



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

Perfil metabólico de pacientes con obesidad. Implicaciones en esteatosis hepática no alcohólica, resistencia a la insulina y citocinas inflamatorias. Propuesta de 3 modelos fisiopatológicos

Modalidad de Graduación de Tesis

Que para optar el grado de Doctorado en Ciencias Médicas y Odontológicas en la Salud

Presenta María Elena Romero Ibarquengoitia

Tutor

Dr Felipe Vadillo Ortega

Unidad de Vinculación de la Facultad de Medicina UNAM, Instituto Nacional de Medicina Genómica.

Comité Tutorial

Dr Juan Carlos López Alvarenga

South Texas Diabetes and Obesity Institute. University of Texas Rio Grande Valley

Dra Maria Elizabeth Tejero Barrera

Laboratorio de Nutrigenética y Nutrigenómica, Instituto Nacional de Medicina Genómica

Alfredo Ulloa Aguirre

Red de Apoyo a la Investigacion, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición

Salvador Zubiran

Ciudad Universitaria, CD. MX. Febrero 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Perfil Metabólico (aminoácidos y acilcarnitinas) de pacientes con obesidad. Implicaciones con esteatosis hepática no alcohólica, resistencia a la insulina y citocinas inflamatorias.
Propuesta de 3 modelos fisiopatológicos**

Indice

Sección	Página
1. Resumen	3
2. Marco Teórico	5
3. Planteamiento del problema	13
4. Justificación	13
5. Pregunta de Investigación	14
6. Hipótesis	15
7. Objetivo	20
8. Material y Métodos	21
9. Aspectos Éticos	22
10. Recursos y Financiamiento	22
11. Resultados	23
12. Discusión	47
13. Conclusión	51
14. Referencias	51

1. Resumen.

Existen controversias en la fisiopatología de la obesidad y sus complicaciones. El paradigma clásico establece que la obesidad es el resultado del desbalance positivo en el gasto energético que desencadena alteraciones metabólicas que predispone a sus complicaciones; otro paradigma sugiere alteraciones metabólicas iniciales generadas por predisposición familiar de obesidad y subsecuentemente el desarrollo de obesidad y sus complicaciones. Lo anterior nos motiva a realizar modelos matemáticos para entender la fisiopatología de este tipo de enfermedades con utilidad teórica y clínica.

Propusimos 3 modelos a través de ecuaciones estructurales (SEM) para determinar cuál explica mejor la relación entre obesidad, esteatosis hepática no alcohólica (EHNA), inflamación de bajo grado, y perfil metabólico (glucosa, aminoácidos y acilcarnitinas). El mejor modelo presentó el menor valor de RMSEA (raíz del error cuadrático medio de la aproximación, un buen modelo tiene un valor menor a 0.09).

Se analizaron 137 pacientes, 70% mujeres, sin diabetes ni hipertensión con/sin obesidad o EHNA de 30.61 (DS 8.6) años. La historia familiar de obesidad (FHOB) estuvo presente en 53%.

El modelo mejor ajustado fue el tercero con RMSEA 0.075 (0.069, 0.081) que propone que la FHOB determina la concentración de aminoácidos libres en suero y acilcarnitinas que se asocian a una disminución en la sensibilidad a la insulina, incremento de citocinas inflamatorias, obesidad y EHNA. Sin embargo, las beta estandarizadas de FHOB hacia la concentración de acilcarnitinas y aminoácidos no alcanzaron el valor > 0.2 . La FHOB hacia el fenotipo de obesidad obtuvo una beta estandarizada de 0.3 por lo que se requirió crear un cuarto modelo en donde se demostró que FHOB predice el fenotipo de obesidad y ésta última las concentraciones de aminoácidos y acilcarnitinas las cuales se asocian a citocinas inflamatorias, EHNA y resistencia a la insulina RMSEA 0.075 (0.069,0.081).

2. Marco Teórico

2.1 Generalidades

La obesidad es un problema de salud a nivel mundial que ha sido caracterizado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una condición con alta prevalencia (1–3). En México la ENSANUT 2016 Medio Camino reportó una prevalencia de sobrepeso y obesidad de 72.5% (4). A pesar de que ha habido avances importantes en el tratamiento, es difícil el mantenimiento sostenido del peso perdido a largo plazo (5), así como existen muchos retos en el manejo que ameritan continuar estudiando su fisiopatología.

El paradigma clásico de la obesidad propone que la obesidad es el resultado de un desbalance positivo en el gasto energético que resulta en la expansión de tejido adiposo, subsecuentemente inflamación de bajo grado donde hay liberación de citocinas, proteína C reactiva (PCR), interferón gama (IFN γ), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), entre muchos otros. Adicionalmente existe incremento en ácidos grasos libres que induce lipotoxicidad (6–8). Como consecuencia los pacientes con obesidad tienen mayor riesgo de tener resistencia a la insulina, dismetabolismo lipídico, diabetes tipo 2 (DM2), esteatosis hepática no alcohólica (EHNA), alteraciones en fondo de ojo, dislipidemia, enfermedades cardiovasculares, síndrome de apnea obstructiva del sueño, osteoartritis, déficit cognitivo, algunas formas de cáncer entre muchas otras complicaciones (6).

Interesantemente no todos los pacientes con exposición ambiental favorable a obesidad la desarrollan y no todos los pacientes con obesidad desarrollan DM2 o EHNA; los pacientes con alta predisposición familiar pueden adquirir obesidad, EHNA, DM2, etc con mayor facilidad ante una exposición ambiental mínima comparada con aquellos sin predisposición familiar; lo que sugiere que existen múltiples factores que pudieran tener efectos aditivos o multiplicativos dentro de los que se agrega estilo de vida, genoma, epigenoma, metaboloma, entre muchos otros factores. Este es el “paradigma no clásico de la obesidad” (9).

Estudios han demostrado que la historia familiar clínica puede determinar riesgo de manera más útil que la genotipificación de un solo gen (10–12), dado que involucra la herencia genética de la enfermedad más el epigenoma y el estilo de vida de los padres (13).

Existe interés en entender la fenotipificación individual de las vías metabólicas o el metabotipo involucrado en enfermedades complejas, así como entender si el fenotipo precede el metabotipo o si es en sentido contrario.

2.2 Estudio de la metabolómica como una herramienta útil para identificar mecanismos fisiopatológicos de enfermedades complejas.

2.2.1 Generalidades

El término metabolómica se refiere al estudio, identificación y cuantificación sistemática de compuestos de bajo peso molecular en ciertas células, tejidos o fluidos biológicos que son producto de las reacciones metabólicas en los seres vivos. Uno de sus principales objetivos es identificar cambios sutiles en los perfiles metabólicos entre sistemas biológicos en diferentes estados fisiológicos o patológicos (14).

2.2.2 Funcionamiento y constitución de un espectrómetro de masas

Un espectrómetro de masas (MS) permite la separación, identificación y cuantificación de moléculas, basada en la relación masa /carga (m/z) en diferentes matrices (líquidas, sólidas) después de su ionización.

Un espectrómetro de masas consta de cinco módulos fundamentales: 1) sistema de introducción de muestra, 2) fuente de ionización, 3) analizador de masas, 4) detector y 5) procesador de datos.

La función de la fuente de ionización en un equipo de MS es aplicar energía a la muestra para generar moléculas cargadas positiva o negativamente, ya que para medir las moléculas por el espectrómetro de masas, éstas deben estar “eléctricamente cargadas”. Existen técnicas de ionización en las que la energía impartida hace que las moléculas sólo adquieran carga (ionización suave) y técnicas de ionización en las que la energía impartida es de mayor magnitud, por lo que la molécula se rompe y forma fragmentos cargados. Las moléculas que solo adquieran carga sin ser fragmentadas se conocen como iones moleculares; las moléculas

que además de ionizarse se fragmentaron se conocen como productos o fragmentos iónico (15).

Los iones provenientes de la fuente de ionización pasan al analizador de masas, que tiene como función separarlos y ordenarlos de acuerdo a su m/z . El intervalo de m/z , su precisión y exactitud dependen del tipo de analizador que se utilice. Para biomoléculas, la masa se puede medir con una exactitud del 99.9%; esto permite detectar pequeños cambios en la masa del compuesto que se estudian, por ejemplo la sustitución de un aminoácido por otro o una modificación post-traducciona.

El detector registra y amplifica la señal proveniente del analizador de masas, posteriormente la envía al procesador de datos en donde esta información se registra en forma de espectro de masas, que es una representación gráfica de los iones separados por su valor de m/z y ajustados de acuerdo al porcentaje de las especies más abundantes en la muestra. Los detectores pueden ser de varios tipos; los más utilizados son el electromultiplicador y el fotomultiplicador.

Como resultado de un análisis por MS se puede obtener el espectro de masas del ion molecular, el de los productos iónicos o el de ambos, dependiendo del tipo de fuente de ionización que se utilice (15).

2.2.3 Espectrometría de masas en tándem.

Esta técnica analítica se introdujo en los laboratorios de análisis clínicos en la década de los años 80 del siglo XX. La palabra tándem viene del inglés *tándem*, cuyo significado inicial es “bicicleta de dos asientos”, también tiene la aceptación de “conjunto de elementos que se complementan” o “reunión de dos personas que colaboran en algo”.

Un equipo MS/MS está constituido de seis componentes básicos: 1) sistema de introducción de muestra; 2) fuente de ionización; 3) primer analizador de masas (MS1); 4) cámara o celda de colisión; 5) segundo analizador de masas (MS2); 6) detector.

En la actualidad existen diferentes acoplamientos entre los componentes de los equipos MS/MS, que se diseñan de acuerdo a la naturaleza de las moléculas de interés. Uno de los equipos más utilizados en química clínica es el de tipo triple cuadrupolo, acoplado a una fuente

de ionización por “electrospray” (ESI). Este equipo funciona de la siguiente manera: una vez que la muestra ha sido introducida, sufre una ionización suave por ESI para adquirir carga; posteriormente pasa al MS en donde los componentes de la muestra se separan y ordenan de acuerdo a su m/z. Los iones pasan por la celda de colisión en donde se generan fragmentos como producto de su colisión con un gas inerte; los fragmentos generados pasan por el MS2, los cuales se pueden correlacionar con las moléculas intactas producidas en el MS1. Los resultados generados se registran en forma de espectro de masas que es como una huella digital de los compuestos. Con esta técnica se puede detectar y cuantificar selectivamente múltiples analitos dentro de una familia de compuestos. También se puede obtener información estructural acerca de un compuesto a través de la formación de fragmentos específicos y es útil para descubrir compuestos en mezclas complejas de acuerdo a su patrón de fragmentación.

Gracias al desarrollo de este tipo de tecnologías es posible a través de una muestra de sangre determinar “perfiles” metabólicos (15).

2.3 Aplicación metabólica en estudio de obesidad , EHNA y resistencia a la insulina

Estudios recientes han documentado que existe diferencia en los metabolitos en sangre tales como glucosa, lípidos, acilcarnitinas y aminoácidos en pacientes con obesidad, resistencia a la insulina y EHNA(16–24). Describiremos algunos de ellos a continuación ya que serán utilizados para explicar más adelante nuestras hipótesis.

2.3.1 Metabólica en obesidad

2.3.1.1 Perfil de acilcarnitinas

Las carnitinas juegan un papel esencial en el papel del metabolismo de ácidos grasos pues se pueden conjugar con ácidos grasos de cadena larga para formar acilcarnitinas a través de su intercambio de grupos acil entre coenzima A y L-carnitina por la acción de acil-transferasas. Las transferasas tiene especificidad solapada para varios grupos acilos de los diferentes tamaños de cadena que van desde 2 carbonos hasta 18 carbonos. Las acilcarnitinas facilitan

el transporte de ácidos grasos a la matriz mitocondrial donde se lleva a cabo la β oxidación. También se puede asociar al metabolismo de aminoácidos de cadena ramificada (principalmente C3-C5). Las acilcarnitinas atraviesan las membranas mitocondriales y plasmáticas por lo que pueden encontrarse en plasma o suero en concentraciones estables. Cualquier enfermedad que bloquee la vía catabólica de ácidos grasos o aminoácidos de cadena ramificada, incrementará intermediarios de acil-CoA y por lo tanto incrementará la concentración de acilcarnitinas (25,26).

En el área de obesidad existe publicada una serie de 30 pacientes con obesidad /sobrepeso y 30 controles delgados por Ji Joung Kim *et al.*, a los que se les realizó espectrometría de masas con medición de 347 metabolitos. Se demostró un incremento estadísticamente significativo ($p < 0.01$) en obesos en los niveles de butirilcarnitina (C4) y propionil carnitina (C3), con un tamaño del efecto > 0.2 en los niveles de hexanoilcarnitina (C6), octanoilcarnitina (C8) y palmitoilcarnitina (C16). Los niveles de L-carnitina se encontraron más altos en pacientes delgados (27).

En el estudio de Andreas Oberbach se demostró acetilcarnitina (C2) (carnitina dominante en las especies que corresponde con la abundancia intracelular) más alta en obesos. Esta carnitina se mantuvo alta posterior a la reducción de peso con dieta hipocalórica y bypass gástrico. Así también encontraron que tetradecenoilcarnitina (C14:1) correlacionó directamente con masa adipocítica aún después del ajuste por edad, género y HBA1c (17).

En el estudio de Brante P Sampley se hizo un modelo donde se indujo obesidad a ratones a través de dieta de cafetería y dieta alta en lípidos. Se demostró alta concentración en tejido adiposo y músculo de palmitoilcarnitina (C16) y octadenoilcarnitina (C18:0) en el primer grupo y decanoilcarnitina (C10), laurilcarnitina (C12) y octadenoilcarnitina (C18) en el segundo grupo comparado con ratones controles (28).

En el mismo estudio se realizó un segundo modelo donde se trató macrófagos derivados de médula ósea con dosis hasta de 1000mcM de Lauroilcarnitina (C12) y se observó cómo polarizó a los macrófagos hacia un fenotipo pro-inflamatorio M1 que reguló a la baja AMPK e incrementó la secreción de citocinas inflamatorias: IL 3, 6, 12, 11, 16, 23 y TNF α .

2.3.1.2 Perfil de aminoácidos

Los aminoácidos son la base estructural de las proteínas, son moléculas consistentes en un grupo amino y un grupo carboxílico con un grupo orgánico lateral (R) unido al átomo de carbono ($\text{NH}_2\text{CHR}\text{COOH}$).

En el estudio de Ji Joung Kim (27) se encontró una concentración más alta ($p < 0.1$) en obesos de triptofano, tirosina, valina y leucina. Todos con tamaño del efecto > 0.2 .

En el análisis de componentes principales del estudio de metabolómica de Christopher B Newgard, que se realizó en 74 individuos obesos y 67 individuos delgados, se encontró diferencias entre grupos en los aminoácidos ($p < 0.01$): leucina, isoleucina, valina (14-20% más alta en obesos) metionina, glutamato, fenilalanina y tirosina así como acilcarnitinas C3 y C5. Con lo anterior los autores propusieron como mecanismo una sobrecarga en el catabolismo de aminoácidos de cadena ramificada en los pacientes obesos (29).

En una población china de 452 pacientes histidina y arginina se asociaron a interleucina 6, proteína C reactiva y estrés oxidativo en mujeres obesas (20).

En otro estudio realizado en ratones C57BL/6J alimentados con dieta alta en grasa y controles delgados, se estudió los niveles de mRNA de los genes asociados a aminoácidos de cadena ramificada en tejido adiposo visceral. Después de ser expuestos a TNF α , IL-6, IL-1 β , and IFN γ se demostró la reducción en la expresión de los genes asociados al transporte y oxidación de estos aminoácidos BCAA, sugiriendo que la acumulación de leucina, isoleucina y valina en plasma fue resultado de la disminución del metabolismo de aminoácidos de cadena ramificada y alteración de ciclo de Krebs (30).

2.3.2 Metabolómica en resistencia a la insulina

Estudios demuestran que los aminoácidos pueden ser marcadores y/o efectores de la resistencia a la insulina (29,31). Se ha encontrado que uno de los mecanismos potenciales en la patogénesis de la diabetes mellitus tipo 2 es la acumulación de aminoácidos, ya que el riesgo de padecer diabetes mellitus se eleva cuatro veces en aquellos con altas concentraciones de aminoácidos en ayuno, manteniéndose elevados incluso 12 años antes del inicio de la diabetes. Además la elevación de los aminoácidos circulantes puede ocurrir

antes de cualquier alteración en la acción de la insulina (24). Estudios han demostrado que los pacientes con antecedentes familiares de diabetes tienen aminoácidos circulantes más altos que controles sin antecedentes. Se ha sugerido por diversos estudios que los aminoácidos de cadena ramificada pueden ser los más importantes en la regulación del metabolismo periférico de la glucosa, y son captados principalmente por el músculo esquelético (32,33).

La elevación de los niveles de aminoácidos séricos puede inducir resistencia a la insulina en el músculo esquelético en humanos (disminuyendo la disposición de glucosa en un 25%)(34) por diferentes mecanismos: 1) competencia de sustrato con la glucosa para la oxidación mitocondrial (34) debido a que los aminoácidos se pueden metabolizar a acetil-CoA y ser oxidados en el ciclo de ácidos tricarboxílicos, 2) inhibición de la piruvato deshidrogenasa debido a un aumento en la relación acetil-CoA/CoA y NADH/NAD⁺ en las células esqueléticas y hepáticas (19,21), 3) reducción en la actividad de la glucógeno sintasa y/o inhibición del transporte/fosforilación de la glucosa (35), que ocasiona reducción del 64% de la velocidad de síntesis de glucógeno en el músculo esquelético, 4) deterioro en la fosforilación de tirosina en los sustratos del receptor de insulina con la consecuente inhibición del fosfatidil inositol 3 kinasa (36), que ocasiona alteración en los pasos iniciales y críticos de la señalización de la insulina (31,32,36–38).

Con respecto al perfil de acilcarnitinas, los pacientes con resistencia a la insulina no diabéticos tienen mayor concentración de C14, C16, C16:1 y C20. La acilcarnitina C16:1 es de vital importancia pues promueve la sensibilidad de insulina en el músculo (29). Se ha visto que pacientes con antecedentes familiares de diabetes el perfil de acilcarnitinas es más alto que los controles sin antecedentes.

2.3.3 Metabolómica y EHNA

Uno de los estudios más representativos fue el de Statish C Kalhan y colaboradores que incluyó 11 pacientes no diabéticos con esteatosis hepática y 24 pacientes con esteatohepatitis que fueron comparados con 25 controles sanos. El patrón metabolómico no pudo diferenciar entre esteatosis hepática y esteatohepatitis; sin embargo en comparación con los controles sanos las concentraciones de carnitinas libres, butirilcarnitina y metilbutiril carnitina (C3-C5)

estuvo más alta (73). Otro estudio ha reportado tanto acilcarnitinas de cadena larga (C18, C18:2, C16) como corta (C4 y C3) relacionado a diferentes grados de EHNA en humanos (23).

Con respecto al patrón de aminoácidos se ha reportado asociación niveles más altos en glutamina, glutamato, creatinina, metionina, alanina, lisina, arginina, fenilalanina, tirosina, valina e isoleucina (22).

2.4 Métodos de análisis con utilidad en metabolómica y enfermedades complejas

El análisis de los datos metabolómicos es complejo por la gran cantidad de datos que arroja y la inherente variabilidad en cada muestra. Los métodos tradicionales de análisis se basan en técnicas de pesca (“fishing”) a través de regresiones lineales estándar y análisis por conglomerados, como por ejemplo análisis de componentes principales (PCA) y análisis de proyección parcial de mínimos cuadrados a estructuras latentes (PLS) cuyo objetivo es encontrar diferencia entre clases o grupos ajustando a la variabilidad intra-grupo; sin embargo no están diseñados para determinar relaciones funcionales entre las variables (39–41).

Las ecuaciones estructurales (SEM) estiman relaciones funcionales entre variables que normalmente no son reveladas en modelos lineales estándar (42). Es una poderosa herramienta de análisis multivariado. Estos modelos han sido utilizados en diferentes campos como genética y psicología, donde se han utilizado para reconstruir redes fenotípicas (43–45). Las ecuaciones estructurales son una generalización tanto de una regresión como de un análisis de factores en donde la matriz de covarianza de las variables observadas es una función de un conjunto de parámetros definidos *a priori*. El modelo de SEM se puede descomponer en 2 sub-modelos: el medido y el estructural. Por convención cuando gráficamente se representa un modelo, las variables observadas son presentadas se representan en cuadrados o rectángulos; mientras que las variables latentes en óvalos o círculos. Los residuales son siempre variables no observadas (factores latentes) y son representados por óvalos o círculos (42,43). En la Figura 1 se describe gráficamente los componentes de una SEM.

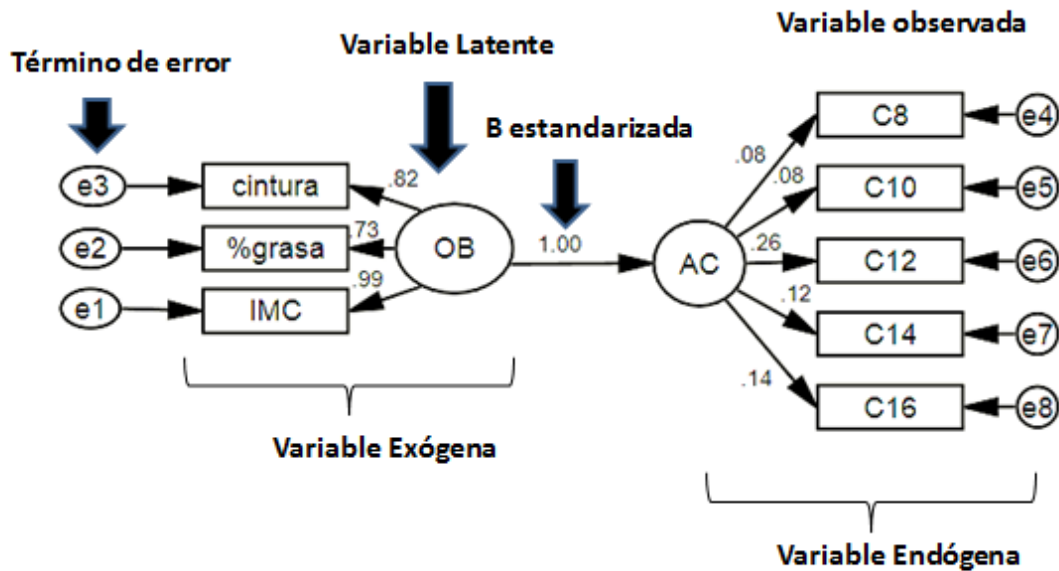


Figura 1. Componentes de una SEM.

Las mayores aplicaciones del modelaje de ecuación estructural son:

1. El modelaje causal que hace hipótesis de relaciones causales entre variables y prueba los modelos a través de un sistema de ecuación lineal. Los modelos causales pueden involucrar tanto variables manifiestas, latentes o ambas.
2. Análisis de factores confirmatorios, que es una extensión del análisis factorial en donde se prueba hipótesis específicas sobre la estructura de las cargas e inter-correlaciones de las mismas.
3. Análisis de factores de segundo orden en donde la matriz de correlación de los factores analizados se vuelven a analizar para obtener factores de segundo orden.
4. Modelos de regresión, como extensión de un modelo lineal.
5. Modelos de estructura de covarianza, donde se hace la hipótesis de que la matriz de covarianza tiene una forma en particular.
6. Modelos de estructura de correlación, donde se hace la hipótesis de que la matriz de correlación tiene una forma en particular.

En nuestro conocimiento no hay estudios donde las SEM se hayan utilizado en el campo de la metabolómica, ni tampoco se han utilizado para establecer la relación entre obesidad, EHNA, diferentes grados de historia familiar de obesidad, acilcarnitinas, aminoácidos y marcadores pro-inflamatorios. Creemos que las SEM pueden ser una herramienta útil para probar direccionalidad a través de un modelaje causal, estructural de covarianza y correlación entre las variables mencionados, además de ser sencilla su interpretación en la práctica clínica, útil y tienen menor probabilidad de no convergencia, a diferencia de otros métodos estadísticos.

En la presente tesis utilizamos SEM para establecer las relaciones y así poder establecer redes de causalidad entre obesidad, NAFLD; diferentes grados de historia familiar de obesidad, metabolómica dirigida y marcadores inflamatorios.

3. Planteamiento del problema

Existen controversias en la fisiopatología de la obesidad (causa y complicaciones). El análisis de mecanismos fisiopatológicos a través de estudios de metabolómica es de utilidad en el entendimiento de enfermedades complejas. Se requiere la utilización de modelos matemáticos como las SEM que tengan utilidad teórica para entender direccionalidad fisiopatológica entre historia familiar de obesidad, fenotipo de obesidad, inflamación de bajo grado, metabotipo y complicaciones asociadas a obesidad como hígado graso y resistencia a la insulina.

4. Justificación

La obesidad es un problema de salud a nivel mundial con alta prevalencia. A pesar del avance en el desarrollo terapéutico, el mantenimiento sostenido del peso a largo plazo continúa siendo un reto, por lo que se requiere continuar entendiendo los mecanismos implicados en su fisiopatología. Se requiere estudios donde se pueda interpretar la direccionalidad del metabolismo. No existe un análisis integrado donde se establezcan las relaciones a través de redes de causalidad entre obesidad, NAFLD; diferentes grados de historia familiar de obesidad, metabolómica dirigida y marcadores inflamatorios. Con el presente trabajo pretendemos realizar un análisis metabolómico con una integración útil que explique los fenómenos mencionados de manera teórica causal con aplicación clínica para plantear a futuro estudios donde se lleven a cabo nuevas propuestas terapéuticas.

5. Pregunta de Investigación

¿Cuál de las tres hipótesis planteadas explica mejor la relación entre obesidad, historia familiar de obesidad, EHNA, resistencia a la insulina, citocinas inflamatorias, concentración sérica de aminoácidos y acilcarnitinas que sea soportada por la matriz de correlaciones y análisis de varianza?

Esto es: ¿La obesidad (OB) precede a una alteración en el metabolismo de aminoácidos (AA), así como alteración en la β oxidación que produce incremento en acilcarnitinas (AC) que se asocia a complicaciones como EHNA, resistencia a la insulina (RI) e inflamación de bajo grado (INFL) ? (OB \rightarrow AA+AC \rightarrow EHNA+IR+ INFL).

¿La historia familiar de obesidad (FHOB) es el mayor determinante del perfil metabólico que hace que las personas que tengan dicho antecedente tengan mayor concentración de AA libres en suero tal vez por defecto en su utilización y esto induzca alteración en la β oxidación, aumentando los niveles de AC, disminución en IR, y por ende EHNA, obesidad e INFL? (FHOB \rightarrow AA \rightarrow AC, IR \rightarrow OB + NAFLD+INFL).

¿La historia familiar de obesidad (FHOB) es el mayor determinante del perfil metabólico que hace que las personas que tengan dicho antecedente tengan a priori alteración en la β oxidación y por ende mayor concentración circulante de AC así como mayor concentración de AA libres en suero tal vez por defecto en su utilización y esto induzca disminución en IR, y por ende EHNA, OB e INFL? (FHOB \rightarrow AA+AC \rightarrow IR+OB + NAFLD+INFL).

6. Hipótesis

Se propusieron 3 modelos cuya significancia clínica tiene diferentes implicaciones teóricas como prácticas:

Hipótesis 1. Si la OB ocasiona exceso de ácidos grasos libres que aumenten el estrés oxidativo y disfunción mitocondrial, esto incrementará la presencia de AC circulantes. Las AC inducirán aumento de INFL y también habrá incremento en AA. Lo anterior inducirá EHNA y IR...

Significado de la hipótesis 1: Este es prácticamente el paradigma actual de cómo se produce la obesidad. Hemos incluido en la ecuación los diferentes estudios y el orden en que se supone deben aparecer estos fenómenos. De ser este el caso, el tratamiento de reducción de peso de la obesidad por si misma mejorará la concentración de sustratos metabólicos lo que concluirá en un aumento en la sensibilidad a la insulina (Figura 2).

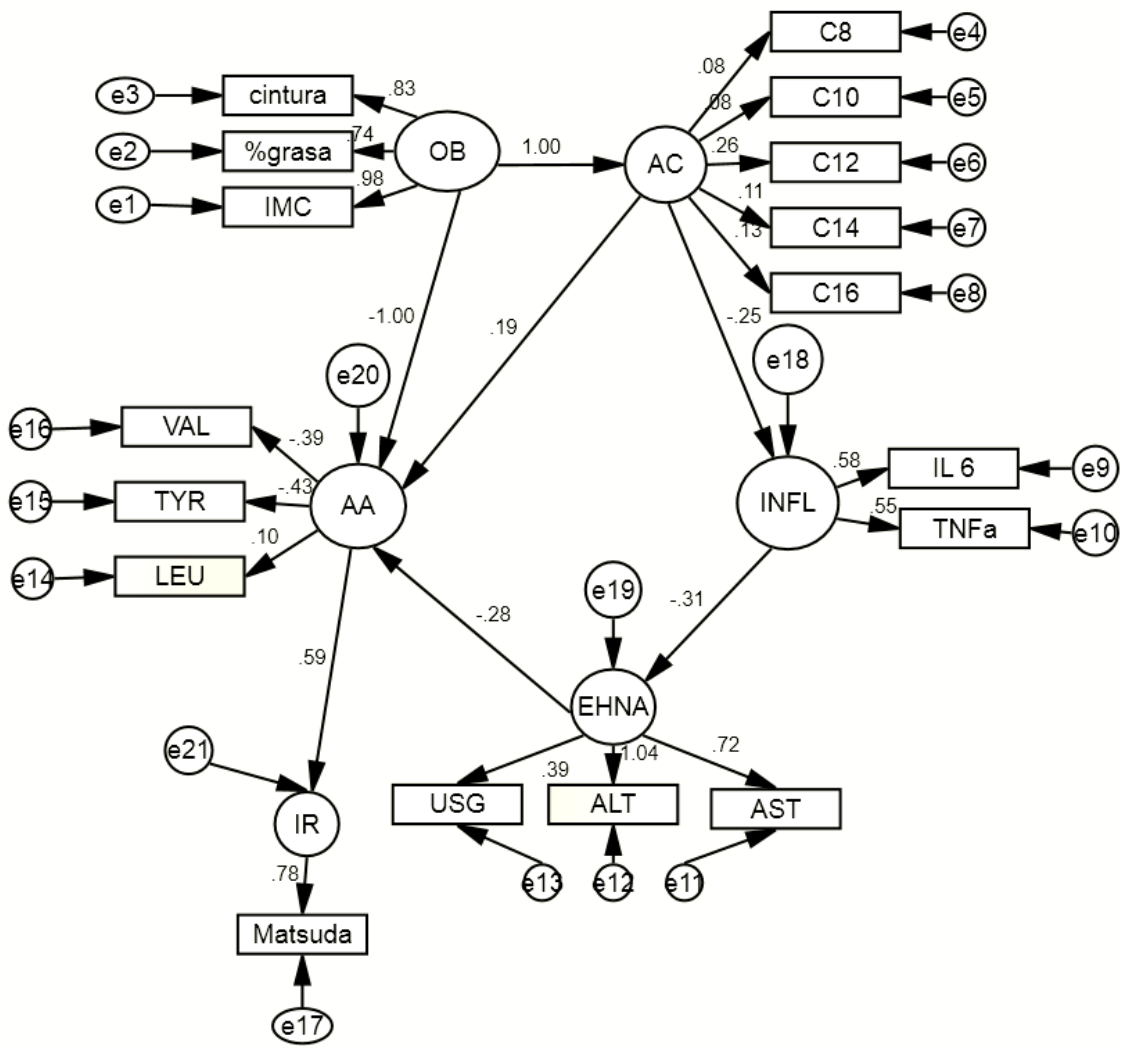


Figura 2. Hipótesis 1. Se realizaron simulaciones de Monte Carlo para modelaje. OB= obesidad, IMC= Índice de Masa Corporal, %grasa= porcentaje de grasa corporal total, cintura= perímetro abdominal, AC= acilcarntinas, INFL= inflamación, AA= aminoácidos, VAL= valina, TYR= tirosina, LEU= leucina, IR= resistencia a la insulina, Matsuda: índice de matsuda, EHNA:

esteatosis hepática no alcohólica, USG= EHNA por USG, ALT= alanina transaminasa, AST= aspartato aminotransferasa.

Hipótesis 2.

Si FHOB produce aumento en la concentración de AA libres en suero, tal vez por defecto en la utilización, esto va a inducir disminución en IR. También va a provocar aumento en las AC que inducirá EHNA y OB...

Significado de la hipótesis 2: Este planteamiento sugiere que la obesidad es un fenómeno secundario a otros de origen genético-metabólico, al menos en un porcentaje del grupo de sujetos con obesidad. El tratamiento dietético con control o disminución de residuos de aminoácido va a mejorar la resistencia a la insulina. La disminución de peso sería un fenómeno independiente que explicara la mejoría a la sensibilidad a la insulina (Figura 3).

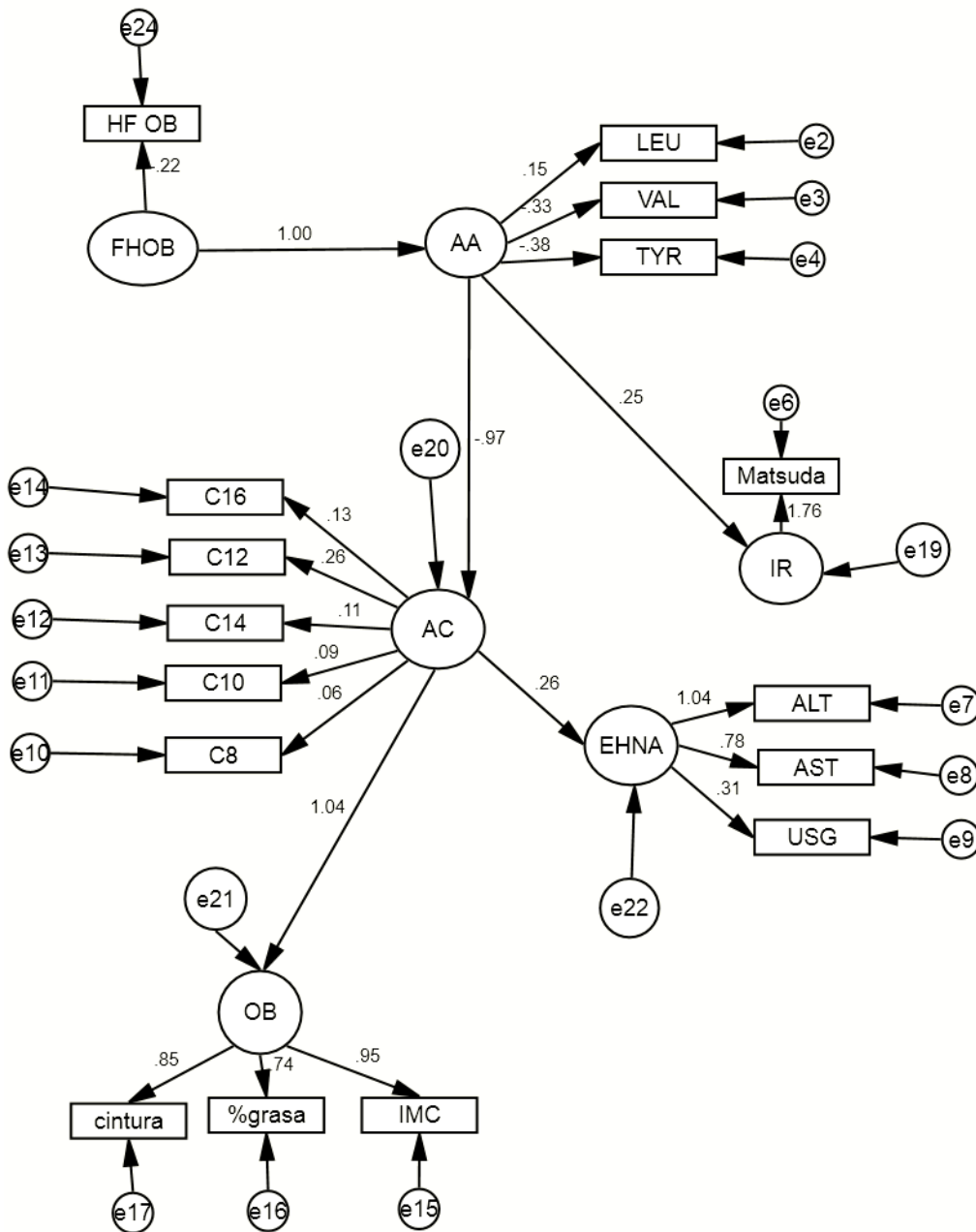


Figura 3. Hipótesis 2. Se realizaron simulaciones de Monte Carlo para modelaje. FHOB e HFOB= historia familiar de obesidad OB= obesidad, IMC= Índice de Masa Corporal, %grasa= porcentaje de grasa corporal total, cintura= perímetro abdominal, AC= acilcarntinas, INFL= inflamación, AA= aminoácidos, VAL= valina, TYR= tirosina, LEU= leucina, IR= resistencia a la insulina, Matsuda: índice de matsuda, EHNA: esteatosis hepática no alcohólica, USG= EHNA por USG, ALT= alanina transaminasa, AST= aspartato aminotransferasa.

Hipótesis 3

Si FHOB afecta la concentración de AA y AC en suero, ambas llevarán al aumento de INFL, EHNA y OB. Todos estos fenómenos explicarán RI. La OB será un epifenómeno asociado al aumento de ácidos grasos libres...

Significado de la hipótesis 3: Es derivado de la hipótesis anterior. Sugiere que la obesidad es una consecuencia secundaria a un fenómeno metabólico subyacente donde el aumento de sustratos es el detonador. Explicaría en parte porqué el tratamiento de la obesidad tiene fracaso. Enfocaría el manejo con sustratos específicos de ácidos grasos y aminoácidos (Figura 4).

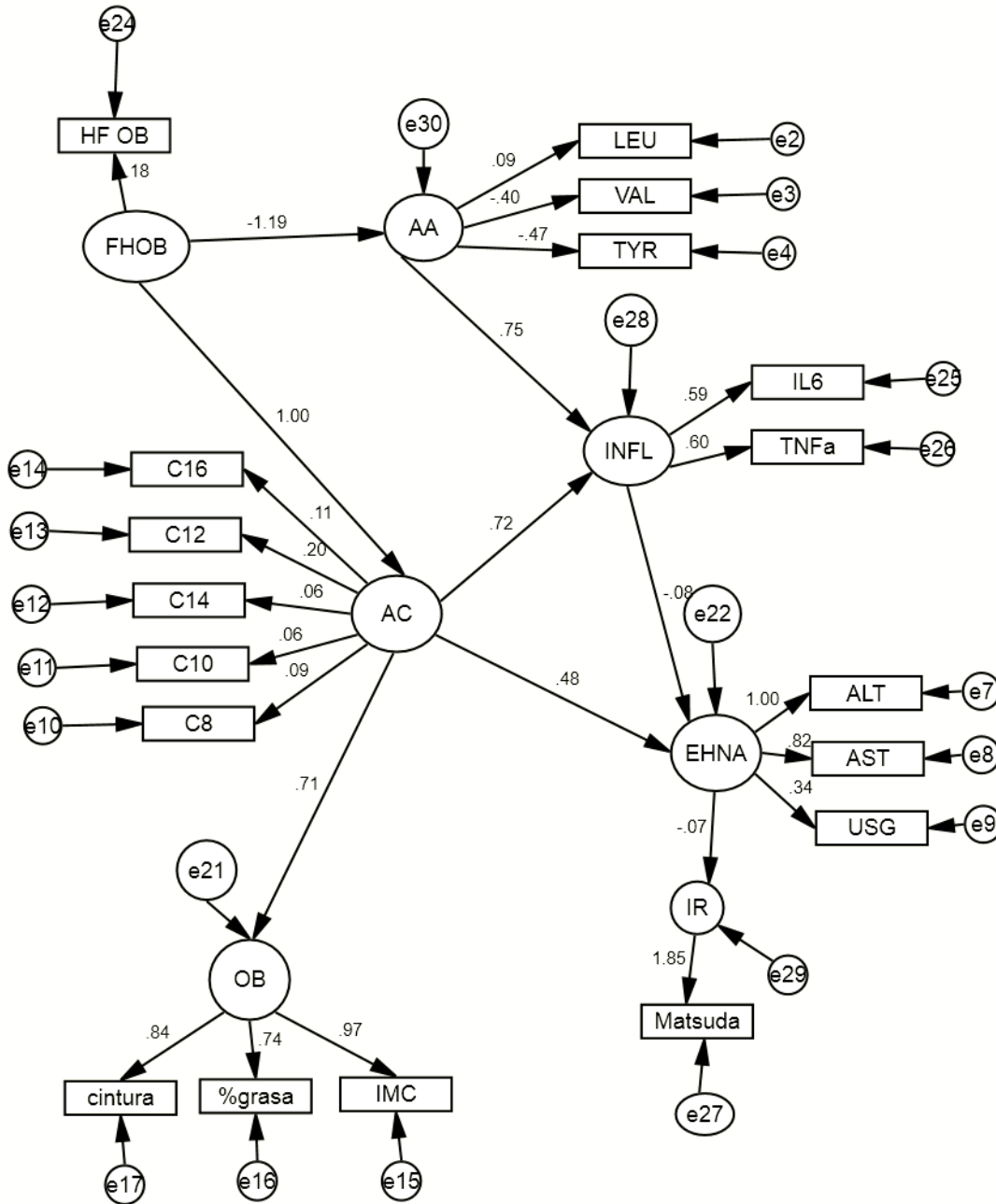


Figura 4. Hipótesis 3. Se realizaron simulaciones de Monte Carlo para modelaje. FHOB e HF OB = historia familiar de obesidad OB= obesidad, IMC= Índice de Masa Corporal, %grasa= porcentaje de grasa corporal total, cintura= perímetro abdominal, AC= acilcarntinas, INFL= inflamación, AA= aminoácidos, VAL= valina, TYR= tirosina, LEU= leucina, IR= resistencia a la insulina, Matsuda: índice de matsuda, EHNA: esteatosis hepática no alcohólica, USG= EHNA por USG, ALT= alanina transaminasa, AST= aspartato aminotransferasa.

...Entonces al analizar pacientes delgados con EHNA, OB con y sin EHNA a través de un análisis de factores subyacentes (ecuación estructural) se observará que el mejor modelo presentarán un RMSEA (raíz del error cuadrático medio de la aproximación) < 0.1 . Los valores B estandarizados para ser considerados como relevantes para la participación de fisiopatología serán >0.2 . De acuerdo a los índices de modificación (estimadores de Lagrange y Wilkins) se harán cambios en las ecuaciones estructurales propuestas.

De existir buen ajuste en varios modelos existirá la posibilidad de integrar un modelo único, cuya significancia clínica reflejará la necesidad de manejar la obesidad en base a sustratos de aminoácidos y reducción calórica.

Las controversias en la fisiopatología y tratamiento de la obesidad nos han motivado a realizar estas tres propuestas que tienen implicaciones teóricas, clínicas y terapéuticas. Por otro lado obtendremos pesos estandarizados para las vías analizadas, lo que contribuirá a integrar mejor las alternativas metabólicas asociadas a este problema. De acuerdo a los resultados se orientará la investigación consecuente.

7. Objetivos

7.1 General

Determinar qué modelo de ecuación estructural puede explicar mejor la relación de OB, EHNA, IR y su relación con INFL, AC y AA en la población estudiada.

7.2 Específicos

7.2.1 Definir la concentración de 31 AC y 11 AA en 3 subgrupos de mexicanos: delgados sin EHNA, OB, con y sin EHNA.

7.2.2 Contrastar las diferencias en las variables clínicas, IR, INFL, AA y AC entre los tres grupos y entre la presencia de FHOB.

8. Material, Métodos y Análisis Estadístico

Se realizó un estudio transversal, que incluyó 137 pacientes consecutivos entre 18 y 45 años que fueron reclutados entre enero y octubre del 2012 en la consulta externa de Medicina Interna del Hospital General de México. Se realizó un diseño cuasi-experimental que dividió los pacientes en 3 grupos: Pacientes con EHNA y obesidad (G1), Pacientes sin EHNA con obesidad (G2). Pacientes sin EHNA sin obesidad (G3). La historia familiar de obesidad fue definida en base a los familiares como “directa” si incluía a la madre o al padre, o “indirecta” se incluía familiares de segundo grado como abuelos, o tíos. Anticipamos *a priori* la posibilidad de grupos desbalanceados en base a modelos de simulación que realizamos anticipadamente. Excluimos pacientes con embarazo, que fumaran, ingirieran más de 10gr de alcohol a la semana, consumieran medicamentos hepatotóxicos, tuvieran cáncer, enfermedad aguda o crónica, hipertensión, diabetes, insuficiencia renal crónica o cualquier condición patológica determinada durante la examinación clínica y laboratorios en sangre.

El estudio fue aprobado por el comité de ética del Hospital General de México y se obtuvo un consentimiento informado de todos los sujetos.

Los sujetos acudieron al hospital, después de la firma del consentimiento informado fueron pesados, medidos, se les tomó la presión arterial, composición corporal a través de impedancia bioeléctrica Quantum IV. Posterior a 12 hrs de ayuno se les realizó curva de tolerancia a la glucosa de 2 hrs, así creatinina, urea, ácido úrico, colesterol total, Colesterol HDL, Colesterol LDL, triglicéridos, alanino aminotransferasa (AST), aspartato aminotransferasa (ALT) con equipo AU480 (Beckman Coulter, EUA). Durante la curva de glucosa también medimos insulinas por ELISA con un kit De Abnova TM. Se calculó el índice de sensibilidad de Matsuda:

$$\text{Índice de Matsuda} = 10,000 \div \sqrt{[(\text{IPA} * \text{GPA}) * (\text{xGPC} * \text{xIPC})]};$$

donde IPA es la insulina plasmática en ayuno en $\mu\text{U}/\text{ml}$, GPA la glucosa plasmática en ayuno en mg/dl , xGPC es el promedio de la concentración de glucosa plasmática en todos los puntos de la curva y xIPC es el promedio de la concentración de insulina plasmática en todos los puntos de la curva.(35). Las interleucinas fueron medidas utilizando un ELISA con ensayo

Bioplex-ProTNM (Rio Rad, EUA) y la proteína C reactiva se midió utilizando in ensayo de microplacas inmunoenzimometrico (Monobind Inc, EUA)

La medición de 31 acilcarnitinas y 7 aminoácidos utilizó el kit de Neobase (PerkinElmer, EUA) a través de un espectrómetro en Tandem (MS-MS) de la marca Quattro Micro API (MicroMass).

Finalmente se realizó ultrasonido hepático utilizando el equipo Voluson Pro VTM (GE, USA), para determinar EHNA en base a 3 criterios: ecotextura hepática, atenuación hepática, y disminución en la visualización venosa portal.

Se realizó estadística descriptiva, transformación log 10 para normalización. Chi- cuadrada, prueba-*t*, ANOVA de una vía, post HOC LSD de Fisher; análisis de componentes principales (PCA), análisis discriminatorio de mínimos cuadrados (PLSDA), análisis de factores subyacente y finalmente SEM de las 3 hipótesis. El mejor modelo fue el que tuvo un RMSEA < 0.1. Los valores B estandarizados para ser considerados como relevantes para la participación de fisiopatología fueron >0.2.

El cálculo de tamaño de muestra se realizó en base a tamaños de efecto que pueden ser discriminados en la ecuación estructural, para ello se realizaron simulaciones de Monte Carlo para una distribución beta inversa con parámetro alfa de 1 y beta de 7. Los valores mínimo y máximo se obtuvieron de distribuciones sesgadas considerando una desviación estándar del promedio obtenido en artículos, el valor máximo fueron 3 desviaciones estándares respecto al mismo promedio. La diferencia esperada de acilcarnitinas entre sujetos con y sin EHNA, se consideró como tamaño de efecto de 20%, mientras que la diferencia entre aminoácidos fue entre delgados y obesos, considerando tamaño de efecto de 20%. Con un tamaño de muestra de 137 pacientes se observó un buen ajuste del modelo que incluye tamaños de efecto entre 19 y 100%.

Programas estadísticos empleados: SPSS 18.0 AMOS 18.0, Metaboanalyst 3.0 (46)

9. Aspectos Éticos

Todos los procedimientos propuestos están de acuerdo con las normas éticas, el reglamento de la ley General de Salud y la declaración de Helsinki del 2013, así como con los códigos y normas internacionales vigentes para las buenas prácticas en la investigación clínica.

10. Recursos y Financiamiento

El protocolo de investigación cuenta con apoyo económico de Recursos Federales.

11. Resultados

11.1 Generales

Incluimos 137 sujetos normoglicémicos con una edad (DS) de 30.61 (8.6) años. Setenta por ciento fueron mujeres. La historia familiar de obesidad (cualquiera) estuvo presente en 53%. El primer grupo tuvo 82 sujetos, el segundo y tercero 24 y 31 respectivamente. El tercer grupo tuvo mayor edad, por lo que se realizaron los ajustes pertinente en los modelos. La tabla 1 muestra los valores medias (DS, IC95%) de los factores clínicos, inflamatorios y metabólicos. Los gráficos 1-4 muestran las curvas de glucosa e insulina de los 3 grupos. La tabla 2 muestra los diferentes grados de historia familiar de obesidad.

Tabla 1. Parámetros clínicos y metabólicos en base a 3 grupos. Media (IC 95%).

	G1 IMC<25 Media (95% CI) n=82	G2 IMC>30; EHNA(-) Media (95% CI) n=24	G3 IMC>30; EHNA (+) Media (95% CI) n=31	Valor-p	Factor en SEM
Antropométrico					
Edad	28(26,29) ^b	27(24,32) ^b	36(33,39) ^a	<0.001	
Género (% Mujeres)	65	87	71	0.098	
IMC	22.2 (22,23) ^c	32.9 (32,34) ^b	36.2 (34,38) ^a	<0.001	OB
Circunferencia Abdominal (cm)	73.42(72,75) ^c	85 (75,95) ^b	102.48 (96,107) ^a	<0.001	OB
%Grasa Total	29.7 (28,31) ^b	40.88 (37,45) ^a	41.63 (32,36) ^a	<0.001	OB
% masa magra	67.6 (67.6,69.2) ^b	57.5(53.7, 60.2) ^a	56.2 (53.7,58.8) ^a	<0.001	

Sensibilidad a la Insulina					
AUC glucosa	435.91(75.71) ^b	464.65(76.75) ^b	515.20 (67.96) ^a	<0.001	
Indice de Matsuda	6.1 (5.4,6.9) ^a	4.8 (4,6) ^a	3.1 (2.4,3.9) ^b	<0.001	IR
Lípidos y pruebas de función hepática					
Colesterol Total (mg/dl)	170 (164,176) ^b	173(161,186) ^b	190 (178,202) ^a	0.008	
Triglicéridos (mg/dl)	93 (85,101) ^b	114 (98,132) ^b	170 (141,206) ^a	<0.001	
HDL(mg/dl)	48 (46,51) ^a	44 (39,50) ^{a,b}	49 (36,42) ^b	0.001	
LDL (mg/dl)	100 (95,105) ^b	110 (102,120, ^{a,b}	119(110,129) ^a	0.001	
ALT (U/L)	19 (17,20) ^c	21 (16,26) ^b	31 (26,37) ^a	<0.001	EHNA
AST (U/L)	21 (20,23) ^b	22 (19,25) ^{a,b}	26 (23.29) ^a	0.005	EHNA
Marcadores inflamatorios					
PCR (mg/dl)	1.9 (1.7,2.2) ^b	4.2 (3.1,5.7) ^a	4.8 (3.9,5.9) ^a	<0.001	PCR
IL-6 (pg/dl)	1.15 (0.96,1.37)	0.66 (0.33,1.3)	0.85 (0.68,1.02)	0.056	INFL
TNFa (pg/dl)	1.14 (0.9,1.43)	75 (0.41,1.3)	0.9 (0.72,1.3)	0.234	INFL
Aminoácidos					
Arginina (µM)	36.3 (33,40) ^b	42.3(37,48.3) ^{a,b}	45.2(39.2,52.1) ^a	0.027	AA1
Citrulina (µM)	9 (8.5, 9.5)	9.5 (8.5,10.6)	9.2(8.3,10.35)	0.656	AA2
Glicina (µM)	101.8 (96.4,105.2)	101.8 (92.5,112)	99.6(92.4,107.3)	0.926	AA1
Alanina (µM)	112 (106.9,117.6) ^b	122.1(113.6,131.7) ^{a,b}	128.3 (119.1,138.1) ^a	0.006	AA2
Leucina (µM)	54.2 (50.6,57.9) ^b	59.3 (54.4, 64.7) ^{a,b}	63.6(57.9,69.9) ^a	0.022	AA1
Metionina(µM)	4.5 (4.3,4.8)	4.6(4.29,5.1)	4.7 (4.3,5.12)	0.737	AA2
Fenilalanina (µM)	20.9 (19.4, 22.4) ^b	24.48 (19.4,22.4) ^{a,b}	25 (22.7, 27.6) ^a	0.005	AA1
Tirosina (µM)	23.2 (22, 24.4) ^b	26.4 (24,29) ^a	28 (26.6,31.2) ^a	<0.001	AA2
Valina (µM)	56.6 (53.8,59.5) ^b	63.035 (12.9) ^{a,b}	67.69 (16.2) ^a	0.004	AA1
Ornitina (µM)	7.9 (7.4,8.6) ^b	10.15 (8.7,11.8) ^a	10.23(9.1,,11.4) ^a	<0.001	AA2
Prolina (µM)	61.2(57.1,65.7) ^a	64.6(56.8,73.6) ^{a,b}	74.5(67.19,82.79) ^a	0.012	AA2
Acilcarnitinas					
C0 (µM)	12.4 (11.7,13.2) ^b	13.9 (12.8,15.3) ^a	13.8(12.6,15.2) ^a	0.044	AC3
C2 (µM)	0.12 (0.11,0.13)	0.13(0.10,0.15)	0.13 (0.10,0.16)	0.794	AC1
C3 (µM)	0.029 (0.026,0.031)	0.033(0.028,0.04)	0.034(0.029,0.040)	0.075	AC1

C4 (μM)	0.035 (0.033,0.036)	0.034(0.030,0.039)	0.035(0.032,0.039)	0.922	AC1
C5 (μM)	0.030 (0.027,0.032)	0.035(0.031,0.039)	0.035(0.028,0.039)	0.078	AC2
C6 (μM)	0.016 (0.0148,0.173)	0.017(0.015,0.02)	0.017(0.015,0.02)	0.243	AC2
C8 (μM)	0.036(0.033, 0.04)	0.039(0.034,0.04)	0.036(0.03,0.04)	0.745	AC2
C10 (μM)	0.07 (0.06, 0.07)	0.069(0.06, 0.07)	0.06 (0.05, 0.07)	0.11	AC2
C10:1 (μM)	0.105 (0.10,0.11)	0.10 (0.0.11, 0.98)	0.103 (0.09,0.11)	0.571	AC2
C10:2 (μM)	0.018 (0.0.017,0.019) ^b	0.018(0.015,0.021) ^{a,b}	0.021(0.019,0.023) ^a	0.05	AC2
C12 (μM)	0.38 (0.036,0.041)	0.037(0.034,0.042)	0.036(0.032,0.040)	0.353	AC2
C12:1 (μM)	0.049(0.047, 0.052)	0.051(0.048,0.055)	0.047(0.043,0.052)	0.769	AC2
C14(μM)	0.014 (0.013,0.015)	0.014 (0.012, 0.016)	0.015(0.013, 0.017)	0.887	AC2
C14:1 (μM)	0.037 (0.035,0.039)	0.037(0.033,0.041)	0.036(0.032,0.040)	0.037	AC2
C14:2 (μM)	0.015 (0.014,0.016)	0.015 (0.013,0.018)	0.014(0.012,0.017)	0.579	AC2
C16 (μM)	0.029 (0.028, 0.031)	0.034(0.030, 0.038)	0.031 (0.027, 0.034)	0.859	AC3
C16:1 (μM)	0.009 (0.007, 0.011)	0.008(0.004, 0.015)	0.01 (0.009, 0.011)	0.813	AC3
C18:1OH (μM)	0.0005(0.0002, 0.0012)	0.0007 (0.0001,0.003)	0.0008(0.0002, 0.002)	0.83	AC4
C18:2 (μM)	0.015 (0.014, 0.016)	0.018(0.016, 0.020)	0.016(0.013, 0.018)	0.12	AC3
C18OH (μM)	0.001 (0.0009,0.0004)	0.0005(0.0001, 0.002)	0.0001(0.00005, 0.0006)	0.377	AC4

Tabla 1. Diferencia entre los 3 grupos. ANOVA de una vía. Post HOC LSD. Los valores son expresados en antilogaritmos. Solo se presentan las acilcarnitinas y aminoácidos usados en SEM.

La tabla 1 muestra la diferencia entre los 3 grupos de estudio en donde G1 equivale a los pacientes con IMC <25 sin EHNA, G2 a los pacientes con IMC >30 sin EHNA y G3 IMC >30 con EHNA.

Se observaron diferencias antropométricas entre los tres grupos, como era de esperarse, en donde G2 y G3 presentaron mayor IMC, mayor porcentaje de grasa y menor masa magra ($p < 0.001$). La prueba de ANOVA con su análisis de Post HOC también demostró diferencia entre los tres grupos en los niveles de triglicéridos, HDL, LDL y enzimas hepáticas ($p < 0.001$). En este tipo de análisis proteína C reactiva estuvo más alta en G2 y G3. Finalmente algunos

aminoácidos y acilcarnitinas demostraron ser diferentes entre los 3 grupos ($p < 0.05$, ver tabla 1).

Gráfico 1.

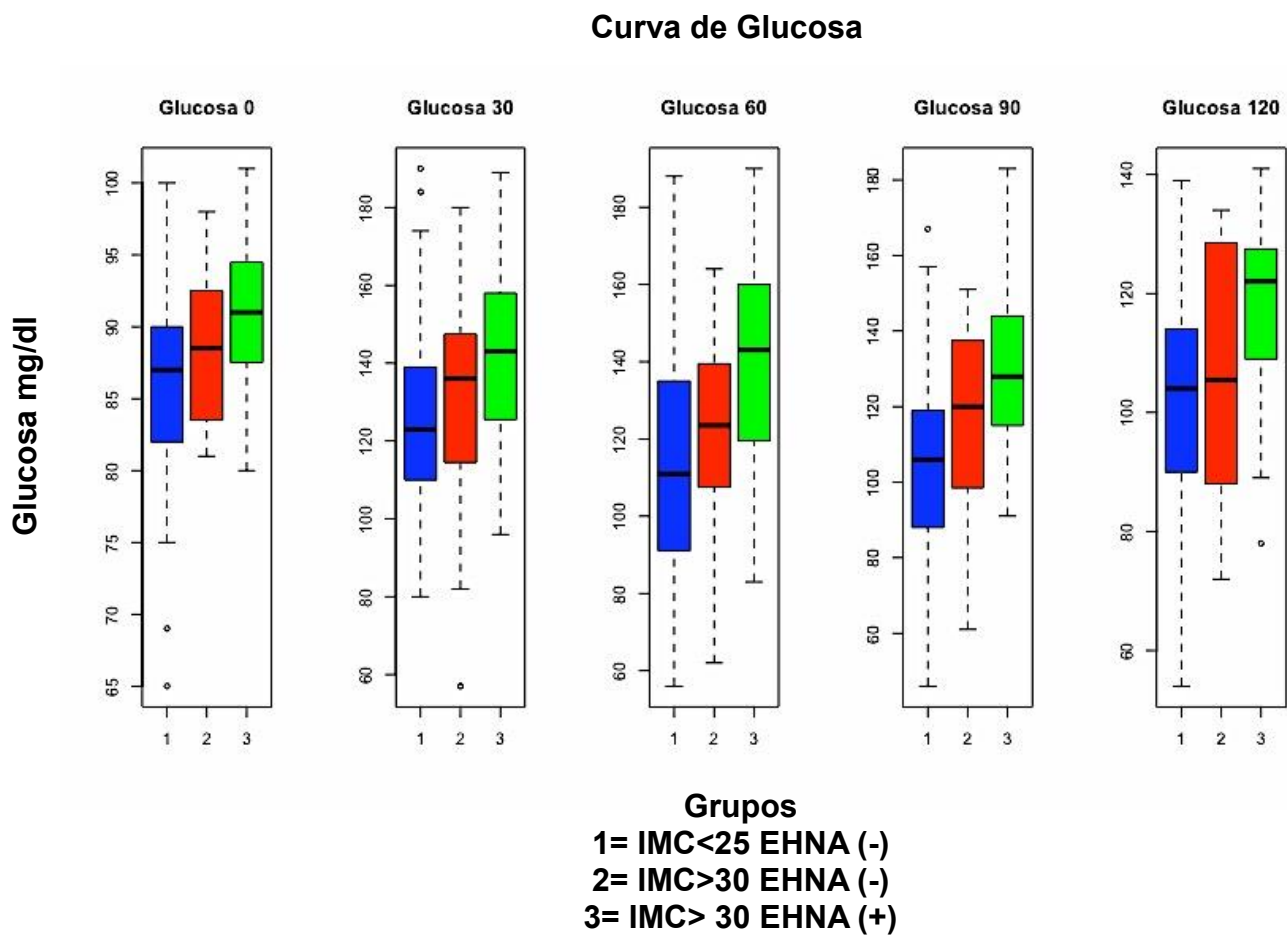


Gráfico 1. Diagrama de cajas y bigotes de los niveles de glucosa en los 3 grupos.

Gráfico 2.

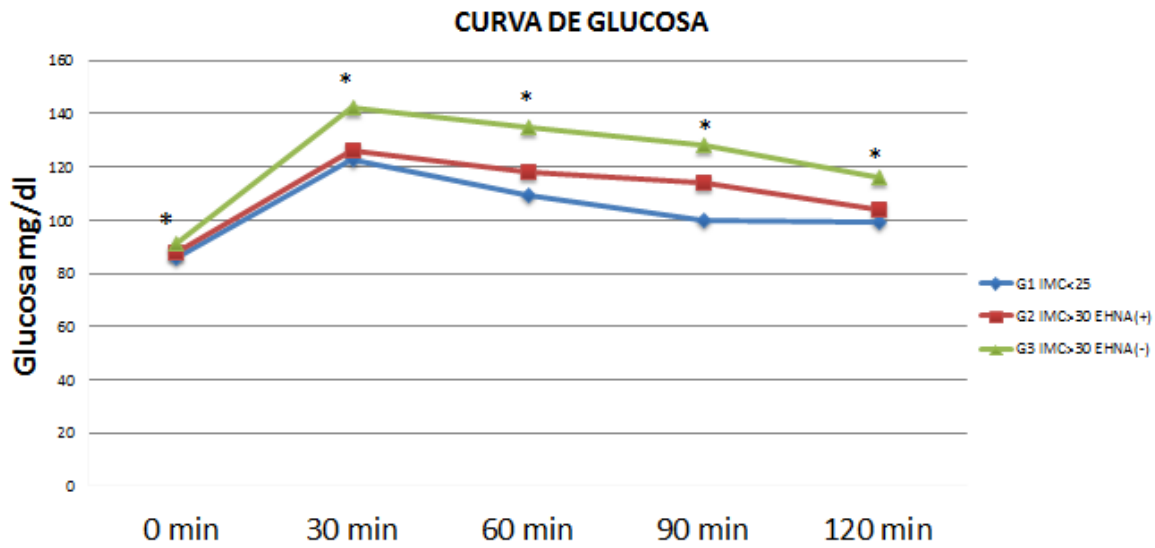


Gráfico 2. Curva de glucosa de los 3 grupos. (*)= $p < 0.01$ en análisis post HOC.

En el gráfico 1 y 2 se muestran las curvas de tolerancia a la glucosa de G1-G3. En estas gráficas se observa que ningún paciente tiene criterio diagnóstico de diabetes; sin embargo, hay mayor elevación de glucosa en G2 y G3 comparado con G1.

Gráfico 3.

Curva de Insulina

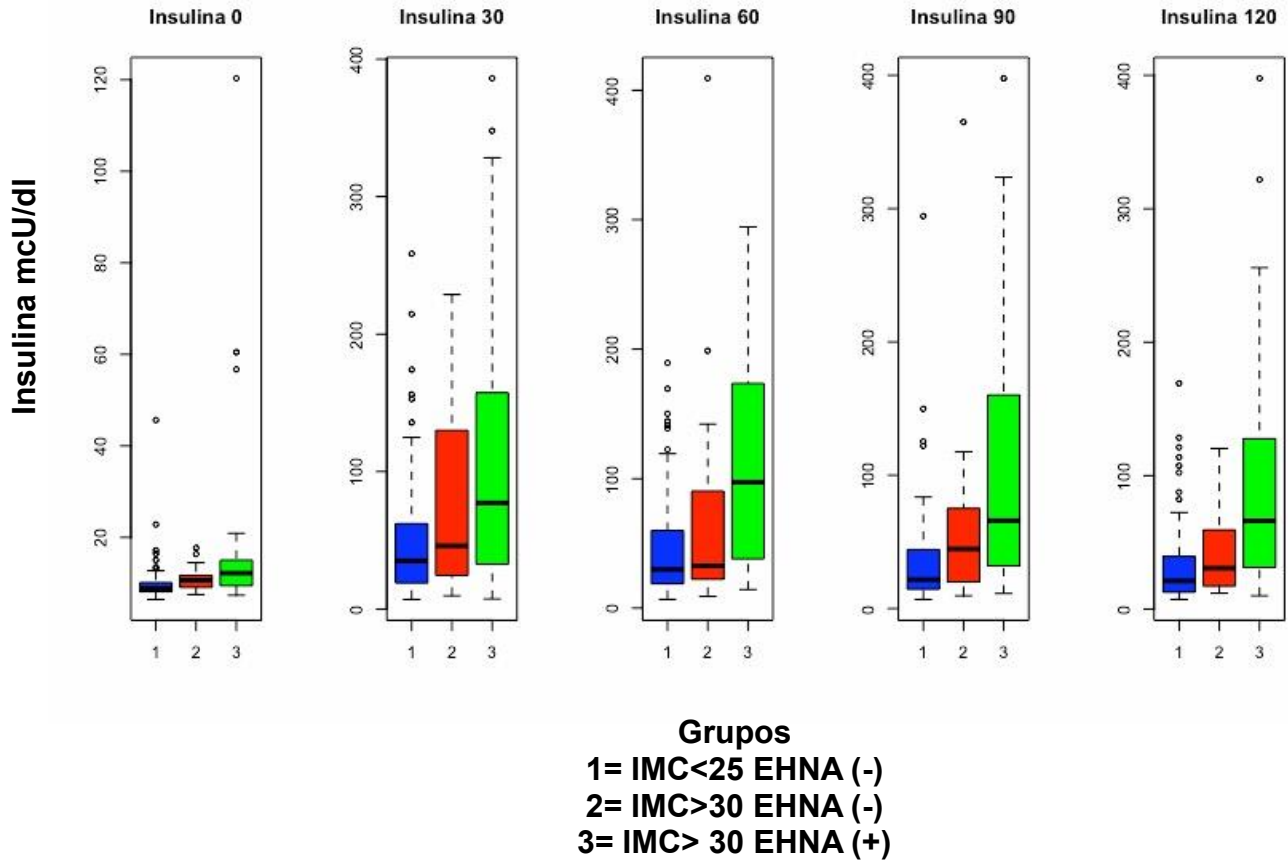


Gráfico 3. Diagrama de cajas y bigotes de los niveles de insulina en los 3 grupos.

Gráfico 4. Curva de Insulina

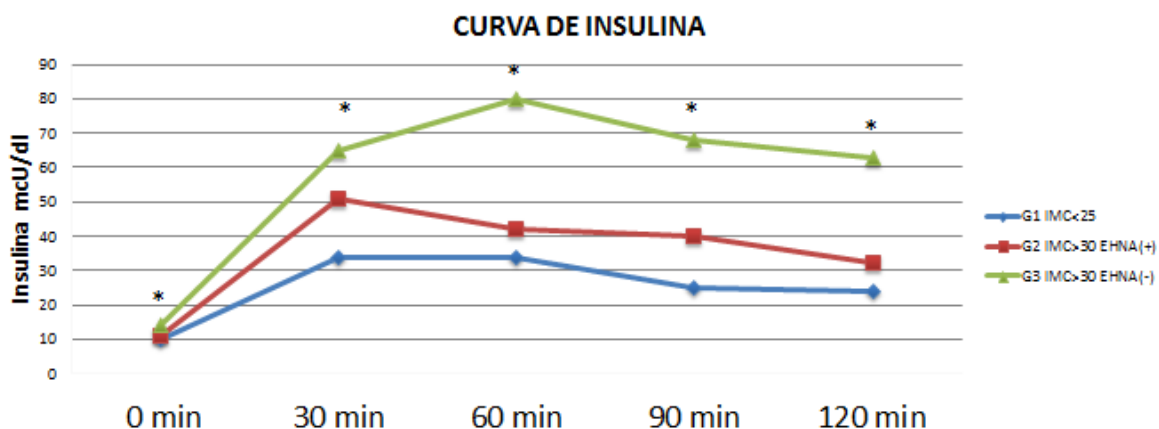


Gráfico 4. Curva de Insulina de los 3 grupos. *= $p < 0.01$

En el gráfico 3 y 4 se muestran las curvas de insulina de G1-G3. En estas gráficas se observa cómo los pacientes con obesidad y EHNA tienen mayores niveles de insulina que los pacientes con obesidad y delgados.

Tabla 2. Historia familiar de obesidad en 3 grupos.

	n=137	G1 n (%) n=82	G2 n (%) n=24	G3 n (%) n=31	Valor-p	Variables en SEM
Historia Familiar de Obesidad (FHOB)	72 (53)	38 (46)	14 (58)	20 (65)	0.14	
Directo	46 (34)	23 (28)	14 (58)	9 (29)	0.02	
Madre	32 (23)	14 (17)	13 (54)	5 (16)	<0.001	MomFHOB
Padre	24 (17)	15 (60)	6 (25)	5 (16)	0.57	DadFHOB
Indirecto	54 (39)	30 (37)	10 (41.7)	14 (45)	0.57	IndFHOB

Tabla 2. Historia familiar de obesidad en G1, G2, G3. G1= IMC < 25, EHNA negativo; G2= IMC > 30, EHNA negativo; G3 = BMI > 30 + EHNA. Los números en paréntesis corresponden al porcentaje de pacientes con antecedente familiar.

En la tabla 2 se muestra la historia familiar de obesidad de los tres grupos. No hay diferencia global entre grupos (FHOB Directo+Indirecto); sin embargo, G2 tiene una proporción mayor en el subgrupo de historia familiar materna que el resto de grupos ($p < 0.01$)

11.2 Análisis de Componentes principales y PLSDA

Se realizó análisis de componentes principales y análisis de PLSDA con las variables correspondientes a perfil de metabólico e inflamatorio. Los datos fueron normalizados y estandarizados. En el análisis de componentes principales no se observó separación entre los 3 grupos. Sin embargo, el análisis de PLSDA mostro una discreta separación entre G1 y G3, mientras que G2 se sobre impuso entre los otros 2. 3 componentes explicaron el 62% de la variancia (certeza 0.68, R2 0.6, Q2 0.39, $p < 0.001$). Ver figura 5 y 6.

Análisis de Componentes Principales

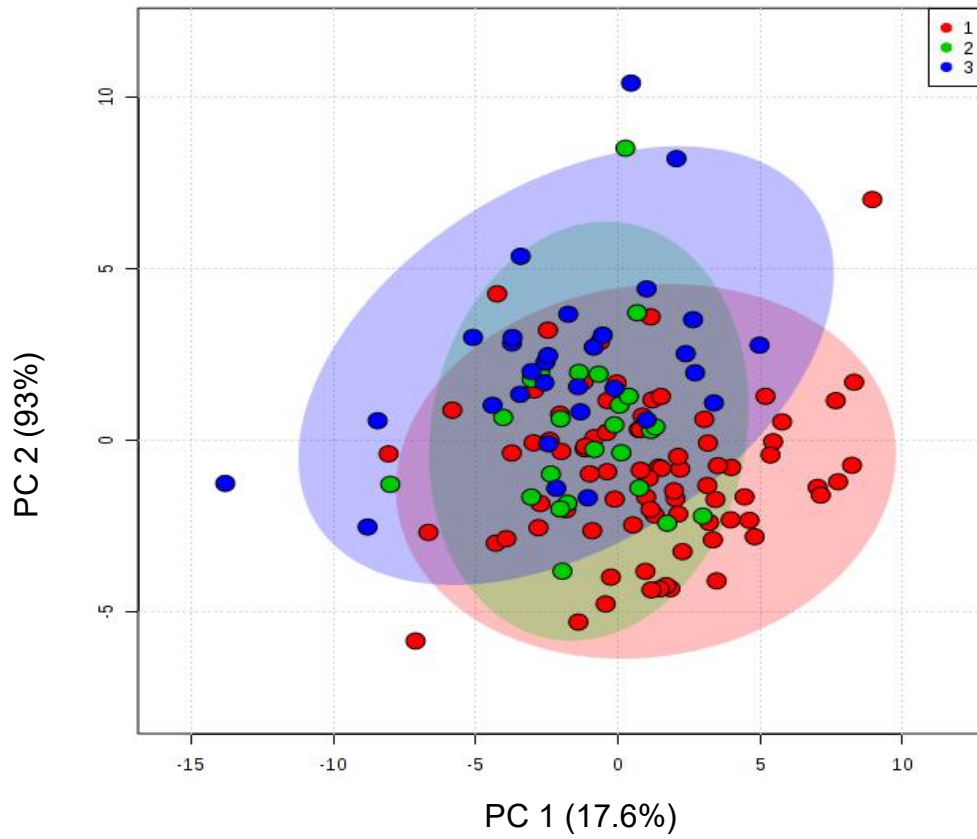
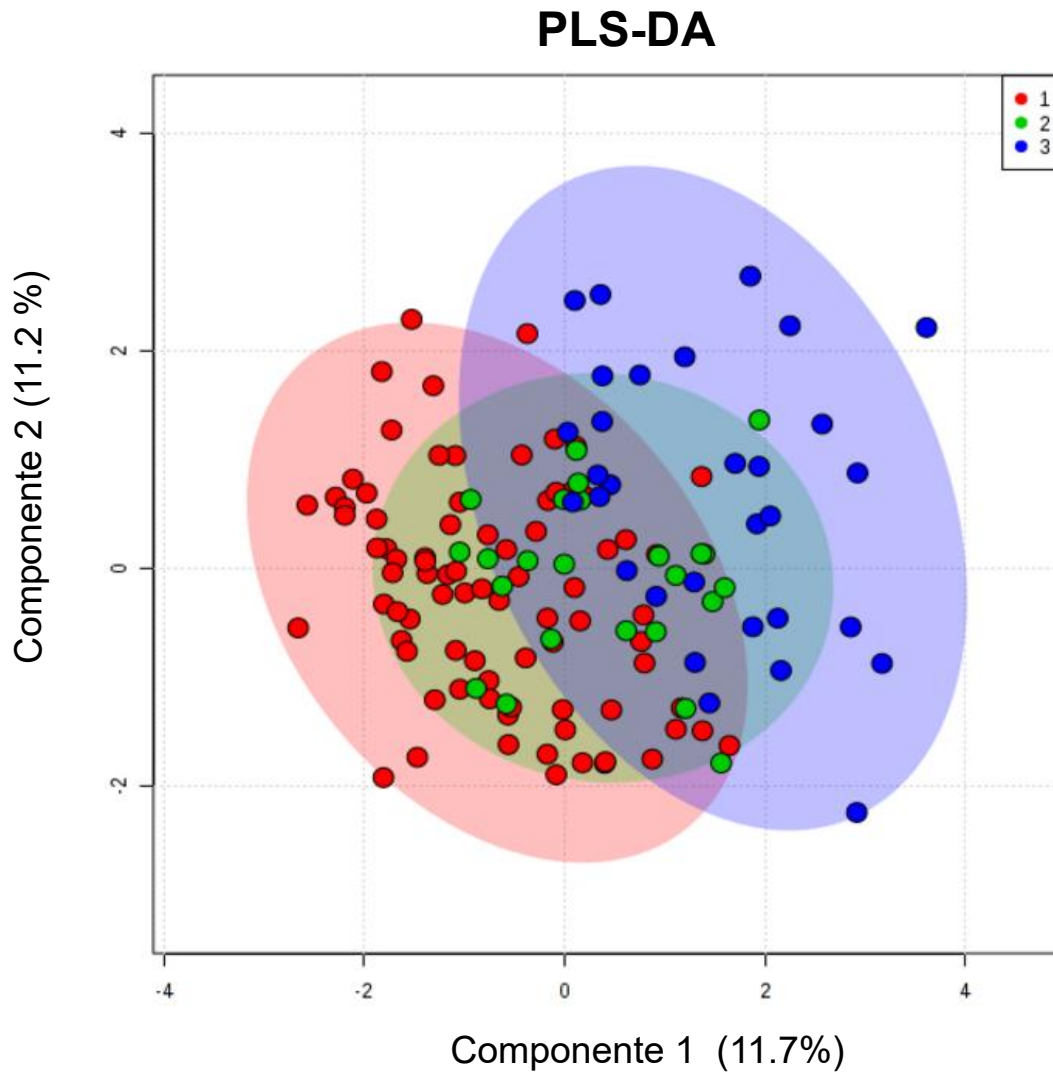
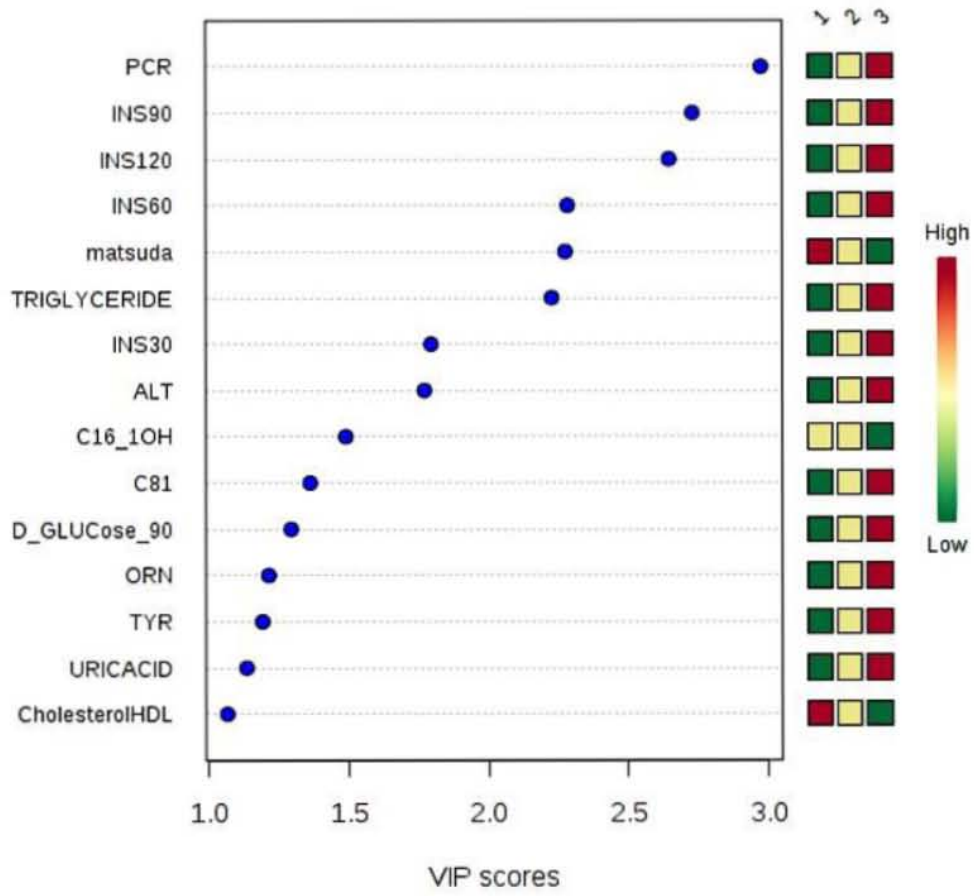


Figura 5. Análisis de Componentes Principales entre los grupos: 1= rojo=IMC< 25, 2= verde= IMC> 30+ EHNA Negativo; 3= azul= IMC> 30+ EHNA Positivo

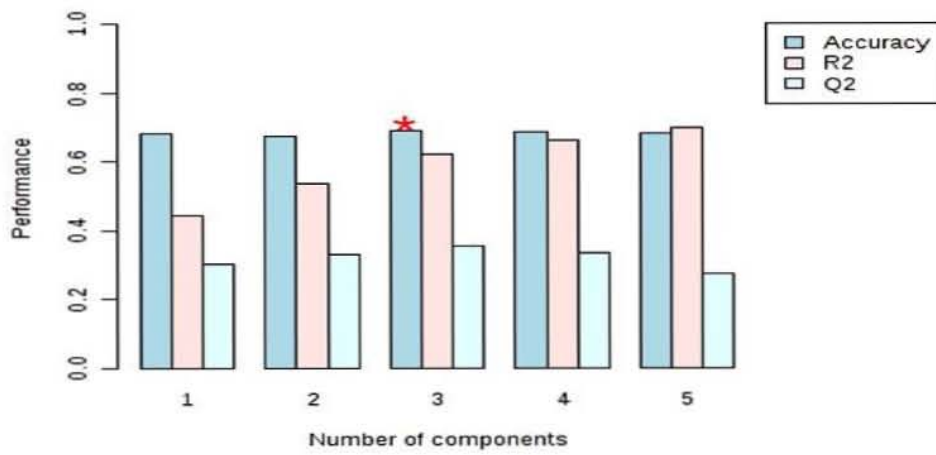
a)



b)



c)



d)

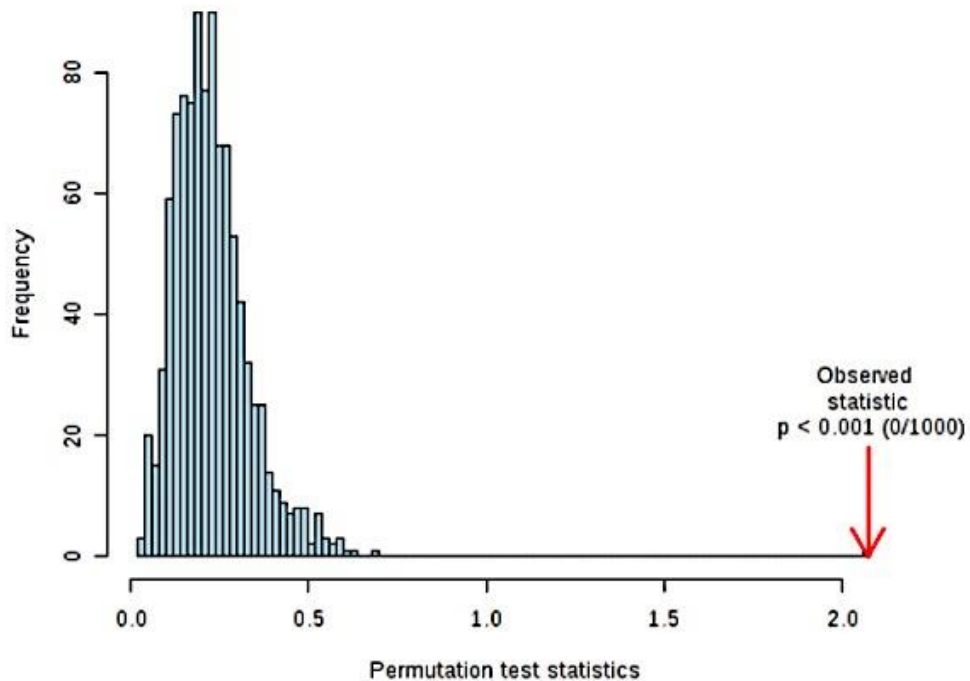


Figura 6. PLSDA entre los 3 grupos. a) Imagen 2 D PLSDA, b) Variables en proyección más importantes que permiten la discriminación entre grupos. c) Ajuste del modelo. d) Modelo de validación a través de 1000 permutaciones

11.3 Ecuaciones estructurales

Creamos 3 modelos de ecuación estructural. En todos los modelos las acilcarnitinas se agruparon en 4 factores, mientras que los aminoácidos se agruparon en 2 factores (ver tabla 1).

Hipótesis 1.

En la primera hipótesis se propuso que OB ocasiona exceso de ácidos grasos libres que aumenten el estrés oxidativo y disfunción mitocondrial, esto incrementará la presencia de AC

circulantes. Las AC inducirán aumento de INFL y también habrá incremento en AA. Lo anterior inducirá EHNA y IR. En este modelo se obtuvo un RMSEA de 0.076 (0.069, 0.082). Los B estandarizados y no estandarizados se pueden observar en la Figura 7 y Tabla 3.

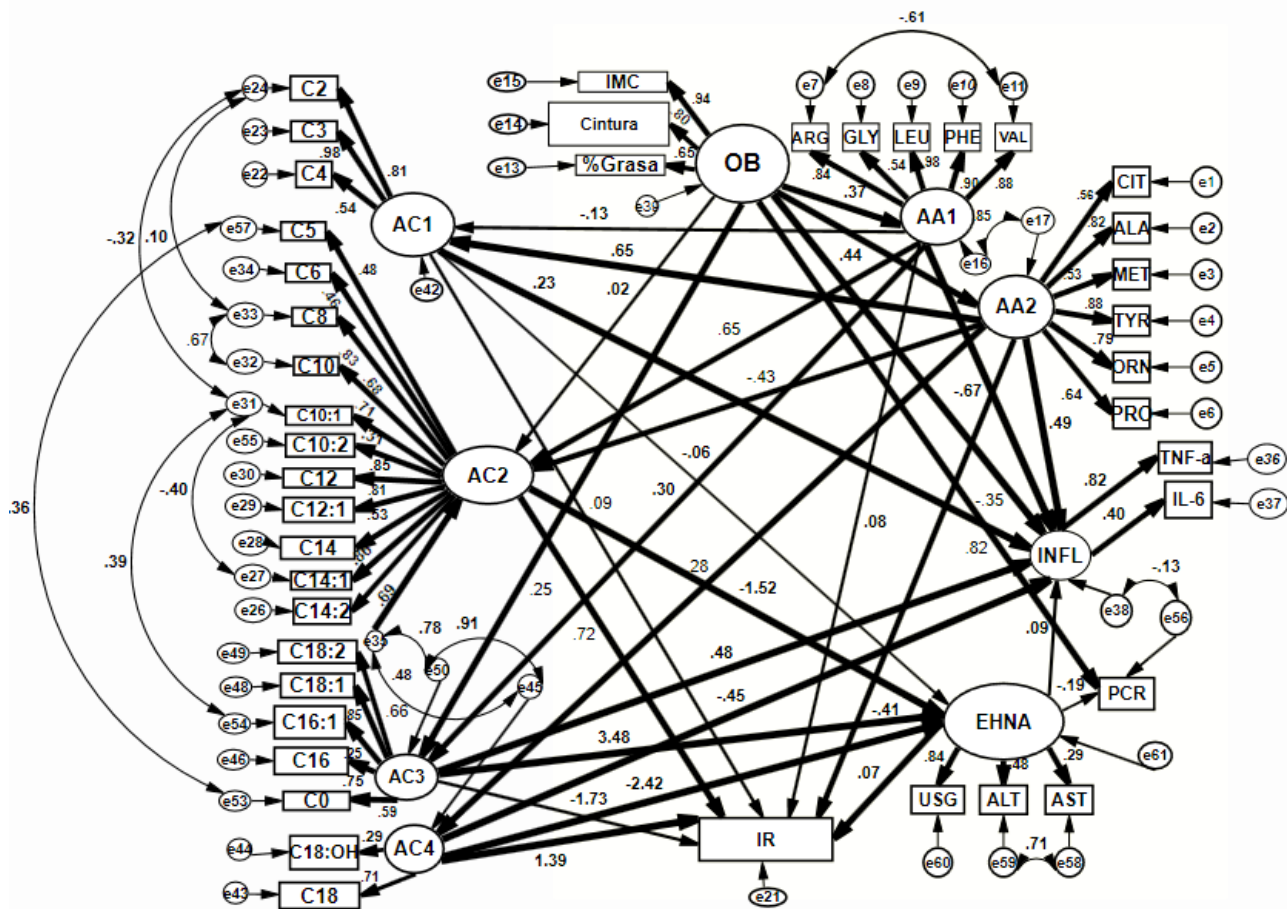


Figura 7. Hipótesis 1. Círculos= variables latentes, rectángulos= variables observadas, e= término de error. AC1, AC2, AC3 Y AC4. Factores de agrupación de acilcarnitinas. AA1 Y AA2 factores de agrupación de aminoácidos. OB= obesidad, IMC= Índice de masa corporal. Cintura= circunferencia de cintura., % Grasa = % de grasa total. AC1, AC2, AC3 y AC4= factores de agrupación de acilcarnitinas C2-C18:2. AA1 y AA2 factores de agrupación de aminoácidos. ALA= alanina, CIT= citrulina, MET= metionina, TYR= tirosina, ORN= ornitina, PRO= prolina, ARG= arginina, GLY= glicina, LEU= leucina, PHE= felialanina, VAL= valina. PCR= Proteína C reactiva. INFL= macadores inflamatorios, TNF-a = Factor de necrosis

tumoral alpha, IL-6= Interleucina 6. USG: ultrasonido de hígado. ALT= Alanina aminotransferasa, AST=Aspartato aminotransferasa. Las líneas en negritas = B estandarizado > 0.2

Tabla 3. Estimados de hipótesis 1.

Factores/variables		β	β std	S.E	Valor-p
OB	AA1	0.705	0.369	0.181	<0.001
	AA2	0.337	0.436	0.087	<0.001
	Cintura	0.886	0.804	0.109	<0.001
	AC2	0.031	0.021	0.14	0.823
	AC3	0.284	0.251	0.091	0.002
	IMC	1.265	0.936	0.142	<0.001
	Grasa	1	0.654		
	INFL	-1.661	-0.351	1.576	0.292
	PCR	3.268	0.819	0.848	<0.001
AA1	AC1	-0.065	-0.134	0.091	0.474
	AC2	0.518	0.653	0.135	<0.001
	AC3	0.179	0.301	0.046	<0.001
	ARG	1	0.843		
	GLY	0.312	0.54	0.046	<0.001
	INFL	-1.655	-0.669	0.686	0.016
	LEU	0.798	0.976	0.048	<0.001
	IR	0.14	0.082	0.344	0.684
	PHE	0.794	0.902	0.055	<0.001
	VAL	0.58	0.883	0.053	<0.001
AA2	AC1	0.779	0.649	0.275	0.005
	AC2	-0.839	-0.428	0.309	0.007
	AC4	0.512	0.278	0.18	0.004
	ALA	1.242	0.819	0.183	<0.001
	CIT	1	0.558		
	INFL	2.982	0.488	1.917	0.12
	IR	-1.719	-0.407	0.992	0.083
	MET	0.816	0.526	0.16	<0.001

	ORN	1.969	0.794	0.294	<0.001
	PRO	1.434	0.643	0.244	<0.001
	TYR	1.54	0.885	0.218	<0.001
AC1	C2	2.471	0.81	0.364	<0.001
	C3	2.324	0.982	0.345	<0.001
	C4	1	0.543		
	EHNA	-0.027	-0.058	0.042	0.514
	INFL	1.174	0.23	0.655	0.073
	IR	0.31	0.088	0.428	0.469
	AC2	C10	1.264	0.832	0.138
C10:1		0.605	0.71	0.075	<0.001
C10:2		0.317	0.306	0.092	<0.001
C12		0.908	0.854	0.097	<0.001
C12:1		0.671	0.815	0.075	<0.001
C14		0.694	0.53	0.117	<0.001
C14:1		0.857	0.864	0.091	<0.001
C14:2		1	0.695		
C5		0.593	0.48	0.108	<0.001
C6		0.557	0.455	0.109	<0.001
C8		1.075	0.684	0.141	<0.001
EHNA		-0.442	-1.522	0.201	0.028
IR		1.559	0.723	4.696	0.74
AC3		C0	0.707	0.594	0.102
	C16	1	0.753		
	C16:1	1.016	0.248	0.359	0.005
	C18:1	1.267	0.848	0.127	<0.001
	C18:2	1.16	0.656	0.154	<0.001
	EHNA	1.351	3.484	0.553	0.015
	INFL	1.993	0.478	1.422	0.161
	IR	-4.987	-1.731	14.397	0.729
AC4	EHNA	-0.747	-2.416	0.325	0.021
	C18	1	0.705		
	C18:1OH	3.704	0.287	1.263	0.003
	INFL	-1.51	-0.454	1.154	0.191
	IR	3.187	1.387	8.052	0.692
EHNA	ALT	2.81	0.48	0.637	<0.001

	AST	1	0.289		
	INFL	0.976	0.091	3.685	0.791
	IR	0.491	0.066	10.24	0.962
	NAFLD	9.946	0.838	3.272	0.002
	PCR	-1.73	-0.191	1.939	0.372
INFL	TNFa	1	0.822		
	IL6	0.477	0.396	0.257	0.064

Tabla 3. Modelo 1, Hipótesis 1. β estandarizada (β std) y no estandarizada (β). OB= obesidad, IMC= Índice de masa corporal. Cintura=circunferencia de cintura. % Grasa = % de grasa total. AC1, AC2, AC3 y AC4= factores de agrupación de acilcarnitinas C2-C18:2. AA1 y AA2 factores de agrupación de aminoácidos. ALA= alanina, CIT= citrulina, MET= metionina, TYR= tirosina, ORN= ornitina, PRO= prolina, ARG= arginina, GLY= glicina, LEU= leucina, PHE= fenilalanina, VAL= valina. PCR= Proteína C reactiva. INFL= Marcadores inflamatorios, TNF-a = Factor de necrosis tumoral alpha, IL-6= Interleucina 6. USG: ultrasonido de hígado. ALT= Alanina aminotransferasa, AST=Aspartato aminotransferasa

Hipótesis 2.

Si FHOB produce aumento en la concentración de AA libres en suero, tal vez por defecto en la utilización, esto va a inducir disminución en IR. También va a provocar aumento en las AC que inducirá EHNA y OB. A pesar de que esta hipótesis pudo ser demostrada en el modelo simulado; al realizarlo con datos reales, no convergió

Hipótesis 3.

Si FHOB afecta la concentración de AA y AC en suero, ambas llevarán al aumento de INFL, EHNA y OB. Todos estos fenómenos explicarán RI. La OB será un epifenómeno asociado al aumento de ácidos grasos libres. El RMSEA de este modelo fue 0.072 (0.067, 0.078). Los resultados se muestran en la Figura 8 y los estimados en la Tabla 4.

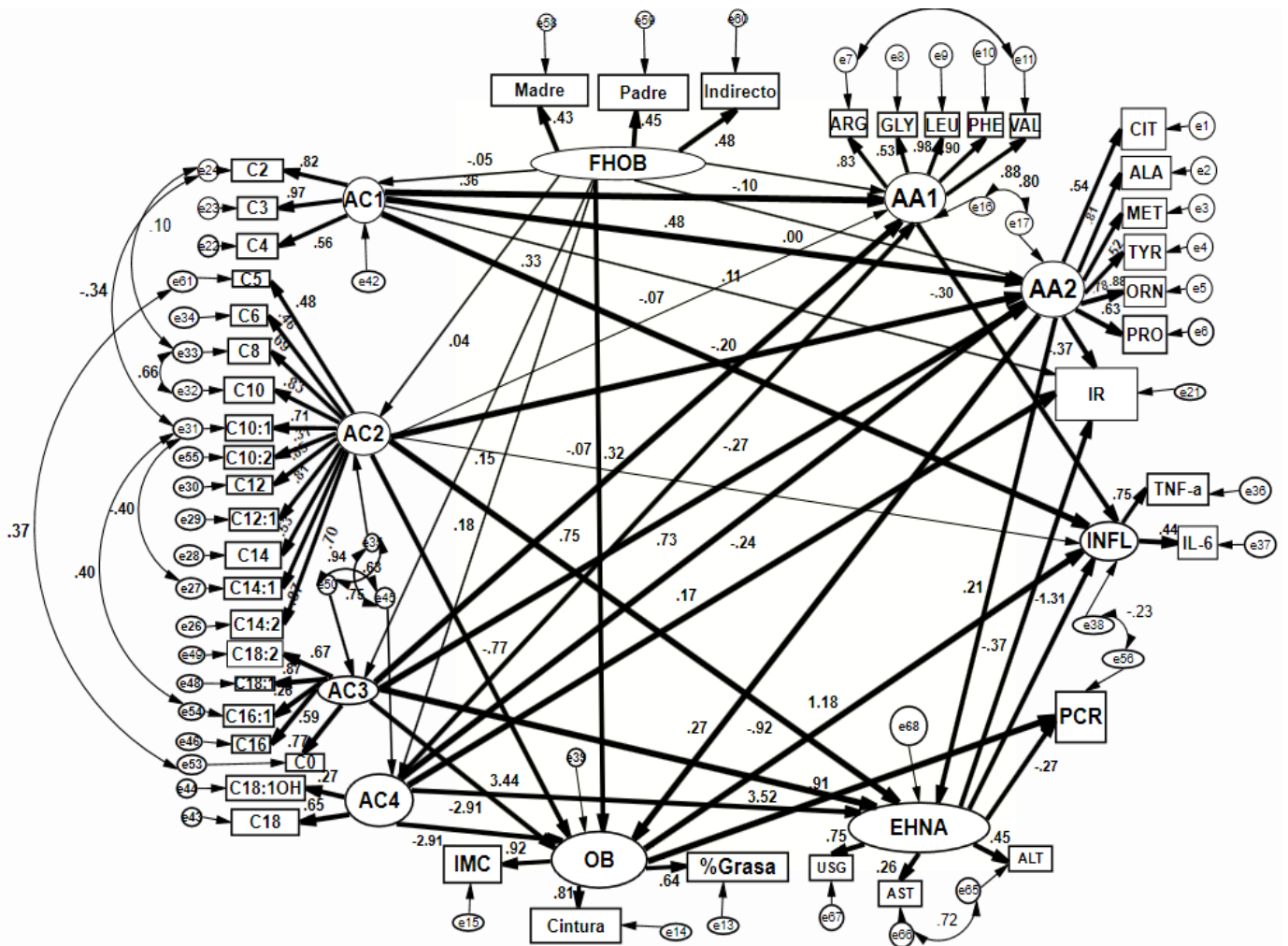


Figura 8. Modelo 2. Hipótesis 3. SEM. Círculos= variables latentes, rectángulos= variables observadas, e= término de error. AC1, AC2, AC3 Y AC4. Factores de agrupación de acilcarnitinas. AA1 Y AA2 factores de agrupación de aminoácidos. FHOB= historia familiar de obesidad. Indirecto= historia familiar de obesidad de segundo grado, Padre= historia familiar de obesidad del padre. Madre= historia familiar de obesidad materna. OB= obesidad, IMC= Índice de masa corporal. Cintura= circunferencia de cintura, % grasa= % de grasa total. AC1, AC2, AC3 y AC4= factores de agrupación de acilcarnitinas C2-C18:2. AA1 y AA2 factores de agrupación de aminoácidos. ALA= alanina, CIT= citrulina, MET= metionina, TYR= tirosina, ORN= ornitina, PRO= prolina, ARG= arginina, GLY= glicina, LEU= leucina, PHE= fenilalanina, VAL= valina. PCR= Proteína C Reactiva. INFL= macadores inflamatorios, TNF-a = Factor de necrosis tumoral alpha, IL-6= Interleucina 6. USG: ultrasonido de hígado. ALT= Alanina

aminotransferasa, AST=Aspartato aminotransferasa. Las líneas en negritas = B estandarizado > 0.2

Tabla 4. Estimados de hipótesis 3

Factores/variables		β	β std	S.E	Valor-p
FHOB	AC1	-0.021	-0.05	0.053	0.698
	AA1	-0.084	-0.104	0.094	0.369
	AA2	0.001	0.004	0.038	0.973
	AC2	0.028	0.042	0.09	0.753
	AC3	0.077	0.15	0.074	0.3
	AC4	0.106	0.182	0.09	0.238
	Padre	0.949	0.453	0.345	0.006
	Indirecto	1.282	0.476	0.458	0.005
	Madre	1	0.429		
	OB	0.14	0.324	0.063	0.027
AA1	INFL	-0.705	-0.3	0.368	0.055
	ARG	1	0.833		
	GLY	0.313	0.528	0.047	<0.001
	LEU	0.801	0.976	0.05	<0.001
	PHE	0.796	0.897	0.058	<0.001
	VAL	0.582	0.878	0.055	<0.001
AA2	ALA	1.241	0.807	0.191	<0.001
	CIT	1	0.543		
	EHNA	0.323	0.208	0.281	0.25
	IR	-1.61	-0.367	0.529	0.002
	MET	0.828	0.519	0.168	<0.001
	OB	0.36	0.273	0.222	0.104
	ORN	1.973	0.784	0.308	<0.001
	PRO	1.446	0.634	0.255	<0.001
	TYR	1.553	0.883	0.229	<0.001
AC1	AA2	0.372	0.475	0.093	<0.001
	AA1	0.692	0.355	0.178	<0.001
	C2	2.432	0.82	0.35	<0.001
	C3	2.233	0.967	0.324	<0.001
	C4	1	0.556		
	INFL	1.49	0.326	0.6	0.013
	IR	0.362	0.105	0.312	0.247

AC2	AA2	-0.096	-0.197	0.084	0.252
	AA1	-0.088	-0.072	0.195	0.654
	C10	1.26	0.834	0.136	<0.001
	C10:1	0.603	0.711	0.074	<0.001
	C10:2	0.318	0.31	0.091	<0.001
	C12	0.902	0.853	0.095	<0.001
	C12:1	0.668	0.815	0.074	<0.001
	C14	0.692	0.532	0.116	<0.001
	C14:1	0.854	0.865	0.09	<0.001
	C14:2	1	0.699		
	C5	0.584	0.478	0.106	<0.001
	C6	0.557	0.459	0.108	<0.001
	C8	1.076	0.689	0.139	<0.001
	EHNA	-0.696	-0.921	0.441	0.114
	INFL	-0.194	-0.068	0.471	0.68
	OB	-0.492	-0.767	0.36	0.171
AC3	AA2	0.47	0.732	0.351	0.18
	AA1	1.192	0.748	0.767	0.121
	C0	0.694	0.594	0.1	<0.001
	C16	1	0.766		
	C16:1	1.048	0.261	0.35	0.003
	C18:1	1.28	0.869	0.124	<0.001
	C18:2	1.156	0.665	0.149	<0.001
	EHNA	3.506	3.524	1.395	0.012
	OB	2.903	3.436	1.2	0.016
AC4	AA2	-0.137	-0.244	0.265	0.606
	AA1	-0.373	-0.268	0.583	0.523
	C18	1	0.654		
	C18:1OH	3.779	0.273	1.308	0.004
	EHNA	-2.523	-2.91	1.033	0.015
	IR	0.428	0.175	0.231	0.064
	OB	-2.142	-2.91	0.91	0.019
OB	INFL	5.245	1.184	2.842	0.065
	Cintura	0.905	0.811	0.114	<0.001
	IMC	1.26	0.922	0.146	<0.001
	% Grasa	1	0.644		
	PCR	3.669	0.907	1.262	0.004
EHNA	INFL	-4.918	-1.307	2.53	0.052

	ALT	1	0.448		
	AST	0.339	0.258	0.083	<0.001
	IR	-1.048	-0.371	0.311	<0.001
	EHNA	3.405	0.752	0.673	<0.001
	PCR	-0.929	-0.271	1.043	0.373
INFL	IL6	0.581	0.442	0.219	0.008
	TNFa	1	0.749		

Tabla 4. Modelo 2. Hipótesis 3. β estandarizada (β std) y no estandarizada (β). FHOB= historia familiar de obesidad. Indirecto=historia familiar de obesidad de segundo grado, Padre= historia familiar de obesidad del padre. Madre= historia familiar de obesidad materna. OB= obesidad, IMC= Índice de masa corporal. Cintura=circunferencia de cintura. % Grasa = % de grasa total. AC1, AC2, AC3 y AC4= factores de agrupación de acilcarnitinas C2-C18:2. AA1 y AA2 factores de agrupación de aminoácidos. ALA= alanina, CIT= citrulina, MET= metionina, TYR= tirosina, ORN= ornitina, PRO= prolina, ARG= arginina, GLY= glicina, LEU= leucina, PHE= fenilalanina, VAL= valina. PCR= Proteína C reactiva. INFL= Marcadores inflamatorios, TNF-a = Factor de necrosis tumoral alpha, IL-6= Interleucina 6. USG: ultrasonido de hígado. ALT= Alanina aminotransferasa, AST=Aspartato aminotransferasa

En base al resultado de los modelos previos en donde se demostró que FHOB no predice con B std > 0.2 AC y AA pero si OB se creó una cuarta hipótesis y tercer modelo en donde en donde FHOB predice OB y esta predice AA y AC y subsecuentemente INFL, EHNA e IR. El RMSEA de este modelo fue 0.075 (0.069, 0.081) (Figura 9, Tabla 5).

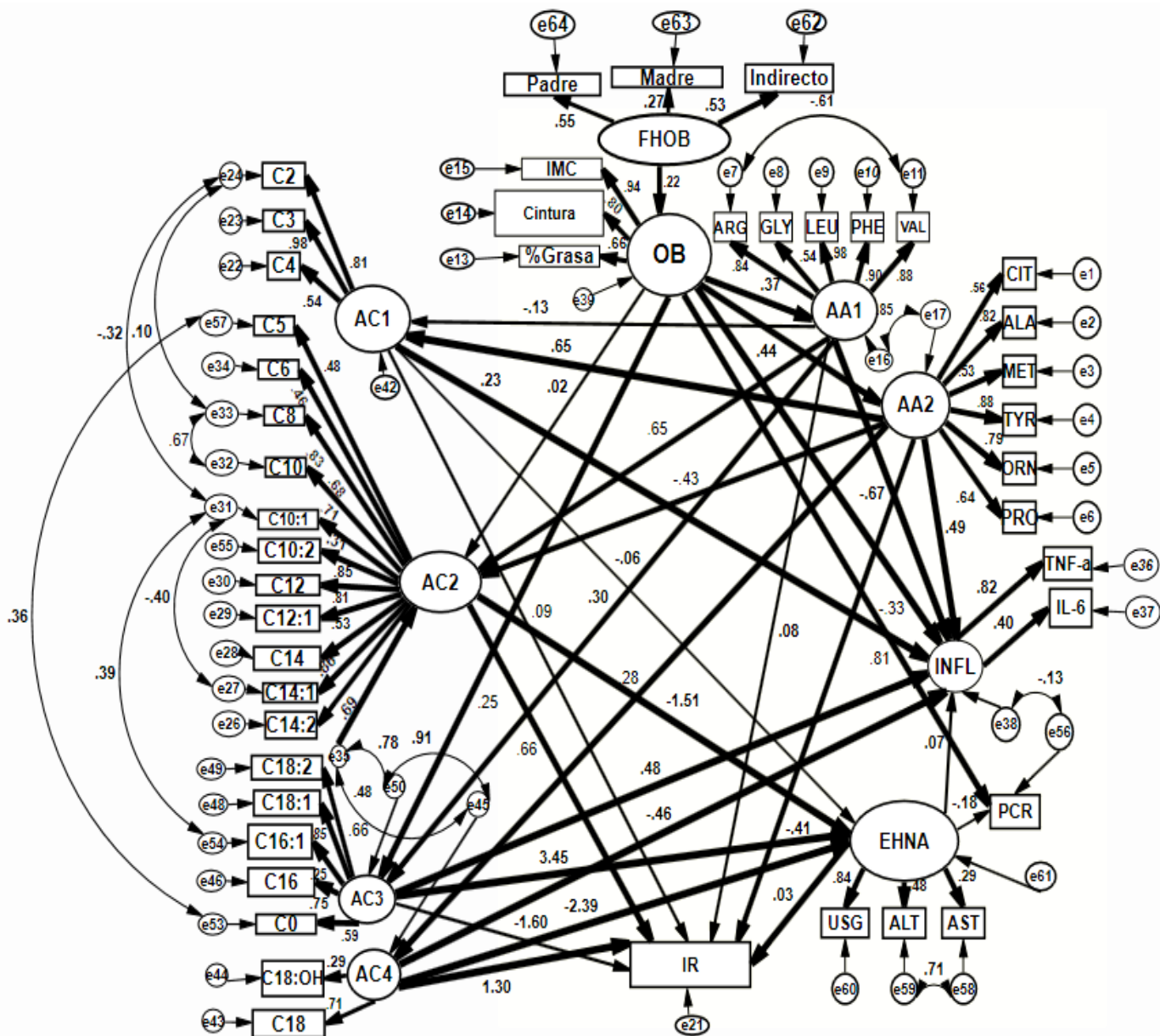


Figura 9. Modelo 3. Hipótesis 4. SEM. Círculos= variables latentes, rectángulos= variables observadas, e= término de error. AC1, AC2, AC3 Y AC4. Factores de agrupación de acilcarnitinas. AA1 Y AA2 factores de agrupación de aminoácidos. FHOB= historia familiar de obesidad. Indirecto= historia familiar de obesidad de segundo grado, Padre= historia familiar de obesidad del padre. Madre= historia familiar de obesidad materna. OB= obesidad, IMC= Índice de masa corporal. Cintura= circunferencia de cintura, % grasa= % de grasa total. AC1, AC2, AC3 y AC4= factores de agrupación de acilcarnitinas C2-C18:2. AA1 y AA2 factores de

agrupación de aminoácidos. ALA= alanina, CIT= citrulina, MET= metionina, TYR= tirosina, ORN= ornitina, PRO= prolina, ARG= arginina, GLY= glicina, LEU= leucina, PHE= fenilalanina, VAL= valina. PCR= Proteína C Reactiva. INFL= macadores inflamatorios, TNF-a = Factor de necrosis tumoral alpha, IL-6= Interleucina 6. USG: ultrasonido de hígado. ALT= Alanina aminotransferasa, AST=Aspartato aminotransferasa. Las líneas en negritas = B estandarizado > 0.2

Tabla 5. Hipótesis 4

Factores/variables		β	β std	S.E	p-value
FHOB	OB	0.069	0.223	0.047	0.138
	Padre	0.808	0.548	0.455	0.076
	Indirecto	1	0.527		
	Madre	0.451	0.274	0.254	0.076
AA1	AC1	-0.065	-0.134	0.091	0.476
	AC2	0.517	0.651	0.135	<0.001
	AC3	0.179	0.302	0.046	<0.001
	ARG	1	0.843		
	GLY	0.312	0.54	0.046	<0.001
	INFL	-1.654	-0.667	0.686	0.016
	LEU	0.798	0.976	0.048	<0.001
	IR	0.14	0.082	0.344	0.684
	PHE	0.794	0.902	0.055	<0.001
	VAL	0.58	0.883	0.053	<0.001
AA2	AC1	0.778	0.649	0.275	0.005
	AC2	-0.836	-0.427	0.309	0.007
	AC4	0.512	0.278	0.18	0.004
	ALA	1.242	0.819	0.183	<0.001
	CIT	1	0.558		
	INFL	2.973	0.485	1.916	0.121
	IR	-1.719	-0.407	0.992	0.083
	MET	0.816	0.526	0.16	<0.001
	ORN	1.969	0.794	0.294	<0.001

	PRO	1.434	0.643	0.244	<0.001
	TYR	1.54	0.885	0.218	<0.001
AC1	C2	2.471	0.81	0.364	<0.001
	C3	2.323	0.982	0.344	<0.001
	C4	1	0.543		
	EHNA	-0.027	-0.056	0.042	0.528
	INFL	1.168	0.229	0.654	0.074
	IR	0.3	0.085	0.401	0.454
AC2	C10	1.264	0.832	0.138	<0.001
	C10:1	0.605	0.71	0.075	<0.001
	C10:2	0.317	0.306	0.092	<0.001
	C12	0.908	0.854	0.097	<0.001
	C12:1	0.671	0.815	0.075	<0.001
	C14	0.694	0.53	0.117	<0.001
	C14:1	0.857	0.864	0.091	<0.001
	C14:2	1	0.695		
	C5	0.593	0.48	0.108	<0.001
	C6	0.557	0.455	0.109	<0.001
	C8	1.075	0.684	0.141	<0.001
	EHNA	-0.437	-1.506	0.199	0.028
	IR	1.432	0.664	4.097	0.727
AC3	EHNA	1.339	3.451	0.548	0.015
	INFL	1.997	0.478	1.428	0.162
	C16	1	0.753		
	C18:1	1.267	0.848	0.127	<0.001
	C18:2	1.16	0.656	0.154	<0.001
	C16:1	1.016	0.248	0.359	0.005
	IR	-4.605	-1.599	12.573	0.714
	C0	0.707	0.594	0.102	<0.001
AC4	EHNA	-0.74	-2.394	0.321	0.021
	C18	1	0.706		
	C18:1OH	3.704	0.287	1.262	0.003
	INFL	-1.522	-0.457	1.157	0.188
	IR	2.975	1.296	7.035	0.672

OB	AA1	0.7	0.368	0.181	<0.001
	AA2	0.336	0.435	0.087	<0.001
	Cintura	0.885	0.805	0.109	<0.001
	AC2	0.033	0.022	0.14	0.812
	AC3	0.286	0.252	0.09	0.002
	IMC	1.261	0.935	0.141	<0.001
	% Grasa	1	0.656		
	INFL	-1.554	-0.329	1.542	0.314
	PCR	3.237	0.813	0.829	<0.001
EHNA	ALT	2.81	0.48	0.637	<0.001
	AST	1	0.289		
	INFL	0.76	0.071	3.612	0.833
	IR	0.244	0.033	8.987	0.978
	EHNA	9.947	0.839	3.276	0.002
	PCR	-1.661	-0.183	1.893	0.38
INFL	IL6	1	0.824		
	TNFa	0.475	0.395	0.258	0.065

Tabla 5. Modelo 3, Hipótesis 4. β estandarizada (β std) y no estandarizada (β). FHOB= historia familiar de obesidad. Indirecto=historia familiar de obesidad de segundo grado, Padre= historia familiar de obesidad del padre. Madre= historia familiar de obesidad materna. OB= obesidad, IMC= Índice de masa corporal. Cintura=circunferencia de cintura. % Grasa = % de grasa total. AC1, AC2, AC3 y AC4= factores de agrupación de acilcarnitinas C2-C18:2. AA1 y AA2 factores de agrupación de aminoácidos. ALA= alanina, CIT= citrulina, MET= metionina, TYR= tirosina, ORN= ornitina, PRO= prolina, ARG= arginina, GLY= glicina, LEU= leucina, PHE= fenilalanina, VAL= valina. PCR= Proteína C reactiva. INFL= Marcadores inflamatorios, TNF-a = Factor de necrosis tumoral alpha, IL-6= Interleucina 6. USG: ultrasonido de hígado. ALT= Alanina aminotransferasa, AST=Aspartato aminotransferasa

Resumen de Ecuaciones estructurales

El modelo que presentó un mayor ajuste fue el tercer modelo que correspondió a la tercera hipótesis, donde se propone que FHOB determina la concentración de AA libres en suero y AC que se asocia a una disminución en la sensibilidad a la insulina, incremento de citocinas inflamatorias, obesidad y EHNA. Sin embargo, las β estandarizadas FHOB hacia la concentración de AC y AA no alcanzaron el valor > 0.2 . FHOB predijo fenotipo de obesidad obtuvo una β estandarizada de 0.3 por lo que se requirió crear un cuarto modelo en donde se demostró que la HFOB es capaz de predecir el fenotipo de obesidad y ésta última predice las concentraciones de AA y AC las cuales se asocian a citosinas inflamatorias, EHNA y resistencia a la insulina.

12. Discusión.

Los modelos de SEM evaluaron hipotéticas relaciones causales entre FHOB, OB, metabólica de AA y AC, INFL, IR y EHNA, encontrándose que FHOB predice OB.

En nuestro estudio los métodos estadísticos clásicos como ANOVA, chi-cuadrada, PCA y PLSDA, demostraron diferencias demográficas, clínicas y metabólica entre G1, G2 y G3; sin embargo, no dieron información respecto a las relaciones biológicas y clínicas de las variables. Las SEM permitieron probar viejos y nuevos paradigmas. De acuerdo al diseño de nuestros modelos, se obtuvo buena cohesión de variables, pequeños errores en la estimación dado la estricta aplicación de criterios de selección de la muestra, buenos tamaños de efecto, soporte biológico y correlaciones novedosas entre las variables. Este es de los primeros estudios analizados de esta manera en población mexicana.

El primer modelo propuso que la obesidad resultado del desbalance positivo de energía genera expansión de tejido adiposo, aumento de ácidos grasos libres y alteración en la β oxidación mitocondrial que genera incremento en AC. Un incremento en AA predice incremento de alfa-cetoácidos que genera incremento de acilcarnitinas, sobre todo de cadena lata. Esta alteración metabólica se asocia a un proceso inflamatorio EHNA e IR.

Se ha publicado mayor concentración de aminoácidos de cadena ramificada derivado de acilcarnitina C3- C5, así como C6 y C8 en pacientes con obesidad y diabetes. La

concentración de aminoácidos de cadena ramificada se han asociado con el desarrollo de diabetes (29).

Nuestro modelo demostró no sólo los aminoácidos de cadena ramificada si no todos los medidos, relacionarse con obesidad. Los aminoácidos agrupados en el factor AA2 predijeron índice de Matsuda. Un estudio en población china e hindú demostró una correlación positiva entre HOMA, alanina, prolina, valina y leucina (47). Se ha publicado que el incremento en la concentración de aminoácidos de cadena ramificada se asocia a resistencia a la insulina a través de un estado de fosforilación crónica de mTOR, c-Jun y el receptor de insulina 1. También una disminución en la fosforilación de tirosina de IRS-1 e IRS-2; disminución en la unión de grb2 y p85 de PI3k hacia IRS-1 (18). Los mecanismos asociados del resto de los aminoácidos que no son de cadena ramificada requiere investigación a futuro.

En EHNA existen mayores concentraciones circulantes de glutamina, metionina, alanina, lisina, arginina, fenilalanina, tirosina, valina e isoleucina (23). En nuestro estudio se confirmó esta relación con arginina, alanina, fenilalanina, tirosina, valina, pero también se encontró citrulina y ornitina. Esta última se encontró más alta en el grupo con obesidad y EHNA pero estuvo más baja en los pacientes con obesidad sin EHNA en comparación con los controles delgados. Recientemente se ha reportado que la enzima ornitincarbomiltransferasa refleja daño hepático ocasionado por TNF- α en ratones con EHNA y obesidad (48).

La relación entre aminoácidos y marcadores inflamatorios ha sido estudiada previamente en una población China donde histidina y arginina se asocian negativamente con IL-6 y PCR en mujeres obesas (49). Nosotros encontramos hallazgos similares en nuestros estudios.

En otro estudio ratones C57BL/6J alimentados con dieta alta en grasa fueron comparados con controles sanos. Niveles de mRNA de los genes que se asocian a aminoácidos de cadena ramificada / ciclo de krebs fueron medidos, demostrando que con dosis ascendentes de TNF α , IL-6, IL-1 β , e IFN- γ en el tejido adiposo visceral existe una disminución en el metabolismo de estas vías metabólicas (30).

En obesidad las acilcarnitinas de cadena corta pueden reflejar el exceso de flujo lipídico, sobrecarga de la β -oxidación, oxidación incompleta u oxidación de aminoácidos (45). En la actualidad no existe evidencia directa del efecto de las acilcarnitinas de cadena corta en

resistencia a la insulina. Nosotros no encontramos la posibilidad de sustentar esta relación en nuestros modelos (β estandarizadas <0.2).

Se ha reportado que los pacientes con obesidad tienen menos carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT1) y citrato sintetasa que promueve menor oxidación de ácidos grasos y un incremento en acilcarnitinas de cadena larga (50). Estas últimas en múltiples estudios si han podido ser vinculadas directamente con resistencia a la insulina (51). Nosotros si pudimos encontrar una correlación directa con obesidad e índice de Matsuda.

Los pacientes con EHNA tienen mayor niveles de acilcarnitinas libres, C3-C5 y acilcarnitinas de cadena larga como C16, C18, C18:2 (22). Un Modelo en ratones encontró una asociación entre C:10 y EHNA (16). En nuestro estudio las acilcarnitinas libres fueron más altas en EHNA y las acilcarnitinas de cadena media y larga predijeron negativamente EHNA. La diferencia en el perfil metabólico de acilcarnitinas entre pacientes con esteatosis hepática y esteatohepatitis ha sido estudiado previamente demostrando que no hay diferencia en dicho perfil (22,52).

Los estudios han sugerido la posibilidad de que las acilcarnitinas participen en inflamación. Un estudio que utilizó medula ósea de ratón probó la posibilidad de polarización de macrófagos tipo 1 y producción de citosinas tales como IL-3, IL-6, IL-12, IL-11, IL-16, IL-23 y $TNF\alpha$ al exponerse a altas dosis de acilcarnitina C12. Esto promovió la regulación de AMPK (28). En un estudio piloto donde se utilizó macrófagos de células murinas C12-C14 estimularon NKFB hasta 200% (53,54). Nuestros modelos demostraron por primera vez que las acilcarnitinas de cadena corta se correlacionan con IL-6 $TNF\alpha$. Se requieren modelos experimentales para demostrar si C2-C4 estimulan marcadores inflamatorios directamente o si es a través de las vías metabólicas de aminoácidos de cadena ramificada. Nuevos modelos se deben de realizar para estudiar la relación entre INFL, AC, EHNA cuyas relaciones no necesariamente son proporcionales al IMC

La Historia Familiar es un estimador de la predisposición genética, epigenética y desarrollo fetal y.

Nuestro segundo modelo no convergió y el tercero fue insuficiente en demostrar que FHOB tuviera un efecto en la varianza de AC y AA; sin embargo, FHOB si demostró ser capaz de explicar la varianza de OB directamente por lo que se requirió la construcción de un cuarto modelo en donde FOH explica la varianza de OB y posteriormente OB los cambios en las concentraciones en sangre de AA, AC y posteriormente los cambios en INFL, PCR y EHNA.

Finalmente lo novedoso de nuestros resultados fue que FHOB predice OB y que esta última resulta de la disrupción en la regulación de enzimas y vías metabólicas clave que genera alteración en AA y AC en plasma.

No incluimos al grupo con $IMC < 25$ con EHNA positivo, porque la fisiopatología de este tipo de esteatosis hepática parece ser independiente de OB e IR. Este grupo merece un estudio complementario en el futuro (55–57).

Como limitantes a nuestro estudio consideramos el diseño transversal, la mayor prevalencia de mujeres que refleja el mayor interés de este grupo en participar en estudios de investigación. La definición FHOB de manera dicotómica, que puede producir inestabilidad leve en la precisión de los coeficientes; sin embargo, creemos que el efecto fue mínimo y metodológicamente tolerable. Se requiera otro tipo de estudios como secuenciación genética completa para valorar de a profundada la historia familiar de obesidad. También sabemos que el ultrasonido hepático pese a su buena sensibilidad y especificidad (58) no es el estándar de oro en el estudio de EHNA. Consideramos que por la naturaleza de nuestros pacientes no es ético la realización de biopsia en todos ellos.

12.1 Proyecciones a futuro.

Un modelo longitudinal donde se integren múltiples ómicas como: genómica, transcriptómica, metabolómica y microbioma serían de utilidad en la generación de nuevos modelos integrados que nos ayuden a entender la fisiopatología de la OB, IR y EHNA.

Este tipo de modelos pueden determinar la base para la construcción posterior de modelos dinámicos tales como ecuaciones diferenciales.

13. Conclusión.

Nuestro estudio soporta a través de las SEM que FHOB predice OB. Esta última resulta en una disrupción severa en la regulación de vías metabólicas y enzimáticas claves que predice alteraciones en AC y AA y se asocian a INFL, IR y EHNA.

14. Referencias

1. WHO | Obesity and overweight [Internet]. [citado 6 de noviembre de 2016]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>
2. Ogden CL, Carroll MD, Kit BK, Flegal KM. Prevalence of Childhood and Adult Obesity in the United States, 2011-2012. JAMA. 26 de febrero de 2014;311(8):806-14.
3. OECD. Health at a Glance 2017 [Internet]. OECD Publishing; 2017 [citado 13 de noviembre de 2017]. (Health at a Glance). Disponible en: http://www.oecd-ilibrary.org/social-issues-migration-health/health-at-a-glance-2017_health_glance-2017-en
4. Shamah-Levy T, Cuevas-Nasu L, Rivera-Dommarco J, Hernández-Ávila M. Encuesta Nacional de Nutrición y Salud de Medio Camino 2016 (ENSANUT MC 2016). Informe final de resultados. Recuperado de <https://www.insp.mx/ensanut/medio-camino-16.html>[Links]; 2016.
5. Garvey WT, Mechanick JI, Brett EM, Garber AJ, Hurley DL, Jastreboff AM, et al. AMERICAN ASSOCIATION OF CLINICAL ENDOCRINOLOGISTS AND AMERICAN COLLEGE OF ENDOCRINOLOGY COMPREHENSIVE CLINICAL PRACTICE GUIDELINES FOR MEDICAL CARE OF PATIENTS WITH OBESITY: *EXECUTIVE SUMMARY* Complete Guidelines available at <https://www.ace.com/publications/guidelines>. Endocr Pract. 2 de julio de 2016;22(7):842-84.
6. Vázquez-Vela MEF, Torres N, Tovar AR. White Adipose Tissue as Endocrine Organ and Its Role in Obesity. Arch Med Res. noviembre de 2008;39(8):715-28.
7. Lumeng CN, Saltiel AR. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. J Clin Invest. 1 de junio de 2011;121(6):2111-7.
8. Jung U, Choi M-S. Obesity and Its Metabolic Complications: The Role of Adipokines and the Relationship between Obesity, Inflammation, Insulin Resistance, Dyslipidemia and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Int J Mol Sci. 11 de abril de 2014;15(4):6184-223.
9. Pigeyre M, Yazdi FT, Kaur Y, Meyre D. Recent progress in genetics, epigenetics and metagenomics unveils the pathophysiology of human obesity. Clin Sci. 6 de mayo de 2016;130(12):943-86.

10. Fesinmeyer MD, North KE, Ritchie MD, Lim U, Franceschini N, Wilkens LR, et al. Genetic risk factors for BMI and obesity in an ethnically diverse population: Results from the population architecture using genomics and epidemiology (PAGE) study. *Obesity*. abril de 2013;21(4):835-46.
11. Weng SF, Redsell SA, Swift JA, Yang M, Glazebrook CP. Systematic review and meta-analyses of risk factors for childhood overweight identifiable during infancy. *Arch Dis Child*. diciembre de 2012;97(12):1019-26.
12. Cederberg H, Stančáková A, Kuusisto J, Laakso M, Smith U. Family history of type 2 diabetes increases the risk of both obesity and its complications: is type 2 diabetes a disease of inappropriate lipid storage? *J Intern Med*. mayo de 2015;277(5):540-51.
13. Graff M, Scott RA, Justice AE, Young KL, Feitosa MF, Barata L, et al. Genome-wide physical activity interactions in adiposity - A meta-analysis of 200,452 adults. *PLoS Genet*. abril de 2017;13(4):e1006528.
14. Fiehn O. Metabolomics--the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol*. enero de 2002;48(1-2):155-71.
15. Fernández-Lainez C, Vela-Amieva M, Ibarra-González I. Espectrometría de masas en tándem: una nueva herramienta para el estudio de la metabolómica en pediatría. *Acta Pediátrica México*. 2009;30(5):258–263.
16. Kim H-J, Kim JH, Noh S, Hur HJ, Sung MJ, Hwang J-T, et al. Metabolomic Analysis of Livers and Serum from High-Fat Diet Induced Obese Mice. *J Proteome Res*. 4 de febrero de 2011;10(2):722-31.
17. Oberbach A, Blüher M, Wirth H, Till H, Kovacs P, Kullnick Y, et al. Combined Proteomic and Metabolomic Profiling of Serum Reveals Association of the Complement System with Obesity and Identifies Novel Markers of Body Fat Mass Changes. *J Proteome Res*. 7 de octubre de 2011;10(10):4769-88.
18. Newgard CB, An J, Bain JR, Muehlbauer MJ, Stevens RD, Lien LF, et al. A Branched-Chain Amino Acid-Related Metabolic Signature that Differentiates Obese and Lean Humans and Contributes to Insulin Resistance. *Cell Metab*. abril de 2009;9(4):311-26.
19. Jensen MD, Haymond MW. Protein metabolism in obesity: effects of body fat distribution and hyperinsulinemia on leucine turnover. *Am J Clin Nutr*. enero de 1991;53(1):172-6.
20. Li Y-C, Li C-L, Qi J-Y, Huang L-N, Shi D, Du S-S, et al. Relationships of Dietary Histidine and Obesity in Northern Chinese Adults, an Internet-Based Cross-Sectional Study. *Nutrients*. 11 de julio de 2016;8(7):420.
21. Luzi L, Castellino P, DeFronzo RA. Insulin and hyperaminoacidemia regulate by a different mechanism leucine turnover and oxidation in obesity. *Am J Physiol*. febrero de 1996;270(2 Pt 1):E273-281.

22. Kalhan SC, Guo L, Edmison J, Dasarathy S, McCullough AJ, Hanson RW, et al. Plasma metabolomic profile in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism*. marzo de 2011;60(3):404-13.
23. Lake AD, Novak P, Shipkova P, Aranibar N, Robertson DG, Reily MD, et al. Branched chain amino acid metabolism profiles in progressive human nonalcoholic fatty liver disease. *Amino Acids*. marzo de 2015;47(3):603-15.
24. Wang TJ, Larson MG, Vasan RS, Cheng S, Rhee EP, McCabe E, et al. Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. *Nat Med*. abril de 2011;17(4):448-53.
25. Kler RS, Jackson S, Bartlett K, Bindoff LA, Eaton S, Pourfarzam M, et al. Quantitation of acyl-CoA and acylcarnitine esters accumulated during abnormal mitochondrial fatty acid oxidation. *J Biol Chem*. 1991;266(34):22932–22938.
26. Millington DS. Tandem mass spectrometry in clinical diagnosis. *Physician's Guide Lab Diagn Metab Dis Berl Springer*. 2003;57–75.
27. Kim JY, Park JY, Kim OY, Ham BM, Kim H-J, Kwon DY, et al. Metabolic Profiling of Plasma in Overweight/Obese and Lean Men using Ultra Performance Liquid Chromatography and Q-TOF Mass Spectrometry (UPLC–Q-TOF MS). *J Proteome Res*. 3 de septiembre de 2010;9(9):4368-75.
28. Sampey BP, Freemerman AJ, Zhang J, Kuan P-F, Galanko JA, O'Connell TM, et al. Metabolomic profiling reveals mitochondrial-derived lipid biomarkers that drive obesity-associated inflammation. *PLoS One*. 2012;7(6):e38812.
29. Newgard CB, An J, Bain JR, Muehlbauer MJ, Stevens RD, Lien LF, et al. A Branched-Chain Amino Acid-Related Metabolic Signature that Differentiates Obese and Lean Humans and Contributes to Insulin Resistance. *Cell Metab*. abril de 2009;9(4):311-26.
30. Burrill JS, Long EK, Reilly B, Deng Y, Armitage IM, Scherer PE, et al. Inflammation and ER stress regulate branched-chain amino acid uptake and metabolism in adipocytes. *Mol Endocrinol Baltim Md*. marzo de 2015;29(3):411-20.
31. Shaham O, Wei R, Wang TJ, Ricciardi C, Lewis GD, Vasan RS, et al. Metabolic profiling of the human response to a glucose challenge reveals distinct axes of insulin sensitivity. *Mol Syst Biol*. 2008;4(1):214.
32. Patti ME, Brambilla E, Luzi L, Landaker EJ, Kahn CR. Bidirectional modulation of insulin action by amino acids. *J Clin Invest*. 1 de abril de 1998;101(7):1519-29.
33. Schwenk WF, Haymond MW. Decreased uptake of glucose by human forearm during infusion of leucine, isoleucine, or threonine. *Diabetes*. 1987;36(2):199–204.
34. Felig P, Marliss E, Cahill Jr GF. Plasma amino acid levels and insulin secretion in obesity. *N Engl J Med*. 1969;281(15):811–816.

35. Krebs M, Krssak M, Bernroider E, Anderwald C, Brehm A, Meyerspeer M, et al. Mechanism of amino acid-induced skeletal muscle insulin resistance in humans. *Diabetes*. 2002;51(3):599–605.
36. Chang TW, Goldberg AL. Leucine inhibits oxidation of glucose and pyruvate in skeletal muscles during fasting. *J Biol Chem*. 1978;253(10):3696–3701.
37. Walajtys-Rode E, Williamson JR. Effects of branched chain alpha-ketoacids on the metabolism of isolated rat liver cells. III. Interactions with pyruvate dehydrogenase. *J Biol Chem*. 1980;255(2):413–418.
38. Traxinger RR, Marshall S. Role of amino acids in modulating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. *J Biol Chem*. 1989;264(35):20910–20916.
39. Worley B, Powers R. Multivariate Analysis in Metabolomics. *Curr Metabolomics*. 1 de noviembre de 2012;1(1):92-107.
40. Xi B, Gu H, Baniyadi H, Raftery D. Statistical Analysis and Modeling of Mass Spectrometry-Based Metabolomics Data. En: Raftery D, editor. *Mass Spectrometry in Metabolomics* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2014 [citado 21 de junio de 2017]. p. 333-53. Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-1258-2_22
41. Korman A, Oh A, Raskind A, Banks D. Statistical Methods in Metabolomics. En: Anisimova M, editor. *Evolutionary Genomics* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2012 [citado 4 de enero de 2018]. p. 381-413. Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-1-61779-585-5_16
42. McDonald RP, Ho M-HR. Principles and practice in reporting structural equation analyses. *Psychol Methods*. marzo de 2002;7(1):64-82.
43. Rosa GJ, Valente BD, de los Campos G, Wu X-L, Gianola D, Silva MA. Inferring causal phenotype networks using structural equation models. *Genet Sel Evol*. 2011;43(1):6.
44. Liu B, de la Fuente A, Hoeschele I. Gene Network Inference via Structural Equation Modeling in Genetical Genomics Experiments. *Genetics*. 1 de febrero de 2008;178(3):1763-76.
45. Valente BD, Rosa GJM, Gianola D, Wu X-L, Weigel K. Is Structural Equation Modeling Advantageous for the Genetic Improvement of Multiple Traits? *Genetics*. 1 de julio de 2013;194(3):561-72.
46. Xia J, Sinelnikov IV, Han B, Wishart DS. MetaboAnalyst 3.0—making metabolomics more meaningful. *Nucleic Acids Res*. 1 de julio de 2015;43(W1):W251-7.
47. Tai ES, Tan MLS, Stevens RD, Low YL, Muehlbauer MJ, Goh DLM, et al. Insulin resistance is associated with a metabolic profile of altered protein metabolism in Chinese and Asian-Indian men. *Diabetologia*. abril de 2010;53(4):757-67.

48. Murayama H, Ikemoto M, Hamaoki M. Serum ornithine carbamyltransferase reflects hepatic damage in diabetic obese mice. *J Gastroenterol Hepatol.* febrero de 2010;25(2):413-9.
49. Niu Y-C, Feng R-N, Hou Y, Li K, Kang Z, Wang J, et al. Histidine and arginine are associated with inflammation and oxidative stress in obese women. *Br J Nutr.* julio de 2012;108(01):57-61.
50. Schooneman MG, Vaz FM, Houten SM, Soeters MR. Acylcarnitines: Reflecting or Inflicting Insulin Resistance? *Diabetes.* enero de 2013;62(1):1-8.
51. Mihalik SJ, Goodpaster BH, Kelley DE, Chace DH, Vockley J, Toledo FGS, et al. Increased Levels of Plasma Acylcarnitines in Obesity and Type 2 Diabetes and Identification of a Marker of Glucolipototoxicity. *Obesity.* septiembre de 2010;18(9):1695-700.
52. Barr J, Caballería J, Martínez-Arranz I, Domínguez-Díez A, Alonso C, Muntané J, et al. Obesity-Dependent Metabolic Signatures Associated with Nonalcoholic Fatty Liver Disease Progression. *J Proteome Res.* 6 de abril de 2012;11(4):2521-32.
53. Rutkowsky JM, Knotts TA, Ono-Moore KD, McCoin CS, Huang S, Schneider D, et al. Acylcarnitines activate proinflammatory signaling pathways. *AJP Endocrinol Metab.* 15 de junio de 2014;306(12):E1378-87.
54. McCoin CS, Knotts TA, Adams SH. Acylcarnitines—old actors auditioning for new roles in metabolic physiology. *Nat Rev Endocrinol.* 25 de agosto de 2015;11(10):617-25.
55. Verdelho Machado M, Cortez-Pinto H. Fatty liver in lean patients: is it a different disease? *Ann Gastroenterol.* 2012;25(1):1-2.
56. Kumar R, Mohan S. Non-alcoholic Fatty Liver Disease in Lean Subjects: Characteristics and Implications. *J Clin Transl Hepatol.* 28 de septiembre de 2017;XX(XX):1-8.
57. Romero-Ibarguengoitia ME, Herrera-Rosas A, Domínguez-Mota AA, Camas-Benitez JT, Serratos-Canales MF, León-Hernández M, et al. Nonalcoholic fatty liver disease can be predicted by retinal vascular changes in patients with obesity without hypertension or diabetes. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* agosto de 2017;29(8):962-7.
58. Piña-Jiménez NS, Vega-Gutiérrez AE, Romero-Ibarguengoitia ME, Cal y Mayor-Villalobos M, Guerrero-Avenidaño M, Cortés-Sosa M. Elastografía hepática cuantitativa en la valoración de sujetos normales y con esteatosis hepática no alcohólica. Correlación interobservador. *An Radiol México.* January-March;12(1):21-8.