada a padres de familia y de ser requerido con la participación de los alumnos, basado en la Guía de Nutrición de la Familia publicado por la Organización de Agricultura y Alimentación (FAO).

El grupo control realizó una sesión de actividad física 1 vez a la semana, correspondiente al número de sesiones semanales normales en la Secundaria del estudio.

#### **6.4. Obtención de muestras para genotipificación**

Se emplearon hisopos de algodón estériles (Puritan, US) los cuales los participantes frotaron por la parte interna de su mejilla 30 s. de cada lado. Posteriormente se sumergió el hisopo en un tubo de 1.5 ml (Eppendorf, DE) que contenía 350  $\mu$ l de solución amortiguadora fosfato salina (PBS) presionando contra las paredes del tubo. Al finalizar los hisopos fueron desechados y las muestras fueron almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su manipulación.

#### **6.5. Obtención de muestras de saliva y suero para análisis metabólicos**

Se obtuvieron muestras de saliva y suero en ayuno previo de al menos 8 horas, antes y después del programa de salud; en el caso de las muestras de suero, estas fueron colectadas a partir de la punción con lancetas de 2 mm (BD, US) en el dedo meñique, anular o índice obteniendo un volumen mínimo de 400  $\mu$ l de sangre en los tubos microtainer (BD, US) para suero, posteriormente estos tubos se centrifugaron a 4000 rpm por 10 min para fraccionar el suero, este se colectó en tubos estériles (Eppendorf, DE) de 0.6  $\mu$ l y se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su manipulación. Para las muestras de saliva se les pidió a los adolescentes que mientras se realizaba la obtención de sangre llenaran un tubo de 1.5 ml estéril (Eppendorf, DE) con saliva, posteriormente estas muestras de saliva se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su manipulación.

Debido a la invasión en la obtención de muestras en los adolescentes el estudio fue revisado y aprobado por el Comité de Ética en Investigación en Ciencias de la Salud COBICIS del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud, UANL (Anexo 3).

#### **6.6. Variables sobre composición corporal**

Se consideraron las variables de peso y estatura para determinar el cálculo de los valores de IMC ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) y dividir la población en los grupos de estudio.

### 6.6.1. Peso corporal

Se empleó una báscula digital modelo Robusta 813 (SECA, MX) que maneja un nivel de precisión de 100 gramos, esta medición se realizó por la mañana en horas similares, tanto en la evaluación inicial como final, con un ayuno de al menos 8 horas y posterior de un vaciado urinario. Los adolescentes se colocaron sobre la báscula descalzos y portando ropa ligera preferentemente traje de baño.

### 6.6.2. Estatura

Se utilizó un tallimetro portátil (SECA, MX) modelo 213 que maneja un nivel de precisión de  $\pm 0.5$  mm. La medición se realizó en una superficie del piso firme y nivelada, en donde, los adolescentes se colocaron de espaldas a la escala de medición, parados, con los pies y talones juntos.

### 6.7. Análisis de variaciones en parámetros involucrados en la calidad de sueño

Se determinaron los valores de variables involucradas en el sueño como los minutos de latencia, porcentaje de eficiencia, el tiempo total de sueño, tiempo de WASO y número de irrupciones de sueño, para esto, se empleó el monitor GTX3 (ActiGraph, FL), con apoyo del software Actilife versión 6 (Tabla 1). Cada alumno trajo consigo el dispositivo durante el periodo de una semana en cada etapa de la evaluación (inicial o final), colocándose y sujetándose con una banda autoajustable en la muñeca del brazo dominante (izquierdo o derecho). Los participantes fueron instruidos de manera detallada de cómo utilizar el acelerómetro, así como los momentos para dejarlo de utilizar, como el caso de actividades que implican agua; bañarse, nadar o algunas actividades del hogar. Posterior a la evaluación inicial y final, fueron considerados como válidos solo aquellos datos de los días en los cuales los alumnos contaran con un monitoreo mínimo 600 minutos al día ya que una monitorización de 7 días durante 10 horas cada uno es considerada como alta fiabilidad.

**Tabla 1.** Variables involucradas en la calidad de sueño

Variable	Descripción
Minutos de Latencia	Tiempo que tarda una persona en dormir después de ingresar en la cama

Porcentaje de Eficiencia	Numero de minutos de sueño dividido entre el número de minutos que las personas están en cama
Tiempo total de sueño	Tiempo en cama menos los minutos de latencia y menos los minutos de WASO
Minutos de WASO	Tiempo despierto después del inicio de sueño, la suma de los tiempos de vigilia desde el inicio del sueño hasta el despertar final
Numero de Irrupciones de sueño	Numero de todos los episodios de despertares

## **6.8. Análisis de variaciones en indicadores metabólicos e inmunológicos involucrados en el sueño**

### **6.8.1. Cortisol**

Para la determinación de las concentraciones de cortisol se emplearon las muestras de saliva mediante ELISA, utilizando el Kit comercial Cortisol Saliva ELISA Assay Kit (Eagle Bioscience, NH) de acuerdo al protocolo del fabricante. La curva de calibración nos permitió conocer concentraciones entre 0.1 y 30 ng/ml.

El cortisol en la muestra compite contra el cortisol conjugado con HRP en el reactivo de trabajo por la unión con el número limitado de Ac recubiertos en la placa. Después de la incubación, el cortisol libre se elimina mediante un lavado, la enzima HRP reacciona al sustrato TMB desarrollando un color azul que cambia a amarillo cuando se agrega la solución de stop. La intensidad del color es inversamente proporcional a la concentración de cortisol en la muestra. La concentración de cortisol en la muestra se calcula a través de la curva de calibración.

### **6.8.2. BDNF**

Para la determinación de BDNF se emplearon las muestras de suero utilizando el kit comercial BDNF E<sub>max</sub> ImmunoAssay System (Promega, US) mediante un ELISA tipo Sandwich de acuerdo al protocolo del fabricante.

Después de un recubrimiento de una placa de 96 pocillos durante la noche, la proteína específica se detecta utilizando una forma de sándwich de anticuerpos. Se empleó un

anticuerpo secundario conjugado con HRP y un sustrato TMB para la detección cromogénica final del factor neurotrófico derivado de cerebro unido. Usando este sistema, el BDNF en suero se puede cuantificar en el intervalo de 7.8-500 pg/ml.

### **6.8.3. TNF- $\alpha$ y VEGF**

Las concentraciones de estos dos metabolitos se detectaron a partir de muestras de suero mediante la plataforma LUMINEX de Millipore Co empleando el kit Milliplex MAP Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel con el uso de las perlas magnéticas:

- Anti-TNF- $\alpha$
- Anti-VEGF

Después de que un analito en una muestra ensayo es capturado por las perlas magnéticas, se introduce un anticuerpo biotinilado para una detección específica. La mezcla de la reacción se incuba con un conjugado de Estreptavidina-PE para completar la reacción en cada superficie de las microesferas. Posteriormente cada microesfera es identificada y el resultado se cuantifica en base a señales fluorescentes del reportero, el analizador Luminex del equipo MAGPIX integra los datos para determinar las concentraciones de los analitos.

### **6.8.4. CRP**

Las concentraciones de CRP en las muestras de suero analizadas se detectaron mediante el método inmunoturbidimétrico para la determinación cuantitativa de proteína C reactiva (Wiener Lab, AR) de acuerdo al protocolo del fabricante.

La proteína C reactiva reacciona con el anticuerpo específico formando inmunocomplejos insolubles. La turbidez provocada por estos inmunocomplejos es proporcional a la concentración de CRP en la muestra y puede medirse espectrofotométricamente.

## **6.9. Extracción de ADN genómico para genotipificación**

La extracción de ADN genómico se realizó a partir de las células de epitelio bucal obtenidas con el hisopado, empleando el kit comercial AxyPrep Multisource Genomic

DNA miniprep (Axygen Bioscience, US) de acuerdo a la metodología del manual del fabricante.

### **6.9.1. Calidad del ADN genómico**

La calidad del ADN en todas las muestras se evaluó mediante la amplificación del gen constitutivo humano de gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa *G3PDH* por medio de la técnica de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) utilizando oligonucleótidos previamente diseñados: F 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' y R 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'. El volumen final de reacción consistió de 25 µl, conteniendo 12.5 µl de GoTaq Green Master Mix 2X (Promega, US), 1 µl de oligonucleótidos 10 nM (IDT, US), 2 µl de ADN con una concentración de 50-100 nM y agua libre de nucleasas a llegar al volumen final, seguido las condiciones de amplificación en el termociclador (LabNet, US) de 94 °C 2 min, 35 ciclos de 94 °C 1 min, 60 °C 1 min, 72 °C 1 min y una extensión final de 72 °C 5 min. La visualización del gen fue mediante el tamaño del fragmento observado de 556 pb en un gel de agarosa (Sigma-Aldrich, US) al 1%.

### **6.10. Genotipificación mediante diferentes técnicas de PCR**

Las muestras de ADN se amplificaron para cada uno de los genes a analizar, considerando un control positivo y un control negativo para cada reacción con la finalidad de descartar contaminación en las muestras.

#### **6.10.1. Genotipificación mediante PCR-RFLP**

Para determinar el genotipo en el gen *CLOCK* T111C se utilizó la técnica de RFLP en la cual se emplearon los oligonucleótidos F 5'-TCCAGCAGTTTCATGAGATGC-3' y R 5'-GAGGTCATTTTCATAGCTGAGC-3' previamente diseñados (Yamagushi *et al.*, 2015) en un volumen de reacción de 20 µl, conteniendo 10 µl de GoTaq Green Master Mix 2X (Promega, US), 1 µl de oligonucleótidos 10 nM (IDT, US), 2 µl de ADN con una concentración de 50-100 nM y agua libre de nucleasas a llegar al volumen final, seguido las condiciones de amplificación en el termociclador (LabNet, US) de 94 °C 5 min, 35 ciclos de 94 °C 30 s, 58 °C 35 s, 72 °C 30 s y una extensión final de 72 °C 5 min, obteniendo un amplicón con tamaño de 221 pb visualizado en un gel de agarosa

(Sigma-Aldrich, US) al 2%, posteriormente el producto amplificado fue digerido durante 4 horas a 37 °C por la enzima de restricción *BspI286I* (New England Biolabs, US), en una reacción con un volumen final de 20 µl conteniendo 2 µl del Buffet T 10X, 10 µl de producto amplificado, 0.3 µl de enzima *BspI286I* y 7.7 µl de agua libre de nucleasas, la inactivación de la enzima fue a una temperatura de 65 °C durante 15 min. El corte obtenido por la digestión enzimática fue visualizado en un gel de agarosa (Sigma-Aldrich, US) al 2%.

En el caso del SNP C311G en el gen *PER2* se emplearon los oligonucleótidos F 5'-GTGCGTGTGCTTGTTAATGC-3' y R 5'-TCCTTGGTGGGGTTACTGG-3' en un volumen de reacción de 20 µl, conteniendo 10 µl de GoTaq Green Master Mix 2X (Promega, US), 0.8 µl de oligonucleótidos 10 nM (IDT, US), 2 µl de ADN con una concentración de 50-100 nM y agua libre de nucleasas a llegar al volumen final, seguido las condiciones de amplificación en el termociclador (LabNet, US) de 94 °C 5 min, 35 ciclos de 94 °C 1 min, 53 °C 1 min, 72 °C 1 min y una extensión final de 72 °C 5 min obteniendo un amplicón con tamaño de 114 pb visualizado en un gel de agarosa al 2%, posteriormente el producto amplificado fue digerido durante 4 horas a 37 °C por la enzima de restricción *HpyCH4V* (New England Biolabs, US), en una reacción con un volumen final de 20 µl conteniendo 2 µl del Buffet T 10X, 15 µl de producto amplificado, 0.3 µl de enzima *HpyCH4V* y 2.7 µl de agua libre de nucleasas, la inactivación de la enzima fue a una temperatura de 65 °C durante 20 min. El corte obtenido por la digestión enzimática fue visualizado en un gel de agarosa (Sigma-Aldrich, US) al 3%.

Para el SNP G3853A en el gen *PER2* se utilizaron los oligonucleótidos F 5'-CTCAGCGAAGTGTCCGACACC-3' y R 5'-TCATCTCTTCCAAGCACCACC-3' previamente reportados (Lee *et al* 2011) en un volumen de reacción de 20 µl, conteniendo 4 µl de Taq&Go Master Mix 5X (MP Biomedicals, US), 1 µl de oligonucleótidos 10 nM (IDT, US), 2 µl de ADN con una concentración de 50-100 nM y agua libre de nucleasas a llegar al volumen final, seguido las condiciones de amplificación en el termociclador (LabNet, US) de 95 °C 5 min, 35 ciclos de 95 °C 30 s, 58 °C 35 s, 72 °C 30 s y una extensión final de 72 °C 5 min obteniendo un amplicón con

tamaño de 137 pb visualizado en un gel de agarosa al 2%, posteriormente el producto amplificado fue digerido durante 4 horas a 37 °C por la enzima de restricción *BamHI* (New England Biolabs, US), en una reacción con un volumen final de 20 µl conteniendo 10 µl de producto amplificado y 0.1 µl de enzima *BamHI*, la inactivación de la enzima fue a una temperatura de 65 °C durante 15 min. El corte obtenido por la digestión enzimática fue visualizado en un gel de agarosa (Sigma-Aldrich, US) al 3.5%.

### 6.10.2. Genotipificación mediante PCR punto final

Para la caracterización del gen *PER3* se emplearon los oligonucleótidos F 5'-CAAATTTTATGACTACCAGAATGGCTGAC-3' y R 5'-AACCTTGTA CTTCACATCAGTGCCTGG-3' en un volumen de reacción de 20 µl, conteniendo 4 µl de Taq&Go Master Mix 5X (MP Biomedicals, US) , 1 µl de oligonucleótidos 10 nM (IDT, US), 2 µl de ADN con una concentración de 50-100 nM y agua libre de nucleasas a llegar al volumen final, seguido las condiciones de amplificación en el termociclador (LabNet, US) de 95 °C 5 min, 40 ciclos de 95 °C 30 s, 58 °C 35 s, 72 °C 30 s y una extensión final de 72 °C 5 min obteniendo un amplicón con tamaño de 635 y 581 pb para cada genotipo, visualizado en un gel de agarosa (Sigma-Aldrich, US) al 2%.

### 6.10.3. Genotipificación mediante ARMS-PCR

Respecto al gen *BDNF* se empleó la técnica de tetra-primer en la cual se emplean 2 pares de oligonucleótidos para amplificar los alelos del polimorfismo. Esta técnica permite realizar el genotipo en una sola reacción de PCR mediante el uso de 4 oligonucleótidos ahorrando tiempo en las reacciones, los oligonucleótidos utilizados fueron F 5'- CCTACAGTTCCACCAGGTGAGAAGAGTG-3', R 5'-TCATGGACATGTTTGCAGCATCTAGGTA-3', F 5'-CTGGTCCTCATCCAACAGCTCTTCTATAAC-3' y R 5'-ATCATTGGCTGACTTTTCGAACCCA-3' en un volumen de reacción de 25 µl, conteniendo 12.5 µl de GoTaq Green Master Mix 2X (Promega, US) , 0.5 µl de oligonucleótidos 10 nM (IDT, US), 2 µl de ADN con una concentración de 50-100 nM y agua libre de nucleasas a llegar al volumen final, seguido las condiciones de

amplificación en el termociclador (LabNet, US) de 94 °C 2 min, 40 ciclos de 94 °C 1 min, 60 °C 1 min, 72 °C 1 min y una extensión final de 72 °C 5 min obteniendo un amplicón con tamaño de 401 pb visualizado en un gel de agarosa (Sigma-Aldrich, US) al 2%.

#### **6.10.4. Electroforesis en gel de Agarosa**

El producto de PCR obtenido de cada muestra fue separado mediante la técnica de electroforesis en geles de agarosa (Sigma-Aldrich, US) al 3.5% para el polimorfismo rs934945, 3% para el polimorfismo rs2304672 y al 2% para los demás genotipos, empleando una fuente de poder (Labnet, US) la cual fue ajustada a 100 V y 300 mA por 45 min. Para determinar el tamaño de los productos de PCR y corroborar que el fragmento corresponde al amplicón y el genotipo deseado se utilizaron marcadores de peso molecular (Axygen, US) de 25, 50 y 100 pb.

Los geles de agarosa (Sigma-Aldrich, US) fueron teñidos con bromuro de etidio al 0.1% y visualizados mediante luz UV en un transiluminador (UVP, US).

#### **6.11. Análisis estadístico**

Los resultados de la caracterización genotípica fueron analizados mediante la prueba  $X^2$  de Pearson, mediante la cual se determinará si las frecuencias observadas son diferentes de las esperadas, las frecuencias esperadas serán obtenidas mediante el principio del equilibrio de Hardy-Weinberg, el cual describe el estado en el que las frecuencias genotípicas son constantes de generación en generación empleando la herramienta PLINK disponible para Windows v1.07.

Las diferencias entre grupos se analizaron mediante un análisis estadístico inferencial en el cual se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, comparando adolescentes con obesidad con implementación de un programa de salud, adolescentes con obesidad sin programa de salud y adolescentes sin obesidad. Así, mismo, también se realizaron comparaciones para conocer las diferencias entre las evaluaciones basales y finales del programa de salud por medio de la prueba de t de Student para los datos normales y la prueba de Wilcoxon cuando no se pudo comprobar normalidad. El valor de significancia fue considerado como  $p < 0.05$  para cada una de las pruebas estadísticas realizadas, los

análisis fueron evaluados mediante el software estadístico SPSS disponible para Windows v22.

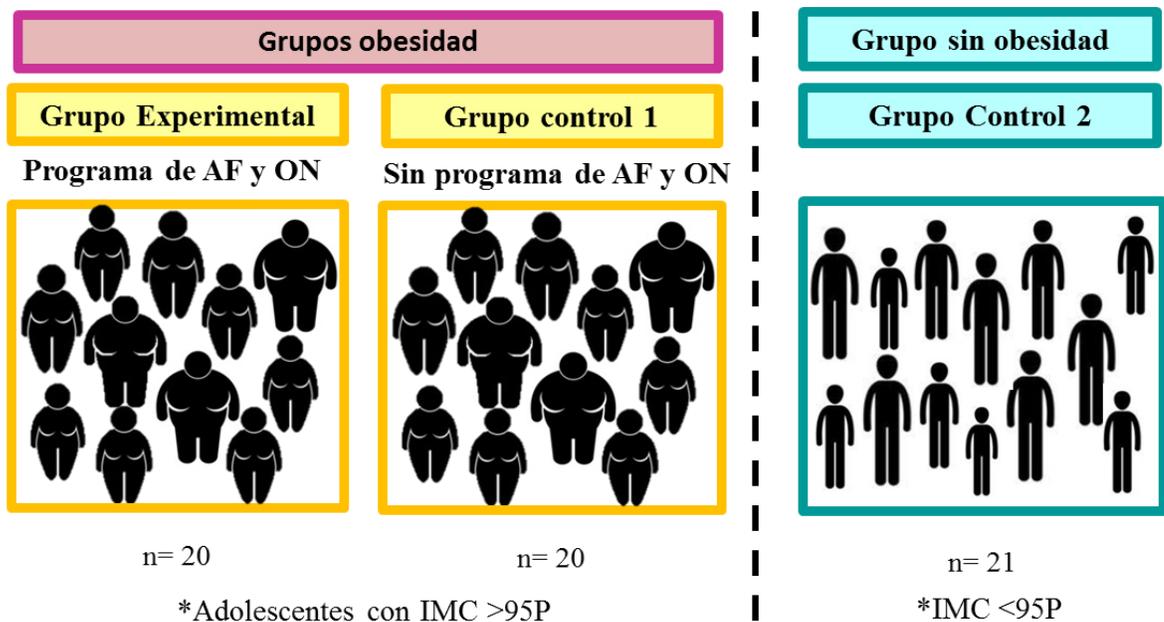
La influencia o efecto de los genotipos y el programa de salud sobre las variables analizadas se determinó mediante un análisis de covarianza ANCOVA utilizando el software estadístico R v3.3.1.

Las pruebas de epistasis y análisis de asociación de genotipos entre obesidad y sin obesidad se realizaron mediante la prueba de regresión logística o lineal y mediante el test de Wald para los grupos de obesidad y sin obesidad utilizando la herramienta PLINK disponible para Windows v1.07.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Agrupación de la población participante

La población final del estudio consistió en 61 adolescentes de ambos sexos, los cuales cumplieron con todos los criterios de inclusión establecidos. El grupo experimental de adolescentes con Obesidad y programa de salud y el grupo Obesidad sin programa de salud fueron los que resultaron con mayor variación en el número de adolescentes que cumplieron con todos los muestreos. En la figura 5 se observa el número final de los sujetos participantes.



**Figura 5.** Población final de estudio. Agrupación en base a las mediciones de IMC por medio de las tablas del centro de control y prevención de enfermedades CDC.

### 7.2. Variables en respuesta al Programa de Salud

Para cuantificar el nivel de variación en los parámetros evaluados en respuesta al programa de salud con intervención de actividad física y orientación nutricional se emplearon diferentes protocolos mencionadas anteriormente. En la tabla 2 se puede observar un panorama general de los cambios que se presentaron en los valores medios antes y después del programa de salud. De los valores medios que mostraron cambios significativos se encuentra el IMC en donde el grupo que no tiene obesidad presenta el valor medio más bajo en comparación con los sujetos con obesidad ( $22.21 \pm 4.34$

kg/m<sup>2</sup>). Se observó mayor incremento de TST (h) en el grupo experimental que corresponde al de obesidad con programa de salud después de finalizado el protocolo (9.16±3.11); mayor TST (h) en la evaluación final del grupo de obesidad sin programa de salud (7.57±1.58) y mayor tiempo de WASO (min) en el mismo grupo en las evaluaciones iniciales (63.71±15.75). Los niveles de BDNF presentaron cambios significativos antes y después del programa de salud, así como también, cambios significativos entre los grupos evaluados. TNF- $\alpha$  se encontró más elevado en la determinación inicial de los adolescentes con programa de salud (11.09±5.96). En la mayoría de los indicadores no se encontraron cambios significativos, sin embargo, considerando que los datos mostrados en la tabla 2 son valores medios, si se pudo observar que algunas más variables presentaron diferencias significativas con determinados adolescentes mostrando tener mayores incrementos o disminuciones de los factores evaluados en respuesta al programa de salud. Los niveles de CRP no pudieron ser evaluados estadísticamente ya que no se tuvo el mínimo número de muestras necesarias por cada grupo para los análisis, debido a que no fueron detectados en el procedimiento de la mayoría de las muestras analizadas.

**Tabla 2.** Indicadores involucrados en el sueño en respuesta a un programa de salud.

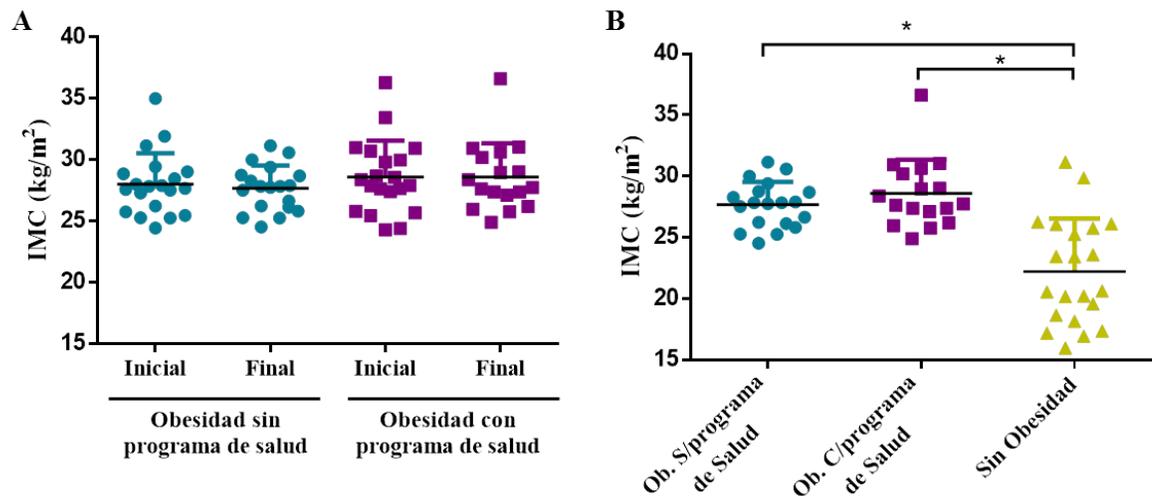
		GRUPO POBLACIONAL					
		OBESIDAD SIN PROGRAMA		OBESIDAD CON		SIN	
		DE SALUD		PROGRAMA DE SALUD		OBESIDAD	
		Inicial	Final	Inicial	Final		
Composición Corporal	IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	27.68 ± 1.97	28.56 ± 2.82	28.58 ± 2.78	27.63 ± 1.85	<b>22.21 ± 4.34*</b>	
	Latencia (min)	2.35 ± 0.89	2.21 ± 0.42	2.55 ± 1.11	2.13 ± 0.65	N/A	
Parámetros en el sueño	Eficiencia (%)	84.98 ± 3.95	87.67 ± 3.01	88.94 ± 3.28	88.33 ± 2.87*	N/A	
	TST (h)	6.53 ± 0.87	7.03 ± 1.10	<b>9.16 ± 3.11*</b>	<b>7.57 ± 1.58*</b>	9.02 ± 1.29	
	WASO (min)	<b>63.71 ± 15.75*</b>	58.16 ± 1.15	58.50 ± 14.75	54.68 ± 15.26	N/A	
	No. de Irrupciones de Sueño por noche	18.10 ± 4.70	18.49 ± 3.13	17.82 ± 5.40	16.56 ± 3.89	21.52 ± 3.40	
	Cortisol (ng/ml)	1.46 ± 0.81	1.72 ± 1.20	1.68 ± 0.88	2.57 ± 1.95	2.71 ± 1.49	
Indicadores metabólicos e Inmunológicos	BDNF (pg/ml)	<b>876.1 ± 182*</b>	<b>893.9 ± 176.5*</b>	<b>569 ± 149.1*</b>	<b>704.6 ± 273.8*</b>	<b>918.6 ± 200.8*</b>	
	TNF- $\alpha$ (pg/ml)	11.87 ± 6.51	<b>11.09 ± 5.96*</b>	8.84 ± 4.05	10.89 ± 4.80	9.94 ± 4.33	
	VEGF (pg/ml)	239.1 ± 97.33	194.9 ± 65.61	178.2 ± 120.1	225.8 ± 98.38	178.1 ± 182.5	
	CRP (mg/l)	1.38 ± 3.97	0.91 ± 3.31	3.95 ± 7.98	1.20 ± 7.19	2.25 ± 5.97	

Valores medios ( $\pm$  Desviación estándar). Abreviaciones: IMC, Índice de masa corporal; WASO, despertares tras inicio del sueño; BDNF, Factor neurotrófico derivado de cerebro; TST, tiempo total de sueño (h); N/A, no analizado; -, valores no detectados. n = 61; n=11 en CRP. \*Significancia  $p < 0.05$ .

### 7.2.1. Composición corporal

Al comparar los índices de masa corporal obtenidos a partir de las mediciones de peso y talla se puede observar que no se presentaron diferencias significativas entre las evaluaciones antes y después, así como tampoco entre los grupos de Obesidad sin programa y con programa de Salud ( $p > 0.05$ ). En las evaluaciones finales de los 3 grupos poblacionales se encontró, como era de esperarse, que el grupo sin obesidad presentara los IMC más bajos con valores medios de 22.21 (kg/m<sup>2</sup>), datos que difieren

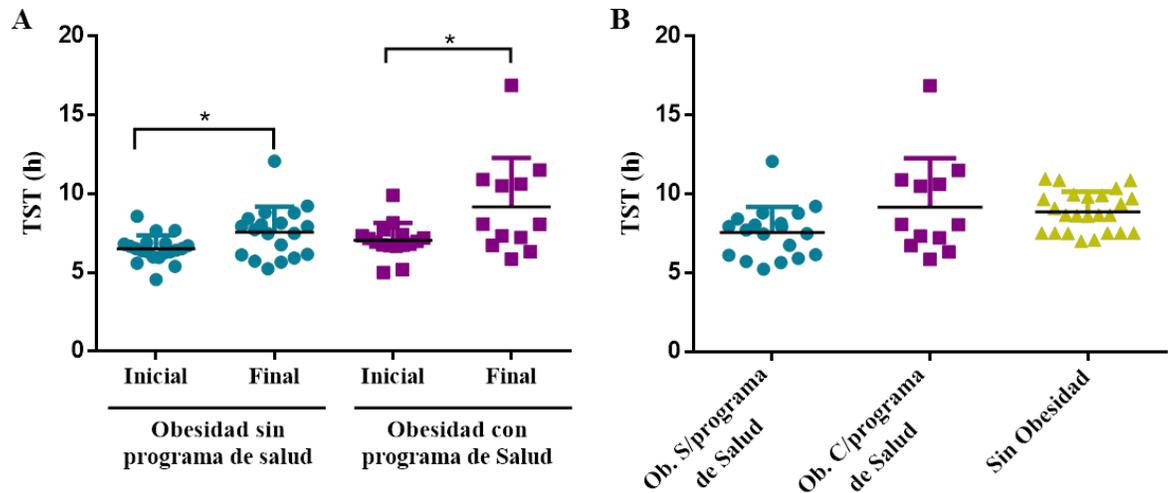
significativamente del grupo experimental y el grupo con obesidad control ( $p=0.005$ ) (Figura 6).



**Figura 6.** Influencia de programa de salud en el IMC ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ). A. Índice de masa corporal en adolescentes con obesidad de 11-15 años antes y después de la intervención de un programa de salud con duración de 14 semanas de actividad física y orientación nutricional. B. IMC después de la intervención de un programa de salud en adolescentes con obesidad y adolescentes sin obesidad. Datos obtenidos mediante Actigrafía. Los valores representan la media  $\pm$  DS de 20 individuos en el grupo con obesidad experimental y obesidad control y 21 individuos en el grupo sin obesidad. \* $p < 0.05$ .

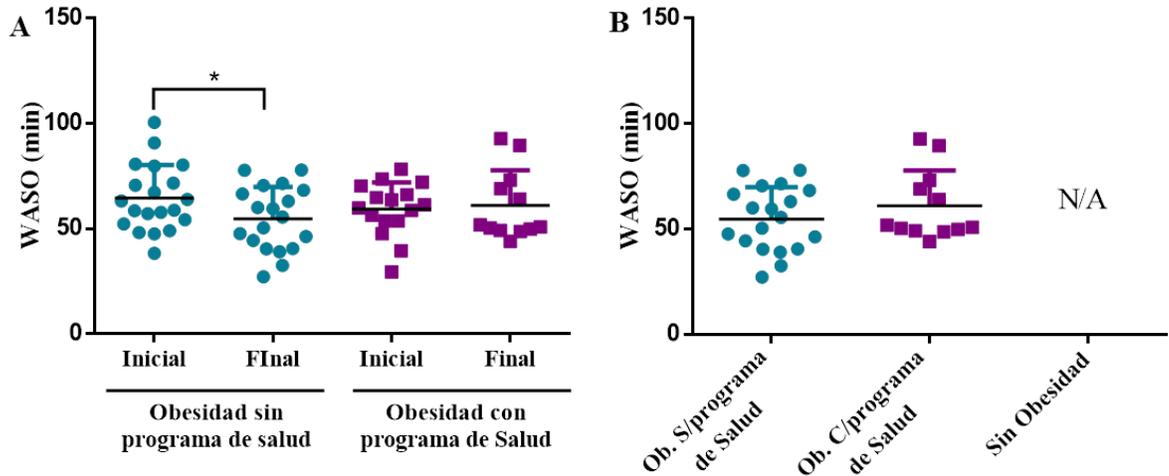
### 7.2.2. Parámetros involucrados en el sueño

En la Figura 7 se observa el tiempo total de sueño (TST) promedio por día de los adolescentes en respuesta a un programa de salud con duración de 14 semanas. En el grupo con implementación de programa de salud se muestra un aumento significativo ( $p=0.01$ ) de las horas de sueño de 6.53 a 7.57 horas después de finalizado el protocolo. En el grupo con obesidad sin programa se observó de igual manera un cambio significativo ( $p=0.01$ ) en el aumento promedio de horas por día que duermen los adolescentes de 7.03 a 9.16 h. La comparación de las tomas finales en la Figura 7 B de las 3 poblaciones, Obesidad control, Obesidad Experimental, y Sin obesidad no presentaron cambios significativos ( $p > 0.05$ ), teniendo horas promedio estadísticamente similares de 7.57, 9.16 y 9.02 respectivamente, sin embargo el grupo Obesidad experimental es el que presenta mayor TST (h) por día.



**Figura 7.** Influencia de programa de salud en el TST (h). A. Tiempo total de sueño en adolescentes con obesidad de 11-15 años antes y después de la intervención de un programa de salud con duración de 14 semanas de actividad física y orientación nutricional. B. Tiempo total de sueño después de la intervención de un programa de salud en adolescentes con obesidad y adolescentes sin obesidad. Datos obtenidos mediante Actigrafía. Los valores representan la media  $\pm$  DS de 20 individuos en el grupo con obesidad experimental y obesidad control y 21 individuos en el grupo sin obesidad. \* $p < 0.05$ .

Los valores de WASO que corresponden a al tiempo total de vigilia nocturna desde el inicio del sueño hasta el despertar final mostraron cambios significativos en el grupo con obesidad sin programa de salud, disminuyendo los minutos de 63.71 a 54.68 ( $p=0.02$ ). En el grupo Obesidad Experimental no se observaron cambios significativos con valores medios de 58.16 y 58.50 antes y después del protocolo, sin embargo, considerando a los adolescentes de manera individual algunos mostraron diferencias con mayor incremento o decremento de los minutos de WASO, como es el ejemplo del sujeto 35 que disminuyó el tiempo de 72.14 a 44 después de finalizado el programa de salud. Al comparar las tomas finales de los grupos no se observaron cambios significativos en el grupo experimental, es decir los adolescentes con obesidad y programa de salud y el grupo Obesidad Control, en el caso del grupo Control que consiste en los niños que no presentan obesidad no se obtuvieron los datos correspondientes por lo que no pudieron ser comparados (Figura 8).



**Figura 8.** Influencia de programa de salud en el WASO (min). A. Tiempo de WASO en adolescentes con obesidad de 11-15 años antes y después de la intervención de un programa de salud con duración de 14 semanas de actividad física y orientación nutricional. B. Tiempo de WASO después de la intervención de un programa de salud en adolescentes con obesidad y adolescentes sin obesidad. Datos obtenidos mediante Actigrafía. Los valores representan la media  $\pm$  DS de 20 individuos en el grupo con obesidad experimental y obesidad control y 21 individuos en el grupo sin obesidad. \* $p < 0.05$

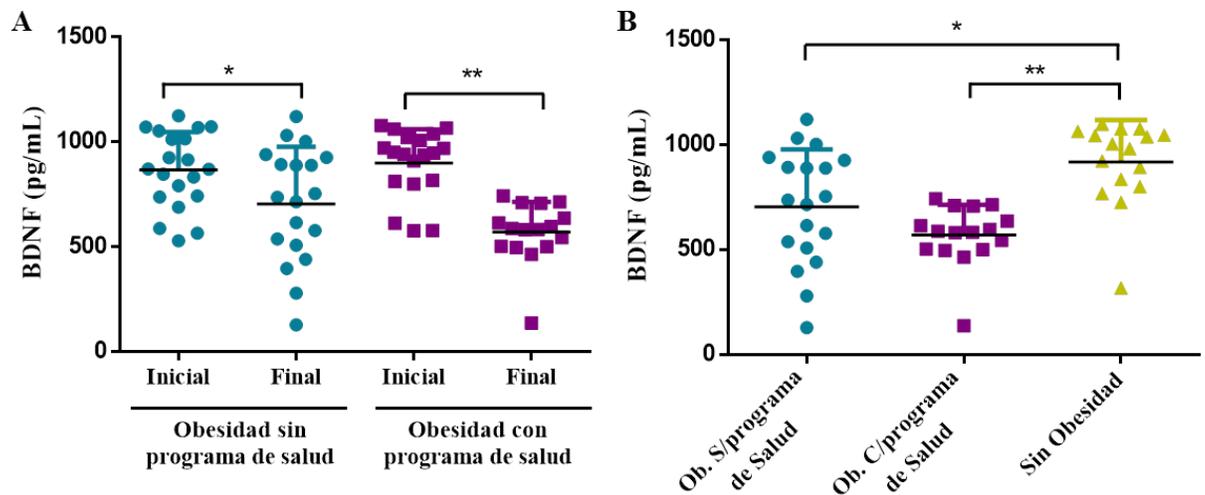
Las variables de latencia (min) que consiste en los minutos que las personas una vez en cama tardan en conciliar el sueño, el porcentaje de eficiencia de sueño y el número de irrupciones de sueño en promedio por noche no mostraron cambios significativos, antes y después de implementar el programa de salud, sin embargo, se observaron ligeras variaciones en sujetos particulares al finalizar el programa de salud con cada una de estas variables (Tabla 1).

### 7.2.3. Indicadores metabólicos e inmunológicos involucrados en el sueño

Los niveles en saliva de cortisol no presentaron diferencias significativas en las valoraciones antes y después de la implementación del programa de salud en los adolescentes con obesidad así como tampoco en la comparación con el grupo control de adolescentes sin obesidad ( $p > 0.05$ ).

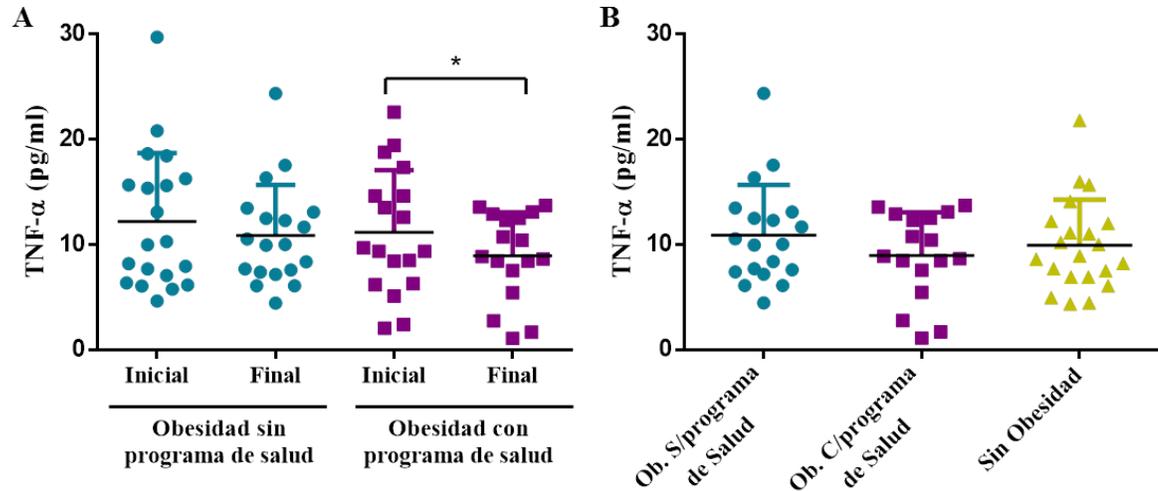
Los niveles de BDNF en suero presentaron cambios significativos al disminuir después del programa de salud de 893.9 a 569 ( $p = 0.01$ ) en el grupo Obesidad experimental y de

876.1 a 704.6 ( $p=0.02$ ) en el grupo Obesidad Control, a pesar de que en ambos grupos disminuyeron, los valores la disminución del grupo Obesidad experimental fueron mayores que en el grupo Obesidad Control (Tabla 1). Al comparar el grupo Control sin obesidad con los grupos experimental y control con obesidad se presentaron diferencias significativas, encontrando que el grupo sin obesidad presenta valores muy por encima de la media de los grupos con programa de salud (obesidad y control) con valores de 918.6 y una diferencia significativa de  $p=0.01$ . El grupo con obesidad sin programa de salud y el grupo de obesidad con implementación de protocolo de salud no presentaron diferencias significativas con valores de  $p>0.05$  (Figura 9).



**Figura 9.** Influencia de programa de salud en los niveles de BDNF (pg/ml). A. Niveles de BDNF en suero de adolescentes con obesidad de 11-15 años antes y después de la intervención de un programa de salud con duración de 14 semanas de actividad física y orientación nutricional. B. Niveles de BDNF después de la intervención de un programa de salud en adolescentes con obesidad y adolescentes sin obesidad. Datos obtenidos mediante ELISA. Los valores representan la media  $\pm$  DS de 20 individuos en el grupo con obesidad experimental y obesidad control y 21 individuos en el grupo sin obesidad. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ .

Respecto a los niveles de TNF- $\alpha$  en suero, solo se observaron diferencias significativas en la disminución de este indicador después de la implementación del protocolo de salud con valores de 11.09 a 8.84 una vez finalizado y significancia de  $p=0.04$ . No se presentaron diferencias significativas en el grupo sin programa de salud en las tomas antes y después ni al comparar las tomas finales de los 3 grupos: Obesidad experimental, Obesidad control y sin obesidad ( $P>0.05$ ) (Figura 10).



**Figura 10.** Influencia de programa de salud en los niveles de TNF- $\alpha$  (pg/ml). A. Niveles de TNF- $\alpha$  en suero de adolescentes con obesidad de 11-15 años antes y después de la intervención de un programa de salud con duración de 14 semanas de actividad física y orientación nutricional. B. Niveles de TNF- $\alpha$  después de la intervención de un programa de salud en adolescentes con obesidad y adolescentes sin obesidad. Datos obtenidos mediante la tecnología Milliplex de Millipore. Los valores representan la media  $\pm$  DS de 20 individuos en el grupo con obesidad experimental y obesidad control y 21 individuos en el grupo sin obesidad. \* $p < 0.05$ .

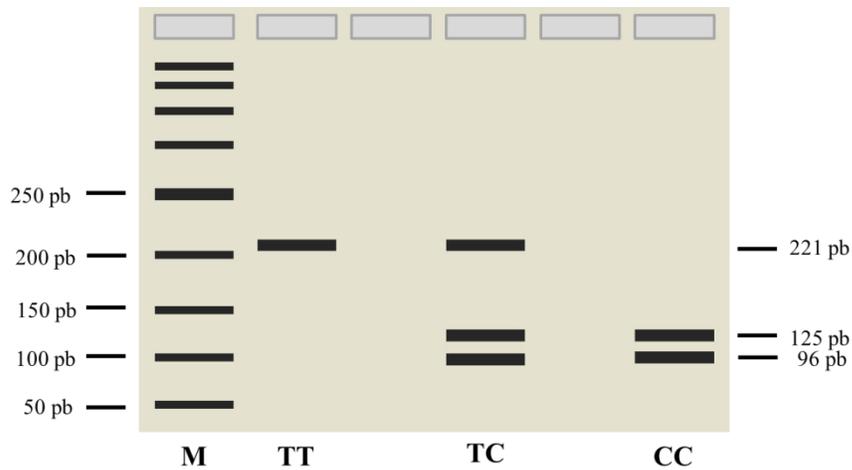
VEGF en suero no presento diferencias significativas al comparar las tomas iniciales y finales de los grupos con obesidad (experimental y control) obteniendo valores de  $p > 0.05$ . Al comparar las tomas finales del grupo experimental, el grupo Obesidad control y el grupo de adolescentes sin obesidad tampoco se presentaron diferencias significativas, sin embargo, se puede notar que el grupo control de personas sin obesidad es el que presenta los niveles más bajos de VEGF (pg/ml) en suero con 178.1 pg/ml (Tabla 1). Los valores en suero de CRP no pudieron ser detectados en todas las muestras analizadas y considerando los valores detectados no se pudieron aplicar pruebas estadísticas debido al bajo número de muestras en cada grupo, como es el caso del grupo Obesidad Control en el cual la toma final solo pudo ser detectada en 1 de 20 muestras.

### 7.3. Genotipificación

#### 7.3.1. Genotipificación del gen *CLOCK*

La determinación del polimorfismo rs1801260 correspondiente al gen *CLOCK* se realizó mediante la técnica de PCR-RFLP, la cual se visualizó en geles de agarosa obteniendo

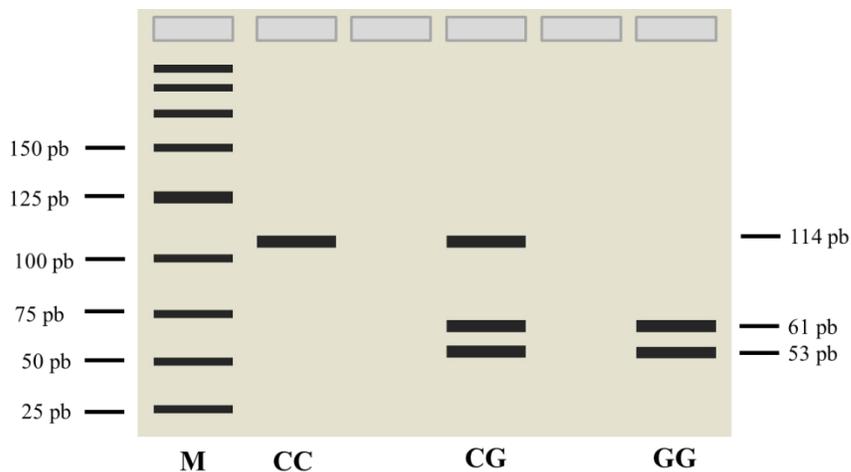
un patrón de bandas específico para cada genotipo después de digerir el fragmento amplificado (Figura 11).



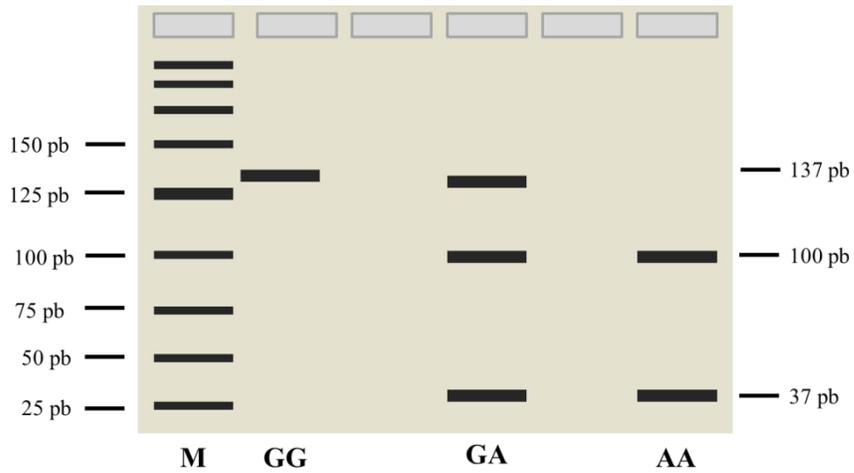
**Figura 11.** Gel muestra para el polimorfismo rs1801260. Gel agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio y visualizado mediante un fotodocumentador. M, marcador de peso molecular de 50 pb

### 7.3.2. Genotipificación del gen *PER2*

Los polimorfismos rs2304672 y rs934945, ambos localizados en el gen *PER2* se realizaron por la misma técnica anteriormente mencionada, RFLP-PCR, generando un fragmento inicial el cual posteriormente se digirió con la enzima de restricción, se obtuvieron patrones de banda característicos para alelo, con lo cual se lleva a la determinación de cada genotipo, los fragmentos digeridos fueron visualizados en gels de agarosa (Figura 12 y 13).



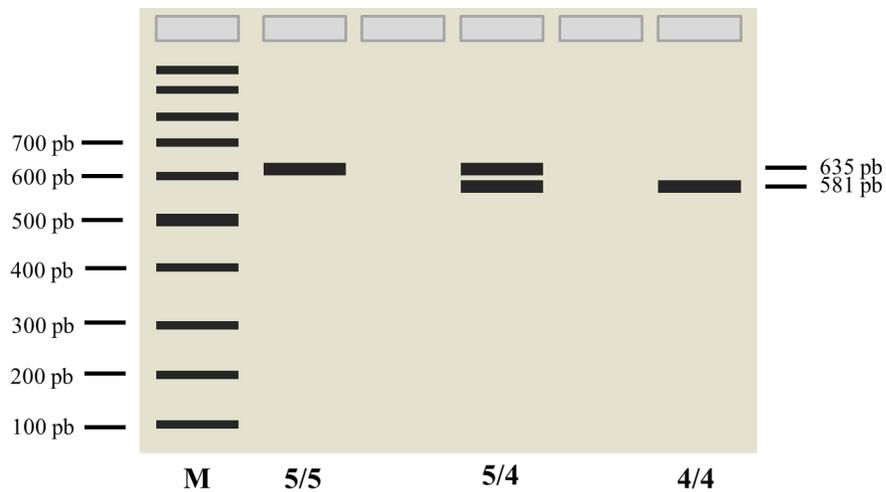
**Figura 12.** Gel muestra para el polimorfismo rs2304672. Gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio y visualizado mediante fotodocumentador. M, marcador de peso molecular de 25pb



**Figura 13.** Gel muestra para el polimorfismo rs934945. Gel de agarosa al 3.5%, teñido con bromuro de etidio y visualizado mediante fotodocumentador. M, marcador de peso molecular de 25 pb.

### 7.3.3. Genotipificación del gen *PER3*

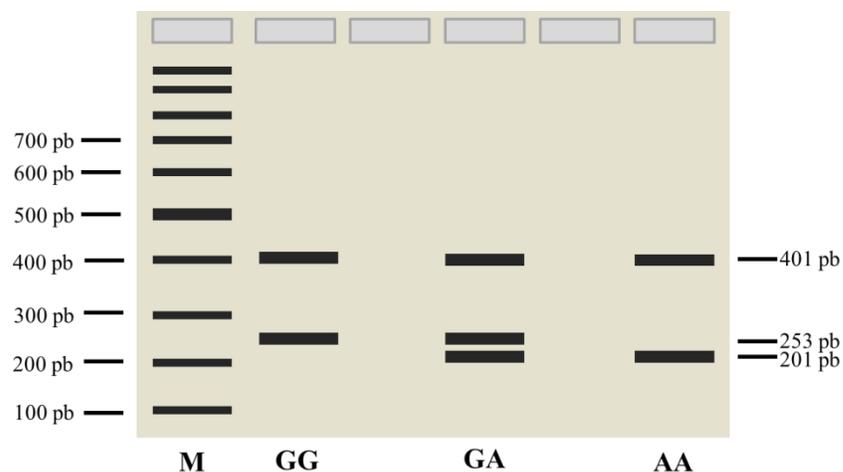
En la figura 14 se observa la determinación de los diferentes genotipos para el gen *PER3* mediante la técnica de PCR en la cual se utilizaron las condiciones mencionadas en la metodología, se puede observar la diferenciación de estos genotipos por medio del tamaño de bandas específicas para cada alelo de las muestras (Figura 14).



**Figura 14.** Gel muestra para el polimorfismo rs57875989. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio y visualizado mediante fotodocumentador. M, marcador de peso molecular de 100 pb

### 7.3.4. Genotipificación del gen *BDNF*

Para la determinación del polimorfismo en el gen *BDNF* se empleó la técnica de ARMS-PCR, en la cual se emplean 4 oligonucleótidos en una sola reacción para la diferenciación de los 3 genotipos: GG, GA, AA. Las condiciones utilizadas se mencionan en la sección de metodología (Figura 15).



**Figura 15.** Gel muestra para el polimorfismo rs6265. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio y visualizado mediante fotodocumentador. M, marcador de peso molecular de 100 pb.

### 7.3.5. Distribución de genotipos en la población

La población de estudio se encontró en equilibrio Hardy-Weinberg para todos los genotipos de los genes *CLOCK*, *PER2*, *PER3* y *BDNF* con valores de  $p > 0.05$  (Tabla 3).

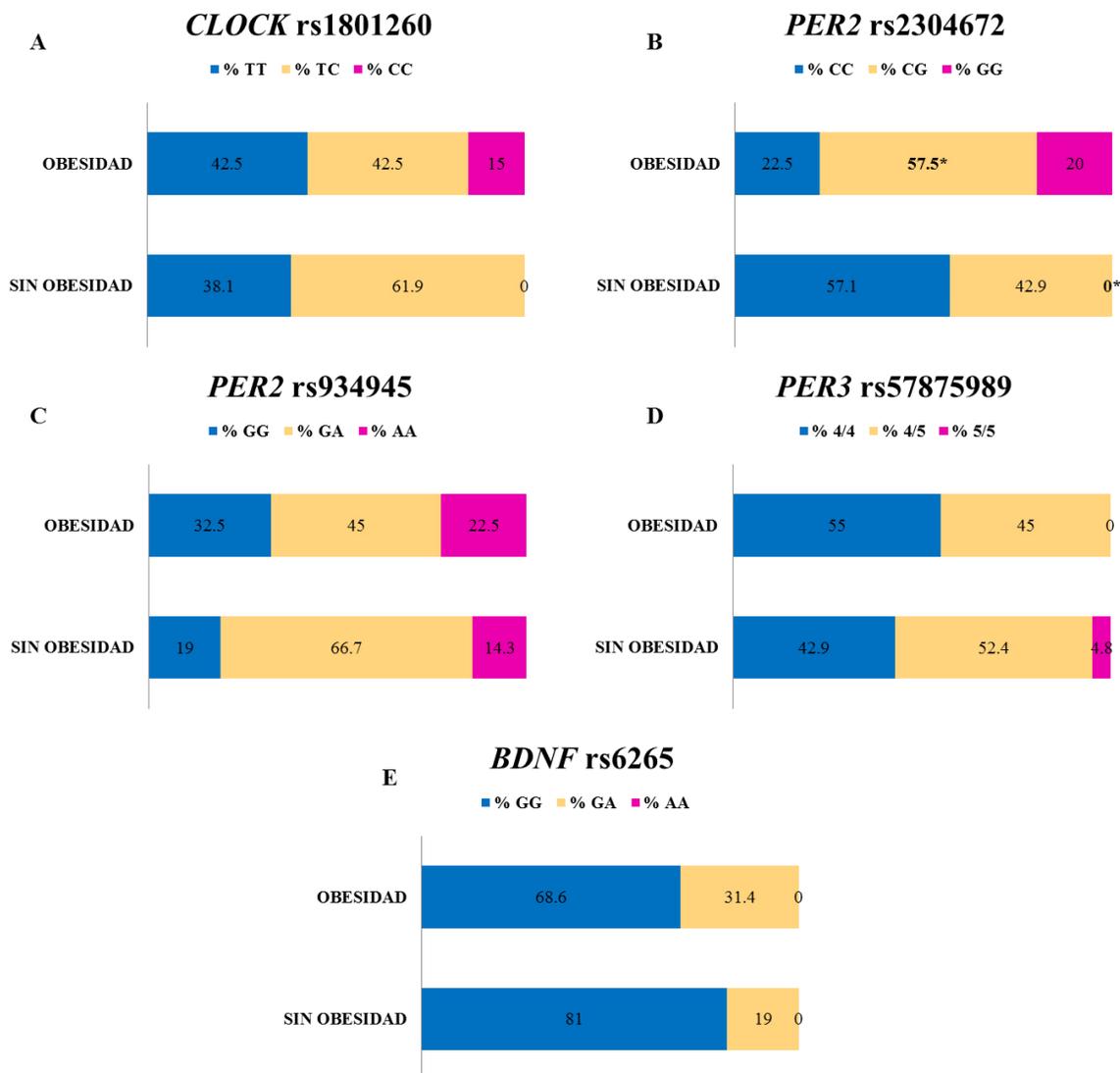
**Tabla 3.** Equilibrio Hardy-Weinberg

GEN	Polimorfismo	Cr	Grupo de trabajo	HW Pval	MAF	Alelos	MA
<i>CLOCK</i>	rs1801260	4	sin programa de salud	0.73	0.30	T/C	C
	rs1801260	4	con programa de salud	1.61	0.42	T/C	C
	rs1801260	4	sin obesidad	4.22	0.31	T/C	C
<i>PER2</i>	rs2304672	2	sin programa de salud	2.87	0.27	C/G	G
	rs2304672	2	con programa de salud	3.67	0.70	C/G	G
	rs2304672	2	sin obesidad	1.56	0.21	C/G	G
<i>PER2</i>	rs934945	2	sin programa de salud	2.2	0.26	G/A	A
	rs934945	2	con programa de salud	0.19	0.52	G/A	A

	rs934945	2	sin obesidad	0.73	0.54	G/A	A
<i>PER3</i>	rs57875989	1	sin programa de salud	0.89	0.18	4/5	5
	rs57875989	1	con programa de salud	2.88	0.27	4/5	5
	rs57875989	1	sin obesidad	1.06	0.30	4/5	5
<i>BDNF</i>	rs6265	11	sin programa de salud	0.43	0.13	G/A	A
	rs6265	11	con programa de salud	0.85	0.19	G/A	A
	rs6265	11	sin obesidad	0.23	0.09	G/A	A

n=61, Abreviaciones: Cr, cromosoma; HW Pval, valor P del equilibrio Hardy-Weinberg; MAF, Frecuencia del alelo menor; MA, alelo menor.

En la figura 16 A se observa la distribución de genotipos por grupos de Obesidad y sin Obesidad, la distribución de genotipos para el gen *CLOCK* no presenta diferencias significativas sin embargo se observa que el genotipo de riesgo CC se encontró en mayor proporción en la población de adolescentes con Obesidad (15 %) y no se presentó en la población sin obesidad (0%). La distribución de genotipos para el gen *PER2* rs2304672 presentó diferencias significativas al encontrar el genotipo heterocigoto CG en mayor proporción en los sujetos con obesidad (57.5 %) y la ausencia del genotipo homocigoto de riesgo GG en la población sin obesidad (0%) con valor de  $p=0.001$  (Figura 16 B). Los demás genotipos no presentaron diferencias significativas en cuanto a su distribución en grupos de Obesidad y sin Obesidad (Figura 16 C y D), en el caso del gen *BDNF* no se detectó el genotipo de riesgo AA en ningún estudiante de la población analizada (Figura 16 E).



**Figura 16.** Frecuencia de genotipos en la población. Determinación de genotipos mediante diferentes técnicas de PCR a partir de epitelio bucal; n=61; \*significancia  $p < 0.05$ .

En la tabla 4 y 5 se muestran los valores y porcentajes de cada frecuencia genotípica y alélica en los grupos de estudio, el genotipo heterocigoto TC del gen *CLOCK* fue el que se encontró en mayor proporción, seguido del genotipo TT y por último el genotipo CC; en el caso del grupo de Obesidad con programa de salud se observó el genotipo CC con mayor frecuencia significativa en comparación con los grupos de Obesidad sin programa de salud y el grupo sin obesidad; 5, 25 y 0 % respectivamente. Los genotipos del gen *PER2* no mostraron diferencias significativas entre los grupos, para ambos, se presentaron en mayor proporción los genotipos heterocigotos CG y GA, y en menor

proporción los genotipos GG y AA con 0% para el grupo con Obesidad sin programa de salud y en un 40 y 30 % respectivamente para el grupo de Obesidad con programa de salud. El gen *PER3* no mostro diferencias significativas, sin embargo, se observó menor cantidad de adolescentes homocigotos para 5/5 solo encontrando 1 sujeto en toda la población analizada. En el gen *BDNF* no se observaron adolescentes homocigotos para el alelo A, en los genotipos restantes no se observaron diferencias significativas entre grupos.

**Tabla 4.** Frecuencias genotípicas en la población de estudio

FRECUENCIAS GENOTÍPICAS					
GEN		GRUPO POBLACIONAL			
		OBESIDAD SIN	OBESIDAD CON	SIN	
		PROGRAMA DE SALUD	PROGRAMA DE SALUD	OBESIDAD	
<i>CLOCK</i>	rs1801260	TT	9 (45)	8 (40)	8 (38)
		TC	10 (50)	7 (35)	13 (62)
		CC	1 (5)	<b>5 (25)*</b>	0 (0)
<i>PER2</i>	rs2304672	CC	9 (45)	0 (0)	12 (57)
		CG	11 (55)	12 (60)	9 (43)
		GG	0 (0)	8 (40)	0 (0)
	rs934945	GG	8 (40)	5 (25)	4 (19)
		GA	9 (45)	9 (45)	14 (67)
		AA	3 (15)	6 (30)	3 (14)
<i>PER3</i>	rs57875989	44	13 (65)	9 (45)	9 (43)
		45	7 (35)	11 (55)	11 (52)
		55	0 (0)	0 (0)	1 (5)
<i>BDNF</i>	rs6265	GG	14 (74)	10 (63)	17 (81)
		GA	5 (26)	6 (37)	4 (19)
		AA	0 (0)	0 (0)	0 (0)

n=61, los datos en paréntesis corresponden a los porcentajes de cada genotipo, \*Nivel de significancia p<0.05.

**Tabla 5.** Frecuencias alélicas en la población de estudio

FRECUENCIAS ALÉLICAS					
GRUPO POBLACIONAL					
GEN			OBESIDAD SIN	OBESIDAD CON	SIN
			PROGRAMA DE SALUD	PROGRAMA DE SALUD	OBESIDAD
<i>CLOCK</i>	rs1801260	TT	0.70	0.58	0.69
		CC	0.30	0.42	0.31
<i>PER2</i>	rs2304672	CC	0.73	0.30	0.79
		GG	0.27	0.70	0.21
	rs934945	GG	0.74	0.48	0.46
		AA	0.26	0.52	0.54
<i>PER3</i>	rs57875989	44	0.82	0.73	0.70
		55	0.80	0.27	0.30
<i>BDNF</i>	rs6265	GG	0.87	0.81	0.90
		AA	0.13	0.19	0.09

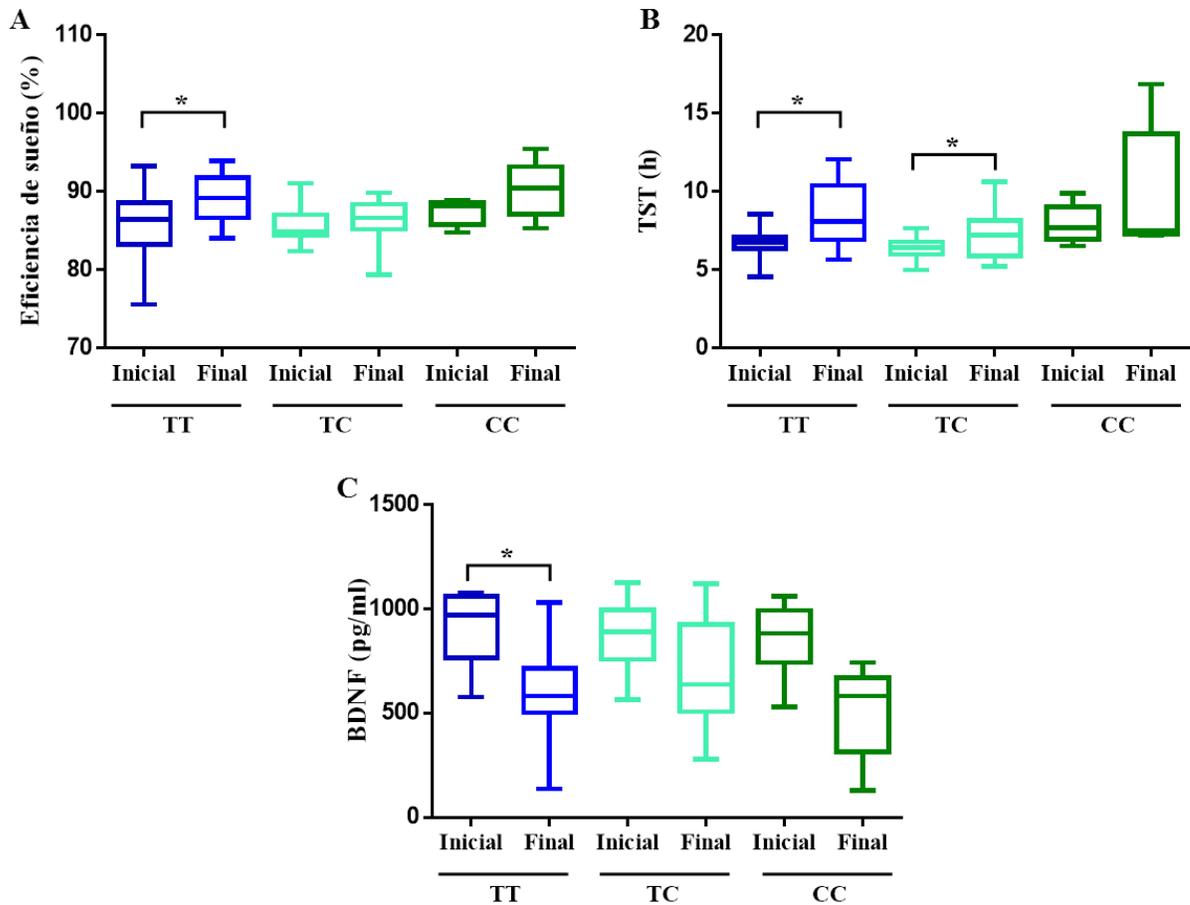
n=61.

#### 7.4. Variables en respuesta al programa de salud agrupadas por genotipo

##### 7.4.1. *CLOCK* T/C

Se agruparon los adolescentes en base al genotipo y se calcularon las diferencias en los índices de respuesta de cada una de las variables evaluadas relacionadas al sueño, como el Cortisol, BDNF, TNF- $\alpha$ , CRP, VEGF, latencia por día, eficiencia del sueño, tiempo total de sueño, WASO, número de irrupciones de sueño e IMC, encontrando diferencias significativas en las evaluaciones antes y después de la implementación del programa de salud en el porcentaje de eficiencia del sueño con cambios de 85.46 a 89.40 para los portadores del genotipo favorable TT ( $p=0.02$ ). Los adolescentes con el genotipo desfavorable CC y los heterocigotos TC no presentaron ningún cambio significativo (Figura 17 A). Se presentaron diferencias significativas en el TST con los sujetos portadores del genotipo favorable TT y los heterocigotos TC, el tiempo total de sueño aumentó una vez finalizado el programa de salud de 6.59 a 8.52 en los homocigotos TT y de 6.45 a 7.39 en los TC, los niveles fueron altamente significativos con valores de  $p=0.001$  para TT y de  $p=0.02$  para los portadores del genotipo TC (Figura 17 B). Los niveles de BDNF disminuyeron de manera altamente significativa de 915.4 a 625.6

pg/ml ( $p=0.0009$ ) en los adolescentes con el genotipo favorable TT, los heterocigotos y el genotipo desfavorable CC no presentó cambios significativos ( $p>0.05$ ) (Figura 17 C). En el caso de las demás variables comparadas no se presentaron diferencias significativas (IMC, Cortisol, TNF- $\alpha$ , latencia por día, WASO y número de irrupciones de sueño).

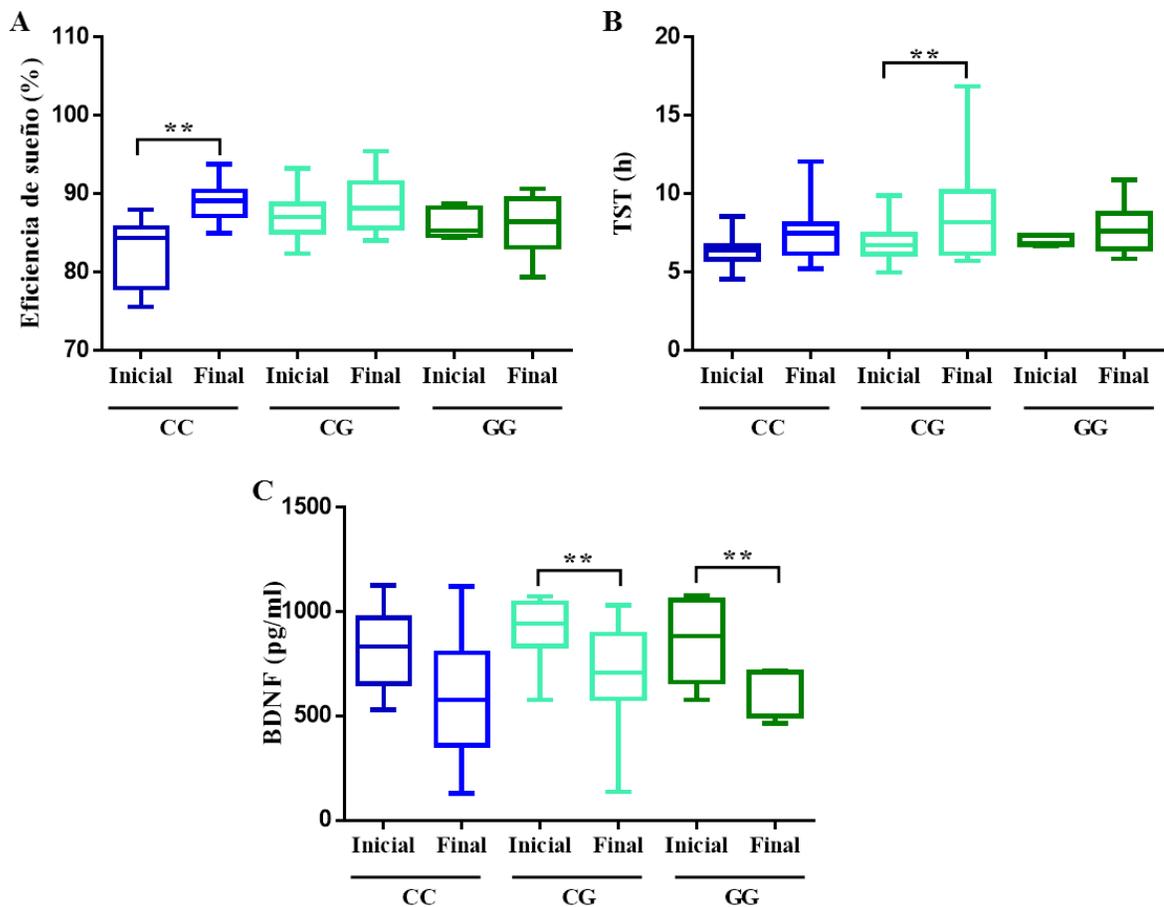


**Figura 17.** Agrupación de polimorfismos del gen *CLOCK T/C*. Determinaciones antes y después del programa de salud con intervención de actividad física y orientación nutricional. Eficiencia de sueño y TST (h) detectados mediante actigrafía y niveles de BDNF mediante ELISA. TST (h), tiempo total de sueño por día.  $n=61$ . Niveles de significancia  $p<0.05$ .

#### 7.4.2. *PER2 C/G*

Se encontraron diferencias altamente significativas en las evaluaciones antes y después de la implementación del programa de salud en el porcentaje de eficiencia del sueño con cambios de 82.72 a 89.1 para los portadores del genotipo favorable CC ( $p=0.003$ ); los

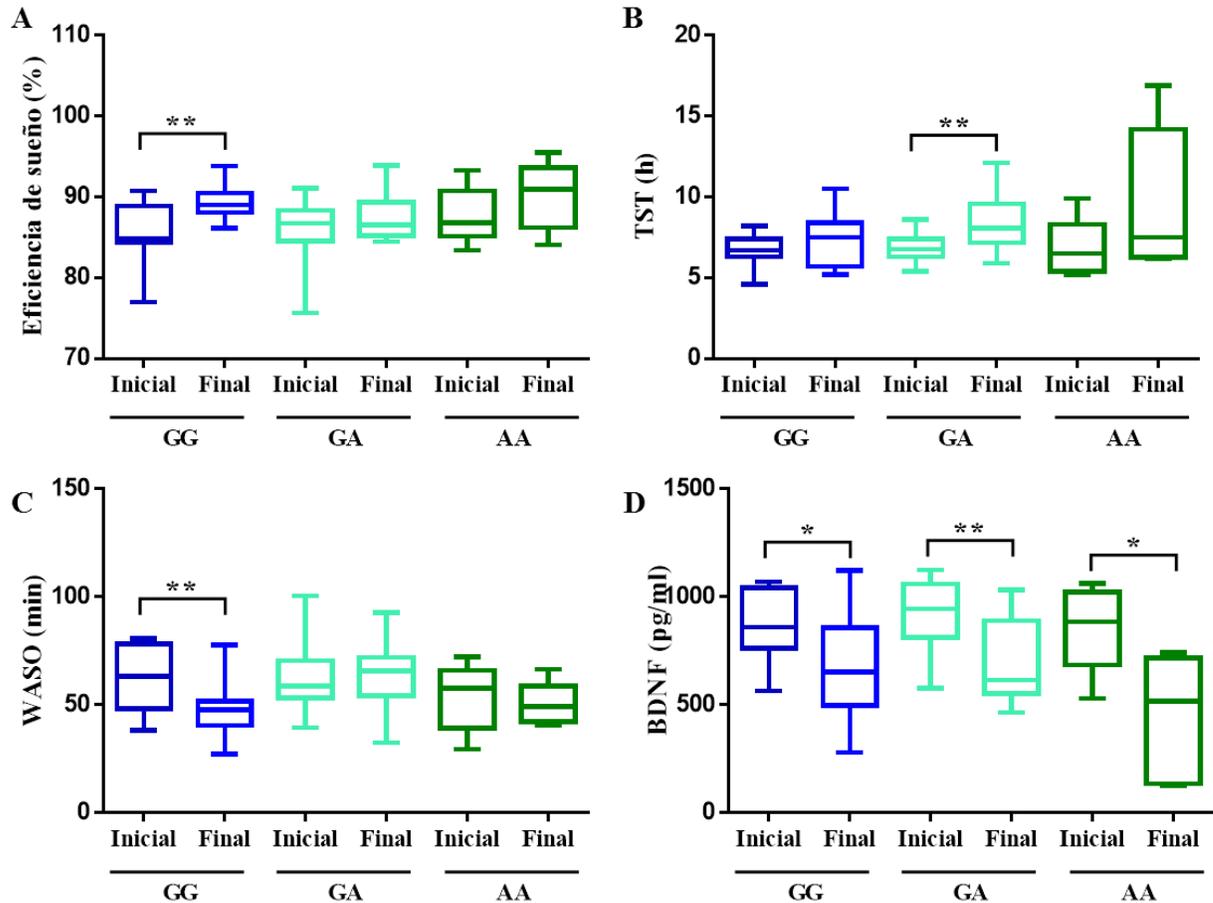
adolescentes con el genotipo desfavorable GG y los heterocigotos CG no presentaron ningún cambio significativo (Figura 18 A). Se presentaron diferencias significativas en el TST con los sujetos portadores del genotipo heterocigoto CG, el tiempo total de sueño una vez finalizado el programa de salud aumentó de 6.89 a 8.64 en los heterocigotos CG, los niveles fueron altamente significativos con valores de  $p=0.003$  (Figura 18 B). Los niveles de BDNF disminuyeron de manera altamente significativa de 918 a 706.2 pg/ml y de 875.2 a 562.1 ( $p=0.002$  y  $p=0.004$ ) en los adolescentes con el genotipo homocigoto GG y el genotipo heterocigoto CG respectivamente, el genotipo favorable CC no presentó cambios significativos ( $p>0.05$ ) (Figura 18 C). En el caso de las demás variables comparadas no se presentaron diferencias significativas (IMC, Cortisol, TNF- $\alpha$ , latencia por día, WASO y número de irrupciones de sueño).



**Figura 18.** Agrupación del polimorfismo del gen *PER2* C/G. Determinaciones antes y después del programa de salud con intervención de actividad física y orientación nutricional. Eficiencia de sueño y TST (h) detectados mediante actigrafía y niveles de BDNF mediante ELISA. TST (h), tiempo total de sueño por día.  $n=61$ . \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ .

### 7.4.3. *PER2 G/A*

El porcentaje de eficiencia de sueño aumentó de manera altamente significativa después de finalizado el programa de salud en la población de obesidad de 85.53 a 89.18 ( $p=0.0007$ ), este aumento solo fue presentado con los portadores del genotipo homocigoto favorable GG ya que los demás genotipos GA y AA no mostraron cambios significativos ( $p>0.05$ ) (Figura 19 A). El tiempo total de sueño o TST (h) aumentó de manera altamente significativa una vez finalizado el programa de salud en el genotipo heterocigoto GA ( $p=0.002$ ), los genotipos homocigotos GG y AA no presentaron cambios significativos (Figura 19 B). Los minutos de WASO mostraron diferencias altamente significativas al comparar las determinaciones iniciales y finales del programa de salud, de 63.17 a 49.02 min ( $p=0.002$ ), el genotipo heterocigoto GA y el genotipo desfavorable AA no mostraron diferencias significativas ( $P>0.05$ ) (Figura 19 C). Los niveles de BDNF en suero disminuyeron de manera significativa en los 3 genotipos después de finalizado el programa de salud, como cabe destacar, el genotipo heterocigoto GA fue el que presentó el mayor porcentaje de disminución al compararlo con los otros genotipos ( $p=0.025$ ,  $p=0.001$  y  $p=0.01$ , respectivamente) (Figura 19 D).

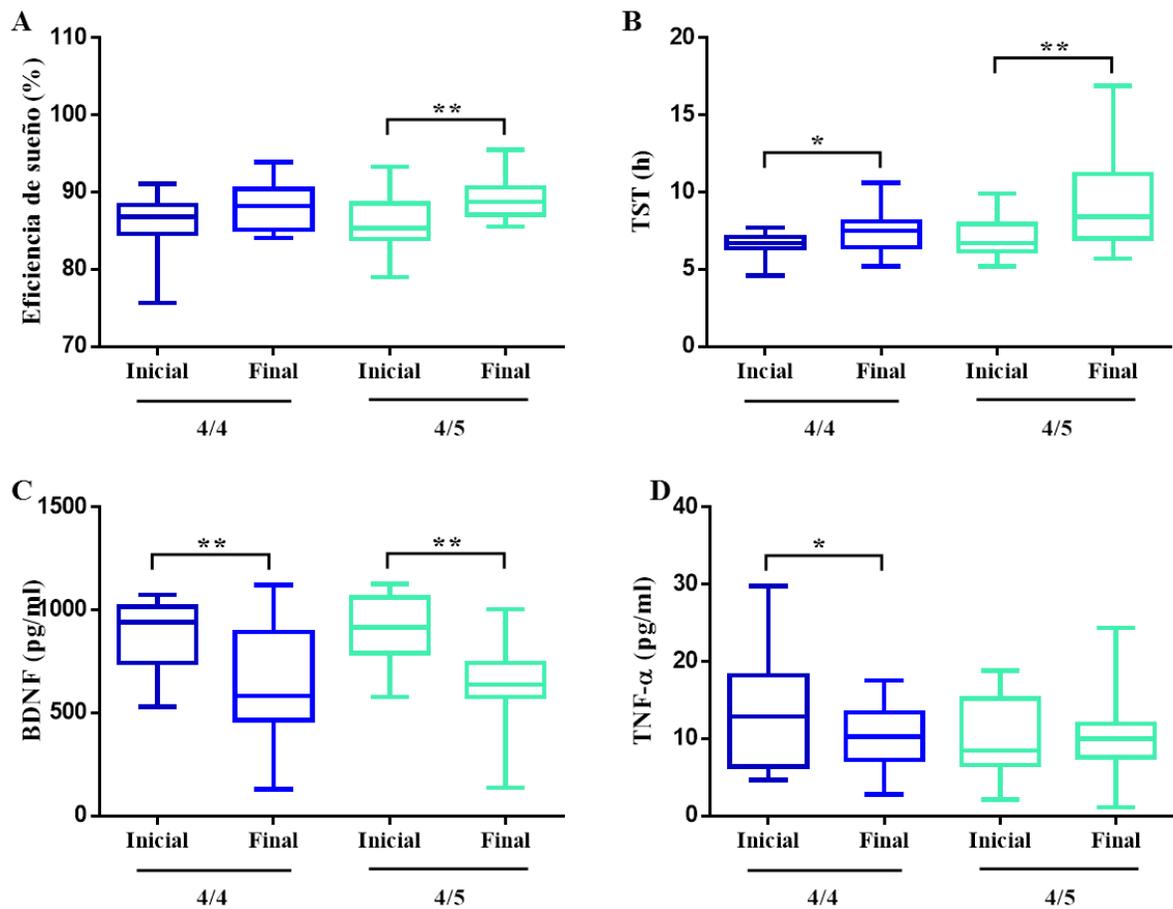


**Figura 19.** Agrupación del polimorfismo del gen *PER2* G/A. Determinaciones antes y después del programa de salud con intervención de actividad física y orientación nutricional. Eficiencia de sueño, TST (h) y WASO (min) detectados mediante actigrafía, niveles de BDNF mediante ELISA. TST (h), tiempo total de sueño por día; WASO, tiempo de vigilia nocturna; BDNF, Factor neurotrófico derivado de cerebro. n=61. \*p<0.05, \*\*p<0.01.

#### 7.4.4. *PER3* 4/5

Los heterocigotos *PER3* 4/5 fueron quienes presentaron cambios altamente significativos al aumentar de 86.12 a 89.09 (p=0.007) el porcentaje de eficiencia del sueño, los homocigotos 4/4 no mostraron cambios significativos (Figura 20 A). El tiempo total de sueño aumentó de manera significativa en los genotipos 4/4 y 4/5, con valores de 6.57 a 7.45 (p=0.01) en los homocigotos 4/4 y de 7.01 a 9.3 (p=0.001) en los heterocigotos (Figura 20 B). Los niveles de BDNF (pg/ml) en suero disminuyeron con una diferencia altamente significativa en los adolescentes genotipo 4/4 con cambios de 877.9 a 641.6 pg/ml (p=0.0002) y en los portadores del genotipo 4/5, de 891.6 a 648.9

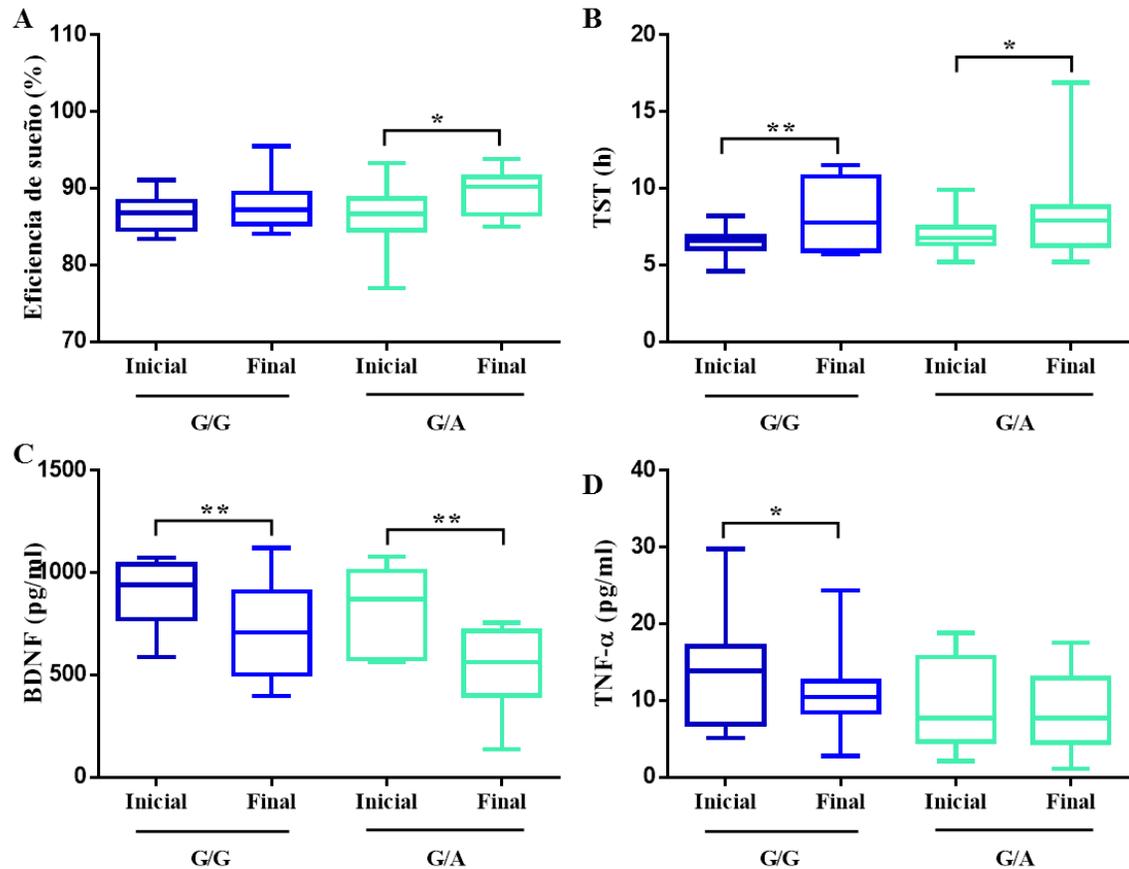
pg/ml ( $p=0.004$ ) (Figura 20 C). El genotipo 4/4 mostró cambios significativos en la disminución de los niveles de TNF- $\alpha$  en suero, de 12.99 a 10.26 pg/ml ( $p=0.04$ ), el genotipo heterocigoto no presentó cambios significativos (Figura 20 D). Las demás variables analizadas mencionadas anteriormente en la metodología no presentaron cambios significativos con valores  $p>0.05$ . El genotipo homocigoto 5/5 que consiste en la inserción de la secuencia VNTR no fue detectado en la población por lo que no pudo ser comparado.



**Figura 20.** Agrupación del polimorfismo del gen *PER3* 4/5. Determinaciones antes y después del programa de salud con intervención de actividad física y orientación nutricional. Eficiencia de sueño y TST (h) detectados mediante actigrafía, niveles de BDNF (pg/ml) detectados mediante ELISA y TNF- $\alpha$  (pg/ml) evaluados mediante la tecnología Milliplex. TST (h), tiempo total de sueño por día; BDNF, Factor neurotrófico derivado de cerebro; TNF- $\alpha$ , Factor de necrosis tumoral alfa. n=61. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ .

#### 7.4.5. *BDNF G/A*

En el caso de los genotipos para *BDNF G/A* se presentaron diferencias significativas en un aumento del porcentaje de eficiencia de sueño en los heterocigotos GA, 86.21 a 89.48 ( $p=0.02$ ) (Figura 21 A). El tiempo total de sueño promedio por día aumentó significativamente de 6.93 a 8.23 h ( $p=0.001$ ) en los homocigotos con el genotipo favorable GG y en los heterocigotos GA de 6.48 a 8.13 h ( $p=0.03$ ) (Figura 21 B). Los niveles en suero de BDNF disminuyeron significativamente en los homocigotos GG, 902.4 a 685.2 pg/ml ( $p=0.0006$ ) y de 837.2 a 527.4 pg/ml ( $p=0.003$ ) en los adolescentes con genotipo heterocigoto GA (Figura 21 C). Los genotipo favorable GG disminuyeron de manera significativa los niveles en suero de la citosina TNF- $\alpha$  de 12.84 a 10.78 pg/ml ( $p=0.04$ ), caso que no sucedió con los heterocigotos GA (Figura 21 D). Las demás variables analizadas no presentaron cambios significativos con valores  $p>0.05$ . El genotipo homocigoto para el alelo A no fue detectado en la población de estudio por lo que no pudo ser comparado con los genotipos mencionados.



**Figura 21.** Agrupación del polimorfismo del gen *BDNF* G/A. Determinaciones antes y después del programa de salud con intervención de actividad física y orientación nutricional. Eficiencia de sueño y TST (h) detectados mediante actigrafía, niveles de BDNF (pg/ml) detectados mediante ELISA y TNF- $\alpha$  (pg/ml) evaluados mediante la tecnología Milliplex. TST (h), tiempo total de sueño por día; BDNF, Factor neurotrófico derivado de cerebro; TNF- $\alpha$ , Factor de necrosis tumoral alfa. n=61. \*p<0.05, \*\*p<0.01.

### 7.5. Variables en respuesta al programa de salud y su asociación con el genotipo

La valoración de la influencia del programa de salud y los genotipos en los genes *CLOCK*, *PER2*, *PER3* y *BDNF* sobre los parámetros analizadas mostró que los genotipos TT y TC en el gen *CLOCK* influyen de manera significativa con estimados negativos en el tiempo total de sueño de la población, indicando que el TST (h) disminuyó en los adolescentes portadores de estos genotipos, así mismo, los portadores del genotipo TC presentaron un aumento en los niveles de TNF- $\alpha$  (pg/ml) después de finalizado el programa de salud. El número de irrupciones durante el sueño disminuyó de manera significativa en los portadores del genotipo 4/5 después de finalizado el

programa de salud con una significancia de  $p=0.0371$  (Tabla 6). Los genotipos restantes no mostraron valores estimados significativos.

**Tabla 6.** Análisis de covarianza ANCOVA

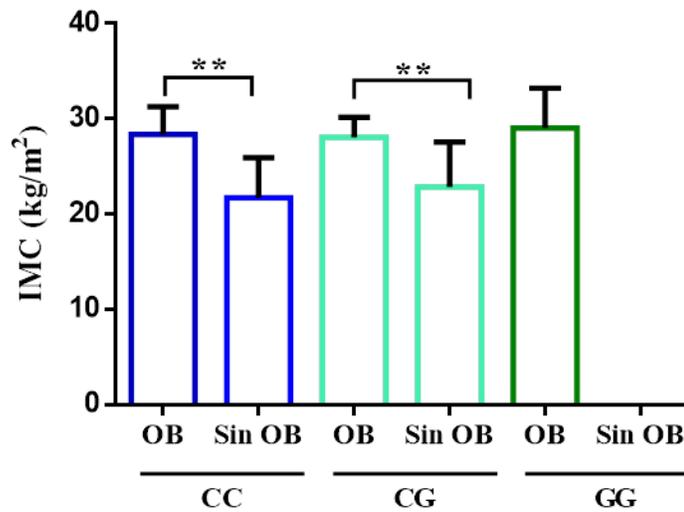
GEN	SNP	GENOTIPO	VARIABLE	ESTIMADO	SE	P
CLOCK	rs1801260	TT	TST (h)	-1.730821	0.702741	0.0169
		TC	TST (h)	-2.251498	0.722280	0.0433
		TC	TNF- $\alpha$ (pg/ml)	9.7898	3.0765	0.0130
PER3	rs57875989	4/5	# Irrupciones	-14.2394	4.6288	0.0371

SNP, polimorfismo; SE, error estándar; P, valor de significancia.

Los análisis de asociación de los diferentes genotipos en los genes *CLOCK*, *PER2*, *PER3* y *BDNF* y los niveles de las variables evaluadas agrupando de manera global a la población en obesidad y sin obesidad (incluyen adolescentes con programa y sin programa) mostraron una asociación estadísticamente significativa entre el genotipo de riesgo GG y los niveles de IMC en la población de adolescentes con obesidad (Figura 22). Los portadores del alelo G para el SNP rs2304672 presentan 2.176 más de IMC ( $\text{kg/m}^2$ ) en comparación con los portadores del alelo C, se observa que ningún adolescente de la población analizada sin obesidad presenta el genotipo de riesgo GG.

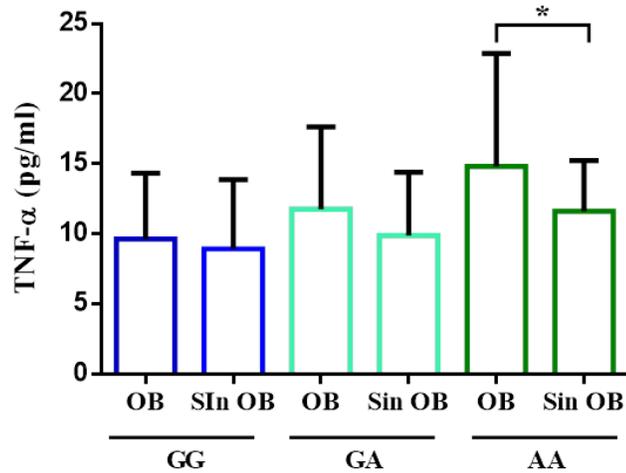
Del mismo modo, se observó que los portadores del genotipo de riesgo AA del SNP rs934945 presentaron 2.15 (pg/ml) más de TNF- $\alpha$  en suero al compararlos con los genotipo GG y GA (Figura 23).

No se encontraron asociaciones significativas entre los genotipos de los genes *CLOCK*, *PER3* y *BDNF* y los niveles de las variables analizadas entre la población de adolescentes con obesidad y adolescentes sin obesidad.



CHR	SNP	BETA	SE	R <sup>2</sup>	T	P
2	rs2304672	2.176	0.8271	0.1049	2.63	0.01087

**Figura 22.** IMC (kg/m<sup>2</sup>) del grupo de adolescentes con Obesidad y sin Obesidad. Determinaciones iniciales. OB, Obesidad; Sin OB, sin Obesidad; CHR, numero de cromosoma; SNP, posición del SNP; BETA, coeficiente de regresión; SE, error estándar; R<sup>2</sup>, r cuadrada; T, distribución de T basado en el test de Wald; P, valor de P en el test de Wald. n=61. \*\*Significancia p<0.01.



CHR	SNP	BETA	SE	R <sup>2</sup>	T	P
2	Rs934945	2.154	1.062	0.06729	2.028	0.04726

**Figura 23.** TNF-α (pg/ml) del grupo de adolescentes con Obesidad y sin Obesidad. OB, Obesidad; Sin OB, sin Obesidad; CHR, numero de cromosoma; SNP, posición del SNP; BETA, coeficiente de regresión; SE, error estándar; R<sup>2</sup>, r cuadrada; T, distribución de T basado en el test de Wald; P, valor de P en el test de Wald. n=61. \*Significancia p<0.05

## 7.6. Asociación haplotípica

Los resultados de la prueba de epistasis no arrojaron resultados significativos por lo que no se presentó una interacción entre los diferentes genes y un determinado carácter fenotípico en los grupos de obesidad y sin obesidad de la población de estudio (Tabla 7).

**Tabla 7.** Prueba de Epistasis

CHR1	SNP1	CHR2	SNP2	OR	STAT	P
1	rs57875989	2	rs934945	0.9281	0.008602	0.9261
1	rs57875989	2	rs2304672	1.87	0.3205	0.5713
1	rs57875989	4	rs1801260	0.4068	0.8957	0.3439
1	rs57875989	11	rs6265	0.7123	0.05627	0.8125
2	rs934945	2	rs2304672	3.345	2.151	0.1425
2	rs934945	4	rs1801260	1.283	0.2009	0.654
2	rs934945	11	rs6265	0.362	1.223	0.2688
2	rs2304672	4	rs1801260	0.9446	0.005153	0.9428
2	rs2304672	11	rs6265	0.8278	0.01931	0.8895
4	rs1801260	11	rs6265	0.3465	0.9564	0.3281

CHR1, cromosoma del primer SNP; SNP1, Identificación del primer SNP; CHR2, Cromosoma del segundo SNP; SNP2, Identificación del segundo SNP; OR, Odds ratio de la interacción; STAT, estadístico de chi cuadrada; P, valor de p. n=61. Significancia  $p < 0.05$ .

## 8. DISCUSIÓN

México ocupa el primer lugar de obesidad infantil a nivel mundial, lo que ocasiona una alta incidencia de enfermedades crónico degenerativas, diabetes y otras morbilidades, las cuales son consecuencia del síndrome metabólico temprano progresivo. A nivel nacional y estatal existen diferentes campañas como: PASOS, SPA, Vibra Nuevo León, entre otras, que se aplican de manera general a la población basándose en intervenciones de actividad física, control nutricional y psicológico, sin embargo estas, no hacen distinción de las características individuales que posee cada persona al inicio del programa, particularidad que tiene una gran influencia en el resultado del plan de intervención, ya que se ha observado que este tipo de estrategias conllevan a resultados solo a corto plazo (OMS, 2012).

Existen datos asociados de la respuesta en la población hacia los programas de salud basados las características antes mencionadas (pruebas físicas, antropométricas, metabólicas y psicológicas), sin embargo, no hay estudios que correlacionen los datos fenotípicos y algún genotipo específico con cada variante analizada, como pueden ser los polimorfismos genéticos en los genes *CLOCK*, *PER2*, *PER3* y *BDNF* involucrados en el reloj circadiano y la respuesta inmune en los humanos, los cuales, se ha reportado que influyen en la regulación del sueño, recientemente considerado como un factor más que influye en el desarrollo de obesidad junto con la falta de actividad física y una mala alimentación (Van Cauter y Knutson 2008). Debido a lo anterior antes mencionado, este estudio se planteó con la finalidad de determinar la utilidad de estas variantes genéticas para crear una posible herramienta para su aplicación en poblaciones específicas así como en campañas y plataformas individualizadas, logrando así, un resultado del cual todos puedan beneficiarse disminuyendo los índices de obesidad.

En nuestros resultados asociados a los parámetros involucrados en el sueño pudimos observar que la implementación del programa de salud con actividad física y orientación nutricional aumentó de forma significativa el promedio de las horas del TST en los adolescentes con obesidad ( $p=0.013$ ), sin embargo, este aumento también se presentó en el grupo de obesidad sin protocolo ( $p=0.001$ ), por lo que al comparar ambos grupos no se observaron diferencias significativas ( $p=0.098$ ). Cabe mencionar que del grupo con

programa de salud se pudo observar que determinados adolescentes fueron los que presentaron mayor respuesta al finalizar el protocolo por lo que éste resultó ser más favorable para ciertos adolescentes. Esta característica en los resultados obtenidos concuerda con estudios anteriores en los que se menciona que la práctica de ejercicio de larga duración, por lo menos de una hora, aumenta de manera significativa el tiempo total de sueño, sin embargo, existen componentes genéticos que influyen el ciclo circadiano de sueño/vigilia que pudieran incrementar o disminuir la calidad de sueño independientemente de un estímulo externo como la actividad física, con lo que se puede mencionar que la actividad realizada en el protocolo de salud, el “taller balón”, y la orientación nutricional tuvieron mayor impacto favorable significativo en las horas promedio de sueño de un número de adolescentes en particular (Atkinson y Davenne, 2007). Las variables de IMC, minutos de latencia, porcentaje de eficiencia de sueño, minutos de WASO y número de irrupciones de sueño no mostraron cambios significativos al finalizar el programa de salud, se ha mencionado que una posible causa de la falta de un impacto significativo en las variaciones de los niveles de estos parámetros relacionados a calidad de sueño y composición corporal podría ser la intensidad del ejercicio realizado ya que no se contó con un monitoreo cardiaco del esfuerzo desarrollado, así como de diversos mecanismos potenciales externos que influyen de manera indirecta en la respuesta del ejercicio sobre la fisiología normal del sueño, como la exposición a la luz natural antes de ir a dormir, niveles de ansiedad, depresión o estrés de las personas, consumo de diversas sustancias (café, bebidas energéticas, tabaco, alcohol, etc.) y los efectos bioquímicos propios de la práctica de actividad física (Tan *et al.*, 2013; Youngstedt 2005).

En el caso de los indicadores metabólicos e inmunológicos involucrados en el sueño. los niveles de cortisol no mostraron cambios significativos después del programa de salud con intervención de actividad física y orientación nutricional ( $p>0.99$ ), datos que son consistentes con los reportados por Born *et al.*, 1997, en donde menciona que podría existir una disminución de los niveles de cortisol después de periodos prolongado de falta de sueño, caso contrario a lo observado en nuestros resultados en donde los adolescentes no presentaron periodos prolongados de falta de sueño ya que los patrones evaluados mediante actimetría se mostraron constantes durante el protocolo, los niveles

de cortisol se encontraron en sus valores normales con una secreción máxima por la mañana al momento de despertar, indicando al organismo el inicio de la actividad diaria disminuyendo el sueño (Backhaus *et al.*, 2004). Respecto a los niveles de BDNF, estos, disminuyeron de manera significativa al finalizar el programa de salud ( $p=0.0001$ ), sin embargo, esta disminución también se presentó en el grupo de adolescentes que no realizaron el protocolo ( $p=0.007$ ). Al comparar los datos finales de los adolescentes con obesidad y la población control sin obesidad se pudo observar que los primeros, presentaron menores niveles en suero de BDNF ( $p=0.0002$ ), datos que concuerdan con diversas investigaciones en las cuales se plantea la hipótesis de una mayor vulnerabilidad al estrés debido a la mala calidad de sueño puede conducir a una disminución de la secreción de BDNF. Tal disminución se menciona que podría estar asociada con una disminución en la expresión de mRNA de BDNF en células mononucleares de sangre periférica. Así mismo, se ha demostrado consistentemente que la prolongada vigilia como resultado de la falta del sueño puede ser considerada como un factor de estrés para el cerebro, conduciendo a una reducción de los niveles de BDNF en suero, resultados que se observaron con los sujetos con obesidad (Giese *et al.*, 2013). Al observar que los niveles de BDNF se encuentran en menor cantidad en la población con obesidad comparados con los adolescentes sin obesidad y que los niveles de cortisol como un indicador de estrés no presentaron diferencias significativas en ningún grupo así como que los parámetros involucrados en el sueño no presentaron cambios significativos entre obesidad y sin obesidad se puede considerar en este estudio que la disminución en suero de este analito puede ser causa no de una mala calidad de sueño, sino, de factores genéticos como el polimorfismo rs6265 en el cual el genotipo GG representa menores niveles de BDNF en suero (Lang *et al.*, 2009). Los niveles de TNF- $\alpha$  en suero disminuyeron de manera significativa al finalizar el programa de salud con actividad física y orientación nutricional ( $p=0.049$ ), resultados que concuerdan con investigaciones anteriormente realizadas en las que se observó que los niveles plasmáticos de TNF- $\alpha$  se encontraron significativamente disminuidos a los 4 meses de intervención con actividad física y educación nutricional en pacientes con síndrome metabólico basal, mientras que se mantuvieron constantes o aumentaron en pacientes no intervenidos y las personas sin síndrome metabólico (Barriga-Ibars *et al.*, 2005), Se ha

mencionado que la privación del sueño altera las respuestas inmunes e induce un aumento en los niveles de marcadores inflamatorios como TNF- $\alpha$ . (Shearer *et al.*, 2001; Zielinski y Krueger 2011) por lo cual, con lo anterior antes mencionado se puede estimar que el programa de actividad física resulto en cambios favorables sobre este indicador al disminuir los niveles de TNF- $\alpha$ . Al comparar los niveles de TNF-alfa con el grupo control sin obesidad no se observaron diferencias significativas por lo que el programa de salud resulto en cambios favorables al impactar en la disminución de un estado inflamatorio causado posiblemente por una falta de sueño en los adolescentes. Los valores en suero de VEGF no cambiaron significativamente al ser comparados en las evaluaciones iniciales y finales después del programa de salud, así como tampoco al ser comparados con los sujetos obesos y sin obesidad, estos resultados concuerdan con los reportados por Rehman y colaboradores en el 2003 quienes tampoco encontraron diferencias significativas de los niveles en suero de VEGF en una población de obesidad y no obesidad. Los cambios que se esperarían después de finalizado el programa de salud no se reflejaron ya que posiblemente la cantidad y nivel de actividad no fue el suficiente para impactar significativamente en esta variante o posiblemente esta variante no se encuentra relacionada con los indicadores de calidad de sueño, así como tampoco pudiera ser considerada como un indicador determinante de obesidad. Los niveles de CRP no pudieron ser evaluados mediante los análisis estadísticos ya que no fue detectado por el procedimiento en la mayoría de las muestras, de las 61 muestras solo se detectaron los niveles de 11 muestras, de las cuales se observó que no se presentaron cambios en las evaluaciones iniciales y finales, así como tampoco al ser comparados en adolescentes con obesidad y sin obesidad, la privación de sueño o algún trastorno en el sueño se ha mencionado que aumenta los niveles de CRP lo cual no fue observado en nuestra población, la inconsistencia de estos datos pudiera ser debido a la diferencia entre las metodologías de los estudios reportados, incluyendo variables no consideradas en esta investigación como la duración de la falta del sueño, la exposición a la luz, el tiempo de la toma de muestra, el perfil nutricional así como los límites de detección de las metodologías empleadas para detectar los niveles de CRP (Panagiotakos *et al.*, 2005).

Respecto a la hipótesis de que los polimorfismos en los genes *CLOCK*, *PER2*, *PER3* y *BDNF* se asocian los con parámetros metabólicos e inmunológicos involucrados con la calidad del sueño en respuesta a un programa de salud se encontraron diferencias significativas con determinados genotipos del gen *CLOCK*, siendo el genotipo TT el que presentó mayor respuesta favorable al aumentar el porcentaje de eficiencia de sueño ( $p=0.02$ ), aumentar el TST ( $p=0.001$ ) y disminuir los niveles de BDNF ( $p=0.004$ ) en las determinaciones iniciales y finales. Estos resultados son consistentes con diversas investigaciones en las cuales hacen referencia al genotipo TT como genotipo favorable, ya que presenta los mayores índices de respuesta en programas con intervenciones de actividad física y nutrición, reportándose que el alelo T es el que resulta con mayores cambios significativos en las variables asociadas con el sueño, mientras que los portadores del alelo C presentan alteraciones en los comportamientos alimenticios asociándose con una reducción en la efectividad de la pérdida de peso en un tratamiento dietético, inclusive se ha demostrado que el polimorfismo *CLOCK* 3111 T/C puede predecir el resultado en la pérdida de peso con estrategias dietéticas bajas en grasa en poblaciones sedentarias (Garaulet *et al.*, 2010a). Respecto a nuestros resultados de asociación, estos mostraron que en este polimorfismo rs1801260 los adolescentes con obesidad portadores del genotipo TC presentaron mayores niveles de la citocina TNF- $\alpha$  ( $r=9.78$ ) en la toma basal, la cual disminuyó significativamente al finalizar el programa de salud, este genotipo indica la presencia del alelo de riesgo C con valores iniciales elevados de esta citocina, resultado que concuerda con investigaciones en las que se indica el alelo C como portador de susceptibilidad a la inflamación ocurrida en la obesidad (Monteleone *et al.*, 2008). Así mismo, se observó que los genotipos TT y TC influyeron de manera significativa con estimados negativos en el tiempo total de sueño de la población con obesidad ( $r=-1.73$ ,  $r=-1.25$ , respectivamente), indicando que el TST es menor en los adolescentes obesos portadores de estos genotipos, sin embargo, son los genotipos que aumentan de manera significativa el tiempo total de sueño al finalizar el programa de salud, esta discrepancia en los resultados obtenidos se ha presentado en investigaciones en las cuales se ha considerado la influencia de otros factores que no fueron considerados en el presente estudio, mencionando la influencia de diferencias en herencias étnicas y/o vínculos con otros polimorfismos no analizados haciendo

referencia a que no siempre se cumple una asociación en los índices de respuesta y el polimorfismo *CLOCK* T/C (Garaulet *et al.*, 2010a; Bandín *et al.*, 2013).

En el caso del polimorfismo rs2304672 del gen *PER2* el alelo C fue el genotipo que mostro mayores índices de respuesta al programa de salud, ya que los portadores de los genotipos CC y CG aumentaron de manera significativa el porcentaje de eficiencia de sueño y el tiempo total de sueño con valores de  $p=0.003$  en ambos casos al finalizar el programa de salud, mientras que los portadores de los genotipos CG y GG mostraron disminución de los niveles de BDNF en suero. Estas características pudieran estar relacionadas con que la presencia del alelo C resulte en considerarse como genotipo favorable en la respuesta al programa de salud empleado en esta investigación. En el caso del genotipo GG que disminuyó los niveles de BDNF se podría indicar que este genotipo no responde de manera favorable, resultados consistentes con investigaciones en las que el alelo G se asocia con trastornos en la duración del sueño (Carpen *et al.*, 2005). Estos datos se confirmaron posteriormente al realizar los análisis de asociación de los genotipos para el polimorfismo C/G y las variantes analizadas, encontrando que el genotipo GG incrementa 2.176 los niveles de IMC en los adolescentes analizados. Se puede mencionar que el genotipo de riesgo resulto ser el genotipo GG sin embargo los resultados obtenidos en esta investigación no pueden ser determinantes para considerarlo como un indicador en la respuesta a programas de salud.

El genotipo GG del polimorfismo rs934945 en el gen *PER2* presentó mayor porcentaje de eficiencia en sueño al final el programa de salud ( $p=0.0007$ ) y menor tiempo de WASO ( $p=0.002$ ), características favorables que pudieran considerarse atribuidas a este genotipo ya que al comparar con los genotipos GA y AA estos presentaron resultados no tan favorables. Los portadores del genotipo GA disminuyeron los niveles de BDNF ( $p=0.001$ ) al finalizar el programa de salud, así mismo al realizar los análisis de asociación se observó que los portadores del alelo A presentan 2.15 pg/ml mayor cantidad de TNF- $\alpha$  en suero, estos resultados demuestran que el alelo G se relaciona con una mejor respuesta a las condiciones en contra de la obesidad, consistente a lo reportando en donde se ha indicado que el gen *PER2* puede modular los comportamientos fenotípicos en la ingesta de comida, afectando no solo a corto plazo la

pérdida de peso sino también el mantenimiento de la pérdida de peso a largo plazo (Englund *et al.*, 2009; Garaulet *et al.*, 2010). Con estos resultados no se pudiera estimar un determinado haplotipo en el gen *PER2* con la respuesta a un programa de salud, sin embargo, se pudiera considerar que estos dos genotipos CG pudieran influir en mayor o menor respuesta a un protocolo con actividad física y orientación nutricional para combatir la obesidad.

Respecto al polimorfismo rs57875989 en el gen *PER3* solo se detectaron los genotipos 4/4 y 4/5, el polimorfismo 5/5 no se encontró en la población de estudio probablemente debido a que es considerado como genotipo poco común, por lo que el número de adolescentes analizados no fue el suficiente para encontrar la presencia de los 3 genotipos, resultados consistentes en otras investigaciones en las que se demuestra que las frecuencias de los alelos de los genes del reloj circadiano, incluido el polimorfismo *PER3* VNT3 varían con el origen étnico (Kunorozva *et al.*, 2012). Se observó que los mejores niveles de respuesta finalizado el programa de salud se obtuvieron para el genotipo favorable 4/4, con el cual aumentó el tiempo total de sueño ( $p=0.015$ ) y disminuyeron los niveles de TNF- $\alpha$  ( $p=0.041$ ). El genotipo heterocigoto 4/5 presentó una influencia sobre el número de irrupciones de sueño por noche presentando un estimado significativo negativo de -14.23, lo cual indica que los adolescentes con este genotipo presentaron menos irrupciones de sueño por noche. Estos datos concuerdan con los encontrados en una población de participantes con problemas de sueño en donde la presencia del alelo 5 solo se observó en las personas con diagnóstico de trastornos del sueño, y el alelo 4 fue el presente en las personas con preferencias de matutinidad (Ebisawa *et al* 2001). Los resultados de este estudio no pueden sostener que este polimorfismo se encuentre correlacionado con trastornos en el sueño o la mejor respuesta en las variantes analizadas en respuesta a un programa de salud por lo que se necesita aumentar el tamaño de muestra considerando la ausencia de un genotipo en la población estudiada.

En cuanto al polimorfismo rs6265 del gen *BDNF* se observó que los portadores del genotipo GG presentaron mayor porcentaje de eficiencia de sueño ( $p=0.001$ ), disminución de los niveles de la citocina TNF- $\alpha$  ( $p=0.042$ ) y disminución de los niveles

de BDNF ( $p=0.0006$ ). Estudios *in vitro* han sugerido que el alelo A (Met) afecta la secreción y el tráfico intracelular de los niveles de la proteína BDNF causando desacoples en la calidad del sueño (Bachmann *et al.*, 2012), datos consistentes con los nuestros en los que la ausencia de este genotipo en la población se vio reflejado en mejor respuesta al finalizar el programa de salud. Cabe mencionar que los niveles de BDNF disminuyeron con los portadores del alelo G, resultados que no precisamente indican que el programa de salud resultó de manera desfavorable, sino que, los niveles de esta citocina disminuyeron probablemente por la presencia del genotipo GG el cual demostrado que disminuye la secreción de los niveles de BDNF de las neuronas, viendo reflejado su efecto en la detección de BDNF en suero en sangre periférica (Lang *et al.*, 2009), existe controversia sobre el genotipo que pudiera determinar niveles elevados o disminuidos de esta citocina, sin embargo, hay que considerar la influencia que la etnia tiene sobre la genética, por lo cual en este trabajo los niveles se vieron influenciados por el alelo G. Además de esto, el aumento del número de sujetos es una característica a considerar ya que no se pueden realizar análisis estadísticos de asociación tan certeros sin la presencia de los 3 genotipos.

Acerca de la relación de los polimorfismos analizados en este trabajo los análisis de epistasias no mostraron una interacción de los genotipos la cual pudo no ser observada ya que no se presentaron los 3 genotipos de cada polimorfismo en los sujetos analizados aunado a que el número de adolescentes por genotipo era muy bajo (Pedrazzoli *et al.*, 2010).

Los presentes resultados demuestran que la implementación de programas de salud con actividad física y orientación nutricional así como la interacción de variables físicas, metabólicas, inmunológicas y de diversos genes asociados son más informativos que los estudios de variables individuales o genes individuales por estudio. En conjunto, los resultados muestran que es posible detectar interacciones entre los genes de reloj circadiano asociados con los fenotipos, pero hay que considerar factores que pueden influir en los resultados, como los métodos para determinar los niveles de citocinas, la hora de la obtención de muestras así como el empleo de cuestionarios sobre la calidad de sueño, lo que podría ayudar a generar informes más específicos señalando así un camino

hacia la construcción de una estrategia de prevención y control con la finalidad de disminuir los índices de obesidad en la población.

## 9. CONCLUSIONES

- La implementación del programa de salud influyó favorablemente con el aumento del tiempo total de sueño, porcentaje de eficiencia de sueño y la disminución de la citocina TNF- $\alpha$ .
- Los portadores del alelo T del gen *CLOCK* mostraron mayor porcentaje de eficiencia en el sueño, aumento del tiempo total de sueño y disminución de los niveles de BDNF en suero al finalizar el programa de salud. Se encontró una correlación del alelo T con una disminución del tiempo total de sueño y un aumento en los niveles de TNF- $\alpha$  en los adolescentes con obesidad.
- Los portadores del alelo C en el polimorfismo rs2304672 del gen *PER 2* presentaron un aumento en el porcentaje de la eficiencia de sueño y tiempo total de sueño después de la implementación del programa de salud. El alelo G se asoció de manera significativa con mayores niveles de IMC.
- Los portadores del alelo G en el polimorfismo rs934945 del gen *PER2* mostraron aumento en el porcentaje de eficiencia de sueño, aumento en el tiempo total de sueño y disminución de los minutos de WASO al finalizar el programa de salud. El genotipo AA se encontró asociado con mayores niveles de TNF- $\alpha$ .
- Los portadores de la variante 4 en el gen *PER 3* presentaron un aumento en el tiempo total de sueño, disminución en niveles de BDNF y disminución en niveles de TNF- $\alpha$  al finalizar el programa de salud. El genotipo heterocigoto 4/5 se correlaciono con una disminución del número de irrupciones de sueño.
- Los portadores del alelo G del gen *BDNF* mostraron un aumento significativo en el tiempo total de sueño, disminución de los niveles de BDNF y TNF-  $\alpha$  al finalizar el programa de salud. El genotipo GG se correlaciono con menor número de irrupciones de sueño por noche.
- En esta investigación se analizó mediante indicadores antropométricos, fisiológicos, metabólicos e inmunológicos la eficacia de un programa de salud piloto enfocado a la población vulnerable con obesidad logrando determinar parámetros y perfiles inmunológico-moleculares asociados con variantes genéticas.

## 10.PERSPECTIVAS

El pequeño tamaño de la muestra en este estudio piloto resultó ser una de las principales limitantes ya que al dividir la población en base al genotipo se pudo observar la ausencia de adolescentes con los genotipos menos frecuentes, los cuales resultan ser importantes al realizar los análisis estadísticos; por este motivo, en futuras investigaciones se deberá contemplar el número de muestras para la población a analizar esperando obtener un número más homogéneo para todos los genotipos. Así mismo, también se considera analizar otras poblaciones con diferentes etnias para observar una correlación específica con las diferentes regiones.

Otra característica a considerar en estudios posteriores es un comparativo en sesiones de diferente intensidad de actividad física. Dichas intervenciones servirían para evaluar los efectos de la dosis-respuesta del ejercicio en la efectividad de la calidad de sueño.

El seguimiento nutricional sería importante al integrar nutriólogos por característica fenotípica y psicólogos que apoyen en el manejo integrado de la obesidad. Considerando lo anterior se podría considerar el llevar de manera escrita los hábitos alimenticios de la población a estudiar mediante la generación de informes específicos.

Se necesitan más estudios de intervención para asociar las evaluaciones en la calidad de sueño. Como perspectiva se podrían integrar monitoreos continuos en etapas intermedias mediante el uso de test sobre el sueño, ansiedad o depresión los cuales son factores que se involucran de igual manera en el desarrollo de síndrome metabólico. Por otra parte, incrementar análisis de expresión génica, asociaciones epigenéticas, así como incrementar perfiles metabólicos e inmunológicos, número de SNP's o estudios de asociación del genoma completo (GWAS). Los posibles resultados se emplearían como herramientas base para la generación de marcadores de riesgo al sobrepeso y la obesidad, dichas plataformas servirían para la prevención de enfermedades crónicas.

# ANEXOS

## ANEXO 1. Autorización por parte del plantel educativo



"Organismo Certificado bajo la Norma ISO 9001:2008, Registro SEB 121009-01"

Oficio No. 006/DEFDI/2014-2015  
ASUNTO: Contestación de Petición.

DR.  
OSWALDO CEBALLOS GURROLA  
RESPONSABLE TÉCNICO DEL PROYECTO  
PRESENTE.-

Por este medio le envío un cordial saludo y a la vez me permito comunicarle que de parte de esta Dirección de Educación Física y Deportes, no hay ningún inconveniente en que se realice la investigación **"Indicadores Biosociales como Predictores de la Obesidad en la Adolescencia"** con los alumnos de la Sec. No. 24 "Guillermo Prieto" del sistema Estatal en el turno matutino, informándole que el Profr. César Omar Salinas López, es el contacto de esta Dirección con la Directora de la Secundaria para que no tengan problemas en aplicar lo que sea necesario en relación a la investigación mencionada.

Sin otro asunto en particular, quedo de usted.

ATENTAMENTE  
SUFRAGIO EFECTIVO. NO REELECCIÓN  
Monterrey, N.L., a 18 de Agosto de 2014

NUEVO LEÓN  
GOBIERNO DEL ESTADO  
LIC. NORALEYDA LUNA RAMÍREZ  
DIRECTORA DE EDUCACIÓN FÍSICA Y DEPORTES

EEB Arroyo  
NL18/14



Subsecretaría de Educación Básica  
Dirección de Educación Física y Deportes  
www.ed.gob.nl

Secretaría de  
EDUCACIÓN NL



PRESTADO MERITO  
ESCOLAR  
2012 - 2013

Secundaria No. 24 "Guillermo Prieto"  
Reg. Estatal No. 270 Clave 15EE90177A  
Ave. Las Torres y Encinos SN Col. Tascachines  
San Nicolás de los Garza, Nuevo León  
Tel 83 52 23 35  
guilermoprieto24@hotmail.com

"2014, AÑO DE OCTAVIO PAZ"

Oficio No. 02  
Expediente: 2014-2015  
Asunto: EL DUE DE NDCA.

Facultad de Organización Deportiva  
Dr. Oswaldo Ceballos Gurrola  
Responsable Técnico del Proyecto de investigación

Por medio de la presente la Dirección de la Escuela Secundaria No. 24 "Guillermo Prieto" da la autorización para que se lleve a cabo el proyecto de investigación titulado "INDICADORES BIOSOCIALES COMO PREDICTORES DE LA OBESIDAD EN LA ADOLESCENCIA" con el alumnado de nuestra institución.

Se reitera que se puede hacer uso de las instalaciones necesarias y en la mejor disposición de apoyarlas en lo que haga falta.

Agradeciendo de antemano su atención, quedamos de usted.

"ESTUDIANTES, MAESTROS Y FAMILIA UNIDOS PARA UN MUNDO MEJOR"

San Nicolás de los Garza, N. L. a 11 de Agosto del 2014.

ATENTAMENTE.-

Profra. María Sanjuliána García Marroquín  
Directora

# ANEXO 2. Carta de consentimiento Informado



Universidad Autónoma de Nuevo León  
**Facultad de Organización Deportiva**  
 Protocolo de Investigación  
**"INDICADORES BIOPSIICOSOCIALES COMO PREDICTORES DE LA OBESIDAD EN LA ADOLESCENCIA"**  
 Dr. Oswaldo Ceballos Gurrola

## FORMULARIO DE INFORMACIÓN PARA PADRES O TUTORES CONSENTIMIENTO INFORMADO

TÍTULO DEL ESTUDIO: "INDICADORES BIOPSIICOSOCIALES COMO PREDICTORES DE LA OBESIDAD EN LA ADOLESCENCIA"

VERSIÓN DEL ESTUDIO: Versión 2.0, fecha 10 de agosto de 2014  
 VERSIÓN DEL DOCUMENTO: Versión 2.0, fecha 10 de agosto de 2014.

**CENTRO (SITIO DE INVESTIGACIÓN):** Director: Dr. Sc Oswaldo Ceballos Gurrola  
 Dirección de la Facultad de Organización Deportiva de la UANL, Campus Ciudad Universitaria, Av. Alfonso Reyes s/n, San Nicolás de los Garza, N.L., C.P. 66451. Teléfono oficina: (81)8352-2356 y teléfono celular 24 horas: 81-1544-5916, correo electrónico: oscogu@hotmail.com

**INVESTIGADOR PRINCIPAL:** Dr. Sc Oswaldo Ceballos Gurrola  
 Dirección de la Facultad de Organización Deportiva de la UANL, Campus Ciudad Universitaria, Av. Alfonso Reyes s/n, San Nicolás de los Garza, N.L., C.P. 66451. Telefax: (81)8352-2356. Celular 24 horas: 81-1544-5916, correo electrónico: oscogu@hotmail.com

**Comité de Ética:** Comité de ética en Investigación del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud, CIDCS, UANL.  
 Contacto: Presidente Dr. Eloy Cárdenas Estrada  
 Telefax: +52(81) 1340-4370 ext. 1743. Celular: 044-81-8020-7585, 24 horas. Correo electrónico: eloy.cardenas@uanl.edu.mx

Participante Sr(a): \_\_\_\_\_

Fecha de nacimiento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_, (Señalar: Padre / Madre / Tutor)

del menor: \_\_\_\_\_

Con fecha de nacimiento de \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ /- Masculino -/ -Femenino -/

Fecha \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Iniciales \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ 1/8  
 Facultad de Organización Deportiva, UANL / Campus Ciudad Universitaria, C.P. 66451, San Nicolás de los Garza, N.L. México  
 Investigador Principal: Dr. Oswaldo Ceballos Gurrola  
 Telefax: + 52(81)8352-2356 oscogu@hotmail.com



Universidad Autónoma de Nuevo León  
**Facultad de Organización Deportiva**  
 Protocolo de Investigación  
**"INDICADORES BIOPSIICOSOCIALES COMO PREDICTORES DE LA OBESIDAD EN LA ADOLESCENCIA"**  
 Dr. Oswaldo Ceballos Gurrola

**1.1.2 DEXA.** (Absorciometría dual de rayos X) se medirá de cuerpo completo y a nivel regional, la masa grasa, la masa libre de grasa sin hueso, la densidad mineral ósea y el contenido mineral óseo. Los participantes tendrán que entrar con ropa ligera (short y playera), se realizarán dos análisis.

**1.1.3 Medición del agua total corporal.** Esta medición se realizará con el método de dilución con deuterio, administrando 30g de agua deuterada y tomando 2 muestras de saliva, basal y postdosis.

El análisis de composición corporal incluirá los cambios en la masa grasa abdominal y apendicular, y como medida de control, las estimaciones de composición corporal serán evaluadas.

### 1.2 Perfil de lípidos sanguíneos y Glucosa

Se determinarán los valores de colesterol total y sus fracciones de Alta Densidad (HDL-C) y Baja Densidad (LDL-C), así como de triglicéridos en sangre y niveles de Glucosa. En condiciones de ayuno por 12 horas se tomará una muestra de sangre capilar, punzando la piel del dedo con una lanceta por personal profesional en el área.

### 1.3 Presión arterial

Se tomará la presión en la muñeca (carpo) del brazo izquierdo, para lo cual la persona estará sentada con la espalda apoyada, con las plantas de los pies sobre el piso. Se utiliza un esfigmomanómetro (tensiómetro o baumanómetro) digital marca OMRON HEM-6111.

### 1.4 Factores Biológicos

Se realizarán pruebas de metabolismo y análisis de ADN, de los cuales para el análisis de metabolismo se tomará una muestra de saliva y una gota de sangre capilar mediante lanceta. Dichas muestras se utilizarán para que se analice su perfil genético-metabólico con fines de investigación y observar la asociación de dichas variantes con la obesidad. A través de un procedimiento denominado "a doble ciego", es decir sin saber la procedencia del individuo de donde se ha obtenido su muestra. Al aceptar participar en este proyecto de investigación dichos resultados obtenidos serán manejados en forma confidencial y que en ningún momento se violará la privacidad del resultado obtenido. Se entiende también que el análisis de las muestras durante el estudio NO implica ningún costo extra para el participante y que los gastos serán absorbidos por los investigadores. Por otra

Fecha \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Iniciales \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ 3/8  
 Facultad de Organización Deportiva, UANL / Campus Ciudad Universitaria, C.P. 66451, San Nicolás de los Garza, N.L. México  
 Investigador Principal: Dr. Oswaldo Ceballos Gurrola  
 Telefax: + 52(81)8352-2356 oscogu@hotmail.com



Universidad Autónoma de Nuevo León  
**Facultad de Organización Deportiva**  
 Protocolo de Investigación  
**"INDICADORES BIOPSIICOSOCIALES COMO PREDICTORES DE LA OBESIDAD EN LA ADOLESCENCIA"**  
 Dr. Oswaldo Ceballos Gurrola

Se le extiende una invitación a participar así como a inscribir a su hijo(a) en el proyecto de investigación titulado "Indicadores Biopsicosociales como Predictores de la Obesidad en la Adolescencia" que está realizando la Facultad de Organización Deportiva, la Facultad de Salud Pública y Nutrición, la Facultad de Ciencias Biológicas y la Facultad de Psicología de la Universidad de Málaga, España, en coordinación con la Dirección de Educación Física y Deportes de la Secretaría de Educación, N.L.

El propósito es identificar el poder predictivo de los indicadores Biopsicosociales en la obesidad en adolescentes, evaluando la composición corporal (indicadores antropométricos), niveles de lípidos plasmáticos (las grasas que se encuentran en la sangre), glucosa, presión arterial, factores biológicos, gasto energético e autoconcepto y ansiedad en escolares mexicanos de 11 a 15 años de edad con obesidad.

La participación de su hijo(a) consiste en colaborar en las mediciones de indicadores antropométricos, la toma de niveles de lípidos plasmáticos, glucosa, presión arterial, análisis de factores biológicos, valoración de gasto energético y la contestación de las encuestas sobre autoconcepto y ansiedad, los cuales se aplicarán en tres momentos diferentes. Al incumplir con este protocolo quedaría excluido del estudio.

La muestra de estudio estará formada por 1 solo grupo de alumnos de género masculino y femenino, entre los 11 y 15 años de edad, pertenecientes a una escuela secundaria de la localidad, que presenten obesidad.

Siendo un estudio longitudinal, las mediciones antes mencionadas se llevarán a cabo en tres etapas: primera medición: enero de 2015, Segunda medición: enero de 2016, tercera medición: enero de 2017, teniendo en cuenta que las mediciones se realizarán al mismo grupo de trabajo.

### 1. Descripción de Variables a medir:

#### 1.1. Composición corporal (Mediciones antropométricas)

**1.1.1 Bod Pod.** Para el análisis de la composición corporal se utilizará el Bod Pod que es una cápsula con un sistema de pletismografía por desplazamiento de aire. La prueba dura aproximadamente 10 minutos y los participantes tendrán que entrar con ropa adecuada para el estudio (traje de baño y gorro).

Fecha \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Iniciales \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ 2/8  
 Facultad de Organización Deportiva, UANL / Campus Ciudad Universitaria, C.P. 66451, San Nicolás de los Garza, N.L. México  
 Investigador Principal: Dr. Oswaldo Ceballos Gurrola  
 Telefax: + 52(81)8352-2356 oscogu@hotmail.com



Universidad Autónoma de Nuevo León  
**Facultad de Organización Deportiva**  
 Protocolo de Investigación  
**"INDICADORES BIOPSIICOSOCIALES COMO PREDICTORES DE LA OBESIDAD EN LA ADOLESCENCIA"**  
 Dr. Oswaldo Ceballos Gurrola

parte, dicho material de ADN obtenido para la investigación NO se utilizará para otros estudios posteriores en proyectos internos y externos, además de que no se almacenarán ni se utilizarán para base de datos genéticas y se desearán dichas muestras al terminar la investigación.

### 1.5 Gasto energético

Para el consumo de calorías se utilizarán calorímetros (Reloj Actigraph) que nos ayuda en la medición de la intensidad de la actividad física, el gasto de energía. Estos relojes serán colocados de forma aleatoria a los participantes, el cual llevará consigo el reloj Actigraph durante una semana para su medición.

### 1.6 Factor Psicológico

**1.6.1 Autoconcepto.** Se evaluará el autoconcepto forma AF-5, compuesto por 30 elementos que evalúan el autoconcepto en su vertiente social, académica, emocional, familiar y física.

**1.6.2 Ansiedad.** Se aplicará un cuestionario de ansiedad-estado (STAI) compuesto por 20 ítems para valorar el nivel de ansiedad de manera general.

### 2. Participación

Su participación y en su caso la de su hijo(a) en esta investigación es de carácter voluntario y sin remuneración. Tiene usted completa libertad de negarse a participar y/o de retirarse de la investigación en cualquier momento sin sanción o pérdida de los beneficios a que tendrá derecho antes de haber iniciado esta investigación.

Al finalizar la investigación usted será informado de los resultados.

Tiene usted el derecho a solicitar y recibir información sobre sus datos, registros, etc.

Toda información que usted suministre en el expediente es totalmente confidencial.

Esta es una investigación financiada con recursos de COMACYT. El presupuesto será ejercido por el Investigador Principal, Dr. Oswaldo Ceballos Gurrola a fin de cubrir todos los gastos originados en el presente Estudio.

Fecha \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Iniciales \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ 4/8  
 Facultad de Organización Deportiva, UANL / Campus Ciudad Universitaria, C.P. 66451, San Nicolás de los Garza, N.L. México  
 Investigador Principal: Dr. Oswaldo Ceballos Gurrola  
 Telefax: + 52(81)8352-2356 oscogu@hotmail.com



# ANEXO 3. Resolución del comité de Bioética



**Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud, UANL**

**Dictamen del Comité de Ética en Investigación, COBICIS**

**Resolución del Comité de Ética / Bioética**

**Dr. Sc Oswaldo Ceballos Gurrola**  
Investigador Principal

Protocolo: FOD: "INDICADORES BIOPICOSOCIALES COMO PREDICTORES DE LA OBESIDAD EN LA ADOLESCENCIA"

COBICIS-A-3.9-2013  
Versión 03 (18-Oct-2013)  
Vigencia a partir de 01-Ene-2014

**COBICIS**  
Comité de Bioética en Investigación en Ciencias de la Salud  
COFEPRIS 103300538X0322  
CONBIOETICA 19CEI01920131218

**2014**





Monterrey, N.L. a 17 de agosto 2014

Oficio E-38.9-001-2014  
Asunto: Resolución COBICIS  
Hoja 1 / 2

**RESOLUCIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA / BIOÉTICA**

**Dr. Sc Oswaldo Ceballos Gurrola**  
Investigador Principal  
Presente.-

REFERENCIA: "Indicadores Biopsicosociales como Predictores de la Obesidad en la Adolescencia".  
Protocolo FOD-38.90014.03CGO. Versión 2.0. Fecha: 10-ago-2014.  
Molestia y Grupo de la Investigación: "D-64-F"  
Sitio: Facultad de Organización Deportiva, UANL. Folio de Protocolo de Investigación FOD-A001. Comité de Bioética en Investigación en Ciencias de la Salud, COBICIS, Fodo CONBIOETICA. 19-CEI-01920131218.  
Dictamen Favorable COBICIS: 38.9/2014.03CGO.  
Investigador Principal: Dr. Sc Oswaldo Ceballos Gurrola. osaga@hotmail.com. Patrocinador: CONACYT, UANL.

En cumplimiento a las Buenas Prácticas Clínicas, le informamos:

El Comité de Bioética en Investigación en Ciencias de la Salud del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud de la UANL, ha evaluado los documentos por Usted sometidos:

- 1) PROTOCOLO de Estudio Clínico. (Versión 2.0, en español, 10 de agosto de 2014),
- 2) FORMA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO del protocolo (Versión 2.0, en español, 10 de agosto de 2014)
- 3) FORMA DE ASSENTIMIENTO INFORMADO del protocolo (Versión 2.0, en español, 10 de agosto de 2014)
- 4) FOLLETO DEL INVESTIGADOR (Versión 2.0, en español, 10 de agosto de 2014)

Resolución:  
**Aprobado. Dictamen Favorable. Folio: COBICIS-38.9/2014.03CGO**



Comité de Bioética en Investigación en Ciencias de la Salud, COBICIS  
Registro COFEPRIS 103300538X0322  
CONBIOETICA 19CEI01920131218  
CONBIOETICA 19CEI01920131218



Comité de Bioética en Investigación en Ciencias de la Salud, COBICIS  
Registro COFEPRIS 103300538X0322  
CONBIOETICA 19CEI01920131218  
CONBIOETICA 19CEI01920131218



Monterrey, N.L. a 17 de agosto 2014

Oficio E-38.9-001-2014  
Asunto: Resolución COBICIS  
Hoja 1 / 2

Esta resolución cumple con el apartado 3.1.2 de la Conferencia Internacional de Armonización (ICHM) sobre Requerimientos Técnicos para el registro de productos farmacéuticos para uso en humanos. Guía Tripartita armonizada de la Conferencia Internacional de Armonización: Llamamiento para la Buena Práctica Clínica (ICHM1).  
Artículos 96, 100 y 104 del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, México.

Toda vez que el protocolo original, así como la carta de consentimiento informado sufran modificaciones, éstas deberán someterse para su re-aprobación.

**Atentamente**




**COBICIS**  
Comité de Ética en Investigación  
COBICIS, UANL  
CONBIOETICA  
19-CEI-01920131218

**Dr. med. Eloy Cárdenas Estrada**  
Presidente del Comité de Bioética en Investigación en Ciencias de la Salud

Esta Resolución queda registrada ante el Comité de Bioética en Investigación en Ciencias de la Salud con el Folio: **COBICIS-38.9/2014.03CGO**

C.c.p. Archivo COBICIS  
ECE/ggg

## 11.BIBLIOGRAFÍA

- Archer SN, Robilliard DL, Skene DJ, Smits M, Williams A, Arendt J and von Schantz, M. 2003. A length polymorphism in the circadian clock gene *Per3* is linked to delayed sleep phase syndrome and extreme diurnal preference. *Sleep*. 26(4): 413–415.
- Atkinson G and Davenne, D. 2007. Relationships between sleep, physical activity and human health. *Physiology and Behavior*. 90(2–3): 229–235.
- Bachmann V, Klein C, Bodenmann S, Schäfer N, Berger W, Brugger P and Landolt H.-P. 2012. The BDNF Val66Met Polymorphism Modulates Sleep Intensity: EEG Frequency- and State-Specificity. *Sleep*. 35(3): 335–344.
- Backhaus J, Junghanns K and Hohagen F. 2004. Sleep disturbances are correlated with decreased morning awakening salivary cortisol. *Psychoneuroendocrinology*. 29(9): 1184–1191.
- Bandín C, Martínez-Nicolas A, Ordovás JM, Ros Lucas JA, Castell P, Silvente T, ... Garaulet M. 2013. Differences in circadian rhythmicity in *CLOCK* 3111T/C genetic variants in moderate obese women as assessed by thermometry, actimetry and body position. *International Journal of Obesity*. 37(8): 1044–1050.
- Barriga-Ibars C, Rodríguez-Moratinos A, Esteban S y Rial R. 2005. Interrelaciones entre el sueño y el estado inmune. *Revista de Neurología*. 40(9): 548-556.
- Born J, Lange T, Hansen K, Molle M, Fehm HL. 1997. Effects of sleep and circadian rhythm on human circulating immune cells. *The Journal of Immunology*. 158: 4454—4464.
- Brunsgaard H. 2005. Physical activity and modulation of systemic low-level inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*. 78:819-835.
- Caratachea MC. 2007. Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*. 20(3):213–221.

- Carpen JD, Archer SN, Skene DJ, Smits M y Von Schantz M. 2005. A single-nucleotide polymorphism in the 5'-untranslated region of the hPER2 gene is associated with diurnal preference. *Journal of Sleep Research*. 14(3): 293–297.
- Cirelli C. 2006. Cellular consequences of sleep deprivation in the brain. *Sleep Medicine Reviews*. 10:307–21.
- Chen K, Li F, Li J, Cai H, Strom S, Bisello A, ... and Szalai AJ. 2006. Induction of leptin resistance through direct interaction of C-reactive protein with leptin. *Nature medicine*. 12(4): 425-432.
- Chennaoui M, Sauvet F, Drogou C, Van Beers P, Langrume C, Guillard M, ... Gomez-Merino D. 2011. Effect of one night of sleep loss on changes in tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) levels in healthy men. *Cytokine*. 56(2): 318–324.
- Colten HR, Altevogt BM. 2006. *Sleep Disorders and Sleep Deprivation: An Unmet Public Health Problem*. The National Academies press: Washington, DC. p.57.
- Contreras LÉ, Santiago GJ 2011. Obesidad, síndrome metabólico y su impacto en las enfermedades Cardiovasculares. *Revista Biomedicina* 2011. 22(3):103-15.
- Ebisawa T, Uchiyama M, Kajimura N, Mishima K, Kamei Y, Katoh M, Watanabe T, Sekimoto M, Shibui K, Kim K. 2001. Association of structural polymorphisms in the human period3 gene with delayed sleep phase syndrome. *EMBO Reports*. 2:342-346
- Englund A, Kovanen L, Saarikoski ST, Haukka J, Reunanen A, Aromaa A, Lönnqvist J, Partonen T. 2009. NPAS2 and PER2 are linked to risk factors of the metabolic syndrome. *Journal of Circadian Rhythms*. 7:5.
- Garaulet M., Corbalán M. D, Madrid JA, Morales E, Baraza JC, Lee YC, & Ordovas JM. 2010. CLOCK gene is implicated in weight reduction in obese patients participating in a dietary programme based on the Mediterranean diet. *International Journal of Obesity*. 34(3): 516–523.

- Garaulet M, Corbalán-Tutau MD, Madrid JA, Baraza JC, Parnell LD, Lee YC y Ordovas JM. 2010. PERIOD2 Variants Are Associated with Abdominal Obesity, Psycho-Behavioral Factors, and Attrition in the Dietary Treatment of Obesity. *Journal of the American Dietetic Association*. 110(6): 917–921.
- Garaulet M, Sánchez-Moreno C, Smith CE, Lee YC, Nicolás F and Ordovás JM. 2011. Ghrelin, sleep reduction and evening preference: Relationships to clock 3111 T/C SNP and weight loss. *PLoS ONE*. 6(2).
- Giese M, Unternährer E, Hütti, H, Beck J, Brand S, Calabrese P, ... and Eckert A. 2013. BDNF: an indicator of insomnia?. *Molecular psychiatry*, 19(2): 151.
- Gozal D, Lipton AJ and Jones KL. 2002. Circulating vascular endothelial growth factor levels in patients with obstructive sleep apnea. *Sleep*. 25(1): 59–65.
- Gupta NK, Mueller WH, Chan W, Meininger JC. 2002. Is obesity associated with poor sleep quality in adolescents?. *American Journal of Human Biology*. 14(6):762–768.
- Gutiérrez JP, Rivera D, Shamah-Levy T, Villalpando HS, Franco A, Cuevas NL, Romero MM. y Hernández M. 2012. Encuesta nacional de Salud y Nutrición. Resultados Nacionales. Cuernavaca (México): Instituto Nacional de Salud Pública.
- Hasler G, Buysse DJ, Klaghofer R, Gamma A, Ajdacic V, Eich D, ... and Angst J. 2004. The association between short sleep duration and obesity in young adults: a 13-year prospective study. *Sleep*. 27(4): 661-666.
- Hida A, Kitamura S and Mishima K. 2012. Pathophysiology and pathogenesis of circadian rhythm sleep disorders. *Journal of Physiological Anthropology*. 31(1): 7.
- Iwase T, Kajimura N, Uchiyama M, Ebisawa T, Yoshimura K, Kamei Y, Shibui K, Kim K, Kudo Y, Katoh M, Watanabe T, Nakajima T, Ozeki Y, Sugishita M, Hori T, Ikeda M, Toyoshima R, Inoue Y, Yamada N, Mishima K, Nomura M, Ozaki N,

- Okawa M, Takahashi K, Yamauchi T. 2002. Mutation screening of the human Clock gene in circadian rhythm sleep disorders. *Psychiatry Research*. 15(109):121–128.
- Katzenberg D, Young T, Finn L, Lin L, King DP, Takahashi JS and Mignot EA. (1998). CLOCK polymorphism associated with human diurnal preference. *Sleep*. 21:569-576
- Knutson KL, Spiegel K, Penev P, and Van Cauter E. 2007. The metabolic consequences of sleep deprivation. *Sleep Medicine Reviews*. 11(3):163–178.
- Ko CH y Takahashi JS. 2006. Molecular components of the mammalian circadian clock. *Human Molecular Genetics* 15(2):271–277.
- Kondratova AA y Kondratov RV. 2012. The circadian clock and pathology of the ageing brain. *Nature Reviews Neuroscience*.
- Kröger C, Roth K. 2003. *Escuela de balón, Guía para principiantes (1era reimpression de la 1era edición en español. Paidotribo: Barcelona.*
- Kunorozva L, Stephenson KJ, Rae DE and Roden LC. 2012. Chronotype and PERIOD3 Variable Number Tandem Repeat Polymorphism in Individual Sports Athletes. *Chronobiology International*. 29(8): 1004–1010.
- Lang UE, Hellweg R, Sander T and Gallinat J. 2009. The Met allele of the BDNF Val66Met polymorphism is associated with increased BDNF serum concentrations. *Molecular Psychiatry*. 14(2): 120–122.
- Lee HJ, Kim L, Kang SG, Yoon HK, Choi JE, Park YM, ... Kripke DF. 2011. PER2 variation is associated with diurnal preference in a Korean young population. *Behavior Genetics* 41(2): 273–277.
- Leproult R, and Copinschi G. 1997. Sleep Loss Results in an Elevation of Cortisol Levels the Next Evening. *Sleep*. 20(10): 865-870.

- Lomas AR. 2011. Perfil de lípidos en niños con sobrepeso y obesidad que participan en un programa de intervención de actividad física con orientación nutricional. Tesis Maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Lopez-Minguez J, Gómez-Abellán P and Garaulet M. 2016. Circadian rhythms, food timing and obesity. *Proceedings of the Nutrition Society*. 75: 501–511.
- Lumeng JC, Somashekar D, Appugliese D, Kaciroti N, Corwyn RF, and Bradley R. H. 2007. Shorter Sleep Duration Is Associated With Increased Risk for Being Overweight at Ages 9 to 12 Years. *Pediatrics*. 120(5): 1020–1029.
- Méndez N, Uribe M. 2002. Obesidad, Epidemiología, fisiopatología y manifestaciones clínicas. *Manual moderno: México*, pp. 8-63.
- Mente A, Yusuf S, Islam S, McQueen MJ., Tanomsup S, Onen CL. 2010. Metabolic Syndrome and Risk of Acute Myocardial Infarction. *Journal of American College of Cardiology*. 55(21): 2390-8.
- McClung CA. 2007. Circadian genes, rhythms and the biology of mood disorders. *Pharmacology and Therapeutics*. 114(2): 222–232.
- Monteleone P, Tortorella A, Docimo L, Maldonato MN, Canestrelli B, De Luca L and Maj M. 2008. Investigation of 3111T/C polymorphism of the CLOCK gene in obese individuals with or without binge eating disorder: Association with higher body mass index. *Neuroscience Letters*. 435(1): 30–33.
- Morley JJ, Kushner I. 1982. Serum C-reactive protein concentrations in disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 389:406–18.
- Omisade A, Buxton OM, and Rusak B. 2010. Impact of acute sleep restriction on cortisol and leptin levels in young women. *Physiology and Behavior*. 99(5): 651–656.
- Panagiotakos DB, Pitsavos C, Yannakoulia M, Chrysohoou C, Stefanadis C. 2005. The implication of obesity and central fat on markers of chronic inflammation: The ATTICA study. *Atherosclerosis*. 183: 308–315.

- Patel SR, Ayas NT, Malhotra MR, White DP, Schernhammer ES, Speizer FE, ... Hu FB. 2004. A Prospective Study of Sleep Duration and Mortality Risk in Women. *Sleep: Journal of Sleep and Sleep Disorders Research*. 27(3): 440–444.
- Pedrazzoli M, Secolin R, Esteves LOB, Pereira DS, Koike B del V, Louzada FM, ... Tufik S. 2010. Interactions of polymorphisms in different clock genes associated with circadian phenotypes in humans. *Genetics and Molecular Biology*. 33(4): 627–632.
- Pereira DS, Tufik S, Louzada FM, Benedito-Silva AA, Lopez AR, Lemos NA, Korczak AL, D’Ameida V. and Pedrazzoli M. 2005. Association of the length polymorphism in the human PER3 gene with the delayed sleep-phase syndrome: does latitude have an influence upon it? *Sleep*. 28: 29–32.
- Peña M, Bacallao J. 2001. La obesidad y sus tendencias en la Región. *Revista Panamericana de Salud Pública*. 10(2): 101-110.
- Rehman J, Considine RV, Bovenkerk JE, Li J, Slavens CA, Jones RM, and March, KL. 2003. Obesity is associated with increased levels of circulating hepatocyte growth factor. *Journal of the American College of Cardiology*. 41(8): 1408–1413.
- Reppert SM, Weaver DR. 2001. Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu Rev Physiol*. 63:647–676.
- Reppert SM, Weaver DR. 2002. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*. 418: 935–941.
- Reilly JJ, Armstrong J, Dorosty AR, Emmett PM, Ness A, Rogers I, ... Sherriff A. 2005. Early life risk factors for obesity in childhood: cohort study. *British Medical Journal*. 330(7504): 1357.
- Rivera JA. 2012. Obesidad en México: Recomendaciones para una política de Estado México: UNAM, pp. 46.

- Ruiz FS, Andersen ML, Martins RC, Zager A, Lopes JD, Tufik S. 2010. Immune alterations after selective rapid eye movement or total sleep deprivation in healthy male volunteers. *Innate Immunity*. 18(1): 44-54.
- Shearer WT, Reuben JM, Mullington JM, Price NJ, Lee BN, Smith EO. 2001. Soluble TNF-alpha receptor 1 and IL-6 plasma levels in humans subjected to the sleep deprivation model of spaceflight. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 107:165–70.
- Roenneberg T, Merrow M. 2003. The network of time: understanding the molecular circadian system. *Current Biology*. 13:198–207.
- Serretti A, Benedetti F, Mandelli L, Lorenzi C, Pirovano A, Colombo C, Smeraldi E. 2003. Genetic dissection of psychopathological symptoms: insomnia in mood disorders and Clock gene polymorphism. *American Journal of Medical Genetics*. 121(B):35–38.
- Silha JV, Krsek M, Sucharda P and Murphy LJ. 2005) Angiogenic factors are elevated in overweight and obese individuals. *International Journal of Obesity*. 29(11): 1308–1314.
- Spiegel K, Leproult R, L'Hermite-Balériaux M, Copinschi G, Penev PD and Van Cauter E. 2004. Leptin levels are dependent on sleep duration: Relationships with sympathovagal balance, carbohydrate regulation, cortisol, and thyrotropin. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 89(11): 5762–5771.
- Stuart B. 2011. *The genetics of circadian rhythms*. Elsevier: USA, pp. 237.
- Schulz R, Humme, C, Heinemann S, Seeger W and Grimminger F. 2002. Serum Levels of Vascular Endothelial Growth Factor Are Elevated in Patients with Obstructive Sleep Apnea and Severe Nighttime Hypoxia. *Critical Care Medicine*. 165: 67–70.
- Tan X, Saarinen A, Mikkola TM, Tenhunen J, Martinmäki S, Rahikainen A, ... Cheng S. 2013. Effects of exercise and diet interventions on obesity-related sleep

- disorders in men: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*. 14(1): 235.
- Van Cauter E and Knutson KL. 2008. Sleep and the epidemic of obesity in children and adults. *European Journal of Endocrinology*. 159(1): 59–66.
- Viola AU, Archer SN, James LM, Groeger JA, Lo JC, Skene DJ, Dijk DJ. 2007. *PER3* Polymorphism Predicts Sleep Structure and Waking Performance. *Current Biology*. 17(7): 613–618.
- Vorona R. D, Winn MP, Babineau TW, Eng BP, Feldman HR y Ware JC. 2005. Overweight and obese patients in a primary care population report less sleep than patients with a normal body mass index. *Archives of Internal Medicine*. 165(1): 25–30.
- Yamaguchi M, Kotani K, Tsuzaki K, Takagi A, Motokubota N, Komai N, ... Nagai N. 2015. Circadian rhythm genes *CLOCK* and *PER3* polymorphisms and morning gastric motility in humans. *PLoS ONE*. 10(3): 1–13.
- Young T, Peppard PE, Gottlieb DJ. 2002. Epidemiology of obstructive sleep apnea: a population health perspective. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*; 165: 1217-39.
- Youngstedt SD. 2005. Effects of exercise on sleep. *Clinics in Sports Medicine*. 24(2): 355–365.
- Zielinski MR and Krueger JM. 2011. Sleep and innate immunity. *Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)*. 3(5): 632–642.

## **12. RESUMEN BIBLIOGRÁFICO**

Brenda Juanita Peña Carrillo

Candidato para el grado de

Maestría en Ciencias con orientación en Inmunobiología

Tesis: INFLUENCIA DE UN PROGRAMA DE SALUD EN LOS PARÁMETROS METABÓLICOS RELACIONADOS A CALIDAD DE SUEÑO EN ADOLESCENTES CON OBESIDAD Y SU ASOCIACIÓN GENÉTICA

Campo de estudio: Ciencias de la Salud

Datos personales: Nacida en Monterrey, NL, México el 18 de Julio de 1991, hija de María Concepción Carrillo Muñoz y Marcial Peña Ovalle.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León obteniendo el grado de Licenciado en Biotecnología Genómica en 2014.