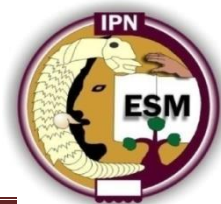




INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



“ESTUDIO DEL PERFIL DE METILACIÓN
DEL GEN DE LEPTINA (*LEP*) EN PADRES E HIJOS CON
OBESIDAD Y SOBREPESO”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
EN FARMACOLOGÍA

PRESENTA

QFB. JESÚS JUÁREZ LUIS

DIRECTORES DE TESIS:

DRA. FENGYANG HUANG

DR. SANTIAGO VILLAFAÑA RAUDA

CIUDAD DE MÉXICO,

ENERO DE 2017

“ESTUDIO DEL PERFIL DE METILACIÓN DEL GEN DE LEPTINA (*LEP*) EN PADRES E HIJOS CON OBESIDAD Y SOBREPESO”

I. Resumen

La obesidad es un problema de salud pública y un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades como diabetes tipo II, algunos tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares, patologías que ocupan los primeros lugares de causa de muerte en nuestro país. A nivel nacional existen aproximadamente 4 millones de niños que sufren de sobrepeso y obesidad y el 29% de la población adolescente presentan obesidad y un alto riesgo de ser adultos obesos. El tratamiento de esta enfermedad es complicado ya que se ha descrito que su etiología es multifactorial, e involucra interacciones complejas entre la genética y factores ambientales como el sedentarismo o hábitos alimenticios inadecuados. Recientemente se ha postulado que entre los diferentes mecanismos que podrían explicar las diferencias interindividuales del desarrollo de obesidad, se encuentra la epigenética y, dentro de los genes que pueden ser modificados epigenéticamente se encuentra la leptina, la cual participa en el desarrollo de la obesidad. Por tal motivo el objetivo de este trabajo es establecer si existe algún tipo de asociación entre el perfil de metilación del gen *LEP* con los niveles de leptina en adolescentes con obesidad y sobrepeso así como también en sus padres. Los resultados obtenidos muestran una correlación positiva entre los pacientes con obesidad y los niveles de leptina sin embargo se observó una correlación negativa con el perfil de metilación del gen *LEP*. Con base a lo anterior podemos concluir que los niveles de leptina están relacionados con el perfil de metilación y el grado de obesidad.

“ESTUDIO DEL PERFIL DE METILACIÓN DEL GEN DE LEPTINA (*LEP*) EN PADRES E HIJOS CON OBESIDAD Y SOBREPESO”

II. Abstract

Obesity is a public health problem and an irrigation factor for the development of diseases such as type II diabetes, some cancers and cardiovascular diseases, pathologies that occupy the first places of cause of death in our country. At the national level, there are approximately 4 million children who are overweight and obese and 29% of the adolescent population are obese and at high risk of being obese adults. Treatment of this disease is complicated because its etiology has been described as multifactorial, and involves complex interactions between genetics and environmental factors such as sedentary lifestyle or inadequate eating habits. It has recently been postulated that among the different mechanisms that could explain the interindividual differences in the development of obesity, epigenetics is found and, within the genes that can be modified epigenetically is leptin, which participates in the development of obesity. For this reason the objective of this work is to establish if there is any association between the methylation profile of the *LEP* gene and leptin levels in adolescents with obesity and overweight as well as in their parents. The results obtained showed a positive correlation between patients with obesity and leptin levels, but a negative correlation was observed with the methylation profile of the *LEP* gene. Based on the above, we can conclude that leptin levels are related to the methylation profile and the degree of obesity.

“ESTUDIO DEL PERFIL DE METILACIÓN DEL GEN DE LEPTINA (*LEP*) EN PADRES E HIJOS CON OBESIDAD Y SOBREPESO”

Índice	Página
I. Resumen.....	
II. Abstract.....	
III. Índice de abreviaturas.....	
IV. Índice de tablas.....	
V. Índice de figuras.....	
1. Antecedentes.....	
1.1 Obesidad.....	
1.2 Leptina y la regulación de la ingesta de alimentos.....	
1.3 Epigenética.....	
1.4 Metilación.....	
1.5 Islas CpG.....	
1.6 Perfil de metilación del ADN y obesidad.....	
1.7 Metilación del ADN y heredabilidad transgeneracional.....	
2. Justificación.....	
3. Hipótesis.....	
4. Objetivos.....	
4.1 Objetivo General.....	
4.2 Objetivo Particular.....	
4.3 Materiales y Métodos.....	
4.4 Criterios de inclusión.....	
4.5 Criterios de exclusión.....	
4.6 Toma de muestras y clasificación de los pacientes.....	
4.7 Determinación de los niveles de Leptina en suero de sangre periférica.....	
4.8 Obtención del ADN genómico.....	
5.9.10 Conversión del ADN con bisulfito de sodio.....	
5.9.11 Identificación y análisis de la región promotora de leptina	
5.9.12 PCR.....	
5.9.13 Diseño de oligonucleótidos.....	
6. Análisis estadístico.....	
7. Resultados.....	

“ESTUDIO DEL PERFIL DE METILACIÓN DEL GEN DE LEPTINA (*LEP*) EN PADRES E HIJOS CON OBESIDAD Y SOBREPESO”

8. Discusión.....

9. Conclusiones.....

10. Referencias Bibliográficas.....

11. Anexo.....

11.1 Protocolo de extracción y purificación de ADN por el método de fenol -cloroformo.....

11.2 Protocolo de modificación del ADN con bisulfito de sodio....

11.3 Protocolo de amplificación del ADN por PCR, Takara Episcopy MSP Kit.....

11.4 Carta de consentimiento informado para niños (as) menores de 18 años.....

11.5 Carta de consentimiento informado para personas mayores de 18 años.....

11.6 Carta de asentimiento informado.....

11.7 Carta de aceptación del protocolo de investigación por el Comité de Investigación, Ética y Bioseguridad del Hospital Materno Infantil “Federico Gómez”.....

“ESTUDIO DEL PERFIL DE METILACIÓN DEL GEN DE LEPTINA (*LEP*) EN PADRES E HIJOS CON OBESIDAD Y SOBREPESO”

III. Índice de abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
OMS	Organización Mundial de la Salud
NPY	Neuropéptido Y
AGRP	Péptido relacionado con agouti
POMC	Propiomelanocortina
MCH	Hormona concentradora de melanina
MC4R	Receptor de melanocortina 4
αMSH	Hormona estimulante de los melanocitos
CART	Transcrito relacionado con cocaína y anfetamina (neuropéptido)
CB1R	Receptor canabinoide tipo 1
CRF	Factor liberador de corticotropina
GHS	Receptor de secretagogos de la hormona de crecimiento (también conocido como el receptor de ghrelina)

“ESTUDIO DEL PERFIL DE METILACIÓN DEL GEN DE LEPTINA (*LEP*) EN PADRES E HIJOS CON OBESIDAD Y SOBREPESO”

IV. Índice de tablas

Tabla 1	Clasificación internacional del sobrepeso y obesidad de acuerdo al IMC
Tabla 2.	Clasificación del sobrepeso y la obesidad en percentiles para niños y adolescentes
Tabla 3.	Diseño de primers
Tabla 4.	Características de la población de estudio
Tabla 5.	Datos antropométricos y perfil bioquímico de los hijos controles, con sobrepeso y obeso
Tabla 6.	Datos antropométricos y perfil bioquímico de las madres de hijos controles, con sobrepeso y obesos
Tabla 7.	Datos antropométricos y perfil bioquímico de los padres de hijos controles, con sobrepeso y obesos
Tabla 8.	Reactivos usados para la conversión con bisulfito de sodio
Tabla 9.	Composición de la reacción para PCR
Tabla 10.	Condiciones de la reacción para PCR

“ESTUDIO DEL PERFIL DE METILACIÓN DEL GEN DE LEPTINA (*LEP*) EN PADRES E HIJOS CON OBESIDAD Y SOBREPESO”

V. Índice de figuras

- Figura 1.** Interacciones entre los diferentes factores involucrados en el inicio del desarrollo de la obesidad
- Figura 2.** Circuito neuronal de la regulación de la ingesta de alimentos y del peso corporal
- Figura 3.** Mecanismos epigenéticos
- Figura 4.** Principales mecanismos epigenéticos involucrados en la expresión y regulación génica
- Figura 5.** Metilación del ADN
- Figura 6.** Vías de metilación del ADN
- Figura 7.** Nucleosomas
- Figura 8.** Niveles de leptina en plasma en el grupo de hijos controles, con sobrepeso y obesos
- Figura 9.** % Expresión relativa del gen de leptina (*LEP*) en el grupo de hijos controles
- Figura 10.** % Expresión relativa del gen de leptina (*LEP*) en el grupo de madres de hijos controles
- Figura 11.** % Expresión relativa del gen de leptina (*LEP*) en el grupo de padres de hijos controles
- Figura 12.** Expresión relativa del gen de leptina (*LEP*) en el grupo de hijos con sobrepeso
- Figura 13.** Expresión relativa del gen de leptina (*LEP*) en el grupo de madres de hijos con sobrepeso
- Figura.14** Expresión relativa del gen de leptina (*LEP*) en el grupo de padres de hijos con sobrepeso
- Figura 15** Expresión relativa del gen de leptina (*LEP*) en el grupo de hijos con obesidad
- Figura 16.** Expresión relativa del gen de leptina (*LEP*) en madres de hijos obesos
- Figura 17.** Expresión relativa del gen de leptina (*LEP*) en padres de hijos con obesidad
- Figura 18.** Expresión relativa del gen de leptina (*LEP*) en el grupo de hijos controles, con sobrepeso y obesos
- Figura 19.** % Expresión relativa del gen de leptina (*LEP*) en el grupo de madres controles, con sobrepeso y obesos
- Figura 20.** % Expresión relativa del gen de Leptina(*LEP*) en el grupo de padres de los controles, con sobrepeso y obesos
- Figura 21.** Amplificación de los productos de PCR, después del tratamiento con bisulfito de sodio
- Figura 22.** Principio del MSP

“ESTUDIO DEL PERFIL DE METILACIÓN DEL GEN DE LEPTINA (*LEP*) EN PADRES E HIJOS CON OBESIDAD Y SOBREPESO”

1. Antecedentes

1.1 Obesidad

La obesidad de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) se define como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud. Una forma simple de medir la obesidad es el índice de masa corporal (IMC). El IMC es un indicador simple de la relación entre el peso y la talla que se utiliza frecuentemente para identificar el sobrepeso y la obesidad en los adultos. Se calcula dividiendo el peso de una persona en kilos por el cuadrado de su altura en metros (kg/m^2).

En el caso de los adultos la OMS clasifica al sobrepeso y la obesidad como se indica en la siguiente tabla:

Tabla 1. Clasificación internacional del sobrepeso y obesidad de acuerdo al IMC. (Organización Mundial de la Salud.)

IMC (kg/m^2)	Clasificación
<18.50	Bajo peso
18.5-24.99	Normal
≥ 25.00 - 29.99	Sobrepeso
≥ 30.00	Obeso
30.00-34.99	Obesidad grado I
35.00-39.99	Obesidad grado II
≥ 40.00	Obesidad grado III

El IMC proporciona la medida más útil del sobrepeso y la obesidad en la población, pues es la misma para ambos sexos y para los adultos de todas las edades.

En el caso de los niños y adolescentes, es necesario tener en cuenta la edad al definir el sobrepeso y la obesidad. El IMC es interpretado de forma diferente para niños y adolescentes a pesar de que es calculado con el peso entre la altura (CDC) debido a que hay cambios en el peso y la altura con la edad, así como su relación con la grasa corporal, los niveles de IMC entre niños y

“ESTUDIO DEL PERFIL DE METILACIÓN DEL GEN DE LEPTINA (*LEP*) EN PADRES E HIJOS CON OBESIDAD Y SOBREPESO”

adolescentes necesitan ser expresados en relación con otros niños de la misma edad y sexo.

Tabla 2. Clasificación del sobrepeso y la obesidad en percentiles para niños y adolescentes. (CDC).

IMC en percentiles	Grado
< 5	Bajo peso
5 a 84.9	Peso normal
85 a 94.9	Sobrepeso
≥ 95	Obesidad

Estos percentiles son calculados de las tablas de crecimiento de la CDC (Centers for Disease Control and Prevention), los cuales se basan en datos de las encuestas nacionales recolectados de 1963 a 1994 en Estados Unidos. La obesidad se define como un IMC igual o superior al percentil 95 para los niños y adolescentes de la misma edad y sexo.

Prevalencia de la obesidad

La prevalencia de la obesidad está incrementándose en todos los países del mundo, tan solo en Estados Unidos en la actualidad hay más de 100 millones de personas con sobrepeso u obesidad (Lopez & Knudson, 2012). El inicio de la obesidad resulta de un desequilibrio entre la ingesta y el gasto energético, siendo esta pandemia en gran parte atribuible a la alta disponibilidad de alimentos con alto contenido calórico junto con la adopción de un estilo de vida sedentaria. Las diferencias interindividuales han sido atribuidas a menudo a variantes genéticas que afectan a cientos de genes relacionados con el metabolismo energético (Hinney, Vogel, & Hebebrand, 2010), pero en los últimos años otros factores han sido descritos para formar parte en la ecuación y contribuir al incremento (o disminución) de la susceptibilidad para ganar peso o desarrollar complicaciones relacionadas con la obesidad, incluyendo enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo 2 o esteatohepatitis. Algunos de estos factores han sido revisados incluyendo infecciones, falta de sueño, reducción en la variabilidad de la temperatura ambiente, aumento en la edad materna, mayor fecundidad entre las personas con mayor adiposidad,

“ESTUDIO DEL PERFIL DE METILACIÓN DEL GEN DE LEPTINA (*LEP*) EN PADRES E HIJOS CON OBESIDAD Y SOBREPESO”

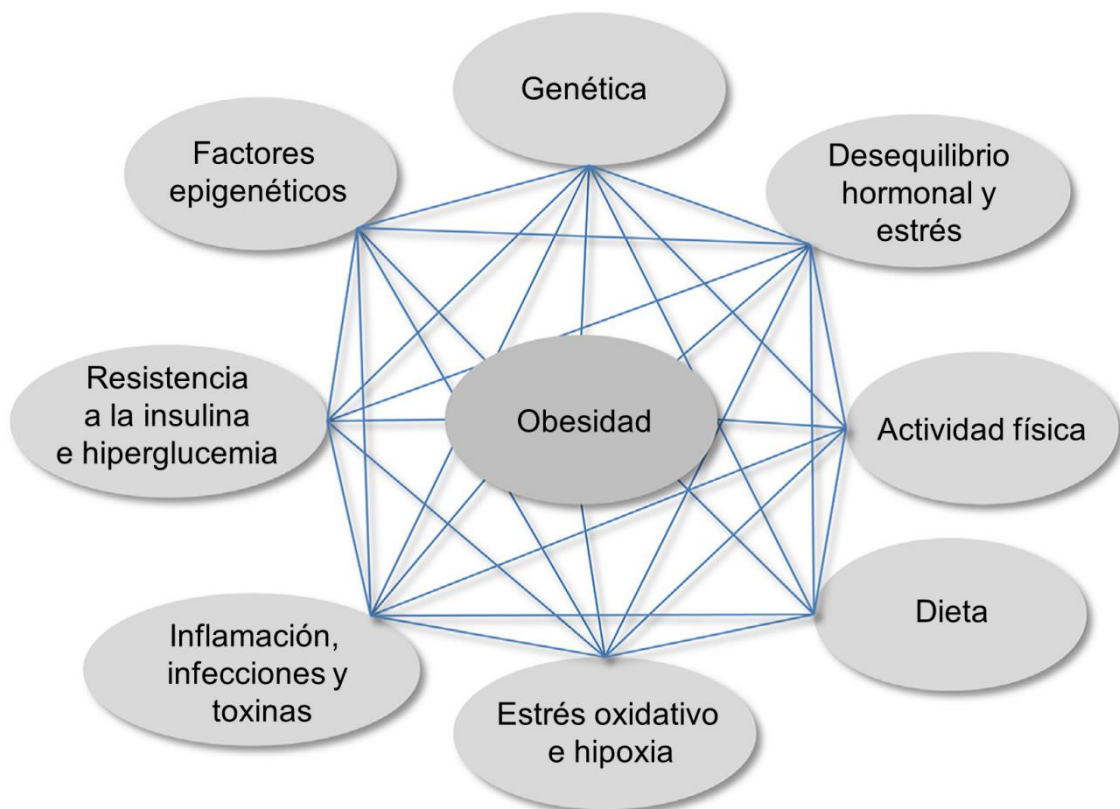
apareamiento selectivo, iatrogènesis farmacéutica, efectos intrauterinos e intergeneracionales, y epigenética.

Obesidad como factor de riesgo para otras enfermedades

La obesidad y el sobrepeso son factores de riesgo para numerosas enfermedades crónicas, entre las que se incluyen la diabetes tipo 2, hipertensión, enfermedades cardiovasculares, infarto, y discapacidad física.

La patogénesis de la obesidad involucra múltiples interacciones entre el medio ambiente y factores genéticos.

Figura 1. Interacciones entre los diferentes factores involucrados en el inicio del desarrollo de la obesidad, modificado de (Milagro, Mansego, De Miguel, & Martínez, 2013).



“ESTUDIO DEL PERFIL DE METILACIÓN DEL GEN DE LEPTINA (*LEP*) EN PADRES E HIJOS CON OBESIDAD Y SOBREPESO”

actualmente se sabe que representan ~5% de obesidad mórbida en humanos, la mayoría de los cuales son en MC4R (el receptor para α MSH, un producto del gen que codifica POMC). Las mutaciones en los genes que codifican para leptina, el receptor de leptina, POMC por sí mismo, y PC1, una enzima que procesa neuropéptidos, también causan obesidad en humanos. Además en este circuito neural, incluyendo la identificación de otros mediadores neurales, son probablemente nuevos enfoques para el tratamiento de la obesidad por inhibición de vías que incrementan el peso y/o activación de vías que reducen el peso. CART, transcrito relacionado con cocaína y anfetaminas (neuropéptido); CB1R, receptor canabinoide tipo 1; CRF, factor liberador de corticotropina; GHS, receptor de secretagogos de la horma de crecimiento (también conocido como el receptor de ghrelina); R1&5, receptores NPY 1 y 5.

2.3 Epigenética

La genética es el estudio de cambios heredables en la actividad de los genes o funciones debido a la alteración directa de la secuencia de ADN. Cada alteración incluye mutaciones puntuales, deleciones, inserciones, y translocaciones. En contraste, la epigenética es el estudio de cambios heredables en la actividad del gen o función que no está asociado con algún cambio en la secuencia del ADN por sí mismo.

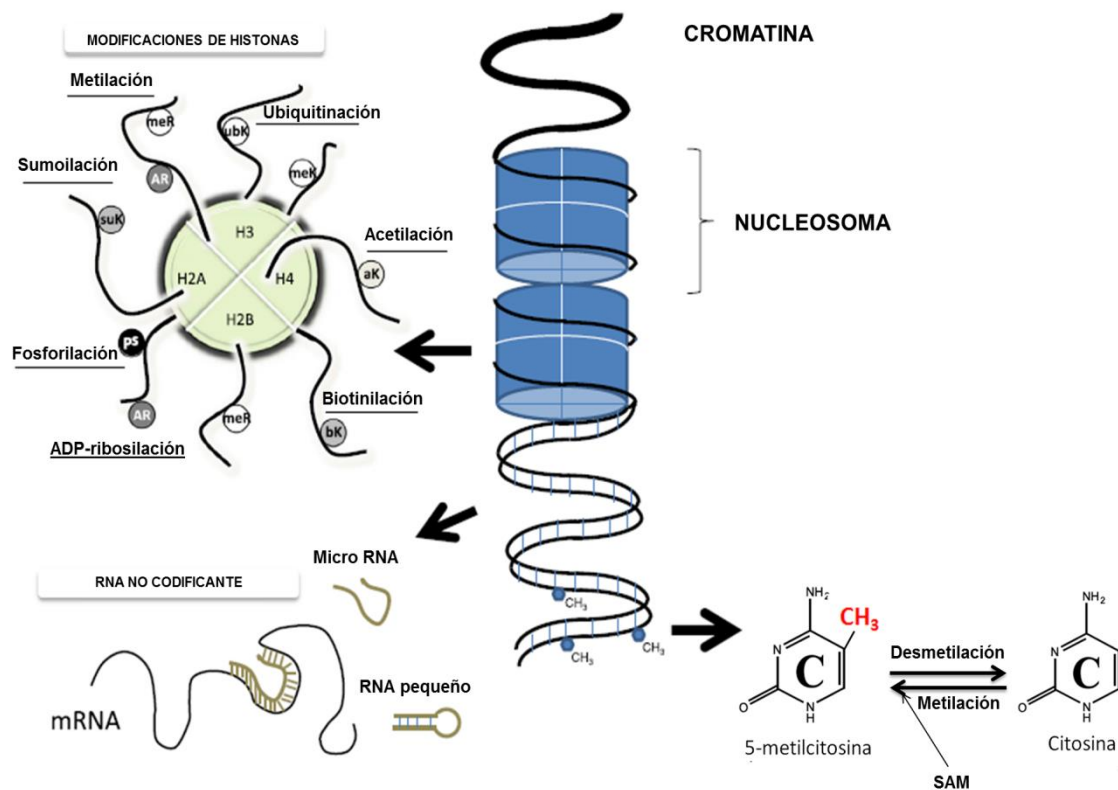
Los mecanismos epigenéticos se pueden agrupar en cuatro grandes categorías las cuales son: metilación del DNA, posicionamiento del nucleosoma, RNA's no codificantes y modificación de la cola de las histonas. Estas marcas epigenéticas no son permanentes a lo largo del tiempo. Se ha descrito que diversos factores, como la nutrición (Thaler R, *et al.*, 2009) el estrés oxidativo (Franco R, *et al.*, 2008) la hipoxia (Shahrzad S, *et al.*, 2007) la inflamación (Stenvinkel P, *et al.* 2007) la edad (Jiang MH, *et al.*, 2008), entre otros, pueden modificar las marcas epigenéticas. Estas modificaciones epigenéticas pueden conservarse en el tiempo a través de generaciones y ser transmitidas a la descendencia, incrementando el riesgo de sufrir enfermedades metabólicas (Lim JP, *et al.*, 2013).

“ESTUDIO DEL PERFIL DE METILACIÓN DEL GEN DE LEPTINA (*LEP*) EN PADRES E HIJOS CON OBESIDAD Y SOBREPESO”

Aunque prácticamente todas las células en un organismo contienen la misma información genética, no todos los genes son expresados simultáneamente por todos los tipos de células. En un sentido más amplio, los mecanismos epigenéticos median la diversificación de los perfiles de expresión de genes en una variedad de células y tejidos en organismos multicelulares (Moore, Le, & Fan, 2013).

La epigenética ha sido objeto de especial interés en los últimos años principalmente porque hay evidencia sobre el impacto de diferentes nutrientes, compuestos ambientales y situaciones metabólicas en el epigenoma, los cuales pueden conducir al desarrollo de estrategias más personalizadas de prevención y tratamiento de la enfermedad.

Figura 4. Principales mecanismos epigenéticos involucrados en la expresión y regulación génica, modificado de (Milagro *et al.*, 2013). La expresión génica viene determinada por tres mecanismos que interactúan entre sí: la metilación del ADN, las modificaciones covalentes de las histonas (metilación, acetilación, fosforilación, etc.) y los ARN no codificantes.



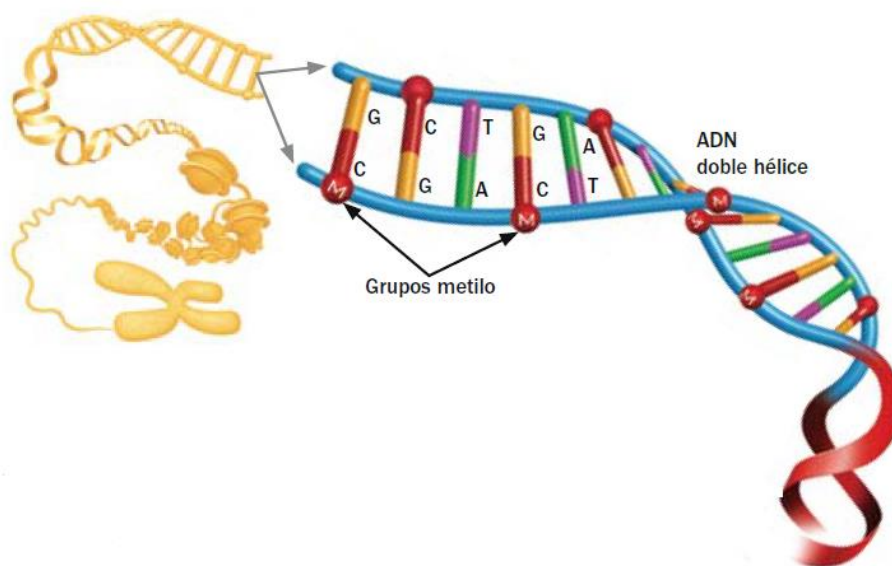
“ESTUDIO DEL PERFIL DE METILACIÓN DEL GEN DE LEPTINA (*LEP*) EN PADRES E HIJOS CON OBESIDAD Y SOBREPESO”

2.4 Metilación

El mecanismo epigenético más estudiado es la metilación del DNA, el cual, se lleva a cabo mediante la adición enzimática de un grupo metilo (-CH₃) al carbono 5 de la citosina (5 mC) del dinucleótido CpG (citosina-guanina). La metilación se lleva a cabo en las islas CpG, que son regiones que contienen una alta frecuencia de dinucleótidos CpG (50-65%) y que generalmente se encuentran en la región promotora de los genes, ésta modificación está asociada al silenciado génico.

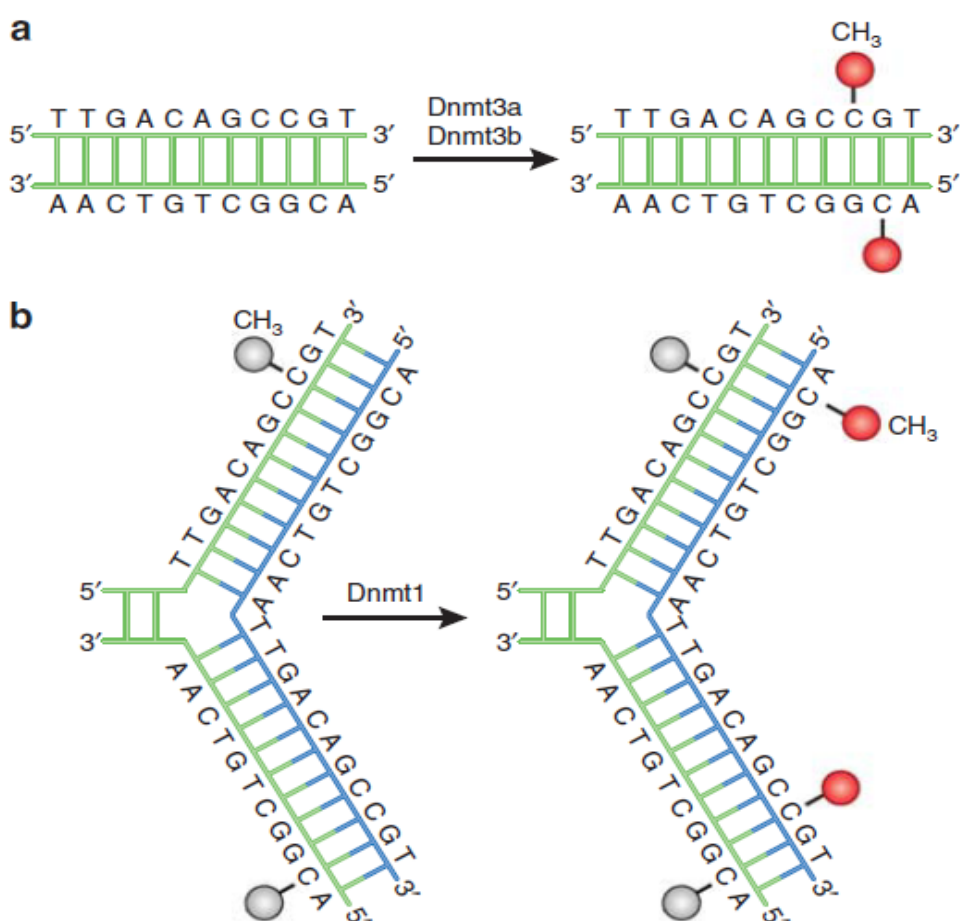
La metilación del DNA es un proceso enzimático: las DNA-metiltransferasas (DNMT) 3A y 3B son metil transferasas de *ново* en regiones no metiladas, mientras que la DNMT1 asegura que los patrones de metilación sean copiados fielmente a través de cada división celular. Estas enzimas cooperan entre sí para establecer y mantener los patrones de metilación del DNA celular, y también interactúan con histona-deacetilasas, histonametiltransferasas y proteínas ligadoras metil-citosina en una compleja red reguladora.

Figura 5. Metilación del ADN. La metilación del ADN es catalizada por una familia de ADN metiltransferasas (Dnmts) que transfieren un grupo metilo de S-adenosil metionina (SAM) al carbono 5 del residuo de citosina para formar 5mC (figura 2). Las Dnmt3a y Dnmt3b pueden establecer un nuevo patrón de metilación para el ADN sin modificar y éstas son conocidas como Dnmt *de novo* (figura 2a). Por otra parte, las Dnmt1 funcionan durante la replicación del ADN copiando los patrones de metilación del ADN parental dentro de la hebra hija recién sintetizada (Figura 2b), (Moore *et al.*, 2013).



“ESTUDIO DEL PERFIL DE METILACIÓN DEL GEN DE LEPTINA (*LEP*) EN PADRES E HIJOS CON OBESIDAD Y SOBREPESO”

Figura 6. Vías de metilación del ADN modificado de (Moore et al., 2013). Una familia de DNA metiltransferasas (Dnmts) catalizan la transferencia de un grupo metilo de S-adenosilmetionina (SAM) al carbono 5 del residuo de citosina para formar 5-metilcitosina (5mC). **(a)** Dnmt3a y Dnmt3b son Dnmts *de novo* y transfieren grupos metilo (rojo) sobre el ADN desnudo. **(b)** Dnmt1 es la Dnmt de mantenimiento y se encarga de conservar los patrones de metilación durante la replicación. Cuando el ADN se somete a replicación semiconservativa, el ADN parental conserva el patrón de metilación del ADN original (gris). Las Dnmt1 asociadas al foco de replicación, replica con precisión el patrón de metilación del ADN original por la adición de grupos metilos (rojo) dentro de la nueva hebra hija formada (azul).



2.5 Islas CpG

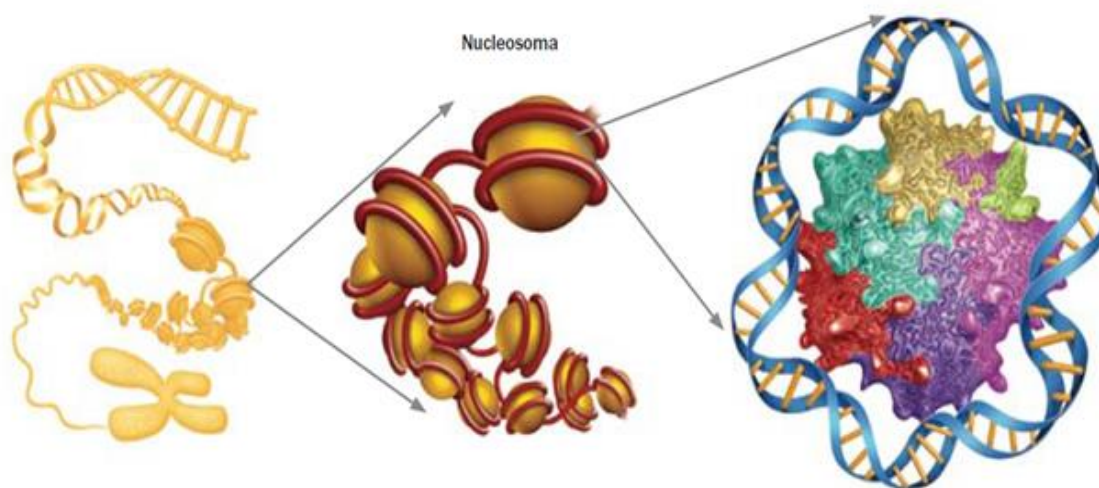
La metilación del ADN en los sitios CpG es uno de los mecanismos epigenéticos más estudiados. Los sitios CpG son regiones del ADN donde un nucleótido de citosina existe junto a un nucleótido de guanina. Las citosinas en los nucleótidos CpG pueden ser metiladas para formar 5-metilcitosina. El

“ESTUDIO DEL PERFIL DE METILACIÓN DEL GEN DE LEPTINA (*LEP*) EN PADRES E HIJOS CON OBESIDAD Y SOBREPESO”

genoma humano contiene acerca de 30 millones de dinucleótidos CpG que existen en un estado metilado y no metilado. Una parte de todos los sitios CpG presentes en el genoma están agrupados dentro de islas CpG que son definidos como regiones genómicas con un aumento en la densidad de CpG. Estas islas CpG están enriquecidas en los genes, acerca del 60% de todos los genes en el genoma humano contienen islas CpG río arriba.

La mayor parte de la metilación del ADN ocurre dentro de los dinucleótidos CpG, aunque la metilación fuera del contexto CpG ha sido reportada en el ADN de humanos.

Figura 7. Nucleosoma. Es la unidad básica de repetición de la cromatina y está constituido de un octàmero de proteínas conteniendo dos moléculas de cada núcleo de histonas (H2A, H2B, H3 y H4) alrededor del cual es enrollado 147 pb de ADN. Cada nucleosoma está separado por un linker de ADN de aproximadamente 60 pb asociado con una sola molécula de histona H1.



2.6 Perfil de metilación del DNA y obesidad

La fisiopatología de la obesidad no se ha comprendido con detalle puesto que los procesos biológicos implicados son muy complejos e involucran gran cantidad de mensajeros químicos y receptores, así como una complicada interacción entre diferentes tipos celulares. Sin embargo, el protagonista principal en este proceso fisiopatológico es el tejido adiposo y en particular el adipocito (Prins JB, *et al.*, 2002).

“ESTUDIO DEL PERFIL DE METILACIÓN DEL GEN DE LEPTINA (*LEP*) EN PADRES E HIJOS CON OBESIDAD Y SOBREPESO”

Múltiples estudios demuestran que el adipocito produce más de 50 mensajeros químicos con acciones locales y sistémicas denominados adipocinas entre los cuales se encuentran la leptina, adiponectina, resistina, visfatina, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6), etc. Dado que se ha descrito que la metilación del DNA puede regular la expresión génica, la alteración en los patrones de metilación de los genes que codifican para las adipocinas involucradas en el mantenimiento del peso corporal puede desempeñar papel muy importante en el desarrollo de obesidad, tal es el caso de la leptina.

La leptina es una proteína de 167 aminoácidos, es una de las adipocinas claves involucradas en la regulación del peso corporal, su concentración sérica es directamente proporcional a la cantidad de tejido adiposo. Esta proteína actúa a nivel de sistema nervioso central (SNC) disminuyendo la ingesta de alimentos y aumentando el gasto energético. Se sabe que la región promotora del gen de leptina presenta islas CpG que podrían verse afectadas por la metilación. En un estudio publicado recientemente, se reportó una asociación directa entre la metilación del gen de leptina placentario y el nivel de glucosa a las 2 h prueba oral de tolerancia a la glucosa de la madre en las semanas 24 a 28 del embarazo (Bouchard L, *et al.*, 2010).

Nuestro grupo de trabajo observó que los adolescentes obesos con resistencia a la insulina (RI) presentan un patrón de metilación diferente al de los individuos no obesos sin RI. Los adolescentes obesos sin RI presentaron estatus similar de metilación en dos sitios de CpG del promotor del gen *LEP* (-31nt y -51nt) en comparación a los eutróficos. Sin embargo, las frecuencias de metilación en dichos sitios disminuyeron significadamente en los obesos con RI, en particular en los obesos mórbidos (Carone BR, *et al.*, 2010).

Dicha disminución en la metilación de este gen se asoció a los niveles séricos de leptina, índice de masa corporal, insulina y colesterol total de manera inversa. Estos hallazgos sugieren que la metilación de la región promotora del

“ESTUDIO DEL PERFIL DE METILACIÓN DEL GEN DE LEPTINA (*LEP*) EN PADRES E HIJOS CON OBESIDAD Y SOBREPESO”

gen de leptina podría estar influenciada por la RI y por ende tener una participación importante en la creciente pandemia de obesidad.

2.7 Metilación del DNA y heredabilidad transgeneracional

Los estudios epigenéticos tempranos consideraban que las modificaciones epigenéticas pueden ser borradas durante la gametogénesis o embriogénesis temprana para reestablecer la totipotencia de las células embrionarias en desarrollo. Sin embargo, dentro de la última década se ha reportado conocimiento adicional sobre la reprogramación epigenética y esta noción ha sido reevaluada. La evidencia actual apoya la idea de que las marcas epigenéticas no son siempre eliminadas por completo entre generaciones. La anulación incompleta de modificaciones en los genes, asociadas con un fenotipo medible, pueden resultar en patrones inusuales de herencia de una generación a la siguiente. La herencia epigenética transgeneracional se refiere a fenotipos presentes en generaciones sucesivas que no son determinadas genéticamente y resultan de modificaciones epigenéticas pasadas vía los gametos (Carone BR, *et al.*, 2010).

3. Justificación

La obesidad es un problema de salud de etiología multifactorial que a pesar de existir tratamientos es de difícil control por lo cual es necesario estudiar nuevos mecanismos involucrados como son los cambios epigenéticos y en especial la metilación del DNA del gen que codifica para leptina debido a que se ha reportado que este gen pueden participar en el desarrollo de la obesidad.

4. Hipótesis

Los adolescentes obesos presentan hipometilación del gen de leptina debido al perfil de metilación de los padres el cual es transmitido a su descendencia.

1. Objetivos

5.1 Objetivo General

Evaluar el perfil de metilación del gen que codifica para leptina y su heredabilidad de padres a hijos con obesidad y sobrepeso.

“ESTUDIO DEL PERFIL DE METILACIÓN DEL GEN DE LEPTINA (*LEP*) EN PADRES E HIJOS CON OBESIDAD Y SOBREPESO”

5.2 Objetivos Específicos

1. Analizar los niveles de colesterol total, HDL, triglicéridos, glucosa, ácido úrico, insulina, leptina y adiponectina en padres e hijos con obesidad y sobrepeso.
2. Determinar el perfil de metilación del gen que codifica para leptina mediante la relación metilado/no metilado en padres e hijos con obesidad y sobrepeso.
3. Correlacionar los niveles de leptina con el perfil de metilación de sus respectivos genes en padres e hijos.
4. Asociar el perfil de metilación del gen que codifica para leptina entre padres e hijos.

6. Materiales y Métodos

6.1 Población de estudio

Se realizó un estudio de casos y controles.

6.2 Criterios de inclusión

FAMILIAS CASO

- a) El diagnóstico de obesidad se hará cuando el IMC \geq percentil 95%, de acuerdo a las tablas propuestas por el CDC (2000).
- b) Al momento de iniciar el estudio, los participantes deberán tener edades de 10-23 años, se reclutarán participantes de ambos géneros.
- c) Firma de la carta de consentimiento informado por los padres y carta de asentimiento por el paciente en el caso de ser menor de edad (ver anexo 11.6).

FAMILIAS CONTROL

- a) Al momento de iniciar el estudio, los participantes deberán tener edades de 10-23 años, se reclutarán participantes de ambos

“ESTUDIO DEL PERFIL DE METILACIÓN DEL GEN DE LEPTINA (*LEP*) EN PADRES E HIJOS CON OBESIDAD Y SOBREPESO”

géneros. Los pacientes eutróficos tienen un IMC entre el percentil 5% y el 85%, de acuerdo a las tablas del CDC.

- b) Firma de la carta de consentimiento informado por los padres y carta de asentimiento por el paciente.

6.3 Criterios de exclusión

FAMILIAS CASOS Y CONTROLES

- a) Si algún miembro de la familia toma medicamentos para el tratamiento de la obesidad (Orlistat y Metformina).
- b) Presencia de alguna otra enfermedad que pueda ser la condicionante de su obesidad como diabetes, hipotiroidismo o alguna otra endocrinopatía de base, etc.
- c) Retraso mental, autismo, alteraciones psiquiátricas, retraso en el desarrollo psicomotor.
- d) Deficiencias de la hormona de crecimiento.
- e) Cualquier enfermedad que pueda influir en el resultado de las pruebas sanguíneas.
- f) Pacientes en tratamiento con algún medicamento que altere las pruebas de coagulación como anti-agregantes plaquetarios, esteroides, etc.
- g) Pacientes que tengas prescrito algún medicamento que favorezca el desarrollo de obesidad como esteroides sistémicos, anticomisiales, etc.

6.4 Toma de muestras y clasificación de los pacientes

Los pacientes se reclutaron en el Hospital Materno Infantil de México “Federico Gómez”, los que cumplieron con los criterios de inclusión fueron sometidos a una evaluación antropométrica, particularmente se determinó su peso (kg) y talla (cm) para poder clasificarlos de acuerdo a su IMC en percentiles.

Con base al IMC en percentiles y el IMC en Kg/m^2 se formaron tres grupos de pacientes: un grupo de sujetos con sobrepeso, un grupo obeso y un grupo eutrófico.

“ESTUDIO DEL PERFIL DE METILACIÓN DEL GEN DE LEPTINA (*LEP*) EN PADRES E HIJOS CON OBESIDAD Y SOBREPESO”

Se les tomó una muestra de 5 mL de sangre periférica usando EDTA como anticoagulante para posteriormente realizar la extracción del ADN. También se extrajo 5 mL de sangre periférica sin anticoagulante para realizar las pruebas bioquímicas (glucosa, colesterol, triglicéridos, colesterol total, HDL, LDH).

Las muestras de sangre sin EDTA también se utilizaron para determinar los niveles de leptina en suero.

6.5 Determinación de los niveles de Leptina en suero de sangre periférica

La determinación de los niveles de leptina en sangre se hizo con el suero de las muestras obtenidas sin anticoagulante, mediante la técnica de ELISA utilizando el Kit Human Leptin ELISA (Kit Millipore).

6.6 Obtención del ADN genómico

Se extrajo el ADN de las muestras de la sangre periférica obtenida de los pacientes, la cual contenía EDTA como anticoagulante. La extracción se hizo mediante el método fenol-cloroformo. Después de la extracción se evaluó la integridad del ADN mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% usando TAE al 1% como buffer de corrida, en el cual se observó una banda uniforme e íntegra en cada una de las muestras analizadas, estos resultados nos indicaron que las muestras de ADN no presentaban degradación.

Se determinó la concentración y pureza de cada muestra de ADN mediante el nanofotómetro (IMPLEN), la concentración se obtuvo en ng/ μ L y la pureza es el resultado de la relación de las absorbancias 260/280 y 260/230.

6.7 Conversión del ADN con bisulfito de sodio

Se realizó la conversión del ADN con bisulfito de sodio siguiendo el protocolo reportado por Clark (Anexo 2) y colaboradores en el 2006, la cual permite una desaminación hidrolítica de las citosinas no metiladas para convertirlas a uracilo, mientras que las citosinas metiladas permanecen sin modificación.

6.8 Identificación y análisis de la región promotora de Leptina

“ESTUDIO DEL PERFIL DE METILACIÓN DEL GEN DE LEPTINA (*LEP*) EN PADRES E HIJOS CON OBESIDAD Y SOBREPESO”

Se buscó la secuencia de bases del gen de leptina (*LEP*) en formato fasta mediante el software Ensembl (www.ensembl.org). Las secuencias obtenidas se usaron para la identificación de sitios CpG's y el diseño de oligonucleótidos, esta parte se llevó a cabo mediante el software MethPrimer 2.0, el cual nos permite identificar islas CpG en la secuencia del gen de interés además de realizar el diseño de los oligonucleótidos.

La región promotora del gen *LEP* se identificó con el software PROMOSER (<http://biowulf.bu.edu/zlab/PromoSer/>), la cual se muestra a continuación:

Figura XXX. Región promotora del gen de Leptina.

```
GACTTCAGAACCCCAACCCCGCAATCTGGGTCGGGGAGCCTGGCGCACT -501
GCGGGCCGCTCCCTCTAACCCCTGGGCTTCCCTGGCGTCCAGGGCCGTCGG -451
GGCCGAGTCCCGATTGCTCCACCCCGAAGCCGCGCCAGGACCAACGAG -401
GGCGCAGCCGTATGCCCCAGCCCGCTCCGCGGAGCCCCCTCACAGCCACCC -351
CCGCCCCGACCGCGCCCCGCGGGCTCGAAGCACCTTCCCAAGGGGCTGG -301
TCCTTGCGCCATAGTCGCGCCGGAGCCTCTGGAGGGACATCAAGGATTTTC -251
TCGCTCCTACCAGCCACCCCAAATTTTTGGGAGGTACCCAAGGGTGCGC -201
GCGTGGCTCCTGGAGCGCCGAGGCCCTCCCTCGAGGCCCGCGAGGTGCA -151
CACTGCGGGCCAGGGCTAGCAGCCGCCCGGCACGTCGCTACCCTGAGGG -101
GCGGGGCGGGAGCTGGCGCTAGAAATGCGCCGGGGCCTGCGGGGCAGTTG -51
CGCAAGTTGTGATCGGGCCGCTATAAGAGGGGCGGGCAGGCATGGAGCCC -1
CGTAGGAATCGCAGCGCCAGCGGTTGCAAGGTAAGGCCCGGCGCGCTCC 49
TTCCTCCTTCTCTGCTGGTCTTTCTTGGCAGGCCACAGGGCCCCACACAA 99
```

6.1 Diseño de oligonucleótidos

El diseño de oligonucleótidos se realizó mediante el software MethPrimer 2.0 (<http://www.urogene.org/methprimer2>), la cual es una plataforma en línea que proporciona una serie de herramientas y bases de datos para facilitar el estudio de la metilación del ADN y la epigenética, incluyendo herramientas para el

“ESTUDIO DEL PERFIL DE METILACIÓN DEL GEN DE LEPTINA (*LEP*) EN PADRES E HIJOS CON OBESIDAD Y SOBREPESO”

diseño de primers y sondas para varios PCR's basados en la conversión con bisulfito, predicción de islas Cp, etc.

El diseño de los oligonucleótidos se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 3. Diseño de primers.

Nombre del primer	Secuencia (5'-3')	Tamaño del producto	Tm	GC%
Metilado				
• Forward	TGGGAGGTATTTAAGGGTGC	113	58.9 °C	50.0
• Reverse	TAACGACGTACCGAACGACT	113	58.3 °C	50.0
No Metilado				
• Forward	TTGGGAGGTATTTAAGGGTGT	117	57.5 °C	42.9
• Reverse	AAATAACAACATACCAAACAACCT	117	52.5 °C	26.1
**Beta-actina				
• Forward	TGGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGT	133	64.7 °C	
• Reverse	AACCAATAAAACCTACTCCTCCCTTA A	133	64.5 °C	

** Los primers para beta-actina tienen la característica particular de ser sitios libres de sufrir metilaciones y han sido reportados en estudios epigenéticos por diversos autores (Hattermann Kirsten, *et al.*, 2008; Bibikova Marina, *et al.*, 2006; Michael W.Y. Chan, *et al.*).

6.9 Identificación de los sitios de unión a FT

Para la identificación de los sitios de unión a FT se ocupó el software PROMO versión 3.0.2 (<http://algggen.lsi.upc.edu>).

“ESTUDIO DEL PERFIL DE METILACIÓN DEL GEN DE LEPTINA (*LEP*) EN PADRES E HIJOS CON OBESIDAD Y SOBREPESO”

6.10 PCR-MSP (Methylation Specific PCR)

El kit EpiScope MSP (cat. 3100A, kit presentación: 200 reacciones marca: TAKARA) es un reactivo de PCR diseñado exclusivamente para el análisis de PCR por metilación específica (MSP). Una enzima específica combinada con un buffer optimizado permite el análisis MSP usando un templado de ADN tratado con bisulfito conteniendo uracilos. Este kit proporciona una habilidad ampliamente mejorada para diferenciar regiones metilado/no metilado en comparación con los reactivos tradicionales de PCR. El sistema de la reacción ha sido optimizado para monitoreo en tiempo real usando SYBR Green I, y permite realizar tanto PCR en tiempo real como detección de punto final bajo las mismas condiciones de reacción.

7. Análisis estadístico

Los parámetros antropométricos y bioquímicos de la población de estudio se presentan como valores promedio con error estándar. Para esto se realizó un análisis de varianza de una vía entre los tres grupos de estudio (control, sobrepeso y obeso). Se compararon los tres grupos correspondientes a los hijos, después los tres grupos de las madres y finalmente se compararon los tres grupos de padres.

Con respecto al % de expresión relativa del gen de leptina (*LEP*) primero se realizó una t-student entre cada grupo, es decir se compararon los porcentajes de metilado vs no metilado y posteriormente se compararon los tres grupos (controles, sobrepeso y obesos) mediante una ANOVA de una vía.

Los análisis estadísticos fueron hechos con el software SigmaStat 3.5, SPSS (Statistical Package for Social Sciences) y GraphPad versión 6.01.

Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos cuando el valor de p fue menor a 0.05.

“ESTUDIO DEL PERFIL DE METILACIÓN DEL GEN DE LEPTINA (*LEP*) EN PADRES E HIJOS CON OBESIDAD Y SOBREPESO”

8. Resultados

8.1 Características de la población de estudio.

Tabla 4. Características de la población de estudio.

	Hijo (n)	Padres (n)	Madres (n)
Grupo eutrófico	11	11	11
Grupo sobrepeso	11	11	11
Grupo obeso	11	11	11
Total:	33 Familias		

8.2 Datos antropométricos y perfil bioquímico de los hijos controles, con sobrepeso y obesos.

Tabla 5. Datos antropométricos y perfil bioquímico de los hijos controles, con sobrepeso y obesos, los valores expresan la media \pm sem. * $p < 0.05$ vs control.

	Control	Sobrepeso	Obeso
Edad (años)	15,727 \pm 0,821	14,182 \pm 0,724	15,182 \pm 0,87
Peso (kg)	51,927 \pm 3,338	63,082 \pm 3,492	*84,264\pm3,244
Talla (cm)	159,182 \pm 3,968	157,973 \pm 3,222	162,927 \pm 2,160
IMC (Kg/m ²)	20,182 \pm 0,658	*24,909\pm0,547	*31,818\pm0,882
IMC Percentiles	53,964 \pm 6,815	*91,062\pm1,025	*97,968\pm0,393
z-Score	0,0799 \pm 0,195	*1,372\pm0,0643	*2,108\pm0,0818
Triglicéridos (mg/dL)	88,364 \pm 15,256	83,818 \pm 11,977	127,182 \pm 22,653
Colesterol (mg/dL)	143,091 \pm 11,849	135,818 \pm 7,061	143,818 \pm 7,720
HDL (mg/dL)	45,818 \pm 4,221	43,364 \pm 3,082	*33,909\pm2,270
Ácido Úrico (mg/dL)	4,691 \pm 0,331	5,282 \pm 0,517	5,782 \pm 0,533
Glucosa (mg/dL)	84,818 \pm 4,112	85,455 \pm 1,770	82,545 \pm 2,250
Insulina (uU/L)	9,778 \pm 1,455	10,028 \pm 1,192	12,548 \pm 2,985
HOMA	2,046 \pm 0,316	2,097 \pm 0,243	2,660 \pm 0,741
Leptina (ng/mL)	6,758 \pm 2,403	*17,123\pm3,088	13,649 \pm 2,286

“ESTUDIO DEL PERFIL DE METILACIÓN DEL GEN DE LEPTINA (*LEP*) EN PADRES E HIJOS CON OBESIDAD Y SOBREPESO”

8.3 Datos antropométricos y perfil bioquímico de las madres de hijos controles, con sobrepeso y obesos.

Tabla 6. Datos antropométricos y perfil bioquímico de las madres de hijos controles, con sobrepeso y obesos. Los valores expresan la media \pm sem. * $p < 0.05$ vs control.

	Control	Sobrepeso	Obeso
Edad (años)	44,455 \pm 1,260	43,091 \pm 1,587	42,700 \pm 1,984
Peso (kg)	74,220 \pm 4,289	71,182 \pm 2,861	77,500 \pm 6,027
Talla (cm)	153,111 \pm 2,497	157,636 \pm 2,421	154,909 \pm 2,637
IMC (Kg/m ²)	32,369 \pm 1,904	28,561 \pm 0,672	32,132 \pm 2,195
Triglicéridos (mg/dL)	153,364 \pm 19,083	146,545 \pm 20,843	159,909 \pm 32,78
Colesterol (mg/dL)	177,636 \pm 5,956	176,364 \pm 7,314	170,182 \pm 9,609
HDL (mg/dL)	39,091 \pm 3,082	40,364 \pm 2,313	40,636 \pm 2,915
Ácido Úrico (mg/dL)	4,818 \pm 0,444	4,545 \pm 0,434	4,545 \pm 0,340
Glucosa (mg/dL)	90,727 \pm 4,315	108,182 \pm 16,903	113,273 \pm 19,588
Insulina (uU/L)	11,903 \pm 1,123	8,517 \pm 0,953	10,286 \pm 2,248
HOMA	2,656 \pm 0,286	2,034 \pm 0,179	2,949 \pm 0,762
Leptina (ug/mL)	18,649 \pm 5,634	22,820 \pm 4,552	10,902 \pm 5,153

8.4 Datos antropométricos y perfil bioquímico de los padres de hijos controles, con sobrepeso y obesos.

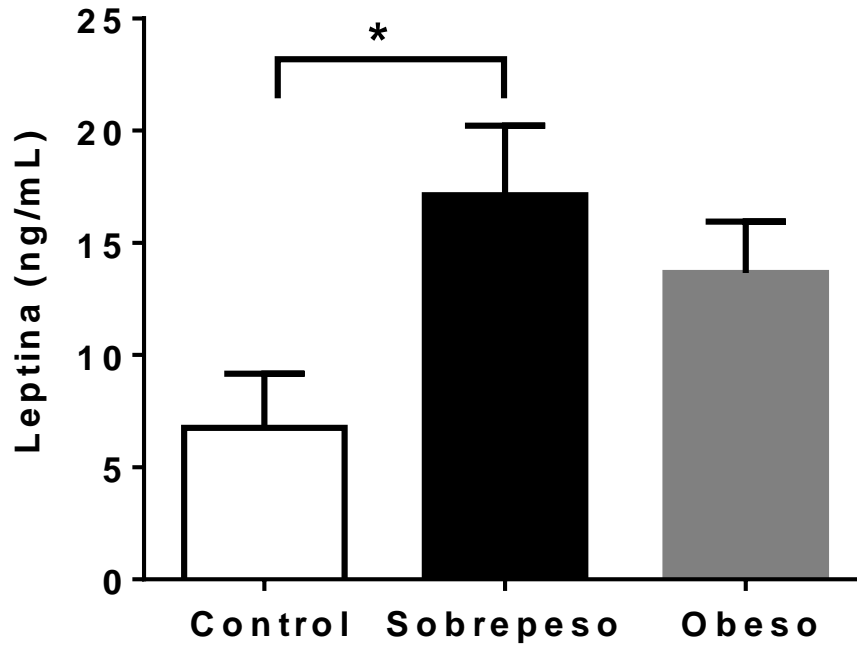
Tabla 7. Datos antropométricos y perfil bioquímico de los padres de hijos controles, con sobrepeso y obesos. Los valores expresan la media \pm sem. * $p < 0.05$ vs control.

	Control	Sobrepeso	Obeso
Edad (años)	47,000 \pm 1,476	45,273 \pm 1,280	49,000 \pm 1,938
Peso (kg)	81.027 \pm 4.664	86,227 \pm 5,131	82,473 \pm 2,556
Talla (cm)	170.350 \pm 1.028	170,745 \pm 2,211	168,909 \pm 1,792
IMC (Kg/m ²)	28,381 \pm 1,740	29,390 \pm 1,262	28,919 \pm 0,822
Triglicéridos (mg/dL)	244,091 \pm 47.110	170,818 \pm 21,514	305,727 \pm 80,930
Colesterol (mg/dL)	179,909 \pm 10.222	187,000 \pm 8,708	189,818 \pm 15,540
HDL (mg/dL)	33,000 \pm 2.162	40,364 \pm 3,040	30,818 \pm 3,024
Ácido Úrico (mg/dL)	6.409 \pm 0,453	6,100 \pm 0,380	6,345 \pm 0,394
Glucosa (mg/dL)	96,727 \pm 4.421	116,636 \pm 15,744	116,636 \pm 16,224
Insulina (uU/L)	10,839 \pm 1,723	8,417 \pm 1,663	13,990 \pm 3,683
HOMA	2,555 \pm 0,405	2,277 \pm 0,480	3,988 \pm 1,403
Leptina (ng/mL)	7,059 \pm 2,376	8,952 \pm 2,955	4,949 \pm 1,169

“ESTUDIO DEL PERFIL DE METILACIÓN DEL GEN DE LEPTINA (*LEP*) EN PADRES E HIJOS CON OBESIDAD Y SOBREPESO”

8.5 Niveles de Leptina en sangre

Figura 8. Niveles de leptina en plasma en el grupo de hijos controles, con sobrepeso y obesos. Los valores expresan la media \pm sem. * $p < 0.05$ vs control.



“ESTUDIO DEL PERFIL DE METILACIÓN DEL GEN DE LEPTINA (*LEP*) EN PADRES E HIJOS CON OBESIDAD Y SOBREPESO”

8.6 Expresión relativa del perfil de metilación del gen de leptina en el grupo de hijos controles.

Figura 9. Expresión relativa del perfil de metilación del gen de leptina (*LEP*) en el grupo de hijos controles, los valores expresan la media \pm sem. de los porcentajes. * $p < 0.05$

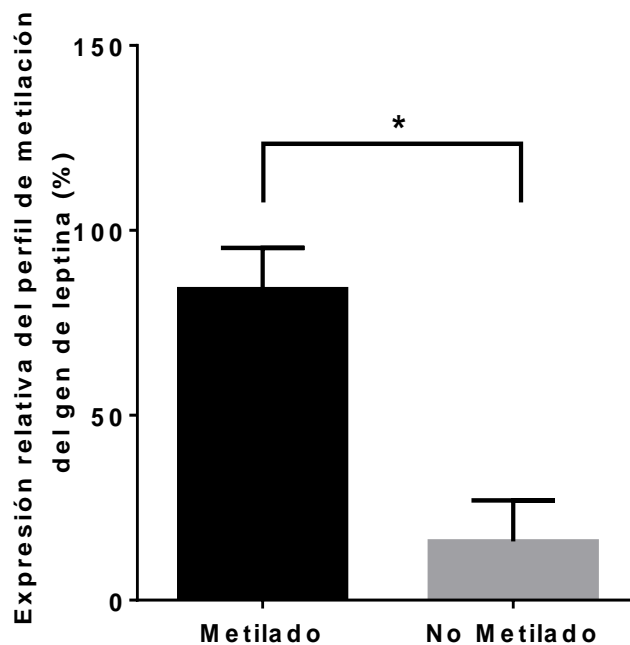
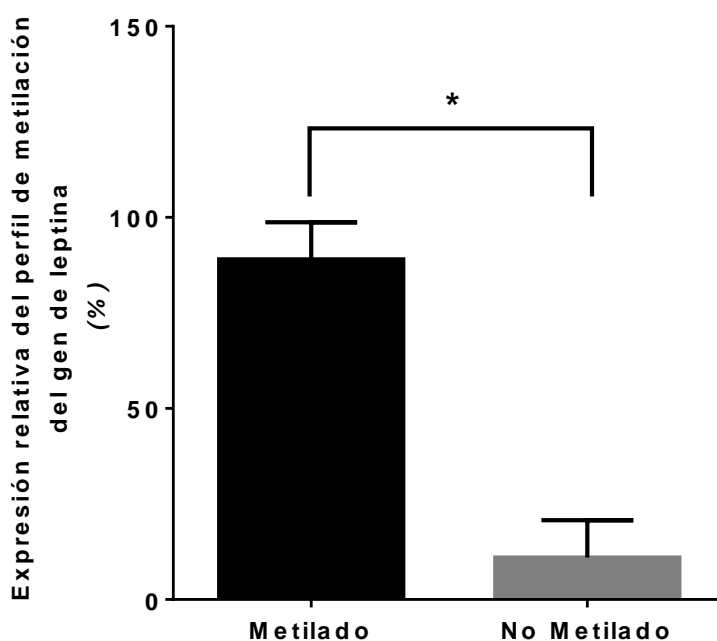
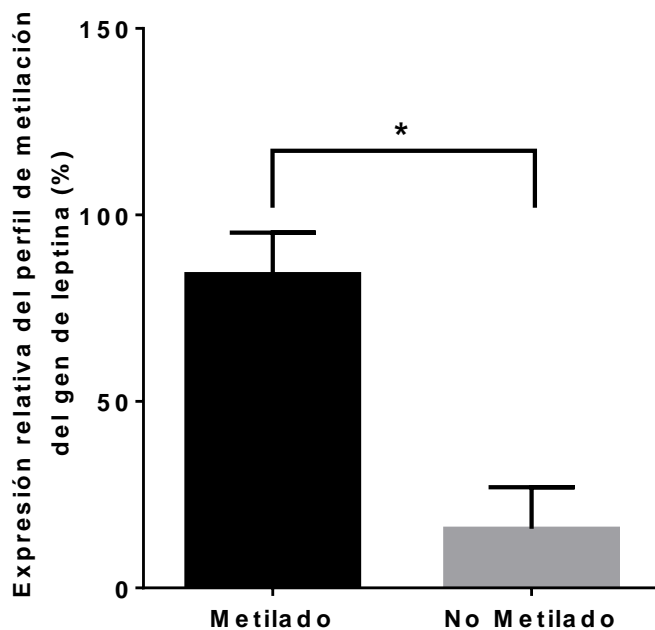


Figura 10. Expresión relativa del perfil de metilación del gen de leptina (*LEP*) en el grupo de madres de hijos controles, los valores expresan la media \pm sem. de los porcentajes. * $p < 0.05$



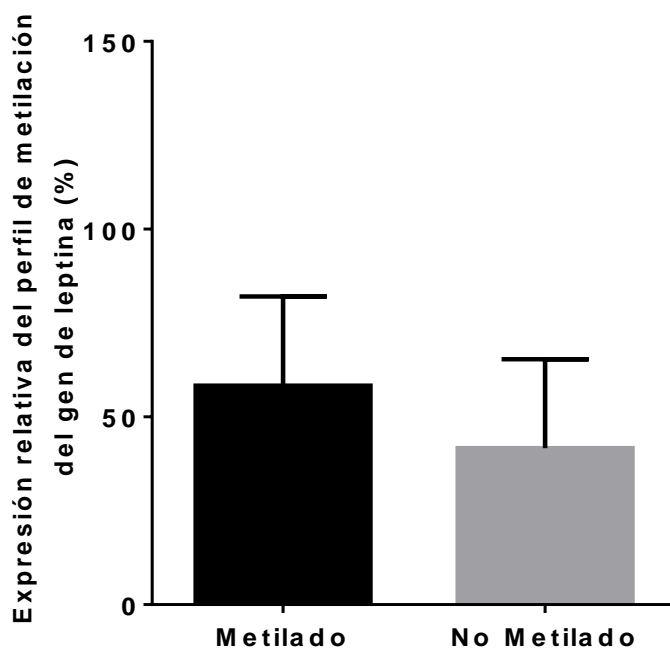
“ESTUDIO DEL PERFIL DE METILACIÓN DEL GEN DE LEPTINA (*LEP*) EN PADRES E HIJOS CON OBESIDAD Y SOBREPESO”

Figura 11. Expresión relativa del perfil de metilación del gen de leptina (*LEP*) en el grupo de padres de hijos controles, los valores expresan la media \pm sem. de los porcentajes. * $p < 0.05$



8.7 Perfil de metilación del grupo con sobrepeso.

Figura 12. Expresión relativa del perfil de metilación del gen de leptina (*LEP*) en el grupo de hijos con sobrepeso, los valores expresan la media \pm sem. de los porcentajes.



“ESTUDIO DEL PERFIL DE METILACIÓN DEL GEN DE LEPTINA (*LEP*) EN PADRES E HIJOS CON OBESIDAD Y SOBREPESO”

Figura 13. Expresión relativa del perfil de metilación del gen de leptina (*LEP*) en el grupo de madres de hijos con sobrepeso, los valores expresan la media \pm sem. de los porcentajes.

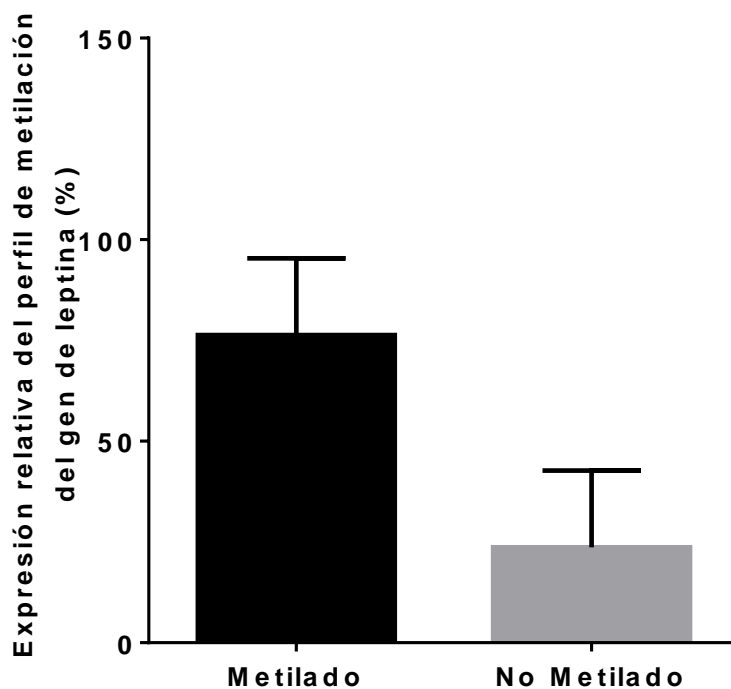
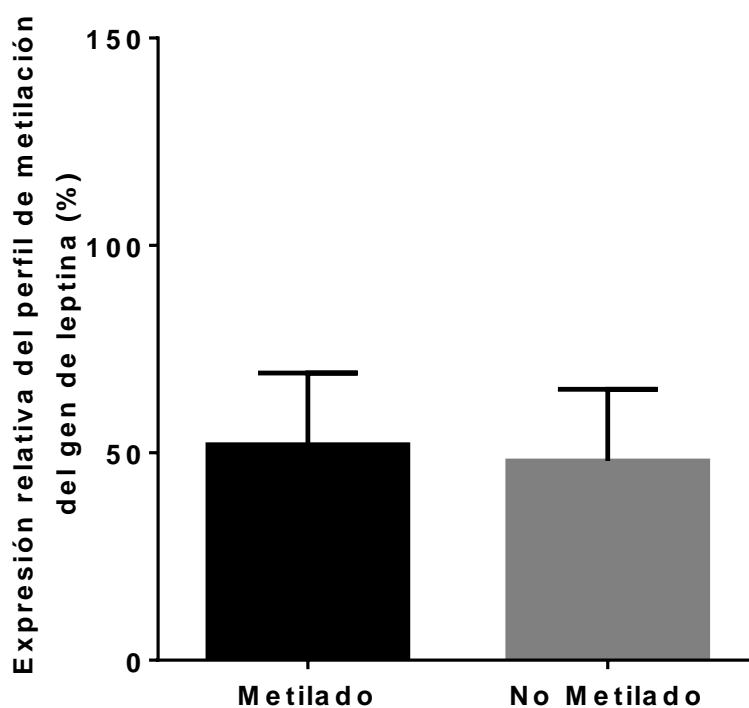


Figura 14. Expresión relativa del perfil de metilación del gen de leptina (*LEP*) en el grupo de padres de hijos con sobrepeso, los valores expresan la media \pm sem. de los porcentajes.



“ESTUDIO DEL PERFIL DE METILACIÓN DEL GEN DE LEPTINA (*LEP*) EN PADRES E HIJOS CON OBESIDAD Y SOBREPESO”

8.8 Perfil de metilación del grupo con obesidad.

Figura 15. Expresión relativa del perfil de metilación del gen de leptina (*LEP*) en el grupo de hijos con obesidad, los valores expresan la media \pm sem. de los porcentajes.

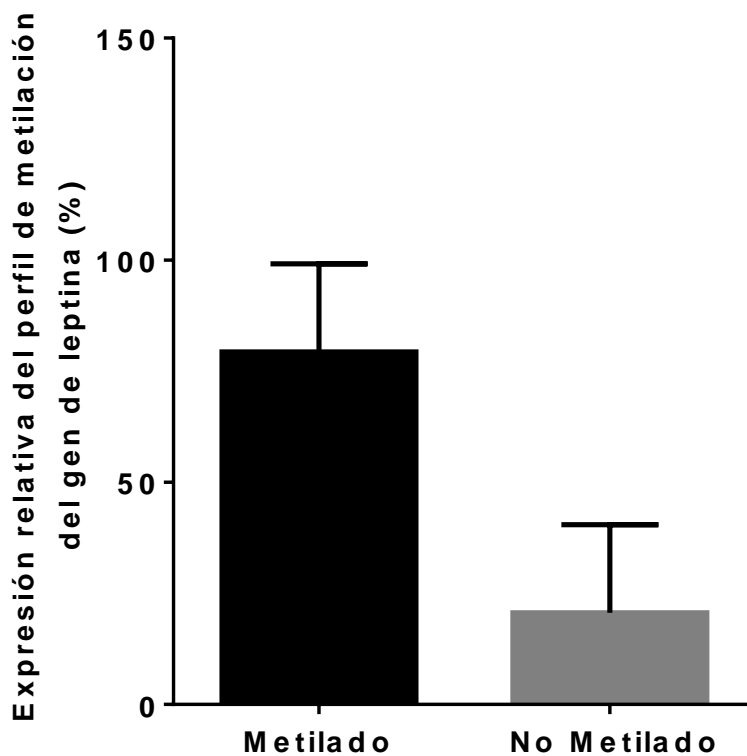
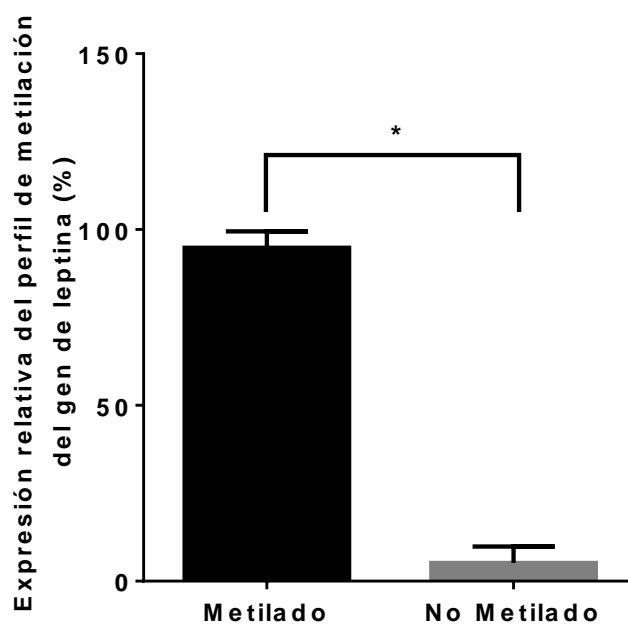


Figura 16. Expresión relativa del perfil de metilación del gen de leptina (*LEP*) en madres de hijos obesos, los valores expresan la media \pm sem. de los porcentajes. * $p < 0.05$



“ESTUDIO DEL PERFIL DE METILACIÓN DEL GEN DE LEPTINA (*LEP*) EN PADRES E HIJOS CON OBESIDAD Y SOBREPESO”

Figura 17. Expresión relativa del perfil de metilación del gen de leptina (*LEP*) en padres de hijos con obesidad, los valores expresan la media \pm sem. de los porcentajes.

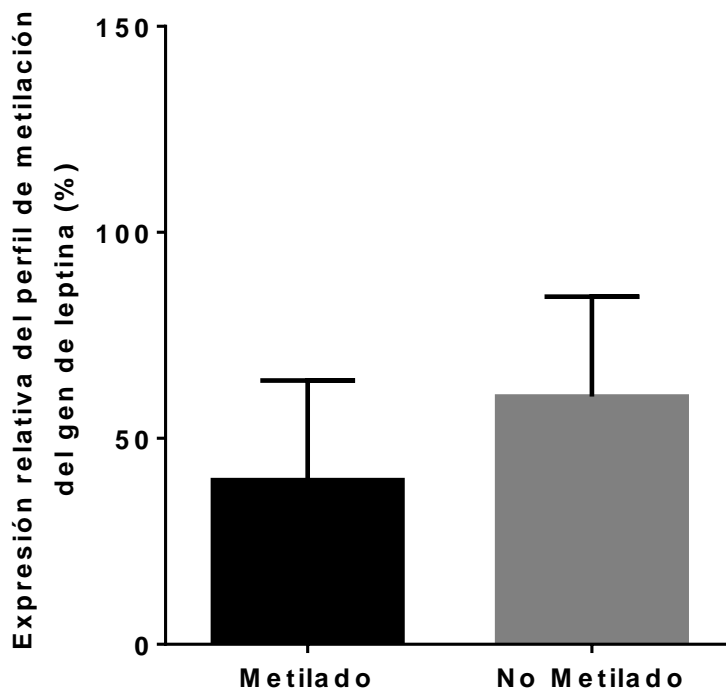
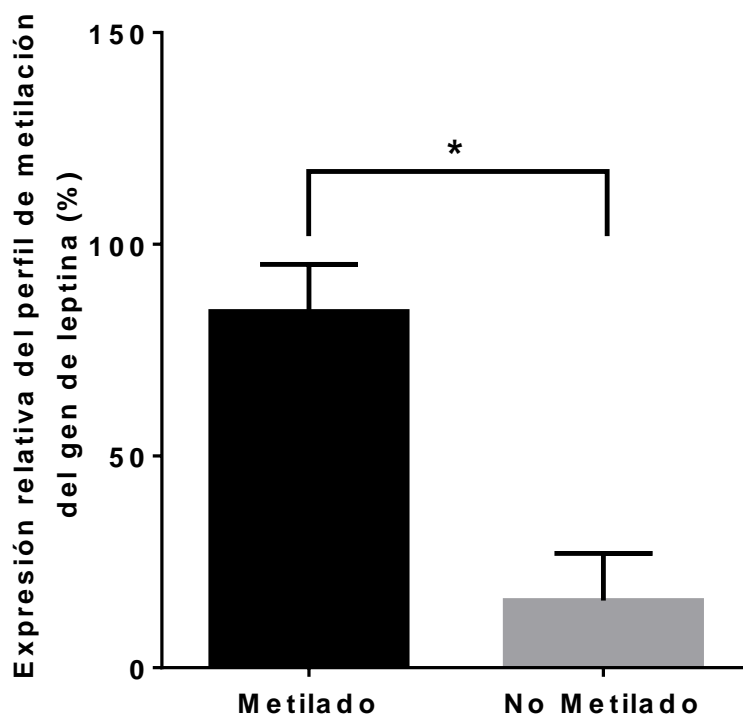
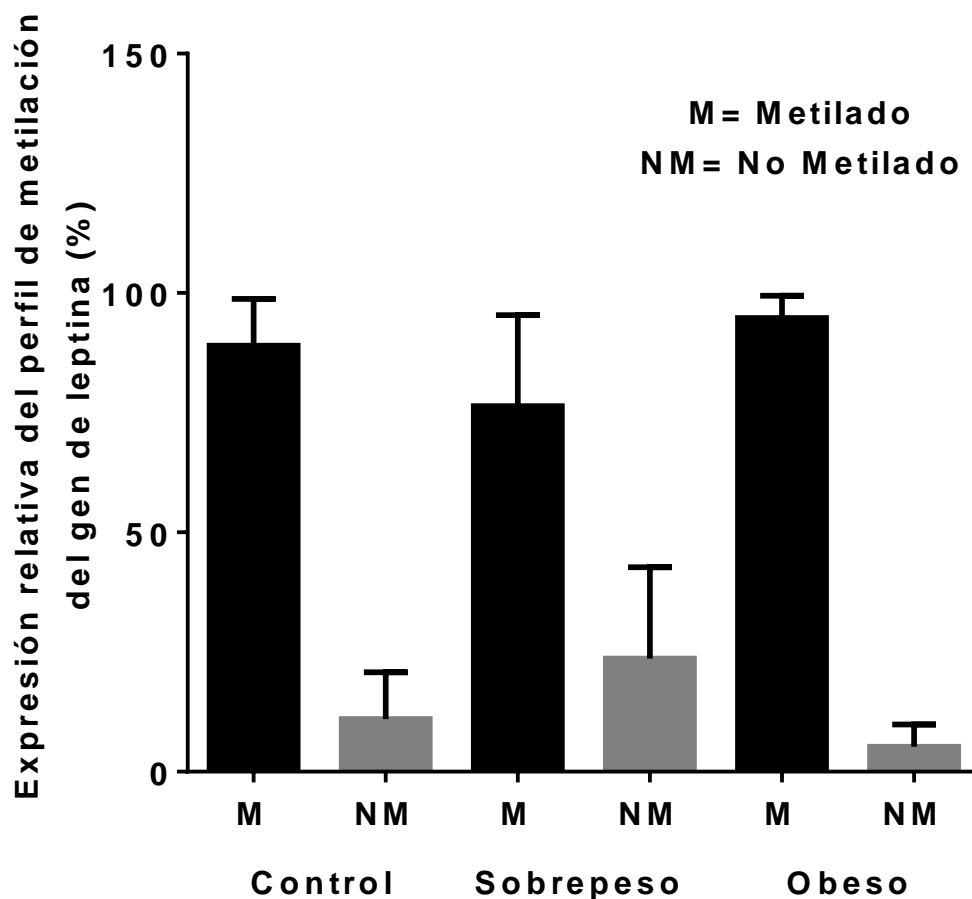


Figura 18. Expresión relativa del perfil de metilación del gen de leptina (*LEP*) en el grupo de hijos controles, con sobrepeso y obesos, los valores expresan la media \pm sem. de los porcentajes. * $p < 0.05$



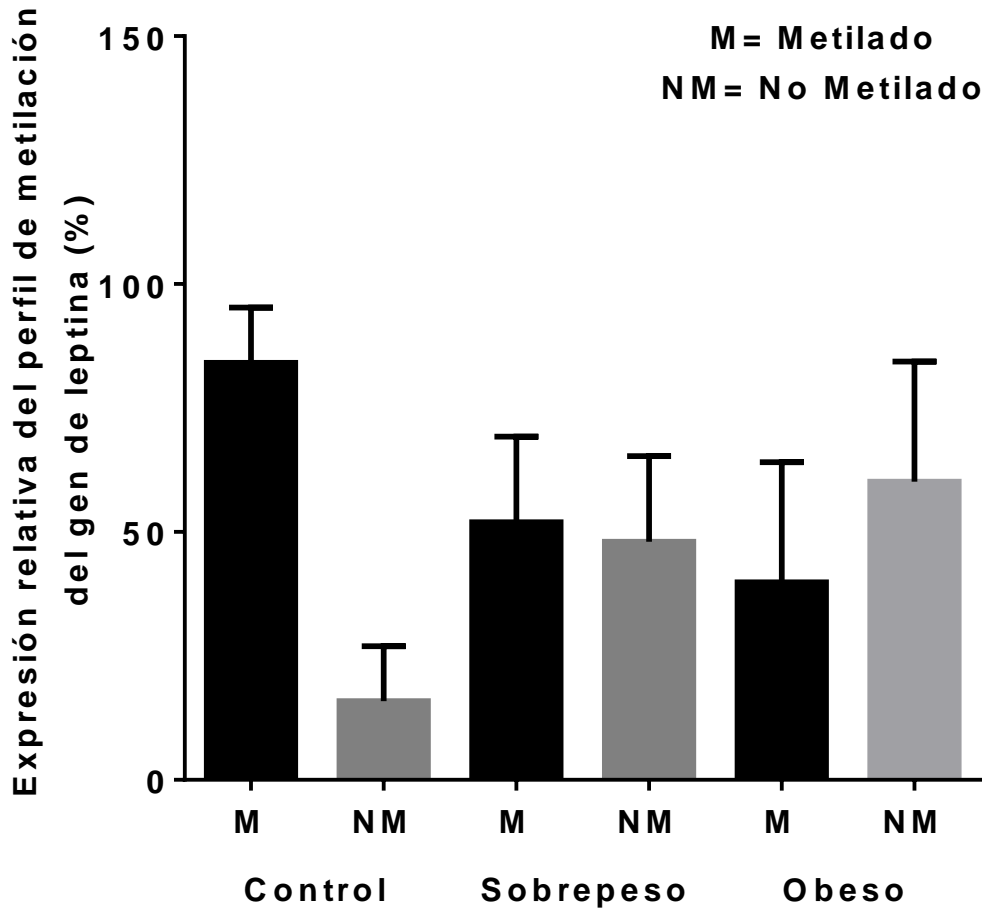
“ESTUDIO DEL PERFIL DE METILACIÓN DEL GEN DE LEPTINA (*LEP*) EN PADRES E HIJOS CON OBESIDAD Y SOBREPESO”

Figura 19. Expresión relativa del perfil de metilación del gen de leptina (*LEP*) en el grupo de madres de los pacientes controles, con sobrepeso y obesos. Los valores expresan la media \pm sem. de los porcentajes. * $p < 0.05$



“ESTUDIO DEL PERFIL DE METILACIÓN DEL GEN DE LEPTINA (*LEP*) EN PADRES E HIJOS CON OBESIDAD Y SOBREPESO”

Figura 20. Expresión relativa del perfil de metilación del gen de leptina (*LEP*) en el grupo de padres de los pacientes controles, con sobrepeso y obesos. Los valores expresan la media \pm sem. de los porcentajes. * $p < 0.05$



“ESTUDIO DEL PERFIL DE METILACIÓN DEL GEN DE LEPTINA (*LEP*) EN PADRES E HIJOS CON OBESIDAD Y SOBREPESO”

Figura XXX. Expresión relativa del perfil de metilación del gen de leptina (*LEP*) en el grupo de familias de hijos controles.

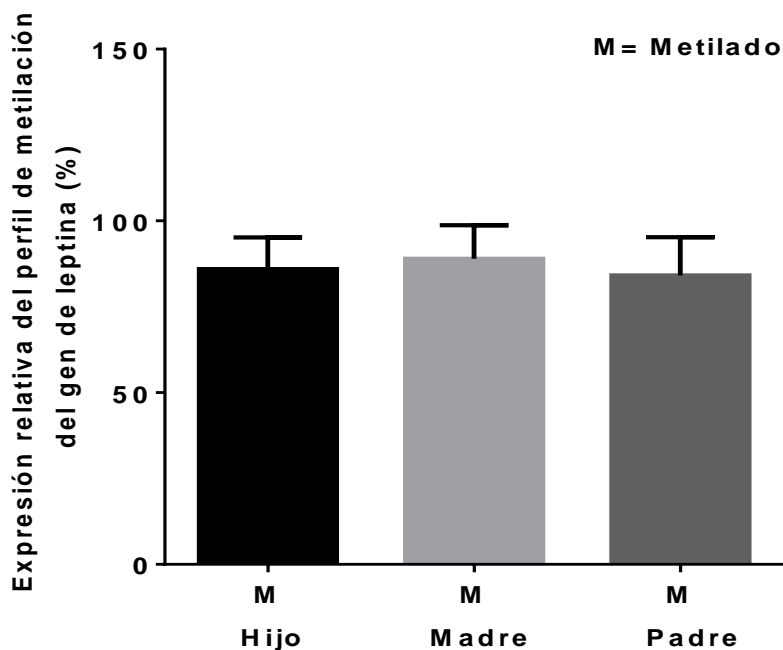
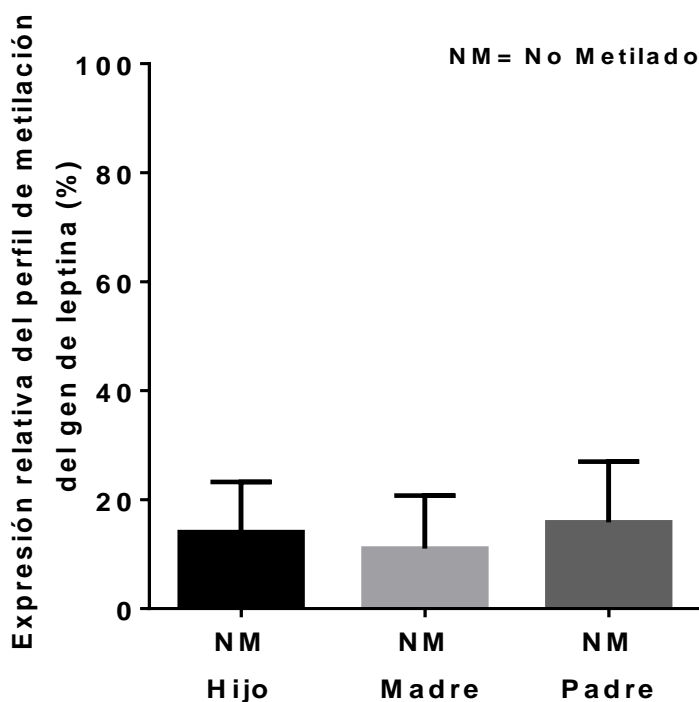


Figura XXX. Expresión relativa del perfil de metilación del gen de leptina (*LEP*) en el grupo de familias de hijos controles.



“ESTUDIO DEL PERFIL DE METILACIÓN DEL GEN DE LEPTINA (*LEP*) EN PADRES E HIJOS CON OBESIDAD Y SOBREPESO”

Figura XXX. Expresión relativa del perfil de metilación del gen de leptina (*LEP*) en el grupo de familias de hijos con sobrepeso.

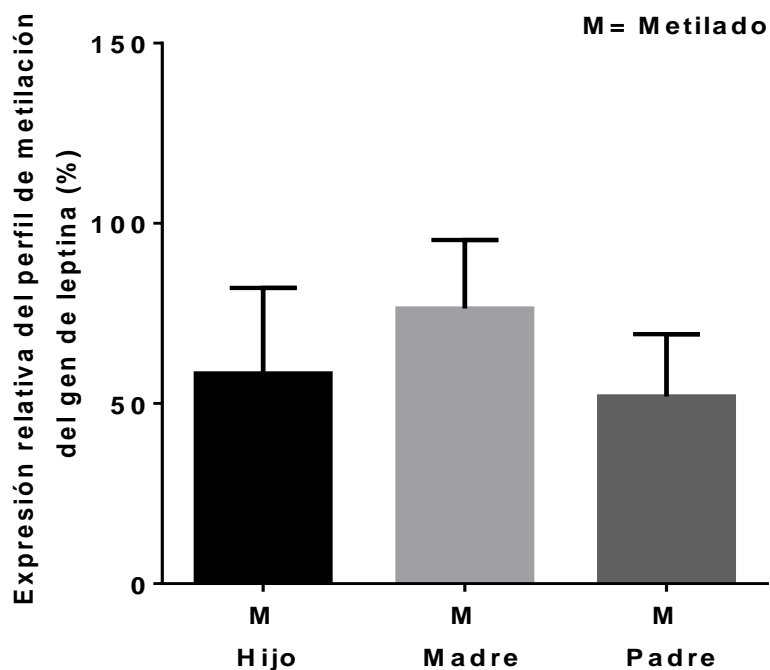
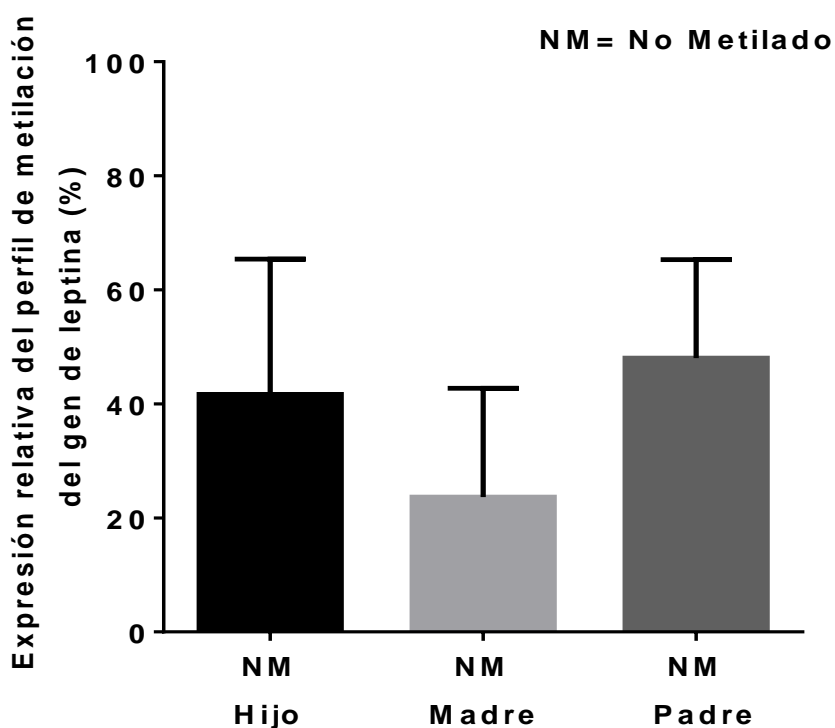


Figura XXX. Expresión relativa del perfil de metilación del gen de leptina (*LEP*) en el grupo de familias de hijos con sobrepeso.



“ESTUDIO DEL PERFIL DE METILACIÓN DEL GEN DE LEPTINA (*LEP*) EN PADRES E HIJOS CON OBESIDAD Y SOBREPESO”

Figura XXX. Expresión relativa del perfil de metilación del gen de leptina (*LEP*) en el grupo de familias con hijos obesos.

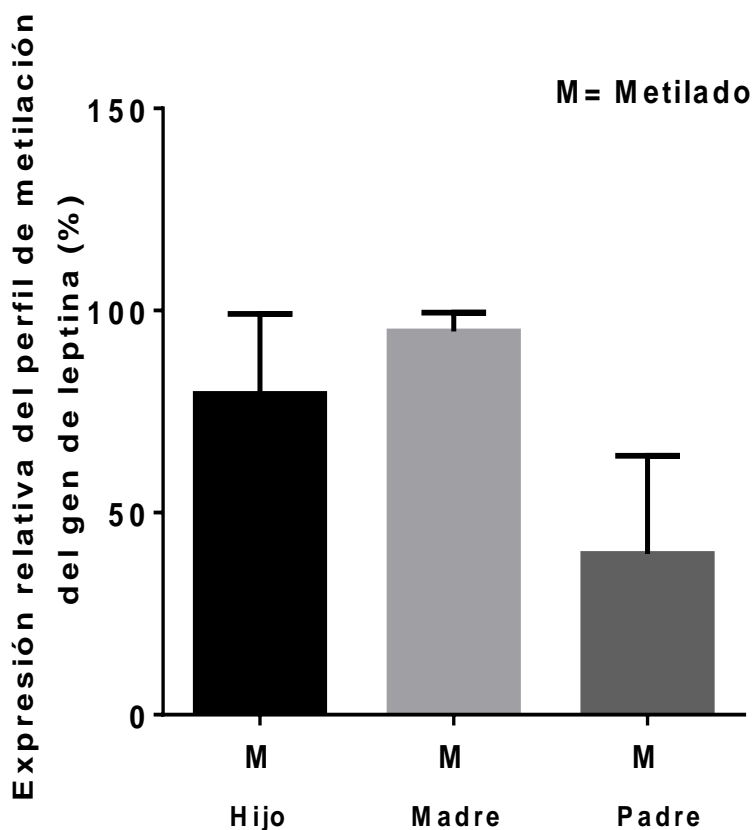
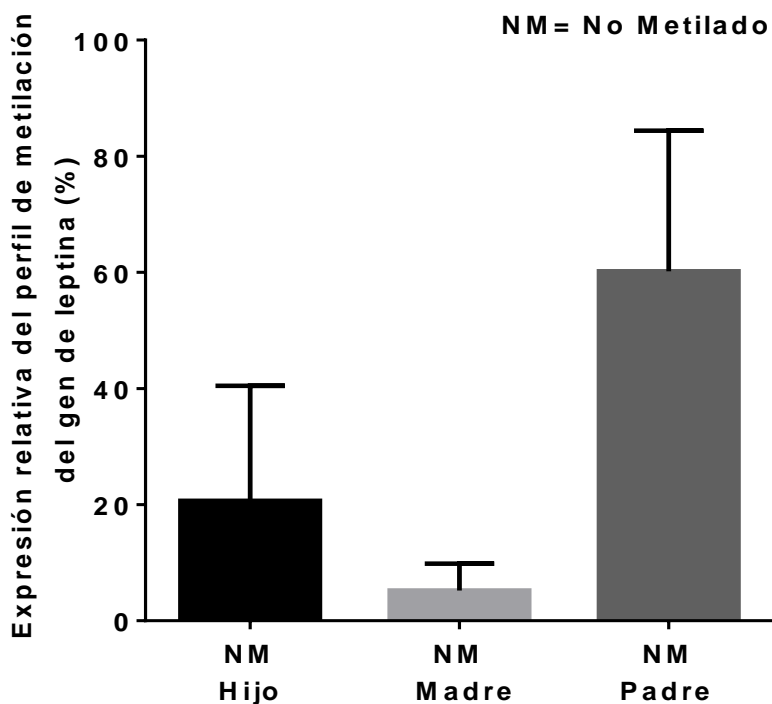


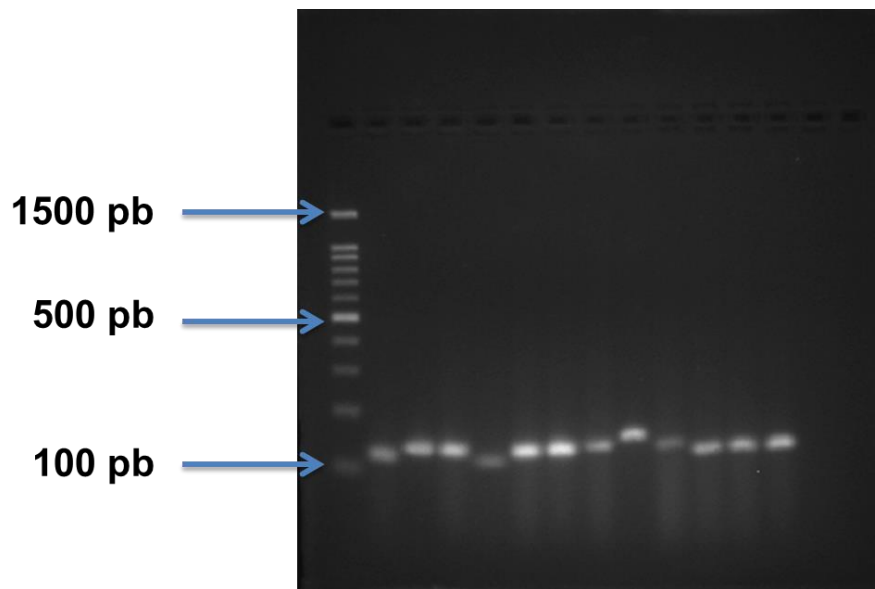
Figura XXX. Expresión relativa del perfil de metilación del gen de leptina (*LEP*) en el grupo de familias con hijos obesos.



“ESTUDIO DEL PERFIL DE METILACIÓN DEL GEN DE LEPTINA (*LEP*) EN PADRES E HIJOS CON OBESIDAD Y SOBREPESO”

Amplificación de los productos de PCR, después del tratamiento con bisulfito de sodio.

Figura 21. Amplificación de los productos de PCR, después del tratamiento con bisulfito de sodio. Carril izquierdo: marcador de peso molecular de ADN de 100-1500 pb; carril 1-6 producto de amplificación de PCR de muestras metiladas; carril 7-12 producto de amplificación de PCR de muestras no metiladas.



Se realizó la amplificación de todos los productos de PCR para corroborar que no hubiera productos inespecíficos de amplificación. También se realizó la curva melting al final de cada corrida de PCR.

“ESTUDIO DEL PERFIL DE METILACIÓN DEL GEN DE LEPTINA (*LEP*) EN PADRES E HIJOS CON OBESIDAD Y SOBREPESO”

9. Discusión

Nuestros resultados mostraron que los niveles de triglicéridos, colesterol, ácido úrico, glucosa, insulina, así como el índice HOMA no presentan diferencias significativas entre padres e hijos, sin embargo se encontró que los niveles de HDL tienden a disminuir en el grupo de adolescentes obesos con respecto a los no obesos, esta diferencia se ha reportado en diversos estudios (Moreno LA *et al.*, 2002) y se ha asociado en cambios en las adipocinas, principalmente la leptina (Wang and Peng, 2011).

Por otra parte, el análisis de los niveles de leptina nos mostró que estos valores tienden a aumentar principalmente en sobrepeso, se ha reportado que los niveles de leptina aumentan con base al grado de obesidad, debido al hecho de que la leptina es producida por el adipocito, y su secreción depende de la cantidad de grasa corporal total, que se ve incrementada en los individuos obesos (Garaulet M, *et al.*, 2000; J. A. Greenberg, *et al.*, 1999; Fahim Abbasi, *et al.*, 2000), por lo cual en los grupos de sobrepeso y obesidad tienden a ser mas marcados los cambios que en los controles.

Interesantemente cuando analizamos la evaluación de los perfiles de metilación observamos que siempre existe una proporción de metilación en todos los grupos; se ha descrito que las metilaciones se presentan de manera basal en diferentes genes (Schroeder I. Diane, *et al.*, 2015), lo cual va de acuerdo a nuestros datos, por otra parte observamos que la metilación tiende a ser mayor en los grupos controles y ésta disminuye conforme aumenta el peso. Por lo cual nuestros datos del perfil de metilación están relacionados de manera inversa con los niveles de leptina, coincidiendo con los resultados obtenidos por otros autores (García-Cardona *et al.*, 2014).

La metilación de genes es un fenómeno que nos permite disminuir la expresión de la transcripción, lo cual se ve reflejado en la síntesis de diversas proteínas, en el caso de leptina su gen presenta sitios susceptibles a metilarse, estudios previos en la región promotora del gen de leptina en humanos han demostrado que contiene un conjunto de 32 sitios CpG susceptibles de metilación (Melzner Ingo, *et al.*, 2002), nuestro trabajo confirma que esos sitios son importantes

“ESTUDIO DEL PERFIL DE METILACIÓN DEL GEN DE LEPTINA (*LEP*) EN PADRES E HIJOS CON OBESIDAD Y SOBREPESO”

para la transcripción debido a que los niveles plasmáticos tienden a disminuir conforme aumenta el grado de metilación y por el contrario en los pacientes obesos esta metilación disminuye, reflejándose en un aumento en los niveles de leptina.

El perfil de metilación es un marcador de herencia entre padres e hijos, en nuestro trabajo analizamos si el grado de metilación entre los hijos presentaban relación con el grado de metilación entre los padres, encontrando que a pesar de que nuestros resultados sugieren que los padres están aportando parte del perfil de metilación, no podemos descartar que los factores ambientales también estén generando cambios en estos perfiles de los hijos.

La transferencia de la metilación entre padres e hijos se ha descrito en los últimos años y actualmente se sabe que estos patrones de metilación pueden ser heredables (Zhang *et al.*, 2013), con base a esto podemos sugerir que el perfil de metilación del gen de leptina puede ser dependiente de los padres y que el desbalance en los niveles de leptina sea resultado del grado de obesidad.

10. Conclusiones

En los últimos años ha habido un creciente interés en estudiar el papel de las modificaciones epigenéticas relacionadas con la obesidad y las enfermedades metabólicas asociadas. Nuestros resultados muestran que existe una regulación metabólica diferente en la leptina de pacientes obesos y no obesos, apoyando la idea de que las modificaciones epigenéticas podrían participar en el desarrollo de la obesidad. Podemos concluir lo siguiente:

1. El gen de leptina es susceptible a metilación en la región -223 nt, -111 nt río arriba del promotor.
2. La metilación del gen de leptina produce disminución de la síntesis de leptina, la cual sugiere podría ser uno de los mecanismos principales en el control de la síntesis de leptina.
3. La herencia del perfil de metilación se presenta debido a las familias pero no descartamos que también sea debido a cambios ambientales.

“ESTUDIO DEL PERFIL DE METILACIÓN DEL GEN DE LEPTINA (*LEP*) EN PADRES E HIJOS CON OBESIDAD Y SOBREPESO”

11. Referencias Bibliográficas

1. Bouchard L, Thibault S, Guay SP, Santure M, Monpetit A, St-Pierre J, Perron P and Brisson D. Leptin Gene epigenetic adaptation to impaired glucose metabolism during pregnancy. *Diabetes Care*. 2010; 33: 2436
2. Carone BR, et al. Paternally induced transgenerational environmental reprogramming of metabolic gene expression in mammals. *Cell*. 2010; 143:1084–1096.
3. Davis CD, Uthus EO. DNA methylation, cancer susceptibility, and nutrient interactions. *Exp Biol Med (Maywood)* 2004; 229:988-95
4. Delcuve GP, Rastegar M, Davie JR. Epigenetic control. *J Cell Physiol* 2009;219:243-50.
5. Fahim Abbasi, et al. Plasma insulin concentration is More tightly linked to plasma leptin concentration than is the body mass index. *Metabolism*, vol 49, No 4 (April), 2000: pp 544-547
6. Franco R, Schoneveld O, Georgakilas AG, Panayiotidis MI. Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. *Cancer Lett* 2008; 266: 6-11.
7. Friedman, J. M. (2004). Modern science versus the stigma of obesity. *Nat Med*, 10(6), 563-569. doi:10.1038/nm0604-563
8. Garaulet M, PYrez-Llamas F, Fuente T, Zamora S, Tebar FJ. Anthropometric, computed tomography and fat cell data in an obese population: Relationship with insulin, leptin, tumor necrosis factor-alpha, sex hormone binding globulin and sex hormones. *Eur J Endocrinol* 2000; 143: 657–666.

“ESTUDIO DEL PERFIL DE METILACIÓN DEL GEN DE LEPTINA (*LEP*) EN PADRES E HIJOS CON OBESIDAD Y SOBREPESO”

9. Greenberg J. A, *et al.* The leptin-fat ratio is constant, and Leptin may be part of two feedback mechanisms for maintaining the body fat set point in non-obese male fischer 344 rats. *Horm Metab Res* 1999; 31: 525—532
10. Hinney, A., Vogel, C. I., & Hebebrand, J. (2010). From monogenic to polygenic obesity: recent advances. *Eur Child Adolesc Psychiatry*, 19(3), 297-310. doi:10.1007/s00787-010-0096-6
11. Lopez, K. N., & Knudson, J. D. (2012). Obesity: from the agricultural revolution to the contemporary pediatric epidemic. *Congenit Heart Dis*, 7(2), 189-199. doi:10.1111/j.1747-0803.2011.00618.x
12. Marina Bibikova, *et al.*, High-throughput DNA methylation profiling using universal bead arrays. *Genome Res.* 2006 16: 383-393. doi:10.1101/gr.4410706.
13. Melzner Ingo, *et al.*, Leptin gene expression in human preadipocytes is switched on by maturation-induced demethylation of distinct CpGs in its proximal promoter. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, No. 47, Issue of November 22, pp. 45420–45427, 2002.
14. Michael W.Y. Chan, *et al.*, Hypermethylation of 18S and 28SRibosomal DNAs Predicts Progression-Free Survival in Patients with Ovarian Cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11(20) October 15, 2005.
15. Milagro, F. I., Mansego, M. L., De Miguel, C., & Martinez, J. A. (2013). Dietary factors, epigenetic modifications and obesity outcomes: progresses and perspectives. *Mol Aspects Med*, 34(4), 782-812. doi:10.1016/j.mam.2012.06.010
16. Moore, L. D., Le, T., & Fan, G. (2013). DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*, 38(1), 23-38. doi:10.1038/npp.2012.11

“ESTUDIO DEL PERFIL DE METILACIÓN DEL GEN DE LEPTINA (*LEP*) EN PADRES E HIJOS CON OBESIDAD Y SOBREPESO”

17. Moreno LA *et al.* Metabolic Syndrome in Children · Horm Metab Res 2002; 34:394–399.
18. Niehrs C. Active DNA demethylation and DNA repair. *Differentiation*. 2009;77:1-11.
19. Jiang MH, Fei J, Lan MS, Lu ZP, Liu M, Fan WW, et al. Hypermethylation of hepatic Gck promotor in ageing rats contributes to diabetogenic potential. *Diabetologia* 2008; 51: 1525-33.
20. Lim JP and Brunet A. Bridging the transgenerational gap with epigenetic memory. *Trends Genet*. 2013;29:176-186.
21. Prins JB, Adipose tissue as an endocrine organ. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2002;16 (4):639-51
22. Shahrzad S, Bertrand K, Minhas K, Coomber BL. Induction of DNA hypomethylation by tumor hypoxia. *Epigenetics* 2007; 2: 119-25.
23. Susan J Clark, Aaron Statham, Clare Stirzaker¹, Peter L Molloy & Marianne Frommer., (2006) DNA methylation: Bisulphite modification and analysis. *Nature Protocols* Vol 1, No. 5. doi:10.1038/nprot.2006.324
24. Stenvinkel P, Karimi M, Johansson S, Axelsson J, Suliman M, Lindholm B, et al. Impact of inflammation on epigenetic DNA methylation – a novel risk factor for cardiovascular disease? *J Intern Med* 2007; 261: 488-99.
25. Thaler R, Karlic H, Rust P, Haslberger AG. Epigenetic regulation of human buccal mucosa mitochondrial superoxide dismutase gene expression by diet. *Br J Nutr* 2009; 101:743-9.
26. Wang and Peng, New insights into the mechanism of low highdensity lipoprotein cholesterol in obesity. *Lipids in Health and Disease* 2011, 10:176.
27. Zhang et al., Fatty acid binding protein 3 (*fabp3*) is associated with insulin, lipids and cardiovascular phenotypes of the metabolic syndrome

“ESTUDIO DEL PERFIL DE METILACIÓN DEL GEN DE LEPTINA (*LEP*) EN PADRES E HIJOS CON OBESIDAD Y SOBREPESO”

through epigenetic modifications in a northern european family population. *BMC Medical Genomics* 2013, 6:9

12. Anexo

12.1. Protocolo de extracción y purificación de ADN por el método de fenol-cloroformo.

La aplicación de técnicas moleculares inicia con la extracción de ADN y la obtención exitosa de datos confiables y reproducibles depende, en gran medida, de la extracción de ADN íntegro y puro. La extracción consiste en el aislamiento y purificación del ADN y se basa en las características fisicoquímicas de la molécula. La mayoría de los protocolos de extracción del ADN se basan en la lisis celular en la cual se libera el ADN en una fase acuosa que es separada de los restos celulares por centrifugación. Las proteínas son removidas de la fase acuosa con solventes orgánicos (fenol-cloroformo). El ADN, que permanece en la fase acuosa, precipita junto al etanol, posteriormente es purificado y resuspendido en un buffer adecuado para su almacenamiento.

A continuación se describe de forma detallada el protocolo de extracción y purificación del ADN a partir de sangre total:

1. Extraer la sangre total en un tubo de ensayo usando EDTA como anticoagulante.
2. Colocar en un tubo eppendorf de 2 mL 800 μ L de sangre total y agregar 800 μ L de buffer RCBL, vortexear y congelar durante 5 minutos.
3. Centrifugar 2 min a 13 000 rpm.
4. Quitar 800 μ L de muestra de arriba hacia abajo y desecharla.
5. A los 800 μ L de sangre centrifugada, agregar 800 μ L de buffer SSC 1X, vortexear y centrifugar durante 2 min a 13 000 rpm.
6. Remover el sobrenadante por decantación suave.
7. Al fondo quedará un pellet rojo, a éste agregar 800 μ L de buffer SSC 1X y vortexear hasta que esté uniforme la solución.
8. Centrifugar 2 min a 13 000 rpm y remover el sobrenadante decantando suavemente.
9. Al pellet formado, agregar 800 μ L de buffer SSC 1X, centrifugar 2 min a 13 000 rpm y retirar el sobrenadante.

“ESTUDIO DEL PERFIL DE METILACIÓN DEL GEN DE LEPTINA (*LEP*) EN PADRES E HIJOS CON OBESIDAD Y SOBREPESO”

10. Continuar lavando hasta que el pellet se vea blanco.
11. Resuspender el pellet en 886 μ L NaCl 5 mM, mezclando con la punta de la pipeta.
12. Agregar a cada tubo 46 μ L de SDS al 10%. Agitar el tubo vigorosamente.
13. Adicionar 308 μ L de NaCl 7 M saturado, agitar vigorosamente y centrifugar 25 min a 13 000 rpm.
14. Transferir el sobrenadante por decantación a otro tubo nuevo y agregar 250 μ L de cloroformo-fenol-alcohol isoamílico (25:24:1), agitar vigorosamente hasta obtener una coloración de color blanco.
15. Centrifugar a 13 000 rpm por 6 min.
16. Transferir el sobrenadante con pipeta a otro tubo eppendorf nuevo, cuidando de no romper la capa de extracción fenólica, evitando que se mezclen las fases.
17. Una vez transferido el sobrenadante, agregar 250 μ L de cloroformo-fenol-alcohol-isoamílico, centrifugar 6 min a 13 000 rpm y transferir el sobrenadante a otro tubo nuevo.
18. Agregar al sobrenadante transferido 1 volumen de isopropanol frío y agitar suavemente por inversión.
19. Centrifugar a 13 000 rpm 6 min y retirar el sobrenadante cuidando que no se vaya el pellet que estará en el fondo.
20. Lavar el pellet con 200 μ L de etanol al 70% dos veces, centrifugando a 13 000 rpm durante 6 min. Dejar secar durante 20 minutos cuidando que no se contamine con aire o polvo.
21. Resuspender el pellet con 20 μ L de agua grado PCR, el volumen agregado variará dependiendo del tamaño del pellet.
22. Cuantificar y determinar la pureza en el nanofotómetro.
23. Almacenar el ADN a una temperatura de -20 °C.

“ESTUDIO DEL PERFIL DE METILACIÓN DEL GEN DE LEPTINA (*LEP*) EN PADRES E HIJOS CON OBESIDAD Y SOBREPESO”

12.2 Protocolo de modificación del ADN con bisulfito de sodio.

La metilación del ADN es una importante modificación epigenética del ADN en los genomas de mamíferos. Los patrones de metilación son establecidos tempranamente en el desarrollo, modulado durante la diferenciación tejido-específico y alterado en muchos estados patológicos, incluidos el cáncer. Para comprender mejor las funciones biológicas de estos cambios, se requieren métodos precisos y reproducibles para analizar completamente la secuencia de metilación del ADN. El presente protocolo de conversión con bisulfito “gold-standard” puede ser usado para re-secuenciar el ADN de células de mamíferos con el fin de determinar y cuantificar el estado de metilación de un gen o región genómica en la resolución de un sólo nucleótido (J Clark Susan, *et al.*, 2006).

La conversión del ADN con bisulfito de sodio comprende los siguientes pasos:

a) DESNATURALIZACIÓN

1. Desnaturalizar el ADN genómico (que ha sido previamente resuspendido en agua o buffer de ADN) en un tubo de 1.5 mL agregando 2 μ L de NaOH 3M a 18 μ L de ADN para hacer un volumen final de 20 μ L.
2. Incubar las muestras a 37 °C por 15 minutos, seguido de una incubación a 90°C por 2 minutos e inmediatamente colocar el tubo en hielo por 5 minutos para asegurar que los remanentes de DNA queden desnaturalizados.
3. Centrifugar los tubos a 4 °C por 10 segundos a 10, 000 g.

b) SULFONACIÓN Y DESAMINACIÓN HIDROLÍTICA

4. Agregar lo siguiente a la muestra de DNA desnaturalizada, inmediatamente después de la centrifugación:

“ESTUDIO DEL PERFIL DE METILACIÓN DEL GEN DE LEPTINA (*LEP*) EN PADRES E HIJOS CON OBESIDAD Y SOBREPESO”

Tabla 8. Reactivos usados para la conversión con bisulfito de sodio.

	Cantidad
DNA desnaturalizado (100 ng-2 ug)	20 μ L
Metabisulfito de sodio pH 5.0	208 μ L
Hidroquinona 10 mM	12 μ L
Aceite mineral	200 μ L

5. Mezclar suavemente todos los reactivos, centrifugar por 10 segundos e incubar a 55 °C en un baño de agua con tapa, de 4-16 h.
6. Después de la incubación, centrifugar brevemente por 10 segundos y remover. Desechar el aceite mineral que está en la fase superior.

c) DESALINIZACIÓN Y DESULFONACIÓN ÀLCALI

El paso de desalinización es para remover los iones del bisulfito y el paso de alcalinización es requerida para completar exitosamente la conversión del bisulfito.

7. Agregar 1 mL de resina DNA clean-up (Promega Wizard, número de catálogo: A7170).
8. Mezclar suavemente por inversión para unir el DNA a la suspensión de gel de sílice.
9. Pipetear dentro de la jeringa de 3 mL unida a una columna Wizard.
10. Insertar el émbolo y presionar lentamente a través de la resina mix.
11. Quitar la jeringa de la minicolumna y remover el émbolo.
12. Volver a colocar el cilindro de la jeringa y lavar con 2 mL de isopropanol al 80%, preparado recientemente.
13. Remover el cilindro de la jeringa y transferir la minicolumna a un tubo de microcentrífuga.
14. Dar un spin en un tubo de microcentrífuga por 2 minutos para secar la resina.
15. Transferir la minicolumna a un nuevo tubo de microcentrífuga. Agregar 50 μ L de H₂O a la minicolumna.
16. Dejar a temperatura ambiente por 5 minutos.

“ESTUDIO DEL PERFIL DE METILACIÓN DEL GEN DE LEPTINA (*LEP*) EN PADRES E HIJOS CON OBESIDAD Y SOBREPESO”

17. Dar un spin por 20 segundos para coleccionar el eluente. Desechar la minicolumna.
18. Desulfonar por adición de 5.5 μL de NaOH 3 M.
19. Incubar a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos.
20. Centrifugar brevemente y agregar 1 μL tRNA (10 mg mL⁻¹).
21. Agregar 33.3 μL de acetato de amonio 5M pH 7.0
22. Agregar 330 μL de etanol 100% frío (-20 $^{\circ}\text{C}$).
23. Mezclar por inversión y dejar a -20 $^{\circ}\text{C}$ durante al menos 1 hora o durante toda la noche para precipitar el DNA.
24. Centrifugar a 14,000 g por 15 minutos a 4 $^{\circ}\text{C}$.
25. Remover los residuos del sobrenadante y secar al aire por 20 minutos.
26. Resuspender el pellet de DNA en 50 μL de buffer de DNA o H₂O a temperatura ambiente por ~2 horas con vortexeo ocasional para asegurarse que el DNA se disuelva y después usarlo en la amplificación por PCR o bien, almacenarlo a -20 $^{\circ}\text{C}$.

12.3 Protocolo de amplificación del ADN por PCR, Takara Espicope MSP Kit.

12.3.1 Descripción

El kit EpiScope MSP (cat. 3100A, kit presentación: 200 reacciones marca: TAKARA) es un reactivo de PCR diseñado exclusivamente para el análisis de PCR por metilación específica (MSP). Una enzima específica combinada con un buffer optimizado permite el análisis MSP usando un templado de ADN tratado con bisulfito conteniendo uracilos. Este kit proporciona una habilidad ampliamente mejorada para diferenciar regiones metilado/no metilado en comparación con los reactivos tradicionales de PCR. El sistema de la reacción ha sido optimizado para monitoreo en tiempo real usando SYBR Green I, y permite realizar tanto PCR en tiempo real como detección de punto final bajo las mismas condiciones de reacción.

12.3.2 Fundamento del MSP

El primer paso es identificar una región nucleotídica cuya secuencia está sujeta a cambio por tratamiento con bisulfito dependiendo del estado de metilación de la secuencia CpG. A continuación, el diseño de dos primers para esta región, uno para el ADN de CpG metilado (primer M) y el otro para el ADN no metilado (primer UM). El último paso es la amplificación por PCR.

“ESTUDIO DEL PERFIL DE METILACIÓN DEL GEN DE LEPTINA (*LEP*) EN PADRES E HIJOS CON OBESIDAD Y SOBREPESO”

Figura 22. Principio del MSP



12.3.3 Composición de la reacción para PCR (50 μ L)

La composición de la reacción es la misma para PCR en tiempo real y detección en punto final (para confirmar la presencia o ausencia de amplificación por electroforesis).

NOTA: Incluso para las detecciones de punto final, asegurarse de agregar SYBR Green I 100X.

Tabla 9. Composición de la reacción para PCR.

Componentes	Cantidad	Concentración final
2X MSP Buffer	25 μ l	1X
PCR forward primer	15 pmol	0.3 μ M
PCR reverse primer	15 pmol	0.3 μ M
100X SYBR® Green I	0.5 μ l	1X
MSP Enzima	1.2 μ l	
ROX Reference Dye (50X) or Dye II (50X)	1 μ l	1X ^{*1}
Templado	<5 μ l	
dH2O (agua destilada estéril)	Hasta 50 μ l ^{*2}	

***1:** Este componente es usado para análisis usando un dispositivo que corrige señales fluorescentes entre pozos como lo es el equipo de PCR en tiempo real

“ESTUDIO DEL PERFIL DE METILACIÓN DEL GEN DE LEPTINA (*LEP*) EN PADRES E HIJOS CON OBESIDAD Y SOBREPESO”

de Life Technologies. Usar ROX Reference Dye para StepOnePlus o ROX Reference Dye II para sistema de PCR en tiempo real 7500. Este componente no se requiere con Thermal Cycler Dice Real Time System II; tampoco es requerido para la detección en punto final por electroforesis.

***2:** Cambiar el volumen de reacción adecuadamente de acuerdo con el volumen recomendado para cada dispositivo de PCR.

12.3.4 Condiciones de la PCR

Las condiciones de PCR son las mismas para tiempo real y punto final.

Tabla 10. Condiciones de la reacción para PCR.

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95 °C	30 s	
98 °C	5 s	40-45
55 °C	30 s	40-45
72 °C	1 min	40-45
Análisis de curva melting para PCR en tiempo real.		

NOTA: La enzima MSP suministrada en este kit es una enzima de PCR hot-start que utiliza un anticuerpo anti-Taq que inhibe la actividad de la polimerasa. No realizar la activación de 5-10 min a 95 °C antes de la reacción de PCR que se requiere con otras enzimas hot start modificadas químicamente por otras compañías. El tratamiento térmico innecesario tiende a reducir la actividad enzimática y afecta la eficiencia de la amplificación. Incluso para la desnaturalización inicial del templado, 95 °C por 30 segundos es generalmente suficiente.

Después del término de la reacción, realizar el análisis necesario para PCR en tiempo real o una electroforesis en agarosa para la detección en punto final. Después de la electroforesis, se tiñe el gel de la manera habitual, por ejemplo con una tinción de bromuro de etidio.

“ESTUDIO DEL PERFIL DE METILACIÓN DEL GEN DE LEPTINA (LEP) EN PADRES E HIJOS CON OBESIDAD Y SOBREPESO”

12.4 Carta de consentimiento informado para niños (as) menores de 18 años.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

(Los niño-as menores de 18 años)

“Asociación del perfil de metilación de los genes que codifican para las adipocinas con la resistencia a la insulina en adolescentes obesos y en sus familias”

Nombre del niño (a): _____

Fecha: _____

Nº del niño(a) del estudio: _____

Relación con el niño (a): _____ Yo mismo; _____ Hermano(a)

Recientemente, se ha descrito que el desarrollo de sobrepeso y obesidad pudiera estar influenciado no sólo por el estilo de vida y la genética sino también por otras alteraciones llamadas alteraciones epigenéticas, las cuales pueden modificar el DNA predisponiendo a la aparición de sobrepeso y obesidad y de otras enfermedades. El **objetivo** es investigar si los cambios epigenéticos de los padres pudieran ser transmitidos a sus hijos, incrementando el riesgo de sufrir obesidad.

La obesidad es considerada una enfermedad y nuestro país ocupa el primer lugar en obesidad en adultos y cada vez son más los niños y adolescentes que la padecen, es por ello que se **justifica** la realización de este estudio. La obesidad favorece la aparición de enfermedades como Diabetes mellitus, hipertensión, enfermedades del corazón e incluso, algunos tipos de cáncer. El **85%** de los niños y adolescentes que tengan sobrepeso u obesidad, serán adultos obesos, es por ello que es de vital interés tratar de disminuir esta condición en los niños y adolescentes.

¿Por qué se está haciendo este estudio? El propósito del estudio es medir, en tu sangre la cantidad de las sustancias producidas por el tejido graso y relacionarlas con el estado genético correspondiente.

“ESTUDIO DEL PERFIL DE METILACIÓN DEL GEN DE LEPTINA (LEP) EN PADRES E HIJOS CON OBESIDAD Y SOBREPESO”

¿Qué procedimientos se me realizarán? Se te pedirá que asistas a dos citas. En la primera cita, preguntaremos por tus datos generales para una historia clínica, antecedentes personales de enfermedad, mediremos tu peso, talla y pliegues cutáneos, presión arterial, frecuencia cardíaca.

En la segunda vista (2 a 7 días después de la primera vista), se tomará una muestra de sangre (10 mililitros) en ayunas para que podamos medir cantidad de grasa en tus células sanguíneas (colesterol, triglicéridos), además de insulina, glucosa, sustancias relacionadas a la obesidad y extracción de DNA.

¿Qué me puede pasar? Durante la toma de muestra de sangre pudieras sentir algo de dolor o molestia ocasionada por la aguja en tu vena, y a veces llega a formarse un pequeño moretón en el sitio de la inserción. Rara vez llega a ocurrir una pequeña hemorragia en el sitio por el que penetra la aguja en la vena.

¿Qué beneficios obtengo por participar en este estudio?

Si decides participar, de manera voluntaria, la consulta médica y todos los estudios que te realicemos serán gratis. Es muy importante decirte que **NO** te daremos ningún estímulo económico o de otro tipo. Así mismo, los registros de participación en este estudio serán mantenidos en una forma de estricta confidencialidad y de seguridad.

NO estas obligado a participar, bajo ninguna condición. Si en algún momento decides no hacerlo, antes de iniciar o durante el procedimiento, solo indícalo al personal. Esto no te causara ningún reproche o sanción alguna.

Yo (**Padre, Madre o tutor**) _____,
he leído y entendido toda la información referente al estudio de investigación. Por lo anterior, consiento que mi hijo (a):
_____,
participe voluntariamente en este estudio y los estudios que deriven de él o ella.

“ESTUDIO DEL PERFIL DE METILACIÓN DEL GEN DE LEPTINA (LEP) EN PADRES E HIJOS CON OBESIDAD Y SOBREPESO”

Que puedo retirarme en cualquier momento sin perjuicio o pérdida de cualquier beneficio y cualquier pregunta que yo tenga relacionada con algún aspecto de este estudio o con mis derechos como persona en investigación, será contestado por la **Dra. Blanca Estela Del Rio Navarro (Méd. Alergólogo, Jefa del Área de Alergia e Investigadora Suplente) al 52289917 ext. 2150).**

Datos adicionales del niño (a):

Dirección: _____

Calle

Número

Colonia o fraccionamiento

Código Postal

Teléfono: _____

Nombre y firma del niño(a) fecha

--/--/----

Fecha: dd/mm/aaaa

Nombre y firma del padre o tutor fecha:

--/--/----

Fecha: dd/mm/aaaa

Nombre y firma del Investigador fecha:

--/--/----

Fecha: dd/mm/aaaa

--/--/----

Fecha: dd/mm/aaaa

Nombre y firma del testigo 1 _____

Dirección: _____

Relación con el paciente: _____

--/--/----

Fecha: dd/mm/aaaa

Nombre y firma del testigo 1 _____

Dirección: _____

Relación con el paciente: _____

“ESTUDIO DEL PERFIL DE METILACIÓN DEL GEN DE LEPTINA (LEP) EN PADRES E HIJOS CON OBESIDAD Y SOBREPESO”

12.5 Carta de consentimiento informado para personas mayores de 18 años.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO
(Miembro de la familia con edad mayor a 18 años)

“Asociación del perfil de metilación de los genes que codifican para las adipocinas con la resistencia a la insulina en adolescentes obesos y en sus familias”

Nombre del niño (a): _____

Fecha: _____

Nº del niño(a) del estudio: _____

Relación con el niño(a): _____ Yo mismo; _____ Hermano(a)

Recientemente, se ha descrito que el desarrollo de sobrepeso y obesidad pudiera estar influenciado no sólo por el estilo de vida y la genética sino también por otras alteraciones llamadas alteraciones epigenéticas, las cuales pueden modificar el DNA predisponiendo a la aparición de sobrepeso y obesidad y de otras enfermedades. El **objetivo** es investigar si los cambios epigenéticos de los padres pudieran ser transmitidos a sus hijos, incrementando el riesgo de sufrir obesidad.

La obesidad es considerada una enfermedad y nuestro país ocupa el primer lugar en obesidad en adultos y cada vez son más los niños y adolescentes que la padecen, es por ello que se **justifica** la realización de este estudio. La obesidad favorece la aparición de enfermedades como Diabetes mellitus, hipertensión, enfermedades del corazón e incluso, algunos tipos de cáncer. El **85%** de los niños y adolescentes que tengan sobrepeso u obesidad, serán adultos obesos, es por ello que es de vital interés tratar de disminuir esta condición en los niños y adolescentes.

¿Por qué se está haciendo este estudio? El propósito del estudio es medir, en tu sangre la cantidad de las sustancias producidas por el tejido graso y relacionarlas con el estado genético correspondiente.

“ESTUDIO DEL PERFIL DE METILACIÓN DEL GEN DE LEPTINA (LEP) EN PADRES E HIJOS CON OBESIDAD Y SOBREPESO”

¿Qué procedimientos se me realizarán? Se te pedirá que asistas a dos citas. En la primera cita, preguntaremos por tus datos generales para una historia clínica, antecedentes personales de enfermedad, mediremos tu peso, talla y pliegues cutáneos, presión arterial, frecuencia cardíaca.

En la segunda vista (2 a 7 días después de la primera vista), se tomará una muestra de sangre (10 mililitros) en ayunas para que podamos medir cantidad de grasa en tus células sanguíneas (colesterol, triglicéridos), además de insulina, glucosa, sustancias relacionadas a la obesidad y extracción de DNA.

¿Qué me puede pasar? Durante la toma de muestra de sangre pudieras sentir algo de dolor o molestia ocasionada por la aguja en tu vena, y a veces llega a formarse un pequeño moretón en el sitio de la inserción. Rara vez llega a ocurrir una pequeña hemorragia en el sitio por el que penetra la aguja en la vena.

¿Qué beneficios obtengo por participar en este estudio?

Si decides participar, de manera voluntaria, la consulta médica y todos los estudios que te realicemos serán gratis. Es muy importante decirte que **NO** te daremos ningún estímulo económico o de otro tipo. Así mismo, los registros de participación en este estudio serán mantenidos en una forma de estricta confidencialidad y de seguridad.

NO estas obligado a participar, bajo ninguna condición. Si en algún momento decides no hacerlo, antes de iniciar o durante el procedimiento, solo indícalo al personal. Esto no te causara ningún reproche o sanción alguna.

Yo (**Padre, Madre o tutor**) _____,
he leído y entendido toda la información referente al estudio de investigación. Por lo anterior, consiento que mi hijo (a):
_____,
participe voluntariamente en este estudio y los estudios que deriven de él o ella.

“ESTUDIO DEL PERFIL DE METILACIÓN DEL GEN DE LEPTINA (LEP) EN PADRES E HIJOS CON OBESIDAD Y SOBREPESO”

Que puedo retirarme en cualquier momento sin perjuicio o pérdida de cualquier beneficio y cualquier pregunta que yo tenga relacionada con algún aspecto de este estudio o con mis derechos como persona en investigación, será contestado por la **Dra. Blanca Estela Del Rio Navarro (Méd. Alergólogo, Jefa del Área de Alergia e Investigadora Suplente) al 52289917 ext. 2150).**

Datos adicionales del niño (a):

Dirección: _____

Calle

Número

Colonia o fraccionamiento

Código Postal

Teléfono: _____

Nombre y firma del niño(a) fecha

--/--/----
Fecha: dd/mm/aaaa

Nombre y firma del padre o tutor fecha:

--/--/----
Fecha: dd/mm/aaaa

Nombre y firma del Investigador fecha:

--/--/----
Fecha: dd/mm/aaaa

--/--/----
Fecha: dd/mm/aaaa

Nombre y firma del testigo 1 _____

Dirección: _____

Relación con el paciente: _____

--/--/----
Fecha: dd/mm/aaaa

Nombre y firma del testigo 1 _____

Dirección: _____

Relación con el paciente: _____

“ESTUDIO DEL PERFIL DE METILACIÓN DEL GEN DE LEPTINA (LEP) EN PADRES E HIJOS CON OBESIDAD Y SOBREPESO”

12.6 Carta de asentimiento informado

CARTA DE ASENTIMIENTO INFORMADO

“Asociación del perfil de metilación de los genes que codifican para las adipocinas con la resistencia a la insulina en adolescentes obesos y en sus familias”

Nombre del Investigador: Fengyang Huang.

Nombre del Investigador suplente: Dra. Blanca Estela Del Rio Navarro.

Nombre del Centro: Hospital Infantil de México Federico Gómez, Dr. Márquez 162, Colonia Doctores, CP 06720. México DF.

Estoy de acuerdo en participar en el estudio descrito en las páginas anteriores que mis padres, tutores o representantes legales han firmado.

La decisión de participar la he tomado por mí mismo(a) y tengo derecho a decidir no seguir participando en cualquier momento del estudio.

Me han explicado en qué consiste, he realizado las preguntas que he querido y me las han respondido.

No tengo la obligación de participar en este estudio si no lo deseo y si deseo interrumpir cualquier prueba en cualquier momento, se lo comunicaré al médico investigador para que la suspenda de inmediato.

Puedo decidir no seguir participando en el estudio por cualquier razón y nadie se enojará conmigo por negarme a participar y seguiré recibiendo atención médica en este Hospital.

Nombre y apellido del paciente: _____

Edad: _____

Firma: _____

Fecha: _____