



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL



**Sección de Estudios de Posgrado e Investigación Programa
Institucional de Biomedicina Molecular**

ASOCIACIÓN DE LA LEPTINA CON LA OBESIDAD EN LA POBLACIÓN MEXICANA

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA:

Biólogo Jerónimo López Alcantar

Directores de tesis:

Dra. Laurence A. Marchat Marchau

Dr. Absalom Zamorano Carrillo

MÉXICO DF. ENERO 2010

Directores de Tesis

Dra. Laurence A. Marchat Marchau

Dr. Absalom Zamorano Carrillo

Comité Tutorial

Dra. Claudia G. Benítez Cardoza

Dra. Irene Mendoza Lujambio

Dr. Juan Salas Benito

Este trabajo, fue realizado en el Laboratorio de Investigación Bioquímica y el Laboratorio de Biomedicina Molecular II de la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía bajo la dirección de los Dra. Laurence A. Marchat Marchau y el Dr. Absalom Zamorano Carrillo investigadores titulares del Programa Institucional de Biomedicina Molecular de la ENMH-IPN.

Este proyecto fue apoyado por el Programa Institucional para la Formación de Investigadores (PIFI), por el Programa de Becas de Maestría del Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyT DF, registro BI-080523183547) así como el proyecto SIP-IPN con el registro 20091269.

Dedicatorias

A mi Mamá

Por darme la vida, por su ejemplo de lucha y esfuerzo que solía realizar día a día y porque se que si ella estuviera a mi lado estaría igual de contenta que yo por este otro logro.

A mi Papá

Que aunque de carácter difícil siempre aplaude todos mis logros.

A mi Esposa

Que a pesar de todos los tropiezos que hemos padecido durante todo este proceso de preparación siempre me ha apoyado incondicionalmente.

A mi Hijo

Quien de cierta forma padeció mas este proceso, ya que no pude estar con el muchos momentos en los que ha requerido de mi a el por estar paciente esperando a que yo tuviera el tiempo necesario para hacer tropelías juntos.

A mis Hermanos

Quienes siempre me hechan porras en cada avance académico que realizo, por su apoyo moral por ser la familia que es.

Agradecimientos

A la Dra. Laurence

Por tomarse el tiempo de asesorarme y dirigirme durante este tiempo de formación, por sus consejos tanto en lo académico como en lo personal por su gran apoyo en momentos difíciles. GRACIAS.

Al Dr. Absalom

Por su asesoramiento durante la realización de este trabajo, por brindarme su tiempo en el desarrollo de este trabajo y por su apoyo en los momentos difíciles. GRACIAS.

A la Dra. Claudia

Por permitirme estar en el espacio que ocupe durante el desarrollo de este trabajo, por su comprensión y apoyo. GRACIAS.

Al Dr. Cesar

Que aunque no formo parte de mi proyecto a través de un escrito, siempre estuvo involucrado en lo que hacia por estar pendiente, por sus regaños ocasionales que contribuían a avanzar de forma correcta en la realización de este proyecto. GRACIAS.

A los Doctores del Comité Tutorial

Por su apoyo en la revisión de este trabajo, por sus comentarios y amplias criticas que contribuyeron a que este trabajo saliera bien.

Y en general a todos los doctores del posgrado por todos sus conocimientos transmitidos durante la etapa de cursos.

GRACIAS A TODOS

Quiero agradecer a todos los compañeros de la generación, ya que ellos fueron un apoyo durante este proceso de formación: Cesar, Brenda, Miriam, temporalmente Gamaliel, Abraham, Gloria, Alejandra, Albino, Erika y a Jonathan con quien estuve muy ligado por el proyecto.

A los compañeros y amigos de otras generaciones: Lorena, Socorro, Carolina, Oriana, Miriam Berenice, Carlos, Roberto Isac, Berenice, Edith, Carmen, a la profesora Rocio, Martha. Gracias por su apoyo y palabras de motivación y sobre todo por aguantarme.

MIL GRACIAS A TODOS.

Índice

Lista de abreviaturas	i
Lista de tablas	ii
Lista de figuras	iii
Resumen	iv
Abstract	iv
1. Introducción	1
2. Obesidad en México	3
3. Etiología de la Obesidad	4
3.1 La Obesidad y el Factor Ambiental	4
3.2 La obesidad y los Factores Genéticos	5
4. Papel de la leptina en la Regulación de la Homeostasis Energética	9
5. Relación entre los niveles de leptina y obesidad	11
6. Organización Molecular del Gen de la Leptina	13
7. Antecedentes	15
7.1 Polimorfismo -2548 G/A en el promotor del Gen de la Leptina: relación con la obesidad y niveles de leptina	15
8. Justificación	19
9. Objetivos	20
10. Estrategia Experimental	21
11. Material y Métodos	22
12. Resultados	27
13. Discusión	41
14. Conclusiones	44
15. Perspectivas	45
16. Bibliografía	46
17. Anexos	51

Lista de Abreviaturas

ACTH: Hormona Adenocorticotropica.

AGPR: Proteínas Relacionadas Aguti.

α -MSH : Hormona Estimulante de Melanocitos α .

CIIDIR: Centro de Investigación Interdisciplinaria para El Desarrollo Regional.

DT2: Diabetes tipo 2.

EMSA: Ensayos de Retardamiento.

ENEC: Encuesta nacional de Enfermedades Crónicas.

ENSA: Encuesta Nacional de Salud.

ENSANUT: Encuesta Nacional de Salud y Nutrición.

IMC: Índice de Masa Corporal.

IPN: Instituto Politécnico Nacional.

LEP: Leptina.

NPY: Neuropeptido Y.

ObRb: Receptor Del gen Ob (Leptina).

OMS: Organización Mundial de la Salud (WHO).

OR: Razón de momios (Odds Ratio).

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.

POMC: Pro-opiomelanocortina.

PPAR γ : Receptor Proliferador de Peroxisomas Activado γ .

SBB: Síndrome de Batdet-Biedl.

SPW: Síndrome de Prader-Willi.

Relación de figuras

Figura 1. comparación de la conformación estructural del tejido adiposo. En sujetos con obesidad, los adipositos están hipertróficos y hay una mayor acumulación de macrófagos. Modificado de Tilg and Moschen 2006.

Figura 2. Mecanismo de acción de la leptina en el hipotálamo. ■ Ruta de acción normal de la leptina, ■ Ruta de acción anormal de la leptina (tomado de Suganami 2004).

Figura 3. Estructura del gen de la leptina y procesamiento del transcrito.

Figura 4. Estrategia experimental.

Figura 5. Distribución de la población de estudio por lugar de nacimiento.

Figura 6. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1% de algunas muestras de ADN purificadas.

Figura 7. Análisis electroforético en gel de agarosa de los productos de amplificación de una región del promotor del gen de la leptina.

Figura 8. Análisis electroforético en gel de poliacrilamida de los productos de la restricción enzimática con *CfoI*. Carril 1, marcadores de tamaño molecular; carril 2, fragmento de PCR sin digerir (control); carril 3, muestra de un sujeto homocigoto AA; carriles 4 y 5, muestras de sujetos heterocigotos AG; carril 6, muestra de un sujeto homocigoto GG.

Figura 9. Frecuencias genotípicas (A) y alélicas (B) de la población de estudio en general (mujeres y hombres).

Figura 10. Frecuencias genotípicas (A) y alélicas (B) de la subpoblación de estudio (mujeres obesas y delgadas).

Figura 11. Niveles de leptina en mujeres delgadas y obesas con respecto a la variante polimórfica presente en la posición -2448 del promotor del gen de la leptina.

Relación de tablas.

Tabla 1. Características antropométricas de la población de estudio.

Tabla 2. Clasificación de la población de estudio en base al género, edad y IMC.

Tabla 3. Distribución de las variantes genotípicas del polimorfismo G-2548A del promotor del gen de la leptina.

Tabla 4. Datos de las frecuencias alélicas del polimorfismo G-2548A del promotor del gen de la leptina.

Tabla 5 Prueba de X^2 de las frecuencias genotípicas y alélicas en población total (mujeres y hombres).

Tabla 6. Prueba de X^2 de las frecuencias genotípicas y alélicas observadas en la subpoblación de mujeres obesas y delgadas.

Tabla 7. Niveles de leptina en la subpoblación de mujeres obesas y delgadas.

Tabla 8. Análisis comparativo entre las medias de los niveles de leptina en las mujeres obesas y delgadas con los diferentes genotipos en la posición -2548 en el promotor del gen de la leptina, mediante la prueba estadística ANOVA.

Tabla 9. Factores de riesgo de presentar obesidad en relación al genotipo en la posición -2548 en el promotor del gen de leptina en mujeres.

RESUMEN

La obesidad es un problema multifactorial que implica factores ambientales y genéticos. En particular, el polimorfismo G-2548A en el promotor del gen de la leptina, una adipocina involucrada en la regulación del hambre y gasto energético, ha sido relacionado con la obesidad y los niveles de leptina en suero en distintas poblaciones, pero no existen datos en la población mexicana. En este trabajo evaluamos si existe una relación entre el polimorfismo G-2548A en el promotor del gen de la leptina, la obesidad y los niveles de leptina en sangre, en una muestra de pacientes mexicanos (160), quienes fueron captados en la clínica de Acupuntura de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía. Se colectaron muestras de sangre para la extracción de ADN y la medición de niveles de leptina en suero. Los sujetos fueron genotipificados por PCR y restricción enzimática usando la enzima *CfoI*. El genotipo AG predominó en mujeres, independientemente del fenotipo, mientras que el genotipo GG predominó en hombres obesos, por lo que tanto en mujeres como en hombres, el alelo G fue el de mayor predominancia, aun si los análisis estadísticos mostraron que no hay asociación entre alguna de las variantes genotípicas del polimorfismo G-2548A y el fenotipo en la población general. Sin embargo, encontramos una posible asociación ($p = 0.059$) entre el alelo G y la obesidad en la población de mujeres. Por lo que determinamos los niveles de leptina en suero mediante ELISA en estos pacientes. De manera general, observamos que los niveles de leptina fueron mayores en mujeres obesas (47.1 ± 18.9 ng/mL); particularmente, los niveles fueron mayores en mujeres obesas con el genotipo GG. Un análisis comparativo de las medias de los niveles de leptina en las mujeres obesas y delgadas con los diferentes genotipos en la posición -2548 en el promotor del gen de la leptina, mediante la prueba estadística ANOVA, mostro que los genotipos GG y AG se asocian con altos niveles de leptina ($p = 0.051$). Finalmente, por análisis de regresión logística binario, determinamos que el riesgo de ser obeso fue 3.7 veces mayor al presentar el genotipo GG, con respecto a no presentarlo ($p < 0.001$).

ABSTRACT

Obesity is a multifactorial problem that involves environmental and genetic factors. Particularly, G-2548A polymorphism in the promoter of leptin gene, an hormone involved in appetite regulation and energy expenditure, has been related with obesity and leptin levels in patients serum in different populations, but there is no data about Mexican population. In this work, we evaluated whether there is a relation between G-2548A polymorphism in the promoter of leptin gene, obesity and leptin levels, in a sample of mexican patients (160), which were recruited in the acupuncture clinic of the National School of Medicine and Homeopathy. We collected blood samples for DNA extraction and the measure of leptin levels in serum. The subjects were genotyped by PCR and enzymatic restriction using CfoI restriction enzyme. The AG genotype was the most frequent in women, while the GG genotype was the most frequent in obese men, therefore G allele was the most frequent; nevertheless the statistical analyses showed that there is no association between G-2548A polymorphism and phenotype in the general population. However, we found a possible association ($p = 0.059$) between the G allele and the obesity in women. Then, we determined the serum leptin levels through ELISA assay in our patients. In general, we observed that leptin levels were higher in obese women (47.1 ± 18.9 ng/mL); particularly the levels were higher in obese women with GG genotype. A comparative analysis of the leptin levels average in obese and lean women with the different genotypes at -2548 position in the promoter of leptin gene, using ANOVA statistical analysis, showed that GG and AG genotypes were related to higher leptin levels ($p = 0.051$). Finally, by a binary logistic regression analysis, we determined that the risk of being obese was 3.7 times higher when the GG genotype was present ($p < 0.001$).

1. Introducción

La obesidad, desde el punto de vista conceptual, se define como un exceso de grasa corporal. Por esta razón, la obesidad se suele valorar utilizando indicadores indirectos de la grasa corporal obtenidos a partir de medidas antropométricas sencillas. El Índice de Masa Corporal (IMC) es una medición válida y conveniente de adiposidad y por lo tanto del sobrepeso y obesidad. El IMC se calcula al dividir el peso en kilogramos sobre el cuadrado de la talla en metros (kg/m^2). Un IMC menor a $25 \text{ kg}/\text{m}^2$, se define como peso normal, es decir personas delgadas, un IMC mayor a $25 \text{ kg}/\text{m}^2$ se define como sobrepeso, y un IMC mayor a $30 \text{ kg}/\text{m}^2$ como obesidad. El análisis de la relación entre el IMC, mortalidad y morbilidad sugieren que el promedio óptimo teórico de IMC es de alrededor de $21 \text{ kg}/\text{m}^2$ (http://apps.who.int/bmi/index.jsp?intro Page=intro_3.html).

Las relaciones de largo término entre la ingesta de energía, gasto de energía, distribución de nutrientes y adipogénesis, determinan la cantidad de energía almacenada en el cuerpo. Cuando la ingesta de alimento excede crónicamente el gasto de energía y cuando la distribución de lo ingerido favorece el almacenamiento de lípidos y oxidación de carbohidratos, el desbalance resultante causa expansión de las células grasas (adipocitos) e incremento en número (**Figura 1**).

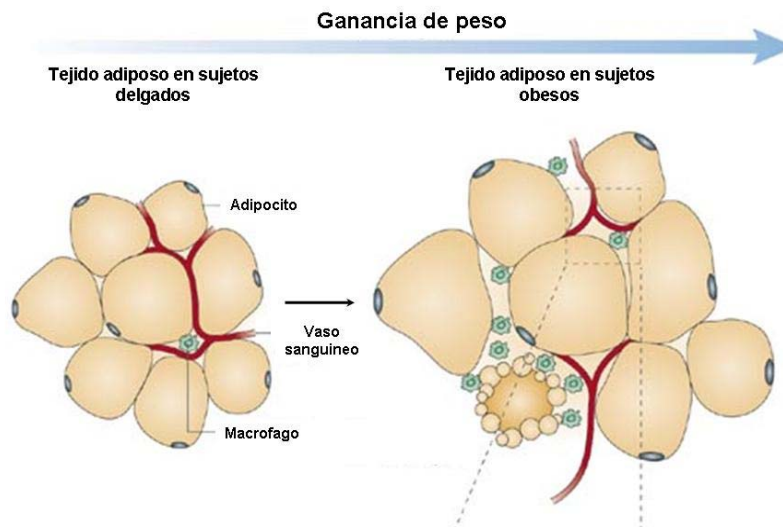


Figura 1. Modificación de la conformación estructural del tejido adiposo. En sujetos con obesidad, los adipositos están hipertróficos y hay una mayor acumulación de macrófagos. Modificado de Tilg y Mosche, 2006.

El tejido adiposo, se encuentra distribuido en distintas localizaciones en el organismo, se distribuye de manera dérmica, subdérmica, subcutánea, mesentérica, perigonadal, perirrenal y retroperitoneal. Se considera que su principal función es albergar la mayor parte de la reserva de grasa, sin embargo también tiene actividad metabólica y endocrina (autocrina y paracrina) mediante la síntesis de diversos tipos de moléculas. Existen dos principales tipos de tejido adiposo, el tejido adiposo café y tejido adiposo blanco. El tejido adiposo café suele encontrarse en gran cantidad en recién nacidos y disminuye conforme el infante crece; en los animales, es frecuente encontrarlo en especies hibernantes, esto es debido a su capacidad de almacenar calor. Los adipocitos que componen el tejido adiposo blanco pueden secretar hormonas, tales como la leptina, la cual informa al cerebro del estado nutricional del individuo para regular la saciedad y el gasto energético (Deshaies *et al.*, 2004).

El balance entre los dos tipos de tejido adiposo puede verse modificado en respuesta a diversos factores, tales como el frío, el calor y la obesidad. El tamaño del adipocito oscila entre 10 y 100 micrómetros de acuerdo al estado nutricional, ya que esta célula presenta una gran plasticidad que le permite adaptarse según la cantidad de triglicéridos que tenga que almacenar. Así, el adipocito puede almacenar hasta 1.2 microgramos de triglicéridos en un sujeto obeso, mientras que en sujetos con peso normal almacena aproximadamente 0.4 microgramos de los mismos (Barbatelli *et al.*, 1995).

Los efectos de la obesidad o el sobrepeso, no son solamente las consecuencias sociales y psicológicas del peso excesivo, sino también la significativa morbilidad y prematura mortalidad asociada con las serias condiciones médicas que esta patología predispone, incluyendo la diabetes tipo II, la hipertensión, las

enfermedades coronarias y varias formas de cáncer que representan las principales causas de mortalidad en el mundo (Must *et al.*, 1999; Calle *et al.*, 2003). Hay aproximadamente 350 millones de gente obesa ($\text{IMC} \geq 30.0 \text{ kg/m}^2$) y cerca de 1 billón de gente con sobrepeso ($\text{IMC} \geq 25 \text{ kg/m}^2$) en el mundo. De este total, cerca de 2.5 millones de personas, mueren por las enfermedades que se originan al presentar sobrepeso u obesidad mundialmente (<https://apps.who.int/infobase/reportviewer.aspx?rptcode=ALL&surveycode=102806a1&dm=5>). Además, estos padecimientos representan las principales causas de muerte en México (Calle *et al.*, 2003).

2. Obesidad en México

La prevalencia de obesidad en los adultos mexicanos ha ido incrementando con el tiempo. En 1993, los resultados de la Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas (ENEC 1993) mostraron que la prevalencia de obesidad en adultos era del 21.5%; los datos de la ENSA 2000 revelaron que el 24% de los adultos mexicanos eran obesos; y actualmente, se considera que alrededor del 30% de la población mayor de 20 años (mujeres: 34.5 %, hombres: 24.2%) tiene obesidad según la información proporcionada por la ENSANUT 2006. Además, más del 60% de la población mexicana padece sobrepeso y obesidad por lo que no es de extrañar que las enfermedades cardiovasculares y la diabetes tipo II ocupen hoy en día las primeras causas de mortalidad en el país. La prevalencia total de diabetes tipo II en México es del 6.6% y 7.2% en hombres y mujeres, respectivamente, mientras que la prevalencia de hipertensión arterial es del 33.3% en hombres y de 25.6% en las mujeres (ENSANUT 2000).

Otro dato particularmente alarmante, es el aumento de la obesidad infantil en nuestro país en los últimos años,. Los datos obtenidos de la ENSANUT del 2006 muestran que de 1999 al 2006 la obesidad en niñas se ha incrementado en un 47%, mientras que en niños aumentó el 77%. Además de generar un adulto obeso, este

padecimiento en el niño y en el adolescente, constituye un importante factor de riesgo para el desarrollo.

3. Etiología de la obesidad

La obesidad es una enfermedad multifactorial en donde intervienen de manera sinérgica factores ambientales y factores genéticos. La susceptibilidad a la obesidad está parcialmente determinada por factores genéticos, pero un entorno obesogénico (ambiente), es necesario para la expresión de este fenotipo. Hay una relación sinérgica entre genes y entorno: en la presencia de una predisposición genética a la obesidad, la severidad de la enfermedad está determinada por el estilo de vida y las condiciones del entorno (Loos y Bouchard, 2003).

3.1 La obesidad y el factor ambiental

El desarrollo económico y la urbanización son los motores de la “transición de la nutrición”. Las vías de esta transición incluyen una mayor seguridad de los alimentos, la disponibilidad de fuentes económicas de grasas en forma de aceites vegetales, el hecho de comer fuera de casa más frecuentemente, la naturaleza menos ardua de los trabajos modernos y el aumento en la recreación sedentaria (principalmente la televisión, computadoras y videojuegos). Estas vías han transformado los patrones de la actividad alimenticia y física y, como resultado, inclinaron la balanza a favor del consumo energético y por lo tanto de la obesidad.

3.2 La obesidad y los factores genéticos

Muchos estudios han documentado que los factores genéticos están envueltos en el desarrollo de la obesidad (Bouchard, 1997; Barsh *et al.*, 2000; Comuzzie *et al.*, 2001). A pesar de que la epidemia de obesidad es global, análisis detallados sugieren que algunos grupos étnicos, como el Africano-Americano y el hispano, presentan mayor susceptibilidad para desarrollar obesidad (Ogden *et al.*, 2006). En este aspecto, es necesario tomar en cuenta que la susceptibilidad para desarrollar la

expresión fenotípica de obesidad está determinada por la interacción entre factores genéticos y un medio ambiente obesogénico (Maes *et al.*, 1997; Bouchard *et al.*, 2003). Por lo tanto, resulta difícil identificar la contribución independiente de cada uno de estos factores, porque en la mayoría de los casos el medio ambiente es también diferente entre los diferentes grupos raciales.

La obesidad puede ser clasificada desde la perspectiva de los factores genéticos en tres tipos:

- Obesidad monogénica: Los pacientes que padecen este tipo de obesidad presentan alteraciones mutagénicas en un solo gen, que generalmente codifica para una proteína esencial en la regulación de la ingesta de alimentos, por ejemplo:
 - Mutación del gen codificante para pro-opiomelanocortina (POMC), la cual es un precursor de péptidos melanotrópicos, corticotrópicos y opioides como la hormona estimulante de los melanocitos α (α -MSH) y hormona adecorticotrópica (ACTH), producidas por las neuronas hipotalámicas del núcleo arcuato. En 1998, se reportó un caso de dos niños alemanes sin parentesco con mutaciones en el gen POMC, ambos niños presentaban hiperfagia y una ganancia de peso acelerada, presumiblemente debido a una señal deficiente de melanocortina en el hipotálamo (Krude *et al.*, 1998).
 - Deficiencia congénita de leptina, la cual es considerada una hormona homeostática que regula la ingesta de alimentos y el peso corporal. Los niveles de esta hormona disminuyen durante el ayuno y se incrementan durante la ingesta. También se ha encontrado que la leptina está asociada a la regulación de procesos hemodinámicos renales (Haynes *et al.*, 1997; Vecchione *et al.*, 2002), tono de vasos sanguíneos (Fernández-Alfonso 2004) y regulación de la presión sanguínea (Galleti *et al.*, 2008; Miyazaki *et al.*, 2008). Genéticamente, los sujetos afectados son homocigotos para una mutación con cambio en el marco de lectura del gen, lo cual genera una proteína trunca que no es secretada, lo cual impide el adecuado

funcionamiento de esta vía de regulación del apetito (Farooqui *et al.*, 1997; Reaves *et al.*, 1999)

- Deficiencia del receptor de leptina. En 1998, se reportó una mutación en el receptor de la leptina en tres sujetos consanguíneos. Los individuos afectados son homocigotos para una mutación que trunca el receptor antes de su dominio transmembranal. Fenotípicamente, presentan características similares á los sujetos con deficiencia congénita de leptina; tienen un peso normal al nacer, sin embargo exhiben una ganancia considerable de peso en los primeros meses de vida, con severa hiperfagía y comportamiento agresivo ante la restricción de alimento (Clement *et al.*, 1998). Los sujetos con esta deficiencia, padecen retraso mental, lo que sugiere que esta alteración resulta en un fenotipo más severo que la pérdida de leptina en sí.

- Obesidad sindrómica: Genéticamente, se caracteriza por presentar un patrón de herencia mendeliano, sin embargo, clínicamente los pacientes presentan un cuadro heterogéneo, las principales características son el retraso mental, malformaciones físicas y obesidad. Algunos ejemplos de este tipo de obesidad son:
 - El Síndrome de Prader-Willi (SPW), fue descubierto en 1956 por los doctores suizos Andrea Prader, Alexis Labarth y Heinrich Willi, cuando estudiaron a nueve pacientes que presentaban un cuadro clínico de obesidad, baja estatura, criptorquidia (situación clínica en la cual el testículo no desciende de manera normal al escroto), hipotonía muscular y alteraciones en el aprendizaje (Burman *et al.*, 2001). Los genes afectados en el SPW, están ubicados generalmente en el cromosoma 15 heredado por el padre. Los genes ubicados en este locus heredado de la madre generalmente están inactivos. Los niños afectados presentan una delección o inactivación debido á un defecto en la metilación de un segmento cromosómico heredado del padre o han heredado dos copias de esta región cromosómica provenientes de la madre, esta situación en particular es denominada disociación uniparental materna (Wattendorf *et al.*, 2005).

- El Síndrome de Bardet-Biedl (SBB), fue reportado por primera vez en 1920 por el Dr. George Bardet, quien caracterizó a esta enfermedad en función de cuatro criterios: retinosis pigmentaria, polidactilia, obesidad e hipoplasia genital. El SBB se transmite genéticamente en las familias siguiendo un patrón autosómico recesivo. La relativa constancia del fenotipo, llevó a la teoría de que este síndrome se debía a un locus específico, sin embargo, hasta la fecha se han relacionado seis loci genéticos con el desarrollo de esta enfermedad (Katsanis *et al.*, 2001).
- Obesidad poligénica u obesidad común: Este tipo de obesidad suele ser de origen multifactorial, donde hay una interacción importante entre el fondo genético del individuo y del ambiente circundante. Esta forma es también la forma más frecuente de obesidad humana. Hasta el momento, se han descrito más de 430 genes con funciones diversas en el organismo, asociados al desarrollo de obesidad en los seres humanos. Entre estos, podemos mencionar a los que codifican para la adiponectina, los receptores adrenérgicos, el receptor de glucocorticoides, el receptor proliferador de peroxisomas activado gamma (PPARG), las proteínas desacoplantes mitocondriales transportadoras de protones y la leptina entre otras.

4. Papel de la leptina en la regulación de la homeostasis energética.

Como se mencionó anteriormente, la obesidad es causada por alteraciones del balance entre la ingesta y el gasto de energía, el cual es regulado por un complejo sistema fisiológico que requiere la integración de muchas señales periféricas y coordinación central en el cerebro. El hipotálamo funciona como regulador central en este sistema. Este recibe información acerca del balance de energía a través de las señales neuronales y hormonales de muchos tejidos (Xu *et al.*, 2003). En particular, recibe información a partir del tejido adiposo mediante la Leptina, una hormona

anorexigénica que es secretada mantenidamente por los adipocitos, y participa en el control de la homeostasis energética activando vías específicas de señalización en el núcleo hipotalámico y particularmente, el núcleo arcuato (Zhang *et al.*, 1994).

La leptina que es sintetizada y secretada por el tejido adiposo blanco es liberada al torrente sanguíneo y transportada hacia el cerebro por un sistema saturable constituido por al menos tres proteínas (Houseknecht *et al.*, 1996; Banks *et al.*, 1996). Una de estas formas es la isoforma libre del receptor de leptina. Se ha propuesto que este complejo sea la forma biológicamente activa de la leptina, necesaria para atravesar la barrera hematoencefálica. Este último proceso podría estar reducido en pacientes obesos, lo que podría explicar la falta de regulación de la homeostasis energética por la leptina en estos individuos (Caro *et al.*, 1996; Schwartz *et al.*, 1996).

El órgano blanco de la leptina en el cerebro, es el hipotálamo en donde el receptor de la leptina presenta un elevado nivel de expresión en neuronas de varios núcleos hipotalámicos, particularmente el núcleo arcuato, el paraventricular, los ventromediales y los dorsomediales, todos implicados en la regulación del comportamiento alimentario y del balance energético. El núcleo arcuato no solo es el que expresa una mayor cantidad de receptor de la leptina, sino que además, es el principal sitio de acción de la leptina en el hipotálamo. La acción de la leptina en este sitio, es doble: por un lado, inhibe la ingesta y por otro lado, activa la termogénesis, lo cual resulta en el control del peso corporal, (Friedman *et al.*, 1998; Boulomieu *et al.*, 1998) (**Figura 2**). Esta función dual se debe al hecho de que el núcleo arcuato contiene dos tipos de neuronas: unas neuronas producen la proteína relacionada a agouti (AGRP) y el neuropeptido Y (NPY) que forman parte de la vía orexigénica, es decir inductora del apetito; y las otras producen la pro-opimelanocortina (POMC) y transcritos relacionados a anfetaminas y cocaína (CART), que forman parte de la vía anorexigénica, es decir inductora de saciedad (Barsh *et al.*, 2002). Las neuronas de las vías orexigénicas y anorexigénicas inervan varios centros del hipotálamo y del

tallo cerebral, de modo que dan origen a las complejas señales integradoras responsables del comportamiento alimenticio del individuo.

Por otro lado, se ha reportado que una baja producción de leptina invierte el mecanismo de control del peso, es decir que favorece la ingesta y reduce el gasto energética, y lo que resulta es un desbalance de la homeostasis energética, promoviendo la ganancia de peso e incremento del número de adipocitos, es decir promoción de la adipogénesis (Friedman *et al.*, 1998; Boulomieu *et al.*, 1998) (**Figura 2**).

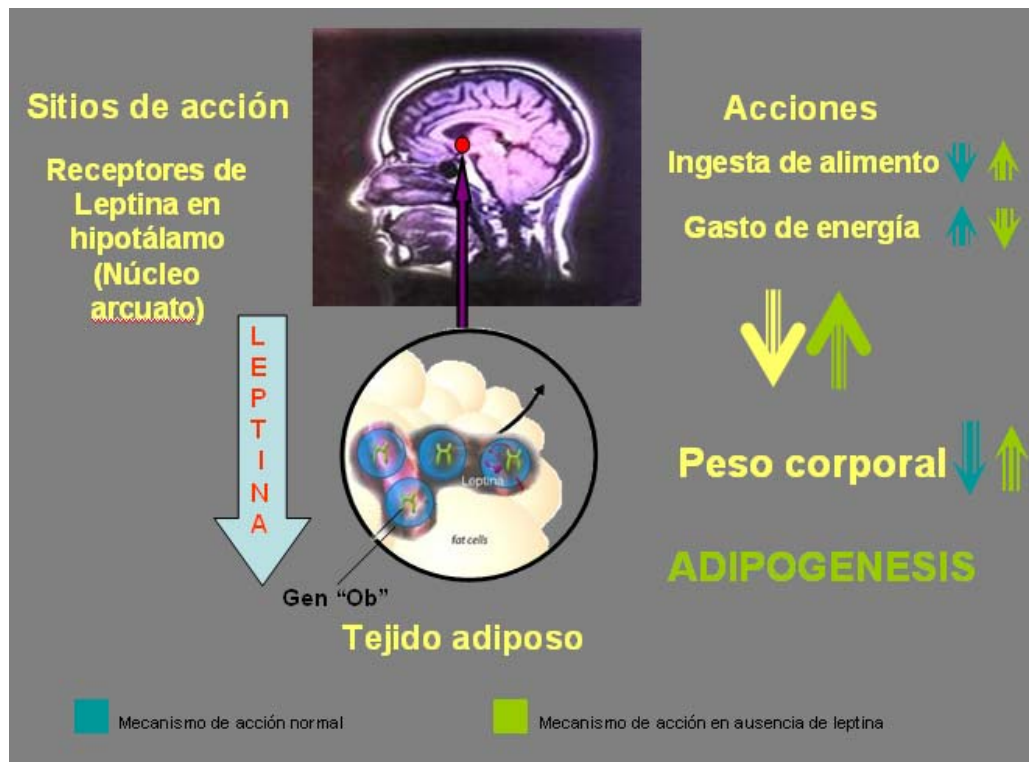


Figura 2. Mecanismo de acción de la leptina en el hipotálamo. ■ Ruta de acción normal de la leptina, ■ Ruta de acción anormal de la leptina (tomado de Suganami 2004).

5. Relación entre los niveles de leptina y la obesidad

Como se describió anteriormente, la leptina es una hormona anorexigenica, es decir que estimula la saciedad y favorece el gasto energético. Sin embargo el rol anti-obesidad de la leptina está limitado por la resistencia celular de esta señal, la cual pudo haberse desarrollado en respuesta a una presión evolutiva para promover el almacenamiento de grasa y así protegerse contra el hambre (Spiegelman *et al.*, 2001).

Varios estudios han demostrado que los niveles de leptina se incrementan con la ganancia de peso (Kolaczynski *et al.*, 1996a, Maffei *et al.*, 1995, Rosenbaum *et al.*, 1997) y decrecen con la pérdida de peso (Maffei *et al.*, 1995), consistente con el rol de la leptina como señal de los almacenes del tejido adiposo.

En el trabajo de Considine *et al.* (1996), se reportó que el promedio de leptina en suero determinado por radioinmunoensayo en sujetos delgados saludables de ambos géneros fue de 7.5 ± 9.3 ng/ml, mientras que aproximadamente se detectó aproximadamente cuatro veces mas leptina en el suero de individuos obesos (31.3 ± 24.1 ng/ml) en el mismo estudio. Similares resultados han sido obtenidos por ensayos de inmunoprecipitación (Maffei *et al.*, 1995) y otros radioinmunoensayos en población de sujetos de ambos sexos (Hosoda *et al.*, 1996). Aunque el mecanismo exacto no ha sido aun determinado, se ha propuesto que los esteroides sexuales tal como los estrógenos, progesterona y andrógenos podrían participar en la regulación de los niveles de leptina (Rosenbaum *et al.*, 1996).

Los niveles elevados de leptina detectados en pacientes obesos no son consistentes con el papel anorexigenico de esta adipocina. Varias hipótesis han sido propuestas para explicar este fenómeno de “resistencia a la leptina” en los pacientes obesos.

La más aceptada de estas hipótesis, se relaciona con defectos de transporte en el torrente circulatorio, ya que se ha visto que al menos un set de tres proteínas, entre

las cuales se encuentra la isoforma libre del receptor de leptina, acarrean la leptina y la llevan hasta su sitio de acción en el núcleo arcuato a través de la barrera hematoencefálica (Houseknecht *et al.*,1996). En estos pacientes se ha visto que a pesar de que tienen niveles óptimos de leptina, la eficiencia de transporte es reducida, posiblemente por disminución de la isoforma libre del receptor de la leptina, lo que sugiere que la leptina es transportada hacia el cerebro por un sistema saturable (Banks *et al.*,1996; Caro *et al.*, 1996 y Schwartz *et al.*, 1996). Otra posibilidad, es que la resistencia a la leptina sea el reflejo de las limitaciones del efecto de la leptina para regular la ingesta y las reservas de grasa corporal, debido a alteraciones en la interacción con el receptor, o bien en la vía de señalización que depende de esta interacción (Spiegelman y Flier 1996).

6. Organización molecular del gen de la leptina

El gen de la leptina incluye 650 kb y consiste de tres exones separados por dos intrones. La región codificante para la proteína está localizada en los exones 2 y 3, el transcrito de estos dos exones genera un producto de 167 aminoácidos (aa). La primera parte del exón 2 codifica un péptido señal de 21 residuos de aa que se elimina, de tal forma que la proteína madura procesada corresponde a solamente 146 aa con un peso molecular de aproximadamente 16 kDa (Zhang *et al.*, 1997) **(Figura 3)**.

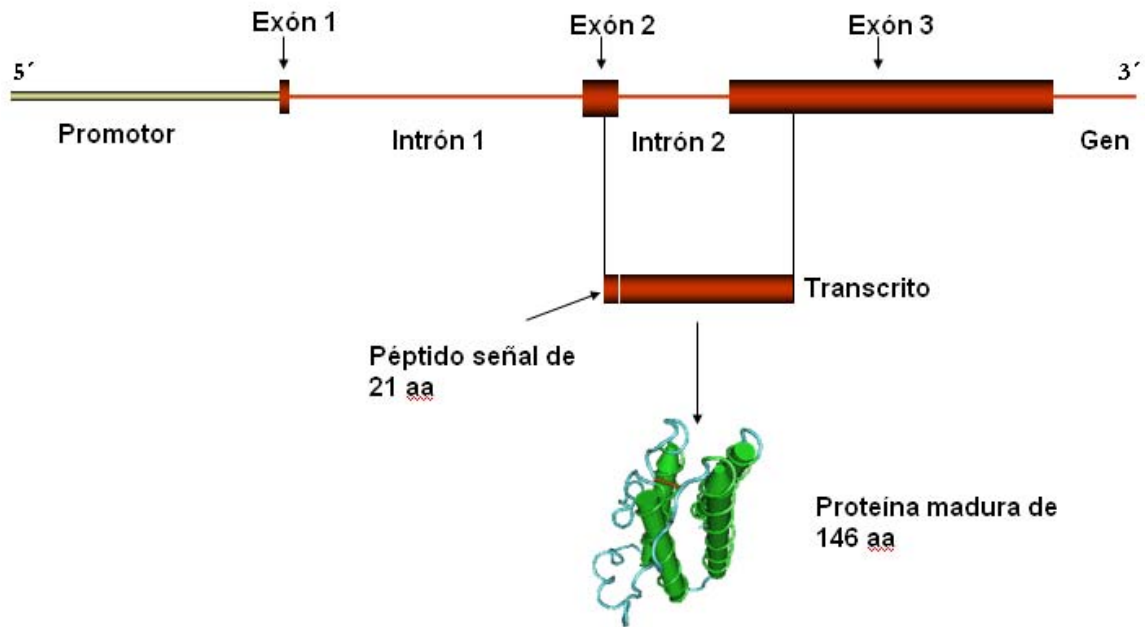


Figura 3. Organización molecular del gen de la leptina y síntesis de la proteína madura.

Muchos elementos regulatorios han sido identificados dentro del promotor del gen de la leptina, incluyendo elementos de respuesta a AMP cíclico y glucocorticoides, así como sitios de unión para SP-1 y el enhancer/CCATT (Gong *et al.*, 1996; Hwang *et al.*, 1996; Miller *et al.*, 1996).

La leptina es una proteína altamente conservada a lo largo de la escala evolutiva. Esta proteína presenta un ~84% de identidad de secuencia entre muchas especies, tal como el humano, gorila, chimpancé, mono Rhesus, orangután, perro, vaca, cerdo, rata y ratón (Zhang *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1997).

El análisis de estructuras por algoritmos y resonancia magnética nuclear de una forma cristalina revelaron que la leptina humana es una proteína conformada por cuatro hélices alfa (hélices A, B, C y D), es decir que presenta un plegamiento muy similar al de los miembros de la familia de las citocinas hematopoyéticas, tales como

la interleucina 6 y el factor estimulante de colonias de granulocitos (Rock *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1997). La leptina contiene un solo puente disulfuro que une dos residuos de cisteína (Cys96 y Cys146) contenidas en las hélices C y D.

7. Antecedentes

7.1 Polimorfismo -2548 G/A en el promotor del gen de la leptina: relación con la obesidad y los niveles de leptina.

En el campo de las investigaciones acerca de la susceptibilidad a la obesidad, los genes candidatos son elegidos en base a su relevancia en la regulación del contenido de grasa corporal, o bien aquellos que tienen un papel importante en la homeostasis energética, tal es el caso de la leptina.

En 1998, Mammès *et al.*, analizaron la región promotora del gen de la leptina y el exon 1 del nucleótido -2608 y hasta el nucleótido +31, excluyendo los sitios potencialmente reguladores descritos por Gong *et al.* (1996) en un grupo de 117 franceses caucásicos obesos (79 mujeres y 38 hombres). El fragmento fue dividido en siete fragmentos pequeños de aproximadamente 250 pares de bases, los cuales fueron amplificados por PCR y analizados con SPSS. Estos análisis permitieron la identificación de ocho polimorfismos reportados como: -2549 C/A, -2437 T/G, -1887 C/T, -1823 C/T, -1387 G/A, -633 C/T, -188 C/A y +19 G/A. Según los autores, ninguno de estos polimorfismos crea o modifica sitios de regulación importantes. Al buscar una asociación de los ocho polimorfismos encontrados con características fenotípicas, observaron que la presencia del alelo A en la posición -2458 (polimorfismo -2548G/A, mal llamado -2549 C/A y después corregido) se asociaba con altos niveles de leptina en sujetos obesos y que además se asociaba con bajo IMC en mujeres.

En el 2000, Mammès *et al.*, vuelven a evaluar el polimorfismo -2548G/A en un grupo de 423 sujetos de la misma población franceses caucásicos (314 sujetos con peso normal y 109 sujetos con sobrepeso), a fin de validar los resultados reportados previamente. En este estudio, encontraron que el alelo G fue más frecuente que A en los sujetos con sobrepeso y que además los sujetos con G tenían bajos niveles de leptina. Esto indicaba que las variaciones genéticas identificadas en el locus de la leptina estaban asociados con fenotipos de obesidad común y no solamente con obesidad extrema o síndromes de obesidad mendelianos raros, como se había reportado previamente.

El mismo año, Le Stunff *et al.* (2000) evaluaron el polimorfismo -2548G/A en dos grupos de niñas obesas caucásicas de 11.5 ± 2.9 años, uno de 140 y otro de 93, encontrando que niñas con niveles de adiposidad comparable, presentaban diferentes niveles de leptina en suero dependiendo del genotipo presente en la posición -2548. Las niñas con el genotipo AA presentaban una reducción del 25 % en los niveles de leptina, comparando con los niveles determinados en las niñas con los genotipos GG y GA. Estos resultados sugieren que el genotipo AA está asociado a bajos niveles de leptina en niñas obesa, y que la secuencia de nucleótidos en la posición -2548 en el promotor podría estar relacionada con cambios en la actividad transcripcional del gen de la leptina, y por lo tanto cambios en la síntesis de la proteína en individuos obesos.

En el 2002, Hoffstedt *et al.* investigaron si las variantes del polimorfismo -2548 G/A influenciaban la transcripción del gen y la expresión de la leptina en 39 sujetos no obesos femeninos. Se tomaron biopsias de tejido adiposo para medir los niveles del ARNm correspondiendo al gen de la leptina. Los resultados mostraron que los niveles del ARNm fueron 60 % más altos en las mujeres con el genotipo AA. Además, estos pacientes presentaron una mayor velocidad de secreción de leptina con respecto a los sujetos con genotipos GA y GG. Mediante ensayos de retardamiento (EMSA), los autores demostraron que proteínas obtenidas de células U937 y adipocitos humanos son capaces de formar un complejo ADN-proteínas con

un fragmento que corresponde a una región del promotor que incluye la posición -2548. Particularmente, estas proteínas presentaban más afinidad con el DNA en presencia del alelo A en la posición -2548.

Wuang *et al.*, en el 2006, estudiaron 308 sujetos taiwaneses aborígenes (126 obesos y 182 con peso normal), encontraron que el genotipo homocigoto GG está significativamente asociado con la obesidad extrema. Sin embargo, ninguna asociación fue encontrada con los niveles de leptina.

En el 2007 Duarte *et al.*, al evaluar 200 sujetos obesos (60 hombres y 140 mujeres) y 150 sujetos delgados (63 hombres y 87 mujeres) saludables todos brasileños de diferentes fondos genéticos y orígenes étnicos, encontraron una asociación entre el genotipo GG y el fenotipo obeso, con un factor de riesgo del 58% con respecto a los genotipos AG y AA.

Finalmente en el 2008, Hinuy *et al.* analizaron el polimorfismo -2548 G/A en un grupo de 228 mujeres brasileñas, encontrando que las mujeres portadoras del alelo G tenían cuatro veces más riesgo de ser obesas que aquellas que tenían el alelo A (OR: 4.11, CI 95%). Además, reportaron que el alelo G estaba relacionado con un incremento de leptina en plasma y el alto índice de masa corporal, con lo cual concluyeron que el polimorfismo -2548 G/A en el promotor del gen de la leptina podría ser un importante marcador del riesgo relacionado con la obesidad.

En México, hasta hace poco, no había ningún trabajo publicado sobre el polimorfismo -2548 G/A en el promotor del gen de la leptina. Sin embargo, encontramos un trabajo de los D. en C. Verónica Lara Castañeda y Ismael Lares Assef reportaron un estudio preliminar en la Nicotine del Centro de Investigación Interdisciplinaria para el Desarrollo Regional (CIIDIR) del Instituto Politécnico Nacional (IPN). En este trabajo, los autores evaluaron el polimorfismo G-2548A en el promotor del gen de la leptina en 27 pacientes jóvenes con obesidad y 29 controles sanos de la Ciudad de Durango. No observaron prevalencia de alguna de las variantes del polimorfismo ya

que las frecuencias genotípicas de 33.3% para los genotipos AA, AG y GG. Sin embargo, observaron que la predominancia del genotipo GG en pacientes obesos con diabetes tipo 2 (DT2), ya que dos pacientes eran homocigoto GG, uno era AG y el otro era AA. Aun si los autores concluyen que el estudio aporta información sobre el comportamiento genético de la población duranguense en relación a la obesidad y la diabetes tipo 2, son solamente resultados preliminares que pueden no ser muy concluyentes debido al pequeño tamaño de la muestra.

De acuerdo a lo expuesto anteriormente podemos inferir que si bien las diferentes variantes del polimorfismo -2548G/A, es decir los genotipos A/A, G/A y G/G, parecen estar relacionados con el fenotipo (peso normal, sobrepeso u obesidad) y/o los niveles de leptina en suero presentes en algunas poblaciones, esto no es válido para otra, es decir que lo que determina un fenotipo (peso corporal y niveles de leptina) en una población no necesariamente se cumple en otra. Lo anterior se debe a que cada población presenta diferente fondo genético y sobretodo diferente entorno ambiental (hábitos alimenticios y disponibilidad de alimentos), y esto es lo que finalmente determina la expresión del genotipo.

8. Justificación

La obesidad es un problema de salud mundial, que en México afecta al 30% de la población y es un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus tipo II y cáncer que son las principales causas de muerte en nuestro país.

La obesidad resulta de un crónico desbalance entre el consumo y gasto energético, debido a factores ambientales pero también genéticos. Estudios realizados en distintas poblaciones sugieren que el polimorfismo -2548G/A en el promotor del gen de la leptina podría correlacionar con la obesidad y/o los niveles de leptina en suero.

Por lo que es importante evaluar la asociación de este polimorfismo en el promotor del gen de leptina con los niveles de la proteína y la obesidad en la población mexicana, con la finalidad de contribuir al desarrollo de métodos diagnósticos y pronósticos de esta enfermedad.

9. Objetivos

Objetivo general:

Determinar la asociación de la leptina con la obesidad en la población mexicana.

Objetivos particulares:

1. Generar un banco de DNA de pacientes mexicanos obesos, pacientes con sobrepeso y grupo control (no obesos).
2. Relacionar el polimorfismo G-2548A en el promotor del gen de la leptina con el fenotipo en la población de estudio.
3. Comparar los niveles de leptina en sangre periférica de mujeres obesas y grupo control (no obesas).
4. Relacionar la presencia del polimorfismo G-2548A en el promotor del gen de la leptina con el fenotipo y los niveles de leptina en la población de estudio.

10. Estrategia experimental



Figura 4. Estrategia experimental.

11. Materiales y metodos

Obtención de las muestras

Población de estudio

La población de estudio consistió de pacientes voluntarios que acuden por primera vez (antes de la realización de cualquier maniobra terapéutica) a la Clínica de Acupuntura de la ENMyH-IPN.

Criterios de inclusión para los casos

Sujetos de entre 18 a 60 años; de cualquier sexo y que acepten participar en el estudio mediante la firma del Consentimiento informado (**ANEXO 1**).

Criterios de exclusión para los casos

Sujetos en los que esté documentada una causa neuroendócrina de obesidad: hipotalámica, hipofisaria, por hipotiroidismo grave, por síndrome de ovarios poliquísticos así como enfermedades graves como neoplasias, diabetes descontrolada, hipertensión arterial descontrolada y enfermedades sistémicas mayores (excepto para la determinación de los polimorfismos genéticos); uso de glucocorticoides en los últimos tres meses, antidepresivos tricíclicos, ciproheptadina, fenotiacinas, estrógenos solos o combinados con progestágenos, hormona de crecimiento, drogas anorexígenas, insulina o cambios de peso.

Criterios de eliminación para los casos

Sujetos en los que no se complete la evaluación; sujetos que soliciten su retiro del estudio.

Después de haber obtenido su consentimiento informado para participar en el proyecto (**ANEXO 1**), los pacientes seleccionados fueron sometidos a una evaluación antropométrica (**ANEXO 2**) para poder ubicarles en tres grupos en base a su IMC (Grupo 1, Obesidad: $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$; Grupo 2, Sobrepeso: $IMC 25 \text{ a } 29.9 \text{ kg/m}^2$;

Grupo 2, Peso normal: IMC de 18.5 a 24.9 kg/m²). Se les realizó una entrevista y se les aplicó un cuestionario (**ANEXO 2**) que incluía detalles sobre su historia médica general, así como la presencia o ausencia de las siguientes enfermedades en los familiares de primer grado (padre, madre y hermanos): obesidad, diabetes mellitus tipo II, hipertensión arterial sistémica, dislipidemia, infarto agudo al miocardio, insuficiencia cardíaca y cáncer (dentro de esta última patología se consignará la localización inicial del tumor). Estos datos fueron utilizados para generar un banco de información.

Finalmente, se les tomó una muestra de sangre periférica para medir los niveles de leptina en suero y extraer el ADN. Dos muestras de 5 mL de sangre fueron colectadas por sujeto. Una de ellas se colectó en un tubo que contenía EDTA como anticoagulante para posteriormente obtener el ADN y genotipificar a los sujetos; estos tubos fueron almacenados a -20 °C hasta obtener suficientes muestras para procesarlas. La segunda muestra fue colectada en un tubo sin anticoagulante con el fin de poder separar el paquete celular y así poder obtener el suero para posteriormente medir la cantidad de leptina presente. Estas muestras fueron almacenadas en ultracongelación (-80° C) hasta completar las muestras necesarias que se requieren para la placa de ensayo de ELISA de 96 pozos.

Obtención del ADN genómico.

A partir de la sangre total congelada colectada en tubos que contenían anticoagulante (EDTA), se realizó la extracción del ADN empleando el kit FlexiGene de Qiagen basado en la técnica de precipitación de ADN por isopropanol (**ANEXO 3**). Una vez obtenido el el ácido nucleico, este se cuantificó por espectrofotometría a 260 y 280 nm y los valores obtenidos sirvieron para calcular la concentración de ADN (ng/mL) de cada muestra. Por otro lado, el cociente de las lecturas de absorbancia (260 y 280 nm), nos indicó el grado de pureza de las muestras, considerando que un

cociente entre 1.7 y 1.9 corresponde a una muestra limpia de impurezas (RNA, fenol, proteínas, etc.). Finalmente el ADN fue analizado por electroforesis en geles de agarosa al 1% para verificar su integridad y almacenado a -80° C hasta su uso.

PCR

La presencia del polimorfismo -2548G/A en la región promotora del gen de LEP fue analizada siguiendo la técnica previamente reportada por Le Stunf *et al.* (2000). Mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se amplificó un fragmento de 242 pb del promotor, del nucleótido -2367 al nucleótido -2608., utilizando el oligonucleótido en sentido 5'-TTTCCTGTAATTT TCCCGTGAG-3' y el oligonucleótido en antisentido 5'-AAAGCAAAGACAGG CATAAA-3'. La PCR fue realizada en un volumen final de 25 µl que contenía: 200 ng de ADN, 25 pmol de cada primer (1 µl) y 12.5 µl de un master mix comercial de Ampliqon que contenía: 82.5 mM Tris-HCl pH 8.5, 1.65 mM MgCl₂, 0.11% Tween 20 mM, 0.22 mM dNTP's, 0.11 unidades/µl TaqDNA polimerasa, colorante rojo inerte y estabilizador. Después de la desnaturalización inicial por 2 minutos a 94°C, se realizaron 25 ciclos a 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos y 68°C por 1 minuto, con una extensión final a 72°C por 5 minutos. Para verificar que el tamaño del fragmento amplificado, se realizó una electroforesis en geles de agarosa al 2 % y tinción con bromuro de etidio; el gel se registró y se analizó en el documentador de imágenes.

Restricción enzimática

Una vez verificado que los productos de PCR tenían el tamaño esperado de 242 pb, fueron sometidos a restricción enzimática con la enzima *CfoI* de Promega (10 u/µl) por 4 horas a 37 °C (**ANEXO 4**). Esta enzima reconoce el sitio de restricción GCGC y corta entre la última C y la penúltima G que es la que se encuentra en la posición -

2548 (GCG/C), por lo que no habrá restricción si está presente la base A en la posición -2548. Posteriormente, las muestras fueron analizadas por electroforesis en geles de acrilamida al 10 % y tinción con bromuro de etidio. El gel se registró y se analizó en el documentador de imágenes. Dependiendo de la variante del polimorfismo presente en la posición -2548 (G o A) en el individuo, esperamos obtener diferentes perfiles de restricción a partir del fragmento de 242 pb: dos fragmentos de 181 y 61 pb en homocigotos G/G (corte por la enzima en ambos alelos); tres fragmentos de 242, 181 y 61 pb en heterocigotos A/G (corte de la enzima en uno de los dos alelos) y un solo fragmento de 242 pb en homocigotos A/A, es decir, no habrá corte por la enzima (Le Stunf et al., 2000).

Determinación de los niveles de leptina en suero de sangre periférica

Para determinar los niveles de LEP en suero, se realizó la separación del paquete celular a partir de las muestras de sangre colectadas en ausencia del anticoagulante. Para la obtención del suero a partir de sangre periférica, los tubos libres de anticoagulante conteniendo 5 mL de sangre se dejaron a temperatura ambiente (30 á 40 minutos) hasta que la sangre se coaguló. Una vez que se formó el paquete celular, este se despegó de las paredes del tubo para ser desechado. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, finalmente el suero fue alicuotado en tubos eppendorf de 1.5 mL y almacenado en ultracongelación a -80 °C hasta que se completaron las muestras para el ensayo de ELISA.

El suero así obtenido se empleó para realizar la cuantificación de leptina siguiendo las indicaciones del Human Leptin ELISA kit (Millipore, **ANEXO 5**), en el cual se emplea un anticuerpo específico contra esta hormona. El sistema tiene una sensibilidad de alrededor de 0.5 ng/mL. Se emplearon curvas de concentración y

controles positivos y negativos para la obtención de resultados cuantitativos en este ensayo. Los niveles de leptina fueron comparados con los reportados en otros artículos y con la referencia adjunta en el manual de procedimiento del ensayo para su clasificación en niveles normales o altos.

Métodos estadísticos

Las estadísticas descriptivas de la población de estudio fueron presentadas como valores promedio con desviación estándar. Las diferencias entre grupos para el genotipo, con respecto al IMC, el porcentaje de grasa y los niveles de leptina, fueron hechas usando la prueba de X^2 y la prueba de razón de momios (Odds Ratio). La relación de los niveles de leptina con el polimorfismo fueron hechos con ANOVA. El análisis estadístico, fue hecho usando el programa Statistical Package for Social Sciences (SPSS 10.0 para Windows; SPSS Inc., Chicago IL, USA) y Microsoft Office Excell 2003. Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos cuando el valor de p fue menor a 0.05.

12. Resultados

Análisis de la población de estudio

El número total de sujetos seleccionados para este estudio de acuerdo a los criterios de inclusión, exclusión y eliminación presentados en la sección de Materiales y métodos, fue de 160, de los cuales 119 fueron mujeres y 41 hombres. Los datos antropométricos como edad, talla, peso corporal, perímetro abdominal, perímetro de cadera y porcentaje de grasa, son presentados en la **tabla 1** expresados en como media con desviación estándar.

En promedio, la edad fue similar en ambos grupos, es decir 37.1 ± 13.8 años en mujeres y 35.7 ± 14 años en hombres. Asimismo, no observamos diferencias significativas en el peso, el perímetro abdominal, el perímetro de cadera o el porcentaje de grasa de acuerdo al sexo. El único parámetro que fue distinto fue la talla, con un promedio de 156.8 ± 5 cm en mujeres y 169.5 ± 6.8 cm. en hombres.

Tabla 1. Características antropométricas de la población de estudio.

	Mujeres (119)	Hombres (41)
Edad (años)	37.1 ± 13.8	35.7 ± 14
Talla (centímetros)	156.8 ± 5	169.5 ± 6.8
Peso Corporal (kilogramos)	72.3 ± 16.9	85.1 ± 18
perímetro abdominal (centímetros)	93.7 ± 15.6	103.1 ± 18.4
perímetro cadera (centímetros)	108.5 ± 16.8	105.1 ± 11.1
Porcentaje de Grasa	39.6 ± 11.8	37.4 ± 9.9

Número de individuos en parentesis. Los datos, son presentados como promedios con desviación estándar.

A pesar de que el estudio se realizó en el Distrito Federal, el grupo fue heterogéneo con respecto al lugar de nacimiento. Aunque el mayor número de sujetos nacieron en

el Distrito Federal (73.1 %), un número importante nacieron en otros estados de la República y radican ahora en el D.F. (26.9 %) (Figura 5).

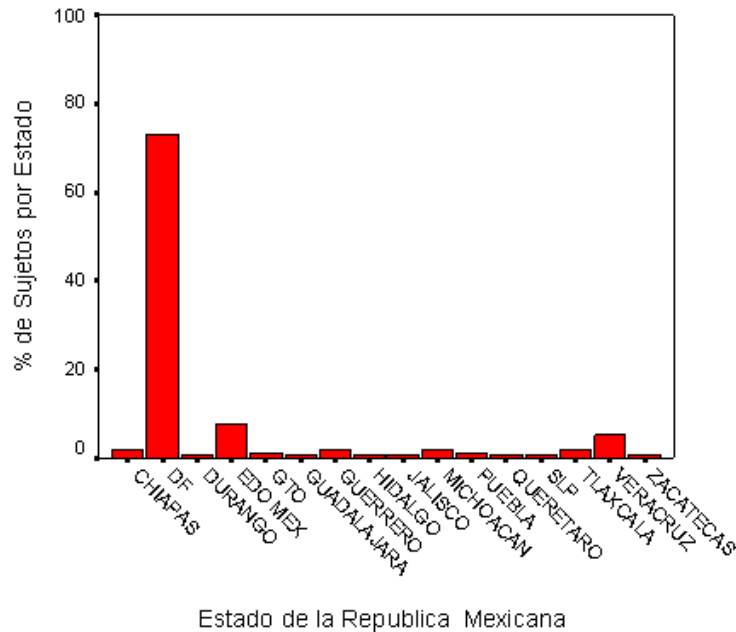


Figura 5. Distribución de la población de estudio por lugar de nacimiento.

Los 160 sujetos fueron clasificados en cuatro grupos etarios (< 18 años, 19-44 años, 45-64 años y > 65 años), de acuerdo a la clasificación de la OMS (www.who.int/classifications). En la **tabla 2**, podemos observar que el mayor número de sujetos estuvo comprendido en los grupos etarios intermedios, es decir que tenían una edad de 19 a 44 años y 45 a 64 años, tanto para mujeres (92.43 %) como para hombres (92.68 %).

Finalmente, los sujetos de cada grupo etario fueron clasificados en base a su índice de masa corporal (IMC) determinado según los criterios de la OMS, considerando que los sujetos con peso normal (delgados) tienen un IMC de 18.5 a 24.9 kg/m²; los sujetos con sobrepeso, un IMC de 25 a 29.9 kg/m² y los sujetos obesos, un IMC ≥ 30 kg/m² (**tabla 2**). Nuestra población de estudio está compuesta mayoritariamente de

individuos obesos (76 de 160, es decir 47.5%), tanto en hombres (15 de 41 hombres, es decir 36.6%) como en mujeres (60 de 119 personas, es decir 50.4%). El grupo de individuos con sobrepeso correspondió al 26.25% de la población, con 19 hombres y 23 mujeres; mientras que el grupo control correspondió al 26.9% de la población con 8 hombres y 35 mujeres.

Tabla 2. Clasificación de la población de estudio en base al género, edad y IMC.

Clasificación	Edad	Normales IMC 18.5 – 24.9 kg/m ²	Sobrepeso IMC 25 – 29.9 kg/m ²	Obeso IMC > 30 kg/m ²	Total por grupo etareo
MUJERES	< 18	3	2	2	7
	19 - 44	31	15	22	68
	45 - 64	1	6	35	42
	≥ 65	0	0	1	1
HOMBRES	< 18	1	1	0	2
	19 - 44	7	14	9	29
	45 - 64	0	3	6	9
	≥ 65	0	1	0	1
TOTAL		43	42	76	160

Generación del banco de ADN genómico

Para iniciar la caracterización genotípica de los sujetos de estudio, se procedió a obtener el ADN genómico a partir de la sangre periférica extraída en tubos con EDTA como anticoagulante utilizando el kit de la marca comercial QIAGEN, el cual basa su método en la precipitación de ADN por isopropanol (**ANEXO 3**). El ADN de los 160 sujetos se cuantificó por espectrofotometría mediante la determinación de la absorbancia a 260 y 280 nm, obteniendo valores que van desde 6.6 µg/mL hasta 944.25 µg/mL dependiendo de la muestra. Por otro lado, el cociente de estas dos

lecturas (260 nm/280 nm) confirmó la pureza de las muestras de ADN obtenidas, ya que en todos los casos obtuvimos un valor entre 1.7 y 1.9, lo que corresponde a una muestra libre de impurezas. Finalmente, se verificó la integridad de todas las muestras de ADN por electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio de 5 a 10 minutos. En la **figura 6**, se muestra un gel representativo con algunas de las muestras que se obtuvieron, en donde se puede apreciar la presencia de ADN de alto peso molecular, lo cual es característico de muestras no degradadas.

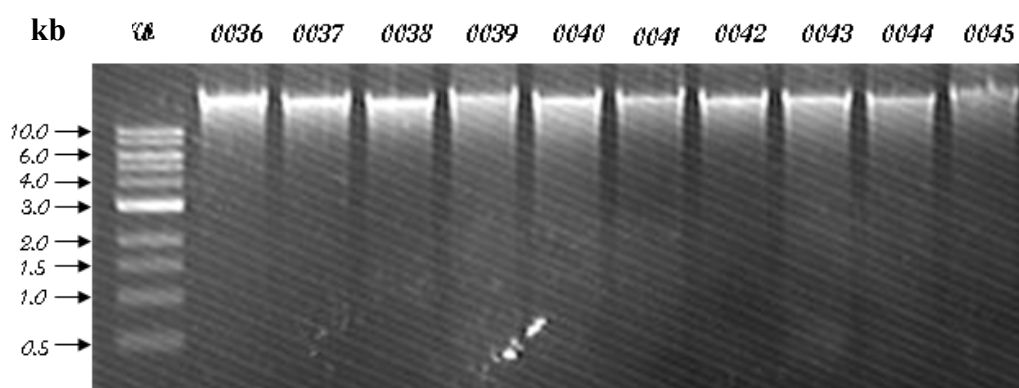


Figura 6. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1% de algunas muestras de ADN purificadas.

Determinación del polimorfismo -2548G/A en el promotor del gen de la leptina

El ADN de las 160 muestras fue sometido a una reacción de PCR para amplificar el fragmento de 242 pares de bases de la región promotora del gen de la leptina (**ANEXO 4**) de acuerdo al método reportado por Le Stunff *et al.* (2000). Los productos amplificados fueron verificados por electroforesis en geles de agarosa al 2 % y teñidos con bromuro de etidio por 5 a 10 minutos. La **figura 7** muestra un gel representativo en donde se puede observar la amplificación específica del fragmento de 242 pares de bases esperado en algunas de las muestras analizadas.

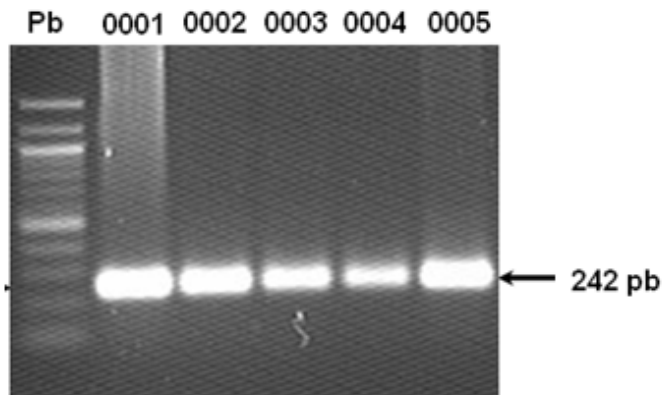


Figura 7. Análisis electroforético en gel de agarosa de los productos de amplificación de la región -2608 a -2366 nt del promotor del gen de la leptina.

Posteriormente, se realizó la restricción enzimática con la enzima *CfoI* 10u/μl (**ANEXO 5**). Todas las reacciones de restricción fueron verificadas por electroforesis en geles de acrilamida al 10% teñidos con bromuro de etidio. En la **figura 8**, se muestra un gel representativo de algunas muestras de la restricción obtenidas. En el carril 1, podemos observar la presencia de un solo fragmento de 242 pb (control sin digestión), similar al fragmento de PCR del carril 2 y 5; este resultado muestra que la enzima no cortó el fragmento de PCR, lo que indica que esta muestra corresponde a un individuo homocigoto con el genotipo AA. En los carriles 3, 4, 6, y 7 podemos observar la presencia de tres bandas de 242, 181 y 61 pb, lo que muestra que la enzima cortó un solo alelo, por lo que estas muestras corresponden a individuos heterocigotos GA. Finalmente En los carriles 8 y 9, se observan las dos bandas de 181 y 61 pb, lo que indica que la enzima cortó los dos alelos, por lo que podemos concluir que se trata de una muestra que corresponde a un individuo homocigoto GG. Cabe mencionar que todas las reacciones de restricción se realizaron por duplicado y las muestras que correspondieron a un genotipo AA fueron sometidas a una tercera restricción para corroborar los resultados.

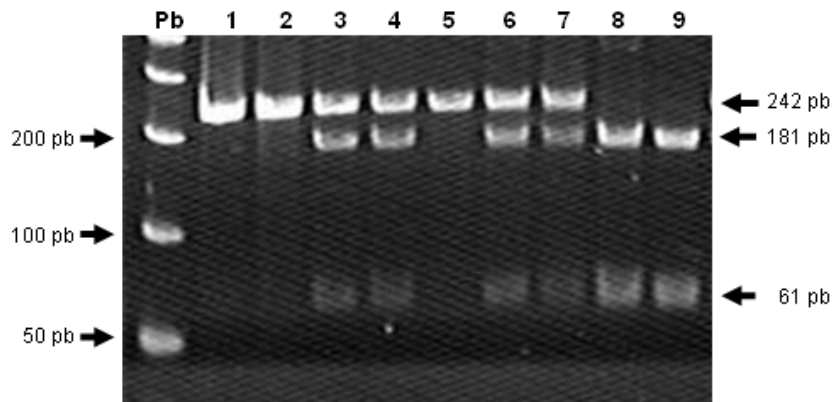


Figura 8. Análisis electroforético en gel de poliacrilamida de los productos de la restricción enzimática con *CfoI*. Carril 1, fragmento de PCR sin digerir (control); carril 2 y 5, muestras de sujetos homocigotos AA; carriles 3, 4, 6 y 7 muestras de sujetos heterocigotos GA; carril 8 y 9, muestra de un sujeto homocigoto GG.

El análisis de todas las muestras nos permitió concluir que los genotipos predominantes en la población de estudio fueron el genotipo heterocigoto GA y homocigoto GG, con 66 y 66 individuos, respectivamente. Mientras que solamente 28 individuos fueron identificados como homocigotos AA (**Figura 9A**).

Cuando se analizaron las frecuencias alélicas, observamos que el alelo que predomina en la población en general, sin importar el sexo o el fenotipo, es el alelo G en un 62 %, mientras que el alelo A representa solamente el 38 % (**Figura 9B**).

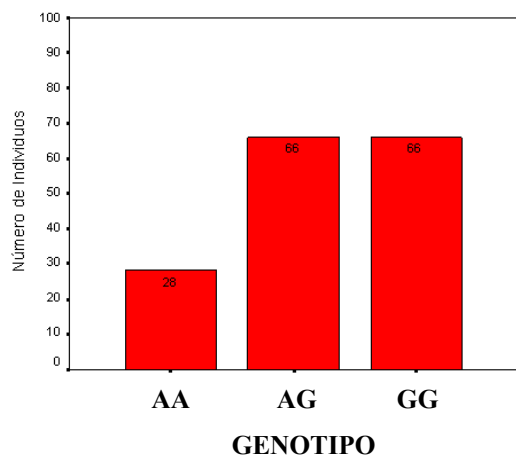
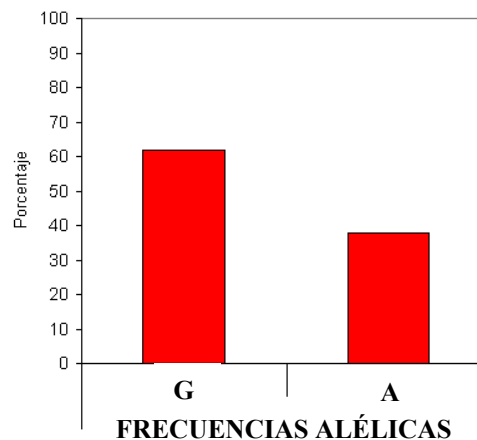
A**B**

Figura 9. Frecuencias genotípicas (A) y alélicas (B) de la población de estudio en general (mujeres y hombres).

Análisis de la asociación del polimorfismo -2548G/A en el promotor del gen de la leptina, con el fenotipo.

Al realizar el análisis de las variables polimórficas de acuerdo al fenotipo (obesidad/sobrepeso y peso normal) y género, encontramos que el genotipo GA estuvo presente en mayor proporción con respecto a los genotipos AA y GG en mujeres obesas y con sobrepeso (46% vs 19 y 35% respectivamente), mientras que en mujeres delgadas, el genotipo predominante fue GG con respecto a GA y AA (51% vs 31 y 17% respectivamente) (**tabla 3**).

En el caso de los hombres obesos y con sobrepeso, el genotipo predominante fue GG (45%) con respecto a GA (36%) y AA (17%). En los hombres delgados los genotipos GG y GA fueron los únicos genotipos encontrados, en las mismas proporciones (50% y 50% respectivamente) ninguno presentó el genotipo AA. Este

resultado podría atribuirse al pequeño número de hombres de la población de estudio (tabla 3).

Tabla 3. Distribución de las variantes genotípicas del polimorfismo G-2548A del promotor del gen de la leptina.

	Mujeres Obesas y con Sobrepeso (84)	Mujeres Delgadas (35)	Hombres Obesos y con Sobrepeso (33)	Hombres Delgados (8)
Genotipo GG	29 (35 %)	18 (51 %)	15 (45%)	4 (50%)
Genotipo GA	39 (46 %)	11 (31 %)	12 (36%)	4 (50%)
Genotipo AA	16 (19 %)	6 (17 %)	6 (18%)	0 (0%)

Número de individuos en parentesis. Los datos, son presentados como frecuencias y en parentesis los porcentajes.

Asimismo, al analizar las frecuencias alélicas de acuerdo al fenotipo (obesidad/sobrepeso y peso normal) y genero, observamos que el alelo G predomina en los sujetos obesos y con sobrepeso, tanto en mujeres como en hombres. Todos los hombres delgados que presentan el alelo A (25%) son heterocigotos GA (tabla 3) y ninguno presentó el genotipo AA (tabla 4).

Tabla 4. Datos de las frecuencias alélicas del polimorfismo G-2548A del promotor del gen de la leptina.

	Mujeres Obesas y con Sobrepeso (84)	Mujeres Delgadas (35)	Hombres Obesos y con Sobrepeso (33)	Hombres Delgados (8)
Alelo G	58%	68%	64%	75%
Alelo A	42%	32%	36%	25%

Número de individuos en parentesis. Los datos, son presentados como porcentajes.

Nuestros resultados sugieren que existe ciertas predominancias genotípicas y alélicas en la población general. Sin embargo, en el análisis estadístico con la prueba del X^2 , asociando los genotipos en un modelo dominante (GG/GA vs AA), recesivo (AA/AG vs GG) o de forma codominante (GG, AG y GG por separado), no encontramos asociación significativa ($p < 0.05$). Por lo tanto, no hay asociación de los

genotipos predominantes GG y GA con algún fenotipo en la población general. El análisis estadístico tampoco indicó una asociación entre el alelo predominante G y algún fenotipo en la población general (**tabla 5**).

Tabla 5. Prueba de X^2 de las frecuencias genotípicas y alelicas en población total (mujeres y hombres).

Genotipos		Mujeres obesas y con sobrepeso (84)	Mujeres delgadas (35)	X^2 / p	Hombres obesos y con sobrepeso (33)	Hombres delgados (8)	X^2 / p
Modelo dominante	GG/GA	68	29	0.06 / 0.807	27	8	1.703 / 0.199
	AA	16	6		6	0	
Modelo recesivo	GA/AA	55	17	2.954 / 0.086	18	4	0.0535 / 0.817
	GG	29	18		15	4	
Modelo Co-dominante	GG	29	18	3.159 / 0.206	15	4	1.79 / 0.409
	GA	39	11		12	4	
	AA	16	6		6	0	
Alelos	A	42%	32%	2.145 / 0.143	36%	25%	2.854 / 0.091
	G	58%	68%		64%	75%	

Debido a que el análisis de la población general no indicó asociación genotipo-fenotipo, y que la población de hombres era muy pequeña con respecto a la población de mujeres, decidimos enfocar nuestros análisis al grupo de mujeres obesas (57 individuos) y con peso normal (32 individuos), es decir excluyendo a las mujeres con sobrepeso y a todos los hombres. Eso con la finalidad de tener un grupo control y un grupo problema más homogéneo.

En esta subpoblación, observamos que los genotipos GG y GA predominan con respecto al genotipo AA, al igual que en la población total (**Figura 10A**). Asimismo, podemos ver que el alelo G (59 %) está más representado que el alelo A (41 %) (**Figura 10B**).

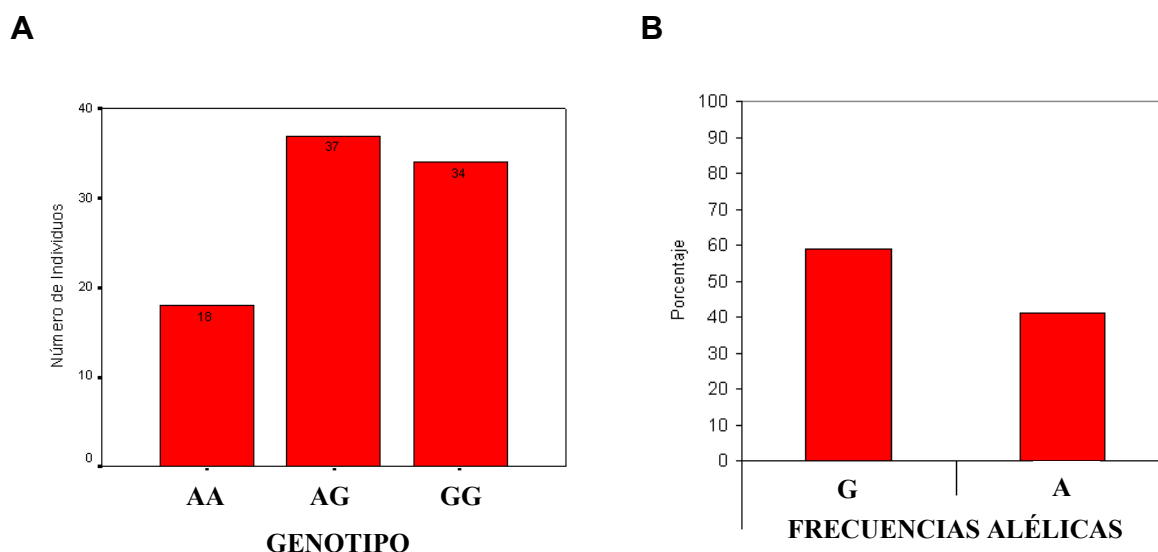


Figura 10. Frecuencias genotípicas (A) y alélicas (B) de la subpoblación de estudio (mujeres obesas y delgadas).

Sin embargo, cuando realizamos el análisis estadístico con la prueba de X^2 , no se encontró asociación entre el polimorfismo y el fenotipo en esta subpoblación de mujeres obesas y delgadas, al igual que en la población general. Sin embargo, el

análisis de las frecuencias alélicas nos arrojó un valor de p igual a 0.059, lo que sugiere que podría existir una asociación entre el alelo G y la obesidad en esta subpoblación (**tabla 6**).

Tabla 6. Prueba de χ^2 de las frecuencias genotípicas y alélicas observadas en la subpoblación de mujeres obesas y delgadas.

Genotipos		Mujeres obesas	Mujeres delgadas	χ^2 / p
Modelo dominante	GG/GA	45	26	0.067 / 0.795
	AA	12	6	
Modelo recesivo	GA/AA	39	16	2.954 / 0.086
	GG	18	16	
Modelo Co-dominante	GG	18	16	3.154 / 0.206
	GA	27	10	
	AA	12	6	
Alelos	A	45%	32%	3.568 / 0.059
	G	55%	68%	

Análisis de la asociación de los niveles de leptina con el fenotipo y el polimorfismo -2548G/A en el promotor del gen de leptina.

Debido a que no habíamos podido evidenciar ninguna asociación alélica o genotípica con el fenotipo de obesidad en la población general, y que nuestros resultados nos habían sugerido una posible asociación entre el alelo G y el peso corporal en el grupo de mujeres obesas y delgadas, decidimos restringir el estudio de los niveles de leptina en suero a esta subpoblación conformada por 57 mujeres obesas y 32 mujeres delgadas. Los niveles de leptina en mujeres obesas (47.1 ± 18.9) fueron mayores que en las delgadas (14.87 ± 4.82) (**Figura 11**).

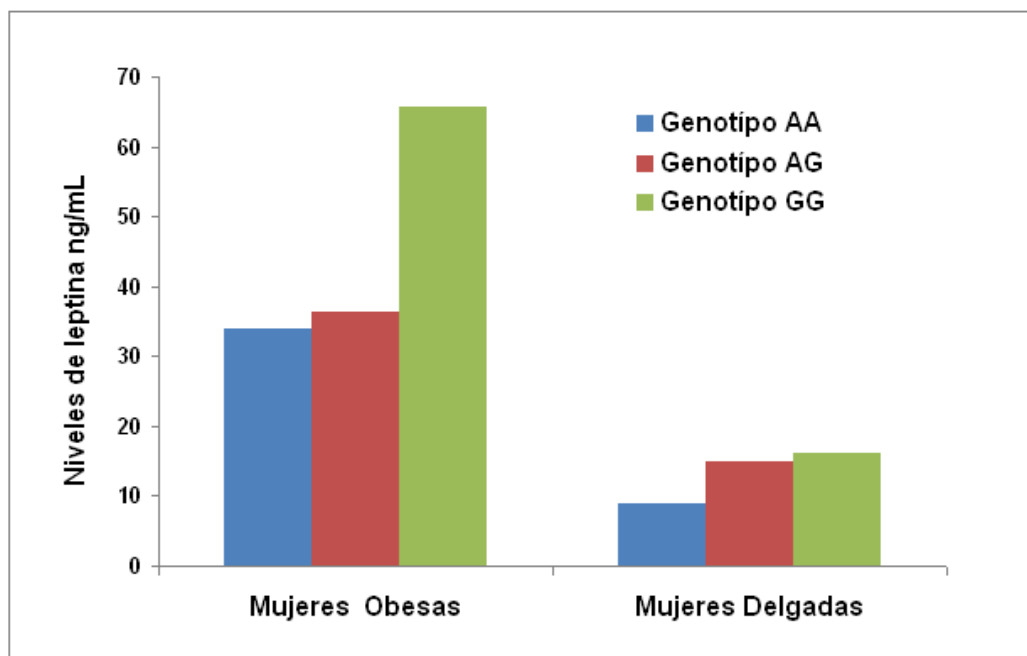


Figura 11. Niveles de leptina en mujeres delgadas y obesas con respecto a la variante polimórfica presente en la posición -2448 del promotor del gen de la leptina.

En particular, las mujeres obesas que tienen el genotipo GG presentaron niveles más altos de leptina (65.6 ± 14.49 ng/mL) en comparación con los otros dos genotipos (GA: 36.4 ± 11.8 ng/mL; AA: 33.8 ± 4.85 ng/mL) (**tabla 7**). Estos resultados sugieren que los niveles de leptina tienden a variar dependiendo del genotipo y del fenotipo, y que el alelo G podría estar asociado a altos niveles de leptina en mujeres obesas. Cabe aclarar que se eliminaron cuatro pacientes de cada grupo debido a que presentaban niveles de leptina muy altos en comparación con el promedio del grupo.

Tabla 7. Niveles de leptina en la subpoblación de mujeres obesas y delgadas.

	Mujeres Obesas (47)	Mujeres Delgadas (27)
Genotipo GG	65,6 ± 14,49	16,2 ± 4,82
Genotipo GA	36,4 ± 11,8	14,86 ± 4,34
Genotipo AA	33,8 ± 4,85	8,97 ± 1,31

Número de individuos en parentesis. Los datos, son presentados como porcentajes.

Con la finalidad de comprobar la posible asociación entre los niveles de leptina y alguna variante genotípica, sin importar el fenotipo, los datos fueron sometidos a una prueba de ANOVA (**tabla 8**). Obtuvimos un valor de p igual a 0.051 al comparar los niveles de leptina en las mujeres con los genotipos AG y GG, lo que indica que los altos niveles de leptina están asociados al alelo G en la subpoblación de mujeres.

Tabla 8. Análisis comparativo entre las medias de los niveles de leptina en las mujeres obesas y delgadas con los diferentes genotipos en la posición -2548 en el promotor del gen de la leptina, mediante la prueba estadística ANOVA.

		Valor de p
Genotipo AA	AG	0.107
	GG	0.963
Genotipo AG	AA	0.107
	GG	0.051
Genotipo GG	AA	0.963
	AG	0.051

Finalmente, realizamos un análisis de regresión logística binario con la finalidad de calcular el factor de riesgo de presentar obesidad debido a la presencia de los diferentes genotipos en esta subpoblación de mujeres. El valor del “odds ratio”

muestra que el riesgo de ser obeso es 3.7 veces mayor al presentar el genotipo GG, con respecto a no presentarlo, con un valor de $p < 0.001$. El valor del factor de riesgo para los otros dos genotipos no fue significativo (**tabla 9**).

Tabla 9. Factores de riesgo de presentar obesidad en relación al genotipo en la posición -2548 en el promotor del gen de leptina en mujeres.

	P	Odds Ratio	R ²
Genotipo GG	< 0.001	3.7	0.027
Genotipo GA	0.192	0.679	0.13
Genotipo AA	0.112	1.611	0.61

13. **Discusión**

La obesidad es un problema de salud que afecta al 30 % de la población mexicana, el desarrollo de enfermedades degenerativas como son las enfermedades cardiovasculares, la diabetes y el cáncer, que representan las principales causas de muerte en la población mexicana adulta. Razón por la cual es urgente aplicar estrategias y programas dirigidos a su prevención, detección temprana, tratamiento y control para disminuir los riesgos asociados a este padecimiento.

La obesidad resulta de un desbalance entre el consumo y gasto energético, el cual es regulado por una red compleja de sistemas fisiológicos y nerviosos. La leptina es una de la piezas clave de la regulación de la homeostasis energética a través de la vía hipotalámica de señales leptina-melanocortina. En particular, varios estudios realizados en distintas poblaciones han sugerido que el polimorfismo -2548G/A en el promotor del gen de la leptina podría estar asociado a cambios en los niveles de esta adipocina en suero y, por lo tanto, al desarrollo de la obesidad. Por lo que en el presente trabajo nos propusimos evaluar la asociación de este polimorfismo, con los niveles de leptina y la obesidad en la población mexicana.

En colaboración con la Clínica de Acupuntura de la ENMyH, reclutamos 160 pacientes mexicanos, de los cuales 119 fueron mujeres y 41 hombres obesos, con una edad promedio de 37.1 ± 13.8 años y 35.7 ± 14 años, respectivamente. La mayoría de los pacientes era originaria del Distrito Federal. Los pacientes fueron agrupados de acuerdo a su IMC, para formar tres grupos; un grupo de individuos obesos, un grupo de individuos con sobrepeso y un grupo de individuos delgados.

Al analizar la presencia del polimorfismo G-2548A en el promotor del gen de la leptina, observamos que los genotipos AG y GG predominan en la población de estudio, tanto en hombres como en mujeres, por lo que el alelo G parece ser el alelo más común en la población mexicana, independientemente del peso corporal de los

individuos. Sin embargo, los análisis estadísticos no permitieron confirmar ninguna asociación con la obesidad en la población en general.

Nuestros datos también sugieren que los mismos genotipos AG y GG, así como el alelo G prevalecen en los individuos obesos y con sobrepeso, de ambos sexos. De manera interesante, los análisis de las frecuencias alélicas sugieren que podría existir una asociación entre el alelo G y la obesidad en la subpoblación de mujeres mexicanas. Este dato concuerda con el estudio de Mammès *et al.* (2000), quien reportó que el alelo G es más frecuente en los individuos franceses caucásicos con obesidad moderada. Por lo que es necesario ampliar el tamaño de la población que analizamos, para confirmar si el alelo G en la posición -2548 en el promotor del gen de la leptina está asociado a la obesidad en la población mexicana.

Por otra parte, determinamos que la subpoblación de mujeres mexicanas obesas presentan niveles altos de leptina, lo cual no es consistente con el papel anorexígeno de esta adipocina. Nuestros resultados concuerdan con datos previamente reportados en otras poblaciones, en donde se sugiere que los pacientes obesos presentan una “resistencia a la leptina” debido a alteraciones en su mecanismo de transporte hacia el núcleo arcuato o bien en la vía de señalización que depende de la interacción de la leptina con su receptor (Houseknecht *et al.*, 1996; Banks *et al.*, 1996; Caro *et al.*, 1996 y Schwartz *et al.*, 1996; Spiegelman y Flier 1996).

Finalmente, nuestros resultados sugieren que el alelo G en la posición -2548 en el promotor del gen de la leptina está asociado a altos niveles de leptina en la subpoblación de mujeres mexicanas obesas. Mammès *et al.* (2000) y Li *et al.* (1999), también encontraron que los genotipos GA y GG estaban asociados a altos niveles de leptina en suero, mientras que Mammès *et al.* (1998 y 2000) reportaron que los sujetos que presentaban el polimorfismo AA presentaban altos niveles de leptina. Estas discrepancias sugieren que podría haber diferencias de acuerdo a la población que se analiza, es decir que existe una asociación entre el polimorfismo G-2548A en

el promotor del gen de la leptina, los niveles de leptina en suero y la obesidad en ciertas poblaciones, pero no en otras. También podrían deberse a diferencias en los criterios de selección de los pacientes, tales como edad, porcentaje de grasa corporal, entre otros, además del tamaño de la muestra manejado en cada estudio. Nosotros analizamos una subpoblación (mujeres obesas y delgadas) de 89 sujetos, mientras que Mammès et al. analizaron 117 sujetos en el año 1998 y 423 sujetos en el año 2000, encontrando en ambos estudios una asociación entre el genotipo AA y altos niveles de leptina.

14. Conclusiones

Se generó un banco de DNA de 160 pacientes mexicanos, 119 mujeres y 41 hombres, agrupados de acuerdo a su IMC en un grupo de individuos obesos, con sobre peso y peso normal.

El análisis del polimorfismo G-2548A en el promotor del gen de la leptina mostró que predominaron los genotipos GG y GA, y por lo tanto el alelo G, en la población total, sin embargo no hubo asociación con la obesidad.

En la subpoblación de mujeres obesas y delgadas, también predominaron los genotipos GG y GA, y por lo tanto el alelo G.

Los análisis estadísticos sugieren que existe una asociación entre el alelo G, los niveles altos de leptina y la obesidad en esta subpoblación.

El riesgo de ser obeso es 3.7 veces mayor al presentar el genotipo GG en esta subpoblación.

15. **Perspectivas**

- Ampliar el tamaño de la población de estudio y procurar tener el mismo número de individuos en cada grupo (obesidad y peso normal)
- Limitar el estudio a una subpoblación, ya sea de mujeres ú hombres, para eliminar la variable del genero.
- Ajustar el intervalo de edad afin de que la población sea lo más posible homogénea.
- Medir los niveles de ARNm del gen de la leptina, con el fin de comprobar si las variantes polimórficas tienen efecto sobre la tasa trancripcional del gen.

16. Bibliografía

1. Banks WA, Kastin AJ, Huang W, Jaspan JB and Maness LM. Leptin enters the brain by saturable system independent of insulin. *Peptides*. 1996, 17: 305-311.
2. Barsh GS, Farooqi IS, O'Rahilly S. Genetics of bodyweight regulation. *Nature*. 2000, 404: 644–651.
3. Barsh, G. S. & Schwartz, M. W. Genetic approaches to studying energy balance: perception and integration. *Nature Rev. Genet.* 2002, 3: 589–600 (2002).
4. Bjorbaek C, Uotani S, da Silva B, Flier JS. Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. *J. Biol. Chem.* 1997, 272: 32686–95.
5. Bouchard C, Loos RJF. Obesity -is it a genetic disorder? *J Intern Med.* 2003, 254: 401-25.
6. Boulomieu Á, Drexler HC, Lafontan M and Busse R. Leptin, the product of Ob gene promotes angiogenesis. *Circ Res.* 1998, 83: 1059-1066.
7. Burman P, Ritzén EM, Lindgren AC. Endocrine dysfunction in Prader-Willi syndrome: á review with special reference to GH. *Endocr Rev.* 2001, 22 (6): 787-99.
8. Calle, E. E., Rodriguez, C., Walker-Thurmond, K. & Thun, M. J. Overweight, obesity, and mortality from cancer in á prospectively studied cohort of U.S. adults. *N. Engl. J. Med.* 2003, 348: 1625–1638.
9. Caro JF, Kolaczynski W, Nyce MR, Ohannesian JP, Opentanova Í, Goldman WH, Lynn RB, Zhang PL, Sinha MK and Considine RV. Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: á possible mechanism for leptin resistance. *Lancet.* 1996, 348: 159-161.
10. Chua SC, Chung WK, Wu-Peng XS. Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor. *Science.* 1996, 271: 994–96.
11. Friedman JM and Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature.* 1998, 395: 763-770.
12. Clement K, Garner C, Hager J, et al. Indication for linkage of the human OB gene region with extreme obesity. *Diabetes.* 1996, 45: 687–90.

13. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 1996, 334: 292-295.
14. Da-Wei Gong, Sheng Bi, Richard E. Pratley, and Bruce D. Weintraub, Genomic Structure and Promoter Analysis of the Human obese Gene, *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271, (No. 8, Issue) 3971–3974.
15. Ghilardi N, Ziegler S, Wiestner A, Stoffel R, Heim MH, Skoda RC. Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1996, 93: 6231–35.
16. Gong DW, Bi S, Pratley RE, Weintraub BD. Genomic structure and promoter analysis of the human obese gene. *J. Biol. Chem.* 1996, 271: 3971–74.
17. He Y, Chen H, Quon MJ, Reitman M. The mouse obese gene. Genomic organization, promoter activity, and activation by CCAAT/enhancer-binding protein a. *J Biol Chem.* 1995, 270: 28887–91.
18. Hill, J. O. & Peters, J. C. Environmental contributions to the obesity epidemic. *Science.* 1998, 280: 1371–1374.
19. Hwang CS, Mandrup S, MacDougald OA, Geiman DE, Lane MD. 1996. Transcriptional activation of the mouse obese (Ob) gene by CCAAT/enhancer binding protein a. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1996, 93: 873–77.
20. Katsanis N, Lupski JR, Beales PL. Exploring the molecular basis of Bardet-Biedl syndrome. *Hum Mol Genet.* 2001, 10 (20): 2293-9.
21. Kim JB, Sarraf P, Wright M, Yao KM, Mueller E, Solanes G, et al. Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1. *J Clin Invest.* 1998, 101: 1-9.
22. Li WD, Reed DR, Lee JH, et al. Sequence variants in the 5' flanking region of the leptin gene are associated with obesity in women. *Ann Hum Genet.* 1999, 63: 227-234.
23. Loos RJF & Bouchard C. Obesity – is it a genetic disorder?. *Journal of Internal Medicine.* 2003, 254: 401–425.
24. Luis A. Moreno Aznar y José E. Olivera, *Obesidad, Nutrición.*

25. Madej T, Boguski MS, Bryant SH. Threading analysis suggests that the obese gene product may be a helical cytokine. *FEBS Lett.* 1995, 373: 13–8.
26. Maes HH, Neale MC, Eaves LJ. Genetic and environmental factors in relative body weight and human adiposity. *Behav Genet.* 1997, 27: 325-51.
27. Mason MM, He Y, Chen H, Quon MJ, Reitman M. Regulation of leptin promoter function by Sp1, C/EBP, and a novel factor. *Endocrinology.* 1998, 139: 1013-22.
28. Miller SG, De Vos P, Guerre-Millo M, Wong K, Hermann T, et al.. The adipocyte specific transcription factor C/EBP α modulates human ob gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1996, 93: 5507–11.
29. Mammès O, Betoulle D, Aubert R, Giraud V, Tuzet S, Petiet A, Colas-Linhart A, and Fumeron F, Novel Polymorphisms in the 5'Region of the L E P Gene: Association With Leptin Levels and Response to Low-Calorie Diet in Human Obesity. *Diabetes.* 1998, Vol. 47, March.
30. Mammès O, Betoulle D, Aubert R, Herbert B, Siest G, Fumeron F. Association of the G-2548A polymorphism in the 5' region of the LEP gene with overweight. *Ann Hum Genet.* 2000, 64: 391-394.
31. Must, A. et al. The disease burden associated with overweight and obesity. *JAMA,* 1999, 282: 1523–1529.
32. Norman RA, Leibel RL, Chung WK, et al. Absence of linkage of obesity and energy metabolism to markers flanking homologues of rodent obesity genes in Pima Indians. *Diabetes.* 1996, 45: 1229 –32.
33. Ogawa Y, Masuzaki H, Isse N et al. Molecular cloning of rat obese cDNA and augmented gene expression in genetically obese Zucker fatty rats. *J Clin Invest* 1995, 96: 1647-52.
34. Ogden CL, Carroli MD, Curtin LR, McDowell MA, Tabak CJ, Flegal KM. Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999-2004. *JAMA.* 2006, 295: 1549-55.
35. Reed DR, Ding Y, Xu W, et al. Extreme obesity may be linked to markers flanking the human OB gene. *Diabetes.* 1996, 45: 691– 4.

36. Rock FL, Altmann SW, Van Heek M, Kastelein RA and Bazan JF. The leptin hematopoietic cytokine fold is stabilized by an intrachain disulfide bond. *Horm Metabol.* 1996, 28: 649-652.
37. Schwartz MW, Peskind WE, Raskind M, Boyko EJ and Porte D. Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans. *Nat. Med.* 1996, 2: 589-593.
38. Tsuchiya T, Shimizu H, Horie T, Mori M. Expression of leptin receptor in lung: leptin as a growth factor. *Eur J Pharmacol.* 1999, 365: 273-9.
39. Sánchez-Castillo CP, Pichardo-Ontiveros E, López RP. Epidemiología de la obesidad, *Gac Méd Méx.* 2004, Vol.140, Suplemento No. 2.
40. Sánchez-Castillo CP, Velázquez-Monroy O, Berber A, Lara-Esqueda A, Tapia-Conyer R, James WPT, and the Encuesta Nacional de Salud (ENSA) 2000 Working Group. Anthropometric cutoff points for predicting chronic diseases in the Mexican National Survey 2000. *Obes Res* 2003, 11: 442-51.
41. Sierra-Honigmann MR, Nath AK, Murakami C, et al. Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science.* 1998, 281: 1583-6.
42. Spiegelman, B. M. & Flier, J. S. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell.* 2001, 104: 531-543.
43. Isse N, Ogawa Y, Tamura N, Masuzaki H, Mori K, et al. Structural organization and chromosomal assignment of the human obese gene. *J. Biol. Chem.* 1995, 270: 27728-33.
44. Tartaglia LA. The leptin receptor. *J. Biol. Chem.* 1997, 272: 6093-96.
45. Vaisse C, Halaas JL, Horvarth CM, Darnell JE Jr, Stoffel M, Friedman JM. Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild type and ob/ob mice but not db/db mice. *Nat. Genet.* 1996, 14: 95-97.
46. Wattendorf DJ and Muenke M. Prader-Willi syndrome. *Am Fam Physician.* 2005, 72 (5): 827-30.
47. www.who.int/classifications
48. World Health Organization. Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic (World Health Organization, Geneva, 1998).

49. Xu, B. et al. Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nature Neurosci.* 2003, 6: 736–742.
50. Zhang F, Margret B. Basinski, Jonh M. Beals, Stephen L. Briggs, Lisa M. Churgay, David K. Clawson, Richard D. DiMarchi, Thomas C. Furman, John E. Hale, Hansen M. Hsuing, Brigitte E. Schoner, Dennis P. Smith, Xing Y. Zhang, Jean-Pierre Wery & Richard W. Schevitz. Crystal Structure of the obese Protein Leptin-E100. *Nature*, Volume 387, 8 May 1997.
51. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 1994, 372: 425–32.
52. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 1994, 372: 425-432.

17. Anexos

ANEXO 1

CONSENTIMIENTO INFORMADO

"Evaluación de la participación de la leptina y su receptor en el desarrollo de la obesidad en la población del Distrito Federal: Niveles de expresión, polimorfismos, interacciones y estabilidad."

Esta carta tiene cómo objetivo obtener su aprobación para participar en un estudio de investigación en curso. Antes de decidir participar, es importante que comprenda el motivo por el que se lleva a cabo la investigación, el modo en que se utilizará su información, lo que involucrará el estudio y los posibles beneficios, riesgos y molestias. Por favor, tómese su tiempo para leer la siguiente información cuidadosamente.

Objetivo del estudio:

En este estudio estamos tratando de determinar que síntomas, problemas de salud y variantes genéticas se pueden asociar con la obesidad, en usuarios de las Clínicas de la ENMH-IPN. Por tal motivo y dado que usted presenta obesidad se le invita a participar en este estudio de investigación

Procedimiento:

Su participación consistirá en que nos proporcione información sobre su salud física. La entrevista para tal propósito la realizará un médico y/o especialista en nutrición. Las preguntas tratarán sobre temas relacionados con su salud y la de su familia, también mediremos su peso, su porcentaje de grasa y el diámetro de su cintura. Además le pediremos que nos permita obtener una muestra de su sangre (5 ml, alrededor de 1 cucharita de azúcar), para aislar su ADN. El ADN se encuentra en cada célula de su cuerpo y contiene información que usted heredó de sus padres. Nosotros usaremos el ADN para estudiar un gen llamado Leptina (LEP) e intentar saber si se relaciona con la obesidad.

Riesgos:

El personal encargado de la toma de muestra sanguínea esta capacitado y se empleará siempre material nuevo y estéril. Los riesgos asociados con participar en este estudio, pudieran incluir malestar por tener que contestar preguntas sobre salud física. Usted puede saltarse cualquier pregunta que no quiera contestar o le incomode hacerlo. La extracción de sangre puede causar molestias menores como un leve dolor por el piquete, leve inflamación, ocasionalmente hematoma (moretón); todos estos problemas son transitorios y generalmente se resuelven sin afectar su salud en general. En caso de que se presenten otro tipo de problemas por efecto de la venopunción, los investigadores serán los encargados de su canalización para darle atención médica apropiada.

Beneficios:

Usted no recibirá ningún beneficio directo por la donación de la muestra de su sangre o por participar en este estudio El estudio nos ayudará a aprender más sobre los problemas de salud que tienen las personas con obesidad y emplear este conocimiento en beneficio del tratamiento y diagnóstico de este tipo de problemas en el futuro.

Confidencialidad:

Sus respuestas serán tratadas como confidenciales. Tendremos el cuidado de reemplazar su nombre con un número de estudio para que nadie, excepto los investigadores responsables, pueda identificar sus respuestas o información genética. Usted tampoco podrá ser identificado en las publicaciones científicas que se deriven del estudio.

Consentimiento para guardar la muestra de ADN:

Uno de nuestros propósitos científicos es el de guardar su ADN para poder realizar estudios futuros sobre la composición genética que se relaciona con la obesidad. Si usted así lo consiente, firmando al final de ésta carta; su material genético será guardado indefinidamente en el laboratorio de la unidad de investigación. El análisis de este material permitirá realizar estudios que se relacionen con la identificación de factores de riesgo para la obesidad en personas con condiciones de vida similares. No habría ninguna compensación adicional por su participación en esta parte del estudio. El resguardo de su muestra de ADN estará a cargo de la Dra. Claudia Guadalupe Benítez Cardoza, quien dirige el laboratorio de Bioquímica de la Sección de Estudio de Posgrado e Investigación de la ENMH-IPN. Su muestra será guardada de manera confidencial, pudiendo ser identificada únicamente a través de una clave que será asignada por los investigadores y a la cual sólo ellos tendrán acceso. Por otra parte en caso de que usted lo solicite de forma expresa, la destrucción de su muestra se manejará como habitualmente se hace en caso de residuos biológicos.

_____ Doy permiso para que se almacene la muestra de ADN tomada de mi sangre, para estudios futuros.

_____ No permito el almacenamiento de la muestra de ADN tomada de mi sangre. Ordeno que se destruya la muestra al concluir el estudio.

Reitero:

Su participación en esta investigación es completamente voluntaria. Usted puede negarse a contestar cualquier pregunta o completar cualquier prueba. Usted puede solicitar información relacionada con su participación en el estudio en el momento en que lo desee, no importando que esto pudiera implicar su retiro del mismo. Así como también, usted puede suspender su participación cuando lo desee. Es importante recalcar que la negativa para participar no involucrará ninguna pérdida de beneficios en su atención dentro de las Clínicas de la ENMH-IPN.

He leído la carta informativa referente al estudio titulado "Evaluación de la participación de la leptina y su receptor en el desarrollo de la obesidad en la población del Distrito Federal: Niveles de expresión, polimorfismos, interacciones y estabilidad", el entrevistador ha aclarado a mi entera satisfacción todas las preguntas en torno a mi participación en este estudio y en caso necesario podré contactar a la Dr. Absalom Zamorano Carrillo, en el laboratorio de Bioquímica, al teléfono 57296000, ext. 55542 y 55562.

Asimismo, queda establecido que en cualquier momento puedo dejar de colaborar en la investigación, sin que esta decisión repercuta en ningún sentido en mi atención médica, continuando con mi tratamiento con el médico tratante que se me ha asignado en la clínica.

En consecuencia entiendo perfectamente lo que significa intervenir en la presente investigación y estoy de acuerdo en colaborar como sujeto de estudio en la misma.

Nombre del participante _____
Firma _____

Testigo _____
Firma _____

Investigador _____
Firma _____

Fecha _____

ANEXO 2

CUESTIONARIO

Datos del paciente. No de ID _____ Fecha ___/___/2008

Nombre completo: _____

Nombre(s) Apellido Paterno Apellido Materno

Dirección: _____ Tel. _____

Edad: _____ Sexo: (M) (F) Estado Civil (C) (S) L.N. _____

Escolaridad _____ Ocupación: _____ Religión: _____ Ingreso fam.: \$ _____

Antecedentes Heredofamiliares.

Obesidad: si no Diabetes: si no HAS: si no

Dislipidemia: si no IAM: si no I. C.: si no

Cáncer: si no

Antecedentes Personales No Patológicos.

Dieta: energética () plástica () reguladora ()

Actividad física: deportiva () recreativa () ninguna ()

Actividad física por mes: _____

Peso mínimo: _____ Kg. Peso máximo: _____ Kg.

Embarazos: Si () No () numero: _____ G () P () A ()

Transfusiones: Si () No () Año _____

Vacunas: total () parcial () ninguna ()

Tabaquismo: Si () No () Cigarros por día: _____ Edad de inicio: _____

Alcoholismo: Si () No () Copa por mes: _____

Drogas: Si () No ()

Alergias: Si () No () sustancia: _____

Antecedentes Personales Patológicos.

Enfermedades Endocrinas: Si () No () Cual? _____

Enfermedades Inmunológicas: Si () No () Cual? _____

Enfermedades Infecciosas: Si () No () Cual? _____

Enfermedades Cardiovasculares: Si () No () Cual? _____

Enfermedades Pulmonares: Si () No () Cual? _____

Enfermedades Osteomuscular: Si () No () Cual? _____

Enfermedades Neoplásicas: Si () No () Cual? _____

Enfermedades Psiquiátricas: Si () No () Cual? _____

Exploración Física y Somatometría.

Talla: _____ cms. Peso: _____ Kgs. Índice de Masa Corporal: _____

Perímetro abdominal: _____ cms. Proporción cintura-cadera: _____

Porcentaje de grasa corporal: _____ % Tensión Arterial: _____ / _____ mmHg

Pulso: _____ por minuto. Respiraciones: _____ por minuto.

Glucemia en ayunas: _____ Glucemia postprandial: _____ Leptina: _____

Colesterol: _____ Triglicéridos: _____ LDL: _____ HDL: _____

Urea: _____ Creatinina: _____ Albúmina: _____ A/G: _____

Consentimiento: Si No Grupo: Normal Sobrepeso Obesidad

Nombre y firma del médico que recopiló los datos: _____

ANEXO 3

Procedimiento para extracción de DNA en 300 μ l de sangre utilizando el kit FlexiGene DNA (250)

1. Pipetear 750 μ l Buffer FG1 dentro de un tubo eppendorf de 1.5 ml. Agregar 300 μ l de sangre fresco y mezclar por inversión 5 veces.
2. Centrifugar por 5 minutos a 10,000 x g.
3. Desechar el sobrenadante y dejar el tubo invertido sobre papel secante por 2 minutos, teniendo cuidado de que la pastilla permanezca en el tubo.

Nota: En raros casos la pastilla se puede perder o no ser visible por la poca cantidad de células. La Inversión del tubo sobre papel secante minimiza el reflujo del sobrenadante del anillo y las paredes del tubo hacia el fondo y a la pastilla.

4. Agregar 150 μ l del Buffer FG2/QIAGEN proteasa (ver cuadro de preparación de proteasa), cerrar el tubo y vortexear inmediatamente hasta que la pastilla se halla homogeneizado completamente.

Volumen of Buffer FG2 (μ l)	150 μ l
Volumen de proteasa QIAGEN (μ l)	1.5 μ l

Nota: Cuando se procesan múltiples muestras, vortexear inmediatamente cada tubo después de agregar la proteasa. No esperar hasta que el buffer haya sido agregado a todas las muestras.

Usualmente 3–4 pulsos a alta velocidad de vortexeo de 5 segundos son suficientes para homogeneizar la pastilla. Sin embargo trazas de la pastilla con consistencia gelatinosa pueden permanecer, si este es el caso adicionar 300 μ l de Buffer FG2 y vortexear otra vez.

5. Centrifugar el tubo ligeramente (3-5 segundos), introducir en baño maría en incubador a 65°C por 10 min.

Nota: La muestra cambia de color rojo a verde olivo, esto indica que la digestión proteica se llevo a cabo.

6. Agregar 150 µl de isopropanol (100%) and mezclar suavemente por inversión hasta que el ADN precipite, lo cual se denotara por la precipitación de las hebras del ADN.

Nota: La completar la mezcla con isopropanol es vital para precipitar el ADN y debe ser checado por inspección visual. Para muestras con muy poca cantidad de de células sanguíneas blancas en las cuales el ADN no es visible, invertir el tubo por al menos 20 veces.

7. Centrifugar por 3 min a 10,000 x g.

Nota: Si la pastilla resultante se pierde o no es visible, el tiempo de centrifugación se debe de aumentar hasta que sea visible.

8. Desechar el sobrenadante en invertir el tubo sobre papel secante teniendo cuidado de que la pastilla permanezca dentro del tubo.

Nota: En raros casos la pastilla se puede perder o ser ligeramente pobre.

Si el conteo de células blancas de la muestra no fue suficientemente alto la pastilla de ADN será muy pequeña.

9. Agregar 150 µl 70% etanol y vortexear por 5 segundos.

10. Centrifugar por 3 minutos a 10,000 x g.

Nota: Si la pastilla resultante no es visible, el tiempo de centrifugación se debe de prolongar.

11. Desechar el sobrenadante y dejar el tubo invertido sobre papel secante por al menos 5 minutos teniendo cuidado de que la pastilla permanezca en el fondo del tubo.

Nota: En raros casos la pastilla se puede perder o no ser visible por la poca cantidad de células. La Inversión del tubo sobre papel secante minimiza el reflujo del etanol del anillo y las paredes del tubo hacia el fondo y a la pastilla.

12. Dejar secar la pastilla del ADN hasta que el líquido se halla evaporado (al menos 5 minutos).

Nota: Si se accede el tiempo de secado de la pastilla de ADN puede ser muy difícil su posterior dilución.

13. Agregar 200 µl Buffer FG3, vortexear por al menos 5 segundos a baja velocidad y disolver el ADN por incubación a 65°C por 10 minutos a baño maría.

Nota: Si el ADN no se disuelve completamente, incubar la solución toda la noche a temperatura ambiente. Si un volumen de Buffer FG3 es usado, el tiempo incubación puede ser mayor.

ANEXO 4

Ensayo de restricción con la enzima *CfoI* (Promega)

En un tubo estéril, agregar en el siguiente orden:

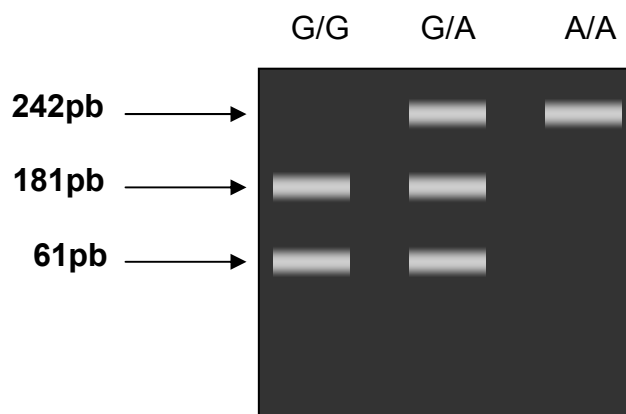
1. 16.3 μl de agua estéril desionizada.
2. 2 μl de buffer RE 10X.
3. 0.2 μl de Albúmina de suero de Bovino (BSA) Acetilada, 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.
4. 1 μl de DNA 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

Mezclar por pipeteo, después agregar 1 μl de enzima de restricción 10u/ μl , para llegar a un volumen final de 20 μl

Mezclar ligeramente por pipeteo, cerrar el tubo y centrifugar por unos segundos en una microcentrifuga. Incubar a la temperatura optima por 4 horas.

Las muestras digeridas fueron separadas por electroforesis en geles de acrilamida al 10%. La digestión del producto de 242 pb con *CfoI* produjo fragmentos de los siguientes tamaños:

- 181 y 61 bp en homocigotos G/G
- 242, 181, y 61 bp en heterocigotos G/A
- 242 bp en homocigotos A/A



ANEXO 5

Procedimiento del ensayo ELISA (KIT Millipore)

Todos los buffers y soluciones a usar, deben de estar a temperatura ambiente

- 1.- Diluir el buffer de lavado 10 veces por adición de 900 ml de agua desionizada mas el contenido de ambos botes de buffer.
- 2.- Remover el número de tiras requeridas de la placa de microensayo.
- 3.- Agregar 300 ml de buffer de lavado diluido en cada pozo, e incubar por 5 minutos a temperatura ambiente.
- 4.- terminado el tiempo, decantar el buffer de lavado y remover los residuos que queden por inversión sobre papel secante, no dejar que los pozos se sequen de un paso a otro.
- 5.- Agregar 75 ml de buffer de ensayo en cada pozo.
- 6.- Agregar en duplicado 25 ml de buffer de ensayo en los pozos blanco.
- 7.- Agregar en duplicado 25 ml de Estándar de Leptina Humana en orden de concentraciones ascendentes en los pozos indicados en la placa.
- 8.- Agregar en duplicado 25 ml de QC1 y QC2 en los pozos indicados.
- 9.- agregar secuencialmente 25 ml de muestras a cuantificar en duplicado en los pozos restantes NOTA: para mejores resultados, la adición debe de ser completada en un lapso de 1 hora.
- 10.-Cubrir la placa con DIUREX e incubar a temperatura ambiente por 2 horas sobre un agitador orbital a una velocidad de 400-500 rpm.
- 11.- Transcurrido el tiempo, remover el sellador de la placa (DIUREX), y decantar las soluciones, remover los residuos que queden por inversión sobre papel secante.
- 12.- Lavar 3 veces con buffer de lavado, adicionando 300 ml por pozo del buffer, remover los residuos que queden por inversión sobre papel secante.
- 13.- Agregar 100 ml de anticuerpo de detección a cada pozo, cubrir la placa con DIUREX e incubar a temperatura ambiente por 30 minutos sobre un agitador orbital a una velocidad de 400-500 rpm.

14.- Transcurrido el tiempo, remover el sellador de la placa (DIUREX), y decantar las soluciones, remover los residuos que queden por inversión sobre papel secante.

15.- Adicionar solución de enzima en cada pozo, cubrir la placa con DIUREX e incubar a temperatura ambiente por 30 minutos sobre un agitador orbital a una velocidad moderada.

16.- Lavar los pozos 5 veces con buffer de lavado con 300 ml por pozo, remover el sellador de la placa (DIUREX), y decantar y golpear suavemente, para remover los residuos que queden por inversión sobre papel secante .

17.- Agregar 100 ml de solución de sustrato en cada pozo, cubrir la placa con DIUREX y agitar por 5 minutos sobre un agitador. Un color azul debe de formarse en cada pozo de estándar de Leptina Humana con intensidades proporcionales a las concentraciones crecientes de Leptina.

El color, puede desarrollarse rápida o lentamente según el tiempo de incubación, dependiendo de la temperatura ambiente del lugar. El desarrollo del color se puede monitorear usando un filtro de 370 nm. Cuando la absorbancia este entre 1.2 y 1.8 a 370 nm, la solución de paro se puede agregar para terminar el desarrollo de color.

18.- Remover el DIUREX y agregar 100 ml de solución de paro y agitar la placa con la mano para asegurar una correcta mezcla de solución en todos los pozos, el color azul debe cambiar a amarillo después de la acidificación.

19.- Leer la absorbancia a 450 nm y 6300 nm en el lector de placa de ELISA en un lapso de 5 minutos, **ASEGURARSE DE QUE NO HAY BURBUJAS DENTRO DE LOS POZOS.**

20.- REGISTRAR LAS LECTURAS EN UNIDADES DE ABSORBANCIA.

NOTA: ASEGURARSE DE QUE NO HAYA BURBUJAS DENTRO DE LOS POZOS DURANTE EL PROCEDIMIENTO Y LA LECTURA.

LISTA DE REACTIVOS PARA ENSAYO DE ELISA PARA LEPTINA HUMANA

A. PLACA DE ELISA PARA LEPTINA HUMANA

- Cubierta con anticuerpo para leptina humana-anticonejo
 - Una placa
 - Lista para usar
- B. ADHESIVO PARA SELLAR PALCA
- 2 hojas
 - Listas para usar
- C. BUFFER DE LAVADO CONCENTRADO 10X HRP
- Buffer salino Tris 50 mM con Tween 20 10X
 - 2 botes de 50 ml cada uno
 - Diluir con agua desionizada 1:10
- D. ESTANDARS PARA ELISA DE LETINA HUMANA
- Leptina Humana en buffer de ensayo: 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50 y 100 ng/mL
 - 1mL por vial
 - Listo para usar
- E. CONTROLES DE CALIDAD 1 Y 2
- Leptina Humana recombinante purificada en buffer QC
 - 0.5 mL por vial
 - Listo para usar
- F. BUFFER DE ENSAYO
- PBS 0.05 M, pH 7.4, que contiene 0.025 M EDTA, 0.08 % de Azida de sodio, 1% de BSA y 0.05 % de Triton X-100
 - 10 mL por vial
 - Listo para usar
- G. ANTICUERPO DE DETECCIÓN PARA LEPTINA HUMANA
- Anticuerpo Leptina Humana-anti ratón biotinilado
 - 11 mL por vial
 - Listo para usarse
- H. SOLUCIÓN DE ENZIMA
- Conjugado de estreptavidina-peroxidasa de rábano en buffer
 - 12 mL por vial

- Listo para usar

I. SUBSTRATO

- 3,3,5,5-tetramethylbenzidine
- 12 mL
- Listo para usar

J. SOLUCIÓN DE PARO

- HCL 3 M
- 12 mL por vial
- Listo para usar (Precaución: Material Corrosivo)

Human Leptin ELISA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	5.0 ng/ml	100 ng/ml	Sample								
B	Blank	5.0 ng/ml	100 ng/ml	Sample								
C	0.5 ng/ml	10.0 ng/ml	QC 1	Etc.								
D	0.5 ng/ml	10.0 ng/ml	QC 1									
E	1.0 ng/ml	20.0 ng/ml	QC 2									
F	1.0 ng/ml	20.0 ng/ml	QC 2									
G	2.0 ng/ml	50 ng/ml	Sample									
H	2.0 ng/ml	50 ng/ml	Sample									