

Original

Relación del polimorfismo rs9939609 del gen FTO con factores de riesgo cardiovascular y niveles de adipocitoquinas en pacientes con obesidad mórbida

D. A. de Luis, R. Aller, R. Conde, O. Izaola, B. de la Fuente, M. Gonzalez Sagrado, D. Primo y M. Ruiz Mambrilla

Centro de Investigación de Endocrinología y Nutrición Clínica. Facultad de Medicina. Hospital Rio Hortega. Universidad de Valladolid. Valladolid. España.

Resumen

Introducción: Algunos polimorfismos del gen asociado con la masa grasa y la obesidad (FTO) se han relacionado con la obesidad y parámetros bioquímicos. Nuestro objetivo fue analizar la relación del polimorfismo rs9939609 del gen FTO con el peso corporal, factores de riesgo cardiovascular y los niveles séricos de adipocitoquinas en una muestra de pacientes con obesidad mórbida.

Material y métodos: Una muestra de 129 pacientes con obesidad mórbida (IMC > 40) se analizó en un diseño de corte transversal. A todos los pacientes se les determinó el peso, presión arterial, glucemia basal, proteína C reactiva (PCR), insulina, resistencia a la insulina (HOMA-R), colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol, triglicéridos y adipocitoquinas (adiponectina leptina, resistina, TNF-alfa, y los niveles de interleucina-6). Se evaluó la masa grasa mediante bioimpedancia tetrapolar y registró prospectivamente la ingesta de nutrientes durante tres días. En todos ellos se genotipo el polimorfismo del gen FTO (rs9939609).

Resultados: Cuarenta y un pacientes (31,8%) tenían el genotipo TT (grupo genotipo salvaje), 55 pacientes (42,6%) el genotipo TA y 33 pacientes (25,6%) el genotipo AA. El índice de masa corporal (43,6 (2,6) kg/m² vs. 44,1 (2,9) kg/m²; p < 0,05), masa grasa (52,0 (12,5) kg vs. 56,3 (11,7) kg; p < 0,05), el peso (111,6 (16,2) kg vs. 114,9 (18,9) kg; p < 0,05), niveles de proteína C reactiva (6,1(4,3) mg/dl vs. 9,8 (7,1) mg/dl; p < 0,05) y niveles de leptina (65,9 (52,2) ng/ml vs. 110,9 (74,1); < 0,05) fueron estadísticamente mayores en los pacientes que presentaron el alelo mutado (A).

Conclusiones: El polimorfismo del gen FTO, rs9939609, se asocia con un mayor peso, masa grasa y niveles circulantes de leptina y proteína C reactiva en pacientes con obesidad mórbida.

(Nutr Hosp. 2012;27:1184-1189)

DOI:10.3305/nh.2012.27.4.5851

Palabras clave: Adipocitoquinas. Factores de riesgo cardiovascular. rs9939609. Obesidad mórbida.

Correspondencia: D. A de Luis.
Profesor de Endocrinología y Nutrición.
Director Ejecutivo del Centro de Investigación de Endocrinología y Nutrición Clínica.
Universidad de Valladolid.
C/Los perales, 16
47130 Simancas. Valladolid. España.
E-mail: dadluis@yahoo.es

Recibido: 13-III-2012.

Aceptado: 21-IV-2012.

RELATION OF THE rs9939609 GENE VARIANT IN FTO WITH CARDIOVASCULAR RISK FACTOR AND SERUM ADIPOKINE LEVELS IN MORBID OBESE PATIENTS

Abstract

Background: Common polymorphisms of the fat mass and obesity associated gene (FTO) have been linked to obesity in some populations. The aim of our study was to analyze the relationship of the rs9939609 FTO gene polymorphism on body weight, cardiovascular risk factors and serum adipokine levels in morbid obese patients.

Material and methods: A sample of 129 patients with obesity was analyzed in a cross sectional design. Weight, blood pressure, basal glucose, c-reactive protein (CRP), insulin, insulin resistance (HOMA), total cholesterol, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol, triglycerides blood and adipocytokines (leptin, adiponectin, resistin, TNF alpha, and interleukin 6) levels were measured. A tetrapolar bioimpedance and a prospective serial assessment of nutritional intake with 3 days written food records were realized. Genotype of FTO gene polymorphism (rs9939609) was studied.

Results: Forty three patients (31.8%) had TT genotype, 55 patients (42.6%) TA genotype and 33 patients (25.6%) AA genotype. Body mass index (43.6 (2.6) kg/m² vs. 44.1 (2.9) kg/m²; p < 0.05), fat mass (52.0 (12.5) kg vs. 56.3 (11.7) kg; p < 0.05), weight (111.6 (16.2) kg vs. 114.9 (18.9) kg; p < 0.05), levels of C reactive protein (6.1 (4.3) mg/dl vs. 9.8 (7.1) mg/dl; p < 0.05) and levels of leptin (65.9 (52.2) ng/ml vs. 110.9 (74.1); < 0.05) were higher in mutant type group (A allele) than wild genotype group (TT).

Conclusion: The FTO gene polymorphism, rs9939609, was found to be associated with weight, fat mass, C reactive protein and leptin levels in morbid obese patients with A allele.

(Nutr Hosp. 2012;27:1184-1189)

DOI:10.3305/nh.2012.27.4.5851

Key words: Adipokines. Cardiovascular risk factors. rs9939609. Morbid obesity.

Introducción

La obesidad, que es un factor de riesgo para la diabetes tipo 2, hipertensión, cáncer y enfermedades cardiovasculares, siendo uno de los trastornos más comunes en todo el mundo. La elevada incidencia de la obesidad está determinada por factores ambientales y genéticos¹⁻². Algunos polimorfismos del gen asociado con la masa grasa y la obesidad (FTO) se han relacionado con la obesidad³⁻⁵. Una de estas variantes genéticas (rs9939609), situada en el primer intrón FTO, se ha relacionado con un mayor riesgo de obesidad y diabetes mellitus tipo 2⁶⁻¹⁵, no obstante los resultados en la literatura son contradictorios. En algunas ocasiones la asociación ha sido claramente demostrada¹⁴⁻¹⁵, y en algunos estudios no se ha podido replicar el resultado¹⁶. Las razones de estos resultados discrepantes no están claras, pueden ser debidos a la falta de ajuste por algunos factores de confusión, especialmente la ingesta de la dieta, ya que la ingesta es importante para modular la susceptibilidad genética de los trastornos relacionados con el estilo de vida como la obesidad. Por otra parte las muestras analizadas han sido heterogéneas pudiendo influir en la variabilidad de los resultados, variables como; el índice de masa corporal (IMC) basal, la presencia de diabetes mellitus, la edad e incluso la etnia.

Por otro lado, la visión actual de tejido adiposo es la de un órgano secretor activo, enviando a las señales que modulan el apetito, sensibilidad a la insulina, el gasto energético, la inflamación y la inmunidad. Estas acciones son realizadas por las adipocitoquinas, que son proteínas producidas principalmente por los adipocitos¹⁷. Los estudios que han evaluado la relación de este polimorfismo (rs9939609) del gen FTO con los niveles de niveles de adipocitoquinas circulantes son escasos¹⁸⁻²⁰. Los datos obtenidos han sido contradictorios al evaluar los niveles de adiponectina, leptina y la interleucina-6¹⁸⁻²⁰ y hasta la fecha no se ha evaluado esta relación en pacientes con obesidad mórbida.

Nuestro objetivo fue analizar la relación del polimorfismo rs9939609 del gen FTO con el peso corporal, factores de riesgo cardiovascular y los niveles séricos de adipocitoquinas en una muestra de pacientes con obesidad mórbida.

Material y métodos

Sujetos

Una muestra de 129 pacientes con obesidad mórbida (IMC > 40) se analizó en un diseño de corte transversal. El Comité de ética local aprobó el protocolo y todos los pacientes firmaron un consentimiento antes de ser incluidos en el estudio. Los criterios de exclusión fueron; antecedentes de enfermedad cardiovascular o accidente cerebrovascular en el año previo, el colesterol total > 250 mg/dl, triglicéridos > 300 mg/dl, presión arterial > 140/90 mmHg, glucosa plasmática en ayunas

> 110 mg/dl, así como el uso de sulfonilureas, tiazolidinedionas, insulina, inhibidores de la dipeptidil tipo IV, exenatide, glucocorticoides, agentes antineoplásicos, bloqueadores del receptor de angiotensina e IECA.

Procedimiento

A todos los pacientes se les determinó el peso, presión arterial, glucemia basal, proteína C reactiva (PCR), insulina, resistencia a la insulina (HOMA-R), colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol, triglicéridos y adipocitoquinas (adiponectina leptina, resistina, TNF-alfa, y los niveles de interleucina-6). Se evaluó la masa grasa mediante bioimpedancia tetrapolar y registró prospectivamente la ingesta de nutrientes durante tres días. En todos ellos se genotipo el polimorfismo del gen FTO (rs9939609).

Genotipado rs9939609 del gen FTO

Los oligonucleótidos cebadores y la sondas fueron diseñados con el 5,0 Beacon Designer (Premier Biosoft International®, LA, CA). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó con 50 ng de DNA genómico, 0,5 ul de cada cebador de oligonucleótidos (cebador directo: 5'-GGCTCTTGAATGAAATAGG-3' y reverso 5'-GACTGTTACCTATTAATAACTT-TAG-3 "y 0,25 ul de cada una de la sondas (sonda salvaje: 5'-Fam-ATC AAG AAG GTC AGC ACG TCA GCC-BHQ-1-3') y (sonda mutante: 5'-Texas rojo-ATC AAG AGC ACA GTC ATT AAG GCC-BHQ-1-3'.) en un volumen final 25 uL (Termociclador iCycler IQ (Bio-Rad®), Hercules, CA). El ADN fue desnaturalizado a 95° C durante 3 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 95° C durante 15 s, y a 55° durante 45 s. La PCR se realizaron en un volumen de 25 uL final con 12,5 l de IQTM Supermix (Bio-Rad®, Hercules, CA) con la polimerasa de ADN Taq arranque en caliente. Se analizó el equilibrio de Hardy Weinberg con un valor de $p > 0,05$.

Ensayos bioquímicos

Los niveles de glucosa en plasma fueron determinados mediante el uso de un método de glucosa oxidasa automatizado (analyzer de glucosa en 2, Beckman Instruments, Fullerton, California). La insulina se midió por RIA (RIA Diagnostic Corporation, Los Angeles, CA) con una sensibilidad de 0,5 mUI/L (rango normal de 0,5 a 30 mUI/L)²¹ y el modelo de homeostasis de resistencia a la insulina (HOMA-R) calcula utilizando estos valores²². La proteína C reactiva (PCR) se midió por inmunoturbimetry (Roche Diagnostcis GmbH, Mannheim, Alemania), con un rango normal de (0-7 mg/dl) y la sensibilidad analítica de 0,5 mg/dl. Las concentraciones séricas de colesterol

total y triglicéridos se determinaron mediante un ensayo colorimétrico enzimático (Technicon Instruments, Ltd., New York, NY, EE.UU.), mientras que el colesterol HDL se determinó enzimáticamente en el sobrenadante después de la precipitación de otras lipoproteínas con sulfato de dextrano y magnesio. El colesterol LDL se calculó mediante la fórmula de Friedewald.

Con respecto a las adipocitoquinas, la resistina se midió por ELISA (Biovendor Laboratory, Inc., Brno, República Checa) con una sensibilidad de 0,2 ng/ml con un rango normal de 4-12 ng/ml (23). La leptina se midió por ELISA (Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Texas, EE.UU.) con una sensibilidad de 0,05 ng/ml y un rango normal de 10 a 100 ng/ml²⁴. Interleucina-6 y TNF alfa se determinó por ELISA (R & D systems, Inc., Mineapolis, EE.UU.) con una sensibilidad de 0,7 pg/ml y 0,5 pg/ml, respectivamente. Los valores normales de IL-6 fue (desde 1,12 hasta 12,5 pg/ml) y TNF-alfa (0,5-15,6 pg/ml)²⁵⁻²⁶. La adiponectina se midió por ELISA (R & D Systems, Inc., Mineapolis, EE.UU.) con una sensibilidad de 0,246 ng/ml y un rango normal de 8.65 a 21.43 ng/ml²⁷.

Determinaciones antropométricas y control de ingesta

El peso corporal se midió con una precisión de 0,1 kg y el índice de masa corporal calculado como el peso corporal en kg/(altura en m²). Se midió la cintura (menor diámetro entre el proceso xifoides y la cresta ilíaca) y la cadera (diámetro mayor a grandes trocánteres) para obtener el índice cintura-cadera (ICC). Se realizó una bioimpedancia eléctrica tetrapolar para determinar la grasa corporal con una precisión de 5 g²⁸ (Biodinámica modelo 310e, Seattle, WA, EE.UU.). La presión arterial se midió dos veces tras un descanso de 10 minutos con un esfigmomanómetro de mercurio, y se promediaron los resultados.

A los pacientes se les realizó una evaluación prospectiva de la ingesta nutricional de 3 días mediante un registro de alimentos. Los registros fueron revisados por una dietista y analizados con un sistema informático basado en tablas nacionales de composición de alimentos²⁹.

Análisis estadístico

El tamaño de la muestra fue calculado para detectar diferencias en torno a 1,5 kg en el peso corporal con un 90% de la potencia y la significancia del 5% (n = 125). Los resultados se expresaron como media ± desviación estándar. La distribución de las variables se analizaron con la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Los pacientes fueron divididos en función del genotipo en 2 grupos (TT, genotipos salvaje) y (TA y AA, genotipo mutante), analizándose como un modelo dominante. Las variables cuantitativas con distribución normal se analizaron con la prueba de t de Student. Las variables no

Tabla I
Variables antropométricas y presión arterial

Genotipos	TT (n = 41)	AT-AA (n = 88)
Edad (años)	50,0 (17,3)	48,9 (16,2)
IMC (kg/m ²)	43,6 (2,6)	44,1 (2,9)*
Peso (kg)	111,6 (16,2)	114,9 (18,9)*
Masa grasa (kg)	52,0 (12,5)	56,3 (11,7)*
Cir. cintura	125,5 (12,8)	125,5 (11,4)
ICC	0,94 (0,08)	0,93 (0,07)
TAS (mmHg)	135,9 (14,8)	135,4 (14,4)
TAD (mmHg)	87,5 (8,9)	86,2 (5,9)

IMC: Índice de masa corporal; ICC: Índice cintura cadera; TAS: Tensión arterial sistólica; TAD: tensión arterial diastólica.

*Diferencias significativas entre ambos grupos.

paramétricas fueron analizadas con la prueba de U-Mann-Whitney. Las variables cualitativas se analizaron mediante el test de chi-cuadrado, con corrección de Yates cuando fue necesario, y la prueba exacta de Fisher. Un valor de p inferior a 0,05 fue considerado estadísticamente significativo.

Resultados

Un total de 129 pacientes firmaron el consentimiento informado y fueron incluidos en el estudio. La edad media fue de 49,9 (15,4) años y el índice de masa corporal (IMC) medio fue de 43,8 (4,9) kg/m², con 99 mujeres (76,7%) y 30 hombres (23,3%).

Cuarenta y un pacientes (12 mujeres/29 varones) (31,8%) tenían el genotipo TT (grupo genotipo salvaje), 55 pacientes (11 varones/44 mujeres) (42,6%) tenían el genotipo TA y 33 pacientes (7 varones/26 mujeres) (25,6%) de AA (estos dos últimos genotipos formaban el grupo con genotipo mutante). No se observaron diferencias de la distribución por sexo entre los diferentes genotipos, ni en las edades medias.

La tabla I muestra las variables antropométricas y la presión arterial en los dos grupos. El IMC (43,6 (2,6) kg/m² vs. 44,1 (2,9) kg/m²; p < 0,05), masa grasa (52,0 (12,5) kg vs. 56,3 (11,7) kg; p < 0,05) y el peso (111,6 (16,2) kg vs. 114,9 (18,9) kg; p < 0,05) fueron estadísticamente mayores en los pacientes que presentaron el alelo mutado (A). La circunferencia de la cintura, índice cintura cadera y presión arterial fueron similares en ambos grupos.

La tabla II muestra las diferencias en los factores de riesgo cardiovascular. El grupo con genotipo mutante presentó unos mayores niveles de proteína C reactiva (6,1 (4,3) mg/dl vs. 9,8 (7,1) mg/dl; p < 0,05). El resto de parámetros fueron similares en ambos grupos.

La tabla III muestra la ingesta nutricional de 3 días. La ingesta calórica, de carbohidratos, grasas y proteínas fue similar en ambos grupos, sin diferencias estadísticamente significativas.

Tabla II
Variables bioquímicas

Genotipos	TT (n = 41)	AT-AA (n = 88)
Glucosa (mg/dl)	102,6 (14,1)	106,7 (13,1)
Col. total (mg/dl)	202,4 (37,7)	204,3 (25,4)
LDL-col. (mg/dl)	125,5 (30,4)	126,1 (38,3)
HDL-col. (mg/dl)	52,7 (10,7)	51,3 (11,4)
TG (mg/dl)	131,5 (55,5)	128,9 (46,9)
Insulina (mUI/L)	19,3 (13,3)	19,2 (12,4)
HOMA-R	5,2 (4,9)	4,9 (4,1)
PCR (mg/dl)	6,1 (4,3)	9,8 (7,1)*

Col: Colesterol; HOMA-R: Homeostasis model assessment; TG: Triglicéridos; PCR: Proteína C reactiva.

*Diferencias significativas entre ambos grupos.

Tabla III
Ingestas dietéticas

Genotipos	TT (n = 41)	AT-AA (n = 88)
Energía (kcal/día)	1.742,1 (620,1)	1.818,4 (567,2)
CH (g/día)	181,2 (546,1)	188,1 (53,4)
Grasa (g/día)	72,3 (31,2)	78,6 (32,1)
Proteína (g/día)	85,1 (19,3)	86,8 (21,1)

CH: Carbohidrato.

Sin diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

La tabla IV muestra los niveles de adipocitoquinas. Los niveles de leptina fueron significativamente mayores en el grupo con genotipo mutante (65,9 (52,2) ng/ml vs. 110,9 (74,1); < 0,05), sin diferencias entre los grupos de alelos.

Discusión

En nuestro trabajo hemos evaluado el papel del polimorfismo rs9939609 del gen FTO sobre la antropometría, factores de riesgo cardiovascular y adipocitoquinas circulante en pacientes con obesidad mórbida. Se detectó una asociación entre este polimorfismo y el índice de masa corporal (IMC), peso, masa grasa, niveles de proteína C reactiva y leptina circulante.

Tabla IV
Niveles séricos de adipocitoquinas

Genotipos	TT (n = 41)	AT-AA (n = 88)
IL 6 (pg/ml)	3,8 (4,1)	3,4 (3,6)
TNF- α (pg/ml)	7,0 (6,3)	6,3 (4,4)
Adiponectina (ng/ml)	46,2 (25,1)	35,4 (26,9)
Resistina (ng/ml)	4,4 (2,3)	4,3 (1,6)
Leptina (ng/ml)	65,9 (52,2)	110,9 (74,1)*

IL-6: Interleukina 6; TNF α : factor de necrosis tumoral alpha.

*Diferencias significativas entre ambos grupos.

La relación del polimorfismo rs9939609 del gen FTO con el peso corporal presenta resultados contradictorios en la literatura. En algunos trabajos se ha demostrado como otros polimorfismos del gen FTO (rs17817449 y rs1421085) se asocian con una serie de medidas de adiposidad como el peso, índice de masa corporal, masa grasa y la circunferencia de la cintura²⁹, sin embargo, el polimorfismo rs9939609 no se relacionaba con ningún parámetro antropométrico. Sin embargo, en otro trabajo¹⁹ sí que se ha demostrado una clara relación entre este polimorfismo (rs9939609) y el IMC, sobre todo en población asiática y en menor medida en población europea. El mecanismo por el cual los polimorfismos del gen FTO pueden influir en la obesidad es desconocida, se especula que el gen puede jugar un papel en la regulación del peso corporal, ya que es altamente expresado en el eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal³⁰.

Los diferentes resultados obtenidos en los trabajos de la literatura pueden ser debidos a diferentes factores, como por ejemplo; diferencias étnicas en las muestras evaluadas, diferentes IMC basales, interacción con la dieta, presencia de otras comorbilidades como la diabetes mellitus o incluso tratamientos frente a esas comorbilidades. En nuestro caso hemos evaluado una muestra homogénea de pacientes con obesidad mórbida, Caucásicos y sin otras comorbilidades asociadas, por otra parte la ingesta dietética fue similar en ambos grupos, no siendo por tanto un factor que influya en nuestro diseño.

Con respecto a las diferencias bioquímicas de ambos genotipos, elevación de los niveles de proteína C reactiva y leptina en los pacientes con el genotipo mutado. Los resultados en la literatura son también divergentes. En algunos trabajos se ha demostrado una relación entre este polimorfismo y alteraciones bioquímicas³¹. Por ejemplo, Tan et al.³² detectaron un incremento en la resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia en pacientes obesos con síndrome de ovario poliquístico, sin efecto sobre los niveles de glucosa. En otro estudio, variantes en el gen FTO se asociaban con el síndrome metabólico y los niveles de glucosa sin encontrar una asociación con la resistencia a la insulina³³. Nuestro trabajo, en un grupo de pacientes con obesidad mórbida no muestra una relación de este polimorfismo con la resistencia a la insulina o el perfil lipídico. Sin embargo en el grupo con el alelo mutado (A), si que existen unos niveles más elevados de leptina y proteína C reactiva (PCR), indicando un patrón inflamatorio en estos pacientes en relación con una mayor masa grasa. Con respecto a las adipocitoquinas, Zimmerman et al.³¹ detectaron una asociación entre los niveles circulantes de leptina y la variante de FTO, pero el efecto se explica por el IMC. Sin embargo, en otro trabajo no existió relación entre este polimorfismo y los niveles de leptina³⁴. Por último, en una población en edad pediátrica³⁵, si que se demostró una relación entre el alelo A de rs9939609 el FTO con una mayor concentración de leptina sérica indepen-

dientemente de posibles factores de confusión como la adiposidad.

En la actualidad el mecanismo por el cual esta variante del gen FTO influye en los niveles circulantes de proteína C reactiva y leptina es incierto. Podemos especular, que el tejido adiposo humano es heterogénea en su actividad metabólica, y las áreas en las que el tejido adiposo es más sensibles a la infiltración de células inmunes podría ampliarse preferentemente entre los portadores del alelo A, lo que resulta en un mayor nivel de proteína C reactiva y leptina.

En conclusión, el polimorfismo del gen FTO, rs9939609, se asocia con un mayor peso, masa grasa y niveles circulantes de leptina y proteína C reactiva en pacientes con obesidad mórbida. Sin embargo, son necesarios más estudios en otras subpoblaciones para confirmar nuestros resultados y para explorar nuevas relaciones metabólicas de este SNP.

Referencias

1. Da de Luis, R Aller, O Izaola, M Gonzalez Sagrado, R Conde, B de La Fuente, HF OValle. Frecuencia alélica Del polimorfismo G308A Del factor de necrosis tumoral alfa y relación con los factores de riesgo cardiovascular y adipocitoquinas em pacientes obesos. *Nutr Hosp* 2011; 26: 711-715.
2. DA de Luis, R Aller, O Izaola, M Goznelz Sagrado, R Conde. Relation of C358A polymorphism of the endocannabinoid degrading enzyme fatty acid amide hydrolase with obesity and insulin resistance. *Nutr Hosp* 2010; 25: 993-998.
3. Hinney A, Nguyen TT, Scherag A, Friedel S, Bronner G, Muller TD et al. Genome wide association (GWA) study for early onset extreme obesity supports the role of fat mass and obesity associated gene (FTO) variants. *PLoS ONE* 2007; 2: e1361.
4. Villalobos-Comparan M, Teresa Flores-Dorantes M, Teresa Villarreal-Molina M, Rodriguez-Cruz M, García-Ulloa AC, Robles L et al. The FTO gene is associated with adulthood obesity in the Mexican population. *Obesity (Silver Spring)* 2008; 16: 2296-2301.
5. Song Y, You NC, Hsu YH, Howard BV, Langer RD, Manson JE et al. FTO polymorphisms are associated with obesity but not diabetes risk in postmenopausal women. *Obesity (Silver Spring)* 2008; 16: 2472-2480.
6. Wing MR, Ziegler J, Langefeld CD, Ng MC, Haffner SM, Norris JM, Goodarzi MO, Bowden DW. Analysis of FTO gene variants with measures of obesity and glucose homeostasis in the IRAS Family Study. *Hum Genet* 2009; 125: 615-626.
7. Villalobos-Comparán M, Teresa Flores-Dorantes M, Teresa Villarreal-Molina M, Rodríguez-Cruz M, García-Ulloa AC et al. The FTO gene is associated with adulthood obesity in the Mexican population. *Obesity* 2008; 16: 2296-2301.
8. Tan JT, Dorajoo R, Seielstad M, Sim XL, Ong RT, Chia KS, Wong TY, Saw SM, Chew SK, Aung T, Tai ES. FTO variants are associated with obesity in the Chinese and Malay populations in Singapore. *Diabetes* 2008; 57: 2851-2857.
9. Qi L, Kang K, Zhang C, van Dam RM, Kraft P, Hunter D, Lee CH, Hu FB. Fat mass-and obesity-associated (FTO) gene variant is associated with obesity: longitudinal analyses in two cohort studies and functional test. *Diabetes* 2008; 57: 3145-3151.
10. Franks PW, Jablonski KA, Delahanty LM, McAteer JB, Kahn SE, Knowler WC, Florez JC; Diabetes Prevention Program Research Group. Diabetes Prevention Program Research Group. Assessing gene treatment interactions at the FTO and INSIG2 loci on obesity-related traits in the Diabetes Prevention Program. *Diabetologia* 2008; 51: 2214-2223.
11. Sjögren M, Lyssenko V, Jonsson A, Berglund G, Nilsson P, Groop L, Orho-Melander M. The search for putative unifying genetic factors for components of the metabolic syndrome. *Diabetologia* 2008; 51: 2242-2251.
12. Legry V, Cotel D, Ferrières J, Arveiler D, Andrieux N, Bingham A, Wagner A, Ruidavets JB, Ducimetière P, Amouyel P, Meirhaeghe A. Effect of an FTO polymorphism on fat mass, obesity, and type 2 diabetes mellitus in the French MONICA Study. *Metabolism* 2009; 58: 971-975.
13. Yajnik CS, Janipalli CS, Bhaskar S, Kulkarni SR, Freathy RM, Prakash S, Mani KR, Weedon MN, Kale SD, Deshpande J, Krishnaveni GV, Veena SR, Fall CH, McCarthy MI, Frayling TM, Hattersley AT, Chandak GR. FTO gene variants are strongly associated with type 2 diabetes in South Asian Indians. *Diabetologia* 2009; 52: 247-252.
14. Hotta K, Nakata Y, Matsuo T, Kamohara S, Kotani K, Komatsu R, Itoh N, Mineo I, Wada J, Masuzaki H, Yoneda M, Nakajima A, Miyazaki S, Tokunaga K, Kawamoto M, Funahashi T, Hamaguchi K, Yamada K, Hanafusa T, Oikawa S, Yoshimatsu H, Nakao K, Sakata T, Matsuzawa Y, Tanaka K, Kamatani N, Nakamura Y. Variations in the FTO gene are associated with severe obesity in the Japanese. *J Hum Genet* 2008; 53: 546-553.
15. Omori S, Tanaka Y, Takahashi A, Hirose H, Kashiwagi A, Kaku K, Kawamori R, Nakamura Y, Maeda S. Association of CDKAL1, IGF2BP2, CDKN2A/B, HHEX, SLC30A8, and KCNJ11 with susceptibility to type 2 diabetes in a Japanese population *Diabetes* 2008; 57:791-795.
16. Horikoshi M, Hara K, Ito C, Shojima N, Nagai R, Ueki K, Froguel P, Kadowaki T. Variations in the HHEX gene are associated with increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetologia* 2007; 50: 2461-2466.
17. Matsuda M, Shimomura I, Sata M. Role of adiponectin in preventing vascular stenosis. The missing link of adipo-vascular axis. *J Biol Chem* 2002; 277: 37487-37491.
18. Fang H, Li Y, Du S, Hu X, Zhang Q, Liu A, Ma G. Variant rs9939609 in the FTO gene is associated with body mass index among Chinese children. *BMC Med Genet* 2010; 22: 136.
19. Qi L, Kang K, Zhang C, van Dam RM, Kraft P, Hunter D, Lee CH, Hu FB. Fat mass-and obesity-associated (FTO) gene variant is associated with obesity: longitudinal analyses in two cohort studies and functional test. *Diabetes* 2008; 57 (11): 3145-51. Epub 2008 Jul 22.
20. Meyre D, Delplanque J, Chèvre JC, Lecoeur C, Lobbens S, ET AL. Genome-wide association study for early-onset and morbid adult obesity identifies three new risk loci in European populations. *Nat Genet* 2009; 41: 157-159.
21. Duart MJ, Arroyo CO, Moreno JL. Validation of a insulin model for the reactions in RIA. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40: 1161-1167.
22. Mathews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher Df. Homesotasis model assessment: insulin resistance and beta cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28: 412-414.
23. Pfutzner A, Langefeld M, Kunt T, Lobig M. Evaluation of human resistin assays with serum from patients with type 2 diabetes and different degrees of insulin resistance. *Clin Lab* 2003; 49: 571-576.
24. Meier U, Gressner M. Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, Ghrelin, adiponectin, and resistin. *Clinical Chemistry* 2004; 50: 1511-1525.
25. Lubrano V, Cocci F, Battaglia D, Papa A. Usefulness of high-sensitivity IL6 measurement for clinical characterization of patients with coronary artery disease. *J Clin Lab Anal* 2005; 19: 110-114.
26. Khan SS, Smith MS, reda D, Suffredini AF, Mc Coy JP. Multiplex bead array assays for detection of soluble cytokines: comparisons of sensitivity and quantitative values among kits from multiple manufacturers. *Cytometry B Clin Cytom* 2004; 61: 35-39.
27. Suominen P. Evaluation of an enzyme immunometric assay to measure serum adiponectin concentrations. *Clin Chem* 2004; 50: 219-221.

28. Pichard C, Slosman D, Hirschel B, Kyle U. Bioimpedance analysis: an improved method for nutritional follow up. *Clin Res* 1993; 41: 53.
29. Mataix J, Mañas M. Tablas de composición de alimentos españoles. Ed: University of Granada, 2003.
30. Dina C, Meyre D, Gallina S. Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nat Genet* 2007; 39: 724-726.
31. Freathy RM, Timpson NJ, Lawlor DA, Pouta A. Common variation in the FTO gene alters diabetes-related metabolic traits to the extent expected given its effect on BMI. *Diabetes* 2008; 57: 1419-1426.
32. Tan S, Scherag A, Janssen O, Hahn S. Large effects on BMI and insulin resistance of fat mass and obesity associated gene (FTO) variants in patients with PCOS: BMC medical genetics 2010; 11: 12-17.
33. Attaoua R, Ait Sm, Radian S, Fica S, Hanzu F. FTO gene associates to metabolic syndrome in women with PCOS. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 373: 230-234.
34. Zabena C, González Sánchez JL, Martínez Larrad MT, Torres García A, Álvarez Fernández J. The FTO obesity gene. Genotyping and gene expression analysis in morbidly obese patients. *Obes Surg* 2009; 19: 87-95.
35. Labayen I, Ruiz JR, Ortega FB, Dalongeville J. Association between the FTO rs9939609 polymorphism and leptin in European adolescents: a possible link with energy balance control. The HELENA study. *International Journal of Obesity* 2011; 35: 66-71.