

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE SALUD PUBLICA Y NUTRICION
LICENCIATURA EN NUTRICION



"FRECUENCIA DEL POLIMORFISMO Q223R DEL
GEN QUE CODIFICA PARA EL RECEPTOR
DE LEPTINA EN NIÑOS CON OBESIDAD
DE MONTERREY, N. L. Y SU AREA
METROPOLITANA"

TESIS

QUE EN OPCION A TITULO DE
LICENCIADO EN NUTRICION

PRESENTAN

LUCRECIA SUSANA CARRERA QUINTANAR
MARIANA MORA DELGADO

MONTERREY, NUEVO LEON

ABRIL DEL 2005

TL

RC628

.C377

2005

c.1



1080170737

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE SALUD PUBLICA Y NUTRICION
LICENCIATURA EN NUTRICION

8 de abril de 2005



QBP. Ana Berenice Medelín Guzmán
Coordinadora de Asesoramiento de
Títulos de Licenciatura en Nutrición

Por lo tanto hago CONSTAR que el proyecto de Tesis de Licenciatura
"Frecuencia del Polimorfismo Q223R del gen que codifica para el receptor de
leptina en niños con obesidad en Monterrey, Nuevo León y su Área Metropolitana"
que aplican las Pasantes de la Licenciatura en Nutrición, Lucrecia Susana Carrera
Quintanar y Mariana Mora Delgado, fue aprobado para su desarrollo e implementación
en el mes de septiembre del 2003 como consta en registro y archivos de esta
Coordinación.

**"FRECUENCIA DEL POLIMORFISMO Q223R DEL
GEN QUE CODIFICA PARA EL RECEPTOR
DE LEPTINA EN NIÑOS CON OBESIDAD
DE MONTERREY, N. L. Y SU AREA
METROPOLITANA"**

TESIS

QUE EN OPCION A TITULO DE
LICENCIADO EN NUTRICION

Lic. Nut. Ana Berenice Medelín Guzmán, MSP
Coordinadora de Investigación

PRESENTAN

LUCRECIA SUSANA CARRERA QUINTANAR
MARIANA MORA DELGADO

MONTERREY, NUEVO LEON

ABRIL DEL 2005







UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN

8 de abril de 2005

QBP. Ana Alicia Alvidrez Morales
Coordinadora del Departamento de
Titulación y Bolsa de Trabajo
Presente. -

Por medio de este conducto hago **CONSTAR** que el proyecto de tesis titulada **"Frecuencia del polimorfismo Q223R del gen que codifica para el receptor de leptina en niños con obesidad en Monterrey, Nuevo León y su Área Metropolitana"** que aplican las Pasantes de la Licenciatura en Nutrición **Lucrecia Susana Carrera Quintanar** y **Mariana Mora Delgado**, fue aprobado para su desarrollo e implementación en el mes de septiembre del 2003 como consta en registro y archivos de esta Coordinación.

Sin otro particular, le reitero mi más alta estima.

Atentamente,
"Alere Flammam Veritatis"

Lic. Nut. Alpha Berenice Medellín Guerrero, MSP
Coordinadora de Investigación



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN

8 de abril de 2005

QBP. Ana Alicia Alvidrez Morales
Coordinadora del Departamento de
Titulación y Bolsa de Trabajo
Presente. -

Por medio de este conducto hago **CONSTAR** que el proyecto de tesis titulada **"Frecuencia del polimorfismo Q223R del gen que codifica para el receptor de leptina en niños con obesidad de Monterrey Nuevo León y su Área Metropolitana"** que desarrollaron las Pasantes de la Licenciatura en Nutrición **Mariana Mora Delgado** y **Lucrecia Susana Carrera Quintanar** ha sido aprobado por el Comité de Tesis de la Facultad de Salud Pública y Nutrición.

Por lo cual solicito a Usted se proceda con lo conducente en estos casos.

Atentamente,
"Alere Flammam Veritatis"

Lic. Nut. Alpha Berenice Medellín Guerrero, MSP
Coordinadora de Investigación



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN

DICTAMEN DEL COMITÉ DE TESIS

Como Miembro del Comité de Tesis de la Facultad de Salud Pública y Nutrición, Apruebo la tesis titulada ***"Frecuencia del polimorfismo Q223R del gen que codifica para el receptor de leptina en niños con obesidad de Monterrey y su Área Metropolitana"*** con la finalidad de obtener el Grado de Licenciatura en Nutrición.

Atentamente,
Monterrey, Nuevo León a 23 de Febrero del 2005
"Alere Flammam Veritatis"

Dr. en C. Zacarías Jiménez Salas
Miembro del Comité de Tesis



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

U A N L



FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN

DICTAMEN DEL COMITÉ DE TESIS

Como Miembro del Comité de Tesis de la Facultad de Salud Pública y Nutrición, Apruebo la tesis titulada ***"Frecuencia del polimorfismo Q223R del gen que codifica para el receptor de leptina en niños con obesidad de Monterrey y su Área Metropolitana"*** con la finalidad de obtener el Grado de Licenciatura en Nutrición.

Atentamente,
Monterrey, Nuevo León a 15 de marzo del 2005
"Alere Flammam Veritatis"

Dr. Eduardo Campos Góngora
Miembro del Comité de Tesis



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN

DICTAMEN DEL COMITÉ DE TESIS

Como Miembro del Comité de Tesis de la Facultad de Salud Pública y Nutrición, Apruebo la tesis titulada ***“Frecuencia del polimorfismo Q223R del gen que codifica para el receptor de leptina en niños con obesidad de Monterrey y su Área Metropolitana”*** con la finalidad de obtener el Grado de Licenciatura en Nutrición.

Atentamente,
Monterrey, Nuevo León a 22 de Febrero del 2005
“Alere Flammam Veritatis”


MC. Blanca Edelia González Martínez
Miembro del Comité de Tesis

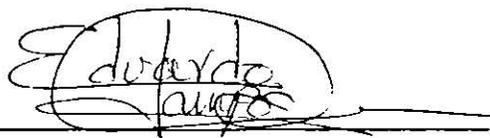
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN
LICENCIATURA EN NUTRICIÓN**

“Frecuencia del polimorfismo Q223R del gen que codifica para receptor de leptina en niños con obesidad de Monterrey, N. L. y su área metropolitana”

**APROBADA
COMITE REVISOR DE TESIS**



Dr. en C. Zacarías Jiménez Salas



Dr. en C. Eduardo Campos Góngora



M. C. Blanca E. González Martínez

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Investigación en Nutriología Básica (LINBA), de la Facultad de Salud Pública y Nutrición, bajo la dirección del Dr. en C. Zacarías Jiménez Salas y la co-dirección del Dr. en C. Eduardo Campos Góngora.

**“FRECUENCIA DEL POLIMORFISMO Q223R DEL GEN
QUE CODIFICA PARA EL RECEPTOR DE LEPTINA EN
NIÑOS CON OBESIDAD DE MONTERREY, N. L. Y SU
ÁREA METROPOLITANA”**

Asesores:

Dr. en C. Zacarías Jiménez Salas

Dr. en C. Eduardo Campos Góngora

Investigadores:

Lucrecia Susana Carrera Quintanar

Mariana Mora Delgado

DEDICATORIA

A mi padre, Héctor Carrera Correa; porque se que estás donde estás te haces siempre presente, sobre todo en la situaciones mas difíciles de mi vida, tu me heredas la fuerza y la inteligencia para continuar pese a tu ausencia. Gracias por llenarme de tu amor!

AGRADECIMIENTOS

A Dios...

Por darme la vida, por la fe que me hace creer que tu eres mi guía, por darme la mas grande de tus bendiciones – mi familia -

A mi Madre...

Susana Quintanar Stephano, gracias por ser la mujer que eres; a ti te agradezco el espíritu de lucha que me inculcaste con tu ejemplo para no darme por vencida a pesar de nuestras circunstancias.

A mis hermanos, tíos, primos, y a la Abuela...

Por estar siempre cerca, pendientes de mi, por darme su amor y respeto. A la Abuela, gracias por que siempre tuve y tendré su bendición que es oro para mi espíritu.

Al Dr. Zacarías Jiménez Salas y al Dr. Eduardo Campos Góngora y QBP. Blanca González...

Que juntos se interesaron por dejarme un aprendizaje tanto profesional como personal, porque sabiamente me han trasmitido su amor al estudio y que generosamente me han dado su riqueza enseñándome el valor de dar. Gracias por los buenos y difíciles momentos, lo cuales dejan en mi una experiencia inolvidable, gracias por su paciencia y por estar siempre pendientes de mi

aprendizaje. Termine esta etapa de mi vida llena de satisfacciones y gran parte ha sido por ustedes.

A mis amigas...

Por aceptarme como soy y por haberse cruzado en mi camino, sin ustedes este sendero se hubiera hecho mas pesado, gracias por el apoyo ilimitado, gracias por los buenos momentos compartidos, las llevare en mi corazón siempre. (Carmen Fuentesvilla, Ania García, Mariana Mora, Marcia Domínguez, Alejandrina Hernández, Rocío Ramirez, Beatriz Escobosa).

A mis compañeros del LINBA, de Análisis Químico y personal de la FaSPyN...

Gracias por tomar parte y estar pendientes de mi trabajo, por su tolerancia y por sus palabras de aliento que fueron de gran ayuda para la conclusión de mi formación universitaria.

A mi compañera de tesis...

Mariana, gracias por ser más que una compañera ¡una amiga!, siempre pendiente de alimentar la amistad y ofreciéndome tu apoyo incondicional.

A una persona especial...

Gracias por cuidarme tanto, por estar pendiente de cada detalle relacionado conmigo y por ser la personas maravillosas que eres.

A todos mi amor y agradecimiento....Siempre.

Dios los bendiga.

Lucrecia Carrera Quintanar

DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado muy especialmente a mis padres el Sr. Luis Mora Reyes y la Sra. Ma. Gpe. Delgado Gzz. que estuvieron al pendiente de mi trabajo. Pero en especial por que han estado al pendiente de todo en mi vida, apoyándome en todo y dándome ánimos siempre que lo necesito. GRACIAS!

AGRADECIMIENTOS

Durante el recorrido de esta investigación recibí el apoyo de un sin numero de personas, que siempre estuvieron dispuestas a ayudarme y orientarme para poder concluir con esta tarea, entre ellas están principalmente:

Dios, que me dio la paciencia para terminar esta gran carga.

Mis padres el Sr. Luis Mora Reyes y la Sra. Ma. Gpe. Delgado Gzz. que me apoyaron y estuvieron conmigo en todo momento.

Mis hermanas Marisol y Minerva Mora Delgado, que se preocupaban y estaban al pendiente de mi trabajo.

Mis profesores el Dr. Zacarías Jiménez Salas, el Dr. Eduardo Campos Góngora y la candidata a doctora Blanca González Martínez, que estuvieron siempre a mi lado apoyándome. Gracias por enseñarme todo lo que ahora se.

El Dr. Ricardo Cerda, Jefe del área de genética en el Centro de Investigación Biomédicas del Noreste, por trasmitirme sus conocimientos para mejora de mi trabajo.

El QBP. José Gaspar miembro del Centro de Investigación Biomédicas del Noreste por ayudarme, apoyarme y enseñarme, gracias por ser más que un compañero, un amigo.

Mi compañera de tesis por ser tan comprensiva, paciente, por ayudarme y ser mas que una amiga, gracias.

Todo el personas de la FaSPyN que estuvieron al pendiente de mi trabajo, alentándome cuando más lo necesite.

A mis amigos (a) por darme su apoyo y ánimo en todo momento.

GRACIAS POR TODO

Mariana Mora Delgado

ÍNDICE

	Página
Abreviaturas	i
Resumen	iii
Introducción	iv
I. Problema a Investigar	1
1.1 Delimitación del problema.....	1
1.2 Justificación.....	2
1.3 Objetivos.....	4
II. Marco Teórico	5
2.1 Obesidad.....	5
2.2 Causas de la Obesidad.....	6
2.3 Leptina y su receptor como responsables de la ingesta dietética y el gasto energético.....	8
2.4 Receptor de Leptina	12
2.5 Polimorfismos del gen LEPR.....	14
III. Hipótesis	19
3.1 Estructura.....	19
3.2 Desarrollo	19
IV. Diseño	20
4.1 Metodológico.....	20
4.1.1 Tipo de estudio.....	20
4.1.2 Unidades de observación.....	20
4.1.3 Temporalidad.....	20
4.1.4 Ubicación espacial.....	20
4.1.5 Criterios de inclusión y exclusión.....	20

4.2 Estadístico.....	22
4.2.1 Marco Muestral.....	22
4.2.2 Tamaño Muestral.....	22
4.2.3 Tipo de Muestreo.....	22
4.2.4 Análisis Estadístico.....	22
4.3 Calendarización.....	23
V. Material y Métodos.....	24
5.1 Material.....	24
5.1.1 Consentimiento Informado.....	24
5.1.2 Área de trabajo.....	24
5.1.3 Material Biológico.....	24
5.1.4 Reactivos Químicos.....	24
5.1.5 Material y Equipo.....	25
5.2 Métodos.....	27
5.2.1 Estrategia General.....	27
5.2.2 Extracción de ADN genómico.....	28
5.2.3 Amplificación del fragmento de la región que contiene la mutación Q223R en el exón 4 por medio de PCR.....	30
5.2.4 Análisis del Polimorfismo Q223R.....	31
5.2.5 Electroforesis.....	32
5.2.6 Estadística.....	33
IV. Resultados.....	34
6.1 Descripción de la población.....	34
6.2 Estandarización de técnicas moleculares.....	34
6.2.1 Estandarización de la reacción de PCR.....	34

6.2.2 Digestión del producto amplificado por PCR.....	35
6.3 Análisis del polimorfismo Q223R del gen LEPR.....	36
6.4 Análisis estadístico de los resultados.....	38
VII. Discusión.....	42
VIII. Conclusiones.....	51
IX. Bibliografía.....	52

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura	Página
1. Causas de obesidad.....	5
2. Efecto de la leptina en la regulación de la ingesta dietética y el gasto energético.....	9
3. Función de neuropéptidos involucrados en el funcionamiento de la hormona leptina y su receptor.....	11
4. Polimorfismos del gen que codifica para el receptor de leptina en humanos.....	15
5. Diagrama de la estrategia general empleada en este trabajo.....	27
6. Electroforesis en gel de agarosa al 3% de productos amplificados por PCR.....	35
7. Electroforesis en gel de agarosa al 3.5% de las digestiones de los productos de PCR con <i>MspI</i>	37
8. Porcentaje de distribución de los alelos A y G del polimorfismo Q223R del gen del receptor de leptina en niños de 6 – 12 años en Monterrey, N. L. y su área metropolitana.....	38
9. Distribución de los diferentes genotipos del polimorfismo Q223R del gen del receptor de leptina en niños de 6 – 12 años en Monterrey, N. L. y su área metropolitana.....	39
10. Comparación de la distribución de alelos del polimorfismo	
11. Q223R del gen del receptor de leptina en niños de 6 – 12 años en Monterrey, N. L. y su área metropolitana.....	40

12. Comparación de la distribución de genotipos del polimorfismo Q223R del gen del receptor de leptina en niños de 6 – 12 años en Monterrey, N. L. y su área metropolitana.....	41
---	----

Tabla

Página

1. Ejemplo de algunos genes asociados con la obesidad y su función.....	7
2. Composición de la reacción de PCR sobre ADN genómico humana.....	31
3. Componentes de la reacción de digestión del producto amplificado por PCR.....	32
4. Frecuencia (%) de los alelos y genotipos del polimorfismo Q223R del gen LEPR descrito para diversas poblaciones.....	45
5. Frecuencia (%) de los alelos y genotipos del polimorfismo Q223R del gen LEPR descrito para diversas poblaciones de sujetos con y sin obesidad.....	47

ABREVIATURAS

<i>AccII</i>	Enzima de restricción <i>AccII</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
°C	Grados centígrados
dNTP's	Desoxirribonucleótidos
Gen OB	Gen de la obesidad
h	Horas
<i>HaeIII</i>	Enzima de restricción <i>HaeIII</i>
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HU	Hospital Universitario
IMC	Índice de masa corporal
Kg	Kilogramo
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LEPR	Receptor de Leptina
LINBA	Laboratorio de Investigación en Nutriología Básica
M	molar
mg	Miligramo
μl	Microlitro
min	Minutos
<i>MluI</i>	Enzima de restricción <i>MluI</i>
<i>MspI</i>	Enzima de restricción <i>MspI</i>
MIV	Marcador de pares de bases IV
<i>NcoI</i>	Enzima de restricción <i>NcoI</i>
pmol	picomoles
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

RFLP	Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
U	Unidad
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León

RESUMEN

La obesidad es un desorden metabólico caracterizado por la acumulación de tejido adiposo. Esta enfermedad se debe al efecto combinado de genes, medio ambiente y estilo de vida. Entre los genes relacionados con la obesidad. Entre los genes relacionados con la obesidad figuran el gen OB, que codifica para la leptina y el gen LEPR que codifica para su receptor que están involucrados en la disminución de la ingesta dietética y el gasto energético. Del gen LEPR se han reportado algunos polimorfismos, siendo el Q223R el más estudiado y asociado con obesidad en diversos trabajos de investigación. Sin embargo, aunque con los resultados de dichas investigaciones se establece alguna relación con variables asociadas a obesidad, ésta asociación no es del todo clara en otros grupos étnicos. Por lo anterior, en el presente trabajo se determinó la frecuencia del polimorfismo Q223R del gen LEPR en una población mexicana de niños con y sin obesidad. Con los resultados obtenidos no se encontró asociación entre el genotipo del polimorfismo y el fenotipo de obesidad en la población estudiada. Se sugiere continuar con investigaciones que incluyan analizar la asociación del polimorfismo a factores bioquímicos asociados con obesidad.

INTRODUCCIÓN

La obesidad es considerada como una enfermedad crónica no transmisible que se caracteriza por el exceso de tejido adiposo en el organismo, se genera cuando la ingesta energética es mayor a la energía utilizada durante un período de tiempo, por lo general largo.

Las causas de la obesidad son múltiples e incluyen factores tanto genéticos como ambientales. La herencia tiene un papel importante ya que se conoce que el riesgo de sufrir obesidad en un niño de padres obesos, es 10 veces superior a lo normal. Algunos genes que se encuentran involucrados con esta enfermedad son el gen que codifica para la leptina (gen Ob) y el del receptor de leptina (gen LEPR), que están asociados con la regulación de la ingesta dietética y el gasto energético.

La leptina es una proteína que funciona como hormona, se sintetiza y secreta por el tejido adiposo y provee una señal retroalimentadora a sus receptores en el hipotálamo que desencadena una reacción de saciedad.

El receptor de leptina es una proteína de membrana de 1200 aminoácidos con distintas isoformas tanto en ratas como en humanos que incluyen isoformas cortas y largas.

Los estudios del gen que codifica para el receptor de leptina (LEPR) han mostrado la existencia de varios polimorfismos que pudieran asociarse con obesidad. El polimorfismo Q223R ubicado en el exon 4 del gen LEPR resulta en la sustitución de aminoácidos (arginina por glutamina) es el más relacionado con la obesidad ya que se ha asociado con disminución de gasto

energético, cambios en el tamaño del adipocito, niveles elevados del colesterol plasmático y de lipoproteínas de baja densidad (LDL), así como niveles disminuidos de lipoproteínas de alta densidad (HDL).

Por otra parte, según la Encuesta Nacional de Nutrición 1999, en México la prevalencia de sobrepeso y obesidad en niños y escolares es de 19.5%, encontrándose los índices mas altos en la ciudad de México (33.4%) y en la región norte del país (35.1%).

Por lo anterior, resulta interesante conocer la frecuencia del polimorfismo Q223R del gen que codifica para el receptor de leptina en una muestra de niños con obesidad de Monterrey, N. L. y su área metropolitana.

I. PROBLEMA A INVESTIGAR

1.1 DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA

Según la Encuesta Nacional de Nutrición 1999, Nuevo León es uno de los estados con mayor incidencia de obesidad infantil; el origen de esta enfermedad se debe a diversos factores, entre los cuales destacan el factor ambiental, social, económico y genético, este último es el factor menos estudiado. De los genes asociados a obesidad estudiados hasta hoy, destacan las investigaciones relacionadas con el gen LEPR, del cual se ha demostrado que uno de sus polimorfismos (Q223R) está asociado a obesidad o a algunos de los factores que caracterizan a esta enfermedad. A la fecha, no existen estudios en nuestra comunidad referentes a la frecuencia del polimorfismo Q223R del gen LEPR por lo que cabe preguntarse:

¿Cuál es la frecuencia del polimorfismo Q223R del gen receptor de leptina en niños de 6 a 12 años de edad que presentan obesidad de la ciudad de Monterrey N. L. y su área metropolitana?

1.2 JUSTIFICACIÓN

La leptina se descubrió en 1994, y desde entonces se ha investigado su relación con la obesidad, primeramente con ratones y posteriormente con humanos adultos. Los primeros estudios revelaron una estrecha relación de la obesidad con los niveles plasmáticos de leptina en ratones, sin embargo en humanos esta asociación no se ha determinado. Por ende se comenzó a estudiar la relación de la obesidad con otros genes entre los que se encuentra el gen que codifica para el receptor de leptina. Este tipo de estudio no se ha realizado en niños de Nuevo León.

El avance de la obesidad a nivel mundial constituye una amenaza cada vez más importante. Se observa un progresivo incremento en estos últimos 100 años, con una marcada aceleración en la última década en casi todo el mundo y principalmente en los países desarrollados. La obesidad está asociada a 300 mil muertes por año en la edad adulta, por lo tanto, infantes que padecen hoy esta patología, el día de mañana serán adultos obesos y con riesgo de morir por causa de esta enfermedad.

La obesidad es una enfermedad multifactorial con un componente genético muy importante. Varios polimorfismos genéticos se han asociado con diferentes aspectos de la obesidad entre ellos destaca el polimorfismo Q223R del gen que codifica para el receptor de leptina.

Por otra parte, según datos de la Encuesta Nacional de Nutrición de 1999 se observó que la Región Norte y la ciudad de México tuvieron una prevalencia de sobrepeso y obesidad de 35.1% y 33.4% respectivamente, mientras que en el centro y en el sur fue menor (25.4% y 21.9%).

Además, de acuerdo con el Diagnóstico Nutriológico de las Familias y Menores de 5 años del estado de Nuevo León realizado en el año 2000, la prevalencia de sobrepeso y obesidad. El indicador peso/talla fue de 18.48% en menores de 5 años.

Por lo anterior se estimó conveniente realizar la presente investigación para determinar la relación del gen LEPR y su polimorfismo Q223R en niños de Monterrey N. L. y su área metropolitana.

1.3 OBJETIVOS

Objetivo general:

Determinar la frecuencia del polimorfismo Q223R del gen LEPR en una población de niños con obesidad entre 6 y 12 años de edad de la ciudad de Monterrey, N. L. y su área metropolitana.

Objetivos específicos:

1. Establecer las condiciones de amplificación y detección de los alelos del polimorfismo Q223R del gen LEPR, utilizando la técnica molecular PCR-RFLP (reacción en cadena de la polimerasa - polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción).
2. Determinar la frecuencia de alelos y genotipos del polimorfismo Q223R del gen del receptor de leptina en una muestra de niños con obesidad y sin obesidad de Monterrey N. L. y su área metropolitana.
3. Comparar la frecuencia de los genotipos del polimorfismo Q223R entre ambos grupos.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 OBESIDAD

La obesidad es una enfermedad crónica originada por diversas causas (Fig. 1) y con numerosas complicaciones, tales como diabetes, enfermedades cardiovasculares e hipertensión, entre otras. Se caracteriza por el exceso, acumulación y almacenamiento de grasa en el organismo, principalmente en tejido adiposo, debido a una ingesta elevada de calorías (Dietz, 1998).

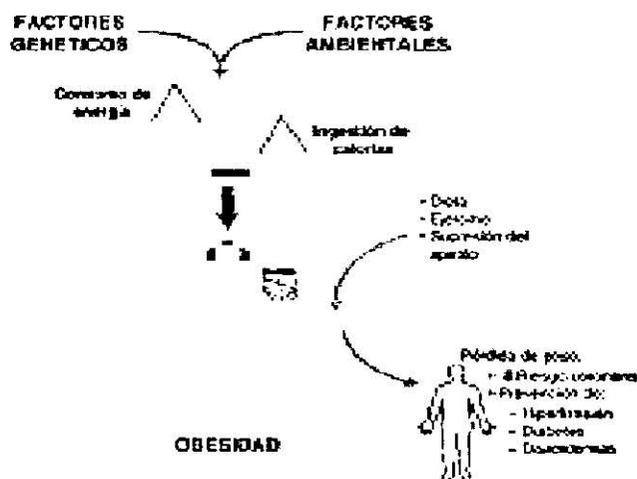


Figura 1. Causas de Obesidad

La palabra obesidad deriva del latín *obesus* que quiere decir "persona que tiene gordura en demasía", se manifiesta por un incremento de peso mayor al 20% del peso ideal esperado para la edad, la talla y el sexo. En adultos, la existencia de obesidad se determina cuando existe un índice de masa corporal (IMC) mayor de 27 y en población de talla baja un IMC mayor de

25. Con la siguiente fórmula se obtiene el grado de obesidad y según el peso y talla llamado también índice de masa corporal. (Rivera *et al.*, 2001; Garrow, 1981).

$$\text{IMC} = \text{Peso (Kg)} / \text{Talla (mts}^2\text{)}.$$

En los últimos años la obesidad se ha incrementado en todo el mundo, incluyendo México, ya sea por imitación de patrones de alimentación de ciertos países o por el consumo de alimentos de alto valor energético, considerándose como un problema de salud pública y uno de los padecimientos epidémicos de los países desarrollados (Serrano y Prieto, 2002).

Actualmente se reconoce que la obesidad está fuertemente relacionada con el desarrollo de otras enfermedades como padecimientos cardiovasculares, dermatológicos, gastrointestinales, diabéticos, osteoarticulares, etc, además, está asociada a 300 mil muertes por año (Serrano y Prieto, 2002).

2.2 CAUSAS DE LA OBESIDAD

La obesidad es el resultado de una compleja interacción entre los factores genéticos, metabólicos, farmacológicos, factores socioculturales y un estilo de vida sedentaria (Thompson *et al.*, 1999).

En cuestiones metabólicas, hay algunas personas que son más eficientes en el uso de calorías para mantener la temperatura corporal y llevar a cabo los procesos metabólicos. En relación a fármacos, se ha comprobado que algunos antidepresivos inducen un aumento de grasa y una importante ganancia de peso (Martínez, 1999). Con respecto a factores socioculturales, últimamente todo gira en torno a la comida y bebida, existe demasiada

publicidad para que se consuman productos como bebidas endulzadas, frituras, comidas instantáneas y enlatadas, entre otras; además, cada religión tiene alguna fecha especial en donde el hecho de comer y cocinar cierto tipo de comida es la forma de celebrar (Serrano y Prieto, 2002). En cuanto a sedentarismo, cada vez la gente se hace más dependiente de la comodidad y trata de hacer el menor esfuerzo posible al realizar sus actividades cotidianas mientras que, por otra parte, el ejercicio se inculca cada vez menos tanto en las escuelas como en los hogares (Marti *et al.*, 2003).

Un factor importante con respecto a la obesidad es el genético, en los últimos años han surgido diversas investigaciones que han ayudado al avance del conocimiento de numerosos genes asociados con ésta y otras enfermedades (Martínez y De Pablos, 1997).

Entre los factores genéticos involucrados con la obesidad existen algunos genes como los descritos en la tabla 1 (González-Barranco, 2002).

Tabla 1. Ejemplos de algunos genes asociados con obesidad y su función

GEN	FUNCIÓN
OB	Codifica para la proteína leptina.
LEPR	Es el gen del receptor de la leptina.
Fat	Controla depósitos de grasa
Tub	Interviene en el desarrollo de obesidad y diabetes.
Tulp 1	Interviene en el desarrollo de obesidad y diabetes.
Tulp	Interviene en el desarrollo obesidad y diabetes.
AY	Interviene en obesidad y diabetes con pelo amarillo.
GLP1	Disminuye el consumo de alimentos e incrementa la actividad física.
GLI	Regula la saciedad.

2.3 LA LEPTINA Y SU RECEPTOR COMO RESPONSABLES DE LA INGESTA DIETÉTICA Y EL GASTO ENERGÉTICO.

Entre los genes asociados con la obesidad, los que codifican para la leptina y el receptor de la leptina son los más relacionados con la ingesta dietética y el gasto energético (Clément *et al.*, 1998).

En diciembre de 1994 el equipo de Friedman y col. (Zhang *et al.*, 1994), descubrieron la hormona llamada leptina cuyo nombre deriva del griego *leptos* que significa delgado, a partir de entonces, la leptina ha sido objeto de un gran número de investigaciones enfocadas a tratar de dilucidar los complejos mecanismos implicados en su funcionamiento y efectos en el organismo, se sabe actualmente que sus funciones son mucho más amplias que las de intervenir en el balance energético (Pisabarro, 1999).

La leptina es una proteína con un peso molecular de 16 kilodaltones y posee una estructura terciaria con un conjunto de cuatro hélices, similar a las citoquinas clase I, es una hormona que presenta un ritmo circadiano de secreción pulsátil (Zhang *et al.*, 1997).

El gen que codifica para la leptina humana se localiza en el cromosoma 7q31.3, su ADN tiene más de 15,000 pares de bases, y posee 3 exones y 2 intrones, así como una región para la unión con factores de transcripción (Isse *et al.*, 1995) Este gen codifica para un precursor de 167 aminoácidos a partir del cual se forma la proteína madura de 146 aminoácidos (Tartaglia *et al.*, 1995)

La leptina es secretada a la sangre por el tejido adiposo blanco y en menor cantidad por el tejido adiposo marrón, el estómago y las células estelares del hígado. En el caso de tejido adiposo, la secreción se lleva a cabo en diversas localizaciones como subcutánea, retroperitoneal y perilinfática. La leptina se libera a la circulación sanguínea unida a proteínas de unión y se elimina principalmente por vía renal (Simón y Del Barrio 2002; Ovies, 1999; Villaseñor, 2002; Gómez, 2003).

La leptina interviene en diversos procesos fisiológicos, que se llevan a cabo a nivel del sistema nervioso central y en órganos periféricos, tales como la regulación del balance energético, inhibición del apetito y control del peso corporal, el metabolismo de los lípidos y carbohidratos, la reproducción y la termogénesis entre otros, además de tener importantes funciones en el inicio de la pubertad y la reproducción (Simón y Del Barrio, 2002; Recabarren, 2000).

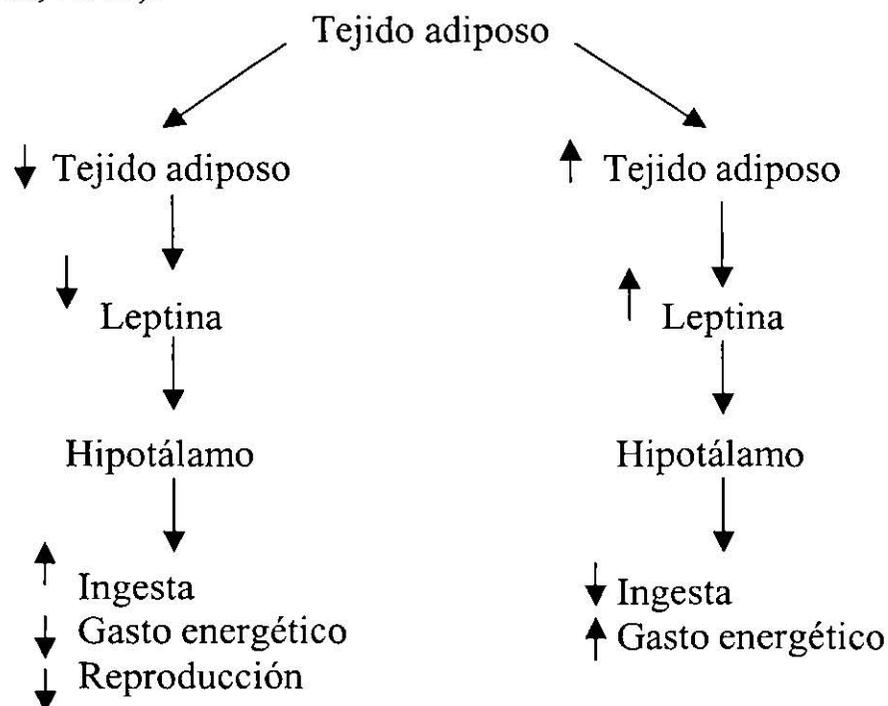


Figura 2. Efecto de la leptina en la regulación de la ingesta dietética y el gasto energético

El creciente conocimiento de esta hormona abre nuevas perspectivas en el difícil campo terapéutico de la obesidad.

La leptina se secreta en tejido adiposo y cuando éste se presenta en gran cantidad los niveles de leptina aumentan y en hipotálamo se presenta una cascada de señales bioquímicas que traen como consecuencia la disminución de la ingesta dietética y el aumento del gasto energético. Por el contrario, cuando el tejido adiposo está en menor cantidad, los niveles de leptina circulante disminuyen y esto hace que en hipotálamo se activen señales de alta ingesta dietética y de disminución de gasto energético (Fig. 2).

Existen diversos neuropéptidos involucrados con la secreción de la leptina destacando el neuropéptido Y, así como el péptido Agouti (AGRP), la proopiomelanocortina (POMC) y el péptido hipotalámico de tipo anorexigénico llamado regulador de la transcripción de cocaína y amfetamina (CART), estos dos últimos se expresan con la presencia de leptina aumentando la ingesta dietética y disminuyendo el gasto energético (Jeffrey y Friedman, 2002). El neuropéptido Y es el agente orexigénico más potente, se origina en el núcleo arcuato y es liberado por el núcleo paraventricular del hipotálamo, se encuentra ampliamente distribuido en el cerebro, es un neurotransmisor de 36 aminoácidos que actúa como estimulador central del consumo de alimentos cuando existe la unión a sus receptores Y1 y Y5, estimulando también la secreción de insulina por la vía del sistema nervioso parasimpático (Stephens, 1995). Como resultado de la acción del neuropéptido Y hay un aumento en la ingesta y disminución de

la termogénesis, principalmente, debido a que reduce la actividad de las vías nerviosas eferentes de tipo simpático que llegan a tejido adiposo marrón, también reduce la respuesta al estrés, la ansiedad, participa en la regulación hipotalámica de reproducción e influye en las resistencias vasculares periféricas, en la contractibilidad miocárdica y en la homeostasis (Erickson, 1996; Stephens, 1996). Al parecer, el principal mecanismo por el que la leptina regula el apetito es inhibiendo la síntesis y secreción del neuropéptido Y (Villaseñor, 2002; Cecilia, 2000; Kalra, 1996).

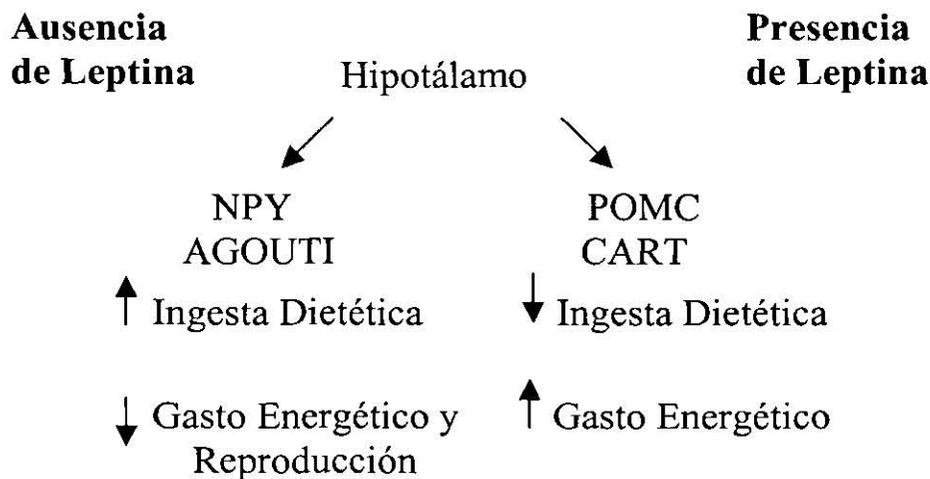


Figura 3. Función de neuropéptidos involucrados en el funcionamiento de la hormona leptina y su receptor.

En la figura 3, se describe que en ausencia de leptina, en el hipotálamo se activan ciertos péptidos como el neuropéptido Y (NPY) y Agouti que son los responsable de aumentar la ingesta dietética y disminuir el gasto energético, y por otro lado, en presencia de leptina se activa la vía catabólica POMC/CART que es la responsable de disminuir la ingesta dietética y aumentar el gasto energético.

En la obesidad, cuando los niveles de leptina son elevados, su sistema de transporte hematoencefálico se satura y no se observa disminución del apetito ni aumento del gasto energético, lo que sugiere un cierto grado de resistencia en su mecanismo de acción biológica. Se ha propuesto como mecanismo de resistencia a la leptina en obesos, una disminución de la eficiencia de su transporte al cerebro o una alteración en sus receptores en los plexos coroideos (Mockus, 2001). Debido a este estado de resistencia, es que la gran mayoría de los obesos tiene un apetito exagerado (hiperfagia) a pesar de tener un exceso de leptina, es decir, esta hormona manda una información que no es registrada por el cerebro, produciéndose una disminución en la respuesta (Auwerx y Staels, 1998).

Las mutaciones en el gen de la leptina se pueden asociar con obesidad, hiperfagia, hiperglicemia, resistencia a insulina, hipotermia e infertilidad (Villaseñor, 2002).

2.4 RECEPTOR DE LEPTINA

La leptina es una hormona que se produce en el tejido adiposo, viaja por torrente circulatorio y tiene un efecto biológico en el hipotálamo, para que esto ocurra es necesaria la presencia y buen funcionamiento de su receptor en los órganos blanco.

El receptor de leptina (LEPR) fue identificado en 1995 por Tartaglia y col. Esta proteína pertenece a la clase 1 de la familia de las citoquinas, tiene varias isoformas las cuales difieren en la longitud del dominio intracelular. Tanto la isoforma larga compuesta por 1165 aminoácidos así como las

formas cortas resultan del procesamiento alternativo del ARN mensajero del mismo gen (Tartaglia *et al.*, 1995).

Algunas de las isoformas cortas son solubles debido a que el receptor está compuesto del dominio intracelular y transmembranal, y se encargan de transportar la leptina que viene del tejido adiposo a la forma corta del receptor de leptina, que se encuentra mayormente expresado en los plexos coroideos. La isoforma corta no soluble tiene un dominio transmembranal que consta de 34 aminoácidos (Carrascosa y Yeste, 1999). Por último, la isoforma larga consta también de un dominio citoplasmático largo efector de 303 aminoácidos; esta proteína predomina en el hipotálamo y es la responsable de la transducción de la señal de la leptina debido a su dominio intracelular (Tartaglia *et al.*, 1995; Carrascosa y Yeste, 1999; Simon y Del Barrio, 2002). Al recibir la señal de la leptina sérica, el receptor de leptina activa la vía de traducción de señales Janus-Kinasa, que culmina con la activación de los genes de neuropéptidos asociados con la regulación de la ingesta dietética y del gasto energético descritos previamente (Woods *et al.*, 1996).

La importancia del receptor de leptina se puso de manifiesto al analizar algunas cepas de ratones obesos. Phillips y col. en 1996 encontraron que una mutación en el gen OB-R, el cual codifica para el receptor de leptina de los ratones *db/db* (ratones que carecen de instrucciones para producir el gen del receptor de leptina), provocan la generación de un ARN mensajero procesado anormalmente que reemplaza al receptor de leptina largo Ob-Rb con la isoforma corta Ob-Ra, lo que origina una transducción anormal de la señal que genera una resistencia a la leptina y el fenotipo de obesidad

(Phillips *et al.*, 1996). Por otra parte, en ratas con genotipo *fa/fa* (ratas Zucker que tienen una alteración en el gen *db*) se encontró una mutación sin sentido en el dominio extracelular altamente conservado del receptor, lo que origina niveles elevados de leptina y obesidad (Chua *et al.*, 1996). Ya que en la mayoría de los casos de obesidad en humanos también se presentan niveles elevados de leptina sérica, se pensó que defectos en el gen del receptor de leptina (LEPR) podrían contribuir a la obesidad, este hallazgo motivó a que se realicen investigaciones para encontrar mutaciones a nivel del receptor de leptina en humanos.

2.5 POLIMORFISMOS DEL GEN LEPR

En 1997, Gotoda y col. analizaron el gen del receptor de leptina en un grupo de sujetos con obesidad mórbida y encontraron que compartían cinco mutaciones en el gen LEPR; dos mutaciones generaron cambios no conservativos en la proteína: El aminoácido glutamina (Q) cambia a arginina (R) en la posición 223 (Q223R) y la lisina (K) a asparagina (N) en el codón 656 (K656N) y otra conservativa: la lisina (K) a arginina (R) en el codón 109 (K109R); dos de transición silenciosa en los codones 343 para serina (S) y 1019 prolina (P) (Fig. 4).

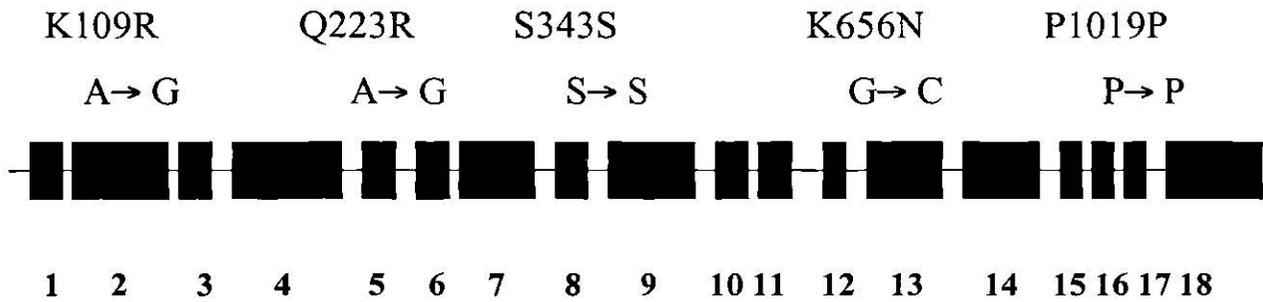


Figura 4. Polimorfismos del gen que codifica para el receptor de leptina en humanos. Los números indican la secuencia codificada del gen. En la parte superior se muestran las mutaciones que originan los polimorfismos indicados.

Estas cinco mutaciones comunes se distribuyen a través de la región codificante, cuatro están localizados en la región extracelular y una en la región intracelular del receptor de la leptina en humanos. Estas mutaciones pudieron ser detectadas en el ADN mediante análisis de los polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción de los productos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR-RFLP) generados por amplificación de genes con oligonucleótidos específicos y una posterior digestión con enzimas de restricción. Solamente la variación en el codón 223 genera un sitio de restricción para la enzima *MspI*, las demás mutaciones ni crean ni eliminan sitios de restricción, pero éstos se introdujeron a través de oligonucleótidos específicos que crearon un nuevo sitio de restricción para *HaeIII*, *MluI*, *AccII* y *NcoI* para las mutaciones en los codones 109, 343, 656 y 1019, respectivamente. Sin embargo, cuando se comparó la frecuencia de los genotipos para las cinco mutaciones, en un estudio que incluyó a 322 ingleses blancos obesos y a 132 sujetos delgados, no se logró detectar diferencias significativas entre las frecuencias de los grupos con y sin

obesidad, por lo que el grupo de investigación concluye que las mutaciones encontradas en el gen no son una causa común de obesidad, al menos en hombres europeos, aunque no se descarta la posibilidad de que estas mutaciones sean causa de alguna forma rara hereditaria de obesidad en otras poblaciones (Gotoda *et al.*, 1997). A raíz de este trabajo se han realizado numerosas investigaciones tratando de asociar estas mutaciones con características de la obesidad en otras poblaciones, sin embargo los resultados han sido controversiales como se describe a continuación.

Existen algunos estudios que han encontrado asociaciones significativas entre la composición corporal y los polimorfismos del gen del receptor de leptina. En 1999 Chagnon y col. investigaron la asociación entre los polimorfismos K109R, Q223R y K656K del receptor de leptina con algunas variables de composición corporal. Utilizaron a un grupo de familias de raza blanca de la ciudad de Québec (Québec Family Study), como grupo de estudio y encontraron una asociación significativa entre el polimorfismo Q223R y la masa grasa, además de asociaciones débiles de los otros dos polimorfismos con el IMC, la masa grasa y la masa grasa libre (Chagnon *et al.*, 1999). En otra investigación del mismo grupo se estudiaron sujetos de raza blanca y negra provenientes del HERITAGE Family Study (individuos provenientes de Québec, Phoenix, Arizona, Mineapolis, Austin, e Indianápolis), se analizaron tres polimorfismos del gen LEPR (K109R, Q223R, K656N) y su asociación con las variables de adiposidad y composición corporal; se encontró una distribución diferente de las frecuencias de los polimorfismos entre los sujetos de raza blanca y negra, específicamente para el polimorfismo K109R. Además, las frecuencias encontradas del polimorfismo Q223R son semejantes a las reportadas en

individuos de raza blanca de Inglaterra, Dinamarca, Estados Unidos y Francia (Chagnon *et al.*, 2000). Aunque hubo poca asociación de las variables de composición corporal con el polimorfismo K109R, si se observó una fuerte asociación entre éstos y el polimorfismo Q223R en los sujetos de raza blanca. En otro estudio, Yiannakouris y col. (2001) encontraron una asociación significativa entre el polimorfismo Q223R del gen LEPR y la presencia de obesidad en una población griega, en contraste, con los polimorfismos K109R y K656N no se encontró asociación significativa, por lo que estos últimos polimorfismos parecen no jugar un papel importante en el fenotipo de la obesidad. Por lo anterior, cabe suponer que de todos los polimorfismos del gen LEPR estudiados, el Q223R es el más relacionado con las características de obesidad (Yiannakouris *et al.*, 2001).

Por otra parte, en otros estudios no se pudo encontrar asociación significativa entre los polimorfismos del gen LEPR y la presencia de obesidad o factores asociados. En el estudio realizado por Gotoda y col. (1997) no se encontró asociación significativa entre los polimorfismos del receptor de leptina (K109R, Q223R, S343S, K656N, P1019P) y los indicadores de obesidad en una población de hombres ingleses de raza blanca. De la misma manera, Silver y col. (1997) estudiando a sujetos de raza blanca de Norteamérica tampoco encontraron asociación entre los polimorfismos Q223R y K656N con algunas características relacionadas con obesidad, tales como IMC, relación cintura-cadera, niveles de glucosa e insulina plasmática (Silver *et al.*, 1997).

Cabe señalar que la variación de las características relacionadas con la obesidad dependen de los antecedentes genéticos de la población, por lo que se ha sugerido investigar los efectos de estos polimorfismos en otras poblaciones étnicas (Silver *et al.*, 1997; Yiannakouris *et al.*, 2001).

En otros estudios tratan de asociar la presencia del polimorfismo Q223R del gen LEPR con algunas variables bioquímicas, se ha encontrado que este polimorfismo esta asociado con alteraciones en el metabolismo de la glucosa (Chagnon *et al.*, 1999). Un estudio en mujeres posmenopáusicas de raza blanca, reportó que el polimorfismo Q223R afecta significativamente la eficiencia de la unión de la leptina a la forma soluble del receptor (Wauters *et al.*, 2001). Stefan y col. en 2002 realizaron una investigación con indios pima y reportaron que el polimorfismo Q223R influye significativamente en el gasto energético, niveles de actividad física y tamaño del adipocito abdominal subcutáneo (Stefan *et al.*, 2002). Por último, Takahashi y col. (2003) estudiaron a hombres japoneses para relacionar el polimorfismo Q223R con niveles de lípidos séricos, y se demostró que independientemente del peso corporal, hay una relación con los niveles elevados de colesterol total sérico y de lipoproteínas de baja densidad.

III. HIPÓTESIS

3.1 ESTRUCTURA

Nuevo León es uno de los estados con mayor incidencia de obesidad infantil en el país; el origen de esta enfermedad es múltiple y se asocia con algunos factores como son el factor ambiental, el social, el económico y el factor genético.

De los genes estudiados relacionados con obesidad, se destacan los trabajos realizados con el gen que codifica para el receptor de leptina (gen LEPR). Las mutaciones de este gen han dado origen a diferentes polimorfismos en la proteína, y en algunos estudios se ha encontrado que el polimorfismo Q223R está fuertemente asociado a la presencia de obesidad y a factores característicos de esta enfermedad; por lo anterior para este trabajo se planteó la siguiente hipótesis:

- **La frecuencia del polimorfismo Q223R del gen que codifica para el receptor de leptina es mayor en niños que presentan obesidad que en niños sin obesidad.**

3.2 DESARROLLO

a) Unidad de análisis:

Niños entre 6 y 12 años de edad con y sin obesidad de la ciudad de Monterrey N. L. y su área metropolitana

b) Variables:

Genotipos encontrados en niños normales y en niños con obesidad.

Presencia del polimorfismo Q223R del gen receptor de leptina.

IV. DISEÑO

4.1 METODOLÓGICO

4.1.1 TIPO DE ESTUDIO

Este estudio es exploratorio, observacional, transversal y descriptivo.

4.1.2 UNIDADES DE OBSERVACIÓN

Niños que participaron en un protocolo sobre obesidad infantil del Servicio de Endocrinología del Hospital José Eleuterio González de la Universidad Autónoma de Nuevo León (Solís-Pérez, 2004), entre los cuales hay niños con obesidad y niños sin esta enfermedad.

4.1.3 TEMPORALIDAD

De agosto del 2003 a febrero del 2005.

4.1.4 UBICACIÓN ESPACIAL

Esta investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación en Nutriología Básica (LINBA) ubicado en la Facultad de Salud Pública y Nutrición de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

4.1.4 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

Inclusión: Niños entre 6 a 12 años de edad de la ciudad de Monterrey, N. L. y su área metropolitana que acudieron al Servicio de Endocrinología del Hospital José Eleuterio González como participantes en un protocolo de obesidad infantil, que aceptaron

participar en el estudio y que acudieron a la toma de muestras de sangre.

Exclusión: Personas fuera del rango de edad, que no hayan acudido al hospital a dar muestra de sangre y que no son de Monterrey N.L. o de su área metropolitana.

4.2 ESTADÍSTICO

4.2.1 MARCO MUESTRAL

Las muestras se obtuvieron de niños que acudieron al Departamento de Endocrinología del Hospital Universitario José Eleuterio González de la UANL como parte de un protocolo de investigación sobre obesidad infantil.

4.2.2 TAMAÑO MUESTRAL

La muestra fue de 76 niños de los cuales 47 presentaban obesidad y 29 no presentaban esta enfermedad.

4.2.3 TIPO DE MUESTREO

Es un diseño no probabilístico, por conveniencia ya que se obtuvieron muestras de sangre de niños que cumplan con los criterios de inclusión establecidos.

4.2.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para medir el grado de asociación, de la distribución del polimorfismo entre los niños con y sin obesidad, se utilizó la prueba estadística Ji cuadrada.

4.3 CALENDARIZACIÓN

Actividades	Año 2003		Año 2004				Año 2005	
	Ago-Sep	Oct-Ene	Feb-Mar	Abr-May	Jun-Ago	Sep-Oct	Nov-Dic	Ene-Feb
Recolección de las muestras (Extracciones de Sangre)								
Procesamiento de las muestras (Extracción de ADN)								
Estandarización de PCR								
Obtención de fragmento del gen LEPR								
Estandarización de digestiones con la enzima de restricción (RFLP'S)								
Detección de polimorfismos del gen LEPR								
Análisis de resultados								
Escritura de tesis								

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 MATERIAL

5.1.1 CONSENTIMIENTO INFORMADO

Se les pidió a los padres de los niños el consentimiento para dicha investigación. El trabajo experimental se realizó con el apoyo del Departamento de Endocrinología del Hospital José Eleuterio González, UANL.

5.1.2 ÁREA DE TRABAJO

En el Laboratorio de Investigación en Nutrición Básica (LINBA) de la Facultad de Salud Pública y Nutrición UANL.

5.1.3 MATERIAL BIOLÓGICO

Las muestras de sangre periférica fueron tomadas en el Departamento de Endocrinología del Hospital Universitario, se les agregó heparina como anticoagulante, fueron etiquetadas con nombre y fecha y enviadas al Laboratorio de Investigación en Nutriología Básica (LINBA) de la Facultad de Salud Pública y Nutrición, UANL.

5.1.4 REACTIVOS QUÍMICOS

- Kit DNazol-BD (DNazol BD, Molecular Research Center Inc).
- Isopropanol (Alcohol Isopropílico; Productos Químicos Monterrey)
- Etanol 75% (MERCK).

- Oligonucleótidos:

P1: 5'CTTCTCTGAAGTAAGATGATTTGTC 3'

P2: 5'AATTATCTTTGGTTTTCCCACTCCT 3'

(Alpha DNA).

- Enzima Taq polimerasa (BIOLINE).
- Buffer de reacción 10 X (BIOLINE).
- Cloruro de magnesio (BIOLINE).
- dNTP's (BIOLINE dNTP's Set).
- Enzima *MspI* (BIOLINE).
- Agarosa (Agarose High Strength Analytical Grade Agarose Ultra Pure DNA; BIO-RAD).
- TAE 1X (EDTA (BIO-RAD), Tris (BIO-RAD) y ácido acético glacial (CTR SCIENTIFIC).
- Bromuro de etidio (Ethidium Bromide Solution; BIO-RAD).
- Marcador molecular de pares de bases (Hyper Ladder V; BIOLINE).

5.1.5. MATERIAL Y EQUIPO

- Tubos de microcentrifuga Eppendorf de 0.5, 1.5 y 2.0 ml.
- Micropipetas de precisión Eppendorf de 10, 20, 100 y 1000 μ l.
- Puntillas de plástico (Eppendorf).
- Guantes de latex estériles (Allegiance)
- Material de vidrio (Pyrex).
- Microcentrífuga (Centrífuga 5415D; Eppendorf).
- Vortex (Maxi-Mix, Vortex Mixer; Daigger).
- Termociclador (Eppendorf, Mastercycler personal).
- Incubadora (Shaking Incubator SL Sep Lab Orbital)

- Cámara de electroforesis horizontal (Sub-Cell GT Agarose Gel Electrophoresis System; BIO-RAD).
- Fuente de poder (Power PAC300 BIO-RAD).
- Transiluminador (UV Transluminator 2000, BIO-RAD).
- Cámara digital (Camara Digital con Zoom DC290; Kodak).
- Sistema fotodocumentador Digi Doc (Digi Doc Photo Documentation System PC 170-81-51 BIO-RAD).

5.2 MÉTODOS

5.2.1 ESTRATEGIA GENERAL

Para cumplir los objetivos planteados se utilizó la estrategia general ilustrada en la figura 5.



Figura 5. Diagrama de la estrategia general empleada en este trabajo

Se recolectaron 76 muestras de sangre periférica en tubos de ensayo que contenían el anticoagulante heparina, de cada una se extrajo ADN genómico y se formó un banco de ADN de los niños, se confirmó la presencia del ADN en geles de agarosa al 1%, se amplificó la región del exon 4 del gen receptor de leptina por PCR utilizando los oligonucleótidos correspondientes.

Se verificó el éxito de la PCR visualizando el producto amplificado en electroforesis en gel de agarosa al 3%, se digirieron los productos de PCR utilizando la enzima *MspI* en una incubadora a 37°C por 24 h. Para verificar el resultado final de la digestión de los productos de PCR se corrió una electroforesis en geles de agarosa al 3.5%. Se generaron imágenes digitales utilizando el equipo de fotografía antes mencionado para observar los resultados finales. Finalmente las imágenes obtenidas se documentaron en un equipo de cómputo por medio del paquete Digi-Doc.

5.2.2 EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

Para la extracción del ADN genómico se utilizó el kit DNAzol-BD de acuerdo con las instrucciones del fabricante como se explica brevemente a continuación.

Para la lisis de las células sanguíneas, en un tubo eppendorf de 2 ml se mezclaron 500 µl del compuesto DNAzol y 250 µl de sangre total. Se agitó por inversión y se almacenó a temperatura ambiente por 5 min, posteriormente se agregaron 200 µl de isopropanol al lisado DNAzol-sangre, se agitó con ayuda de un vortex y se almacenó 5 min a temperatura ambiente, se centrifugó a 6000 rpm 6 min, se eliminó el sobrenadante y se agregaron 400 µl de DNAzol-BD a la pastilla de ADN, se agitó en vortex y se centrifugó a 6000 rpm 5 min. Se eliminó el sobrenadante, se lavó el ADN mezclándolo con 500 µl de etanol al 75% y se centrifugó a 6000 rpm por 5 min.

Se eliminó el etanol y la pastilla de ADN se disolvió en 50 μ l de agua ultra- pura estéril; por último la solución de ADN se almacenó a -20 °C hasta su uso.

5.2.3 AMPLIFICACIÓN DEL FRAGMENTO DE LA REGIÓN QUE CONTIENE LA MUTACIÓN Q223R EN EL EXÓN 4 POR MEDIO DE PCR

El fragmento que contiene la mutación correspondiente al polimorfismo Q223R se encuentra en la región del exón 4 del gen LEPR. Para la amplificación de este fragmento se utilizó la técnica de PCR con las condiciones descritas a continuación.

Se usaron los oligonucleotidos descritos por Silver y col. (1997) cuyas secuencias son:

Sentido: 5'CTTCTCTGAAGTAAGATGATTTGTC 3'

Antisentido: 5'AATTATCTTTGGTTTTCCCACTCCT 3'

Cada una de las reacciones de PCR se realizó en un volumen final de 50 µl de una mezcla de reacción que contenía agua ultra pura, cloruro de magnesio, buffer, oligonucleotidos, dNTP's, Taq DNA-polimerasa y ADN genómico humano como templado, en las cantidades que se mencionan en la tabla 2. La mezcla se pasó a un termociclador en el cual se sometió a 35 ciclos de reacción bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C/30 s, apareamiento a 62°C/30 s, elongación de cadena 72°C/30 s y un ciclo final de extensión a 72°C durante 10 min. Posteriormente se mantuvo a temperatura constante de 4°C y finalmente se almacenó a -20°C hasta su análisis.

Tabla 2
Composición de la reacción de PCR sobre ADN genómico humano

Reactivo	Concentración	Cantidad (μ l)
Agua ultra pura	_____	29.8
MgCl ₂	50 Mm	2
Buffer	10X	5
Primer 1	10 pm/ μ l	2
Primer 2	10 pm/ μ l	2
DNTP's	2.5 mM	5
Taq polimerasa	5 U/ μ l	0.2
Muestra de ADN	2-10 ng/ μ l	4
Volumen Final	_____	50

5.2.4 ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO Q223R

Para el análisis del polimorfismo Q223R se utilizó la técnica de Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP). Los productos de ADN amplificados por PCR fueron digeridos sometidos a la acción de la enzima *MspI* (20 U/ μ l), cuyo sitio de corte es C'CGG. Para cada una de las reacciones de digestión se preparó una mezcla de reacción con agua ultrapura, buffer, enzima y ADN amplificado por PCR, en las cantidades que se mencionan en la tabla 2. Las mezclas de digestión se incubaron por 24 h a una temperatura de 37°C y posteriormente se guardaron a -20°C hasta su análisis por electroforesis.

Tabla 3
Componentes de la reacción de digestión
del producto amplificado por PCR

Reactivo	Cantidad (µl)
Agua ultra pura	2
Buffer (10X)	1
Enzima <i>MspI</i> (20U/µl)	1
DNA producto de PCR	6
Volumen Final	10

5.2.5 ELECTROFORESIS

El ADN, los productos amplificados por PCR y los productos de la digestión se visualizaron en geles de agarosa al 1, 3 y 3.5% respectivamente.

La electroforesis se realizó bajo las siguientes condiciones: se utilizó TAE al 1% como buffer de corrida, se aplicó un voltaje de 100 V durante 20 min para el ADN, 30 min para los productos de PCR y 40 min para los productos de las digestiones (Sambrook *et al.*, 1989).

Para la electroforesis en cada gel de agarosa se usó el marcador hyper ladder IV (BIOLINE) como referencia del tamaño de los fragmentos, así como controles negativos y positivos para la PCR y la digestión. Los geles se tiñeron 5 min con una solución de bromuro de etidio (Ethidium Bromide

Solution; BIO-RAD) y se lavaron 2 veces con agua destilada. Las bandas se observaron con ayuda de un transiluminador equipado con luz UV.

5.2.6 ESTADÍSTICA

Las frecuencias de los genotipos encontrados en los niños con y sin obesidad, se compararon utilizando la prueba Ji cuadrada. (Wayne D, 2002).

VI. RESULTADOS

6.1 DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN

Se estudiaron 76 niños de los cuales 29 niños no presentaban obesidad y 47 si presentaban esta enfermedad. La población femenina de esta investigación, fue de 14 niñas sin obesidad y 20 con esta enfermedad, con lo que respecta a la población masculina se diagnosticó a 16 niños sin obesidad y a 26 con esa enfermedad.

6.2 ESTANDARIZACIÓN DE TÉCNICAS MOLECULARES

6.2.1 ESTANDARIZACIÓN DE LA REACCIÓN DE PCR

Una vez extraído el ADN de las muestras de sangre proporcionadas se realizó la amplificación del fragmento de 368 pb mediante la técnica de PCR. Durante el proceso de estandarización se probaron diferentes temperaturas de alineamiento. Con una temperatura de 62°C se obtuvieron los productos amplificados de 368 pb conforme a lo esperado no observándose bandas inespecíficas de amplificación, por lo que se decidió usar esta temperatura de alineamiento (62°C). En la figura 6 se muestran las bandas de ADN del producto amplificado, que fueron teñidas con bromuro de etidio.

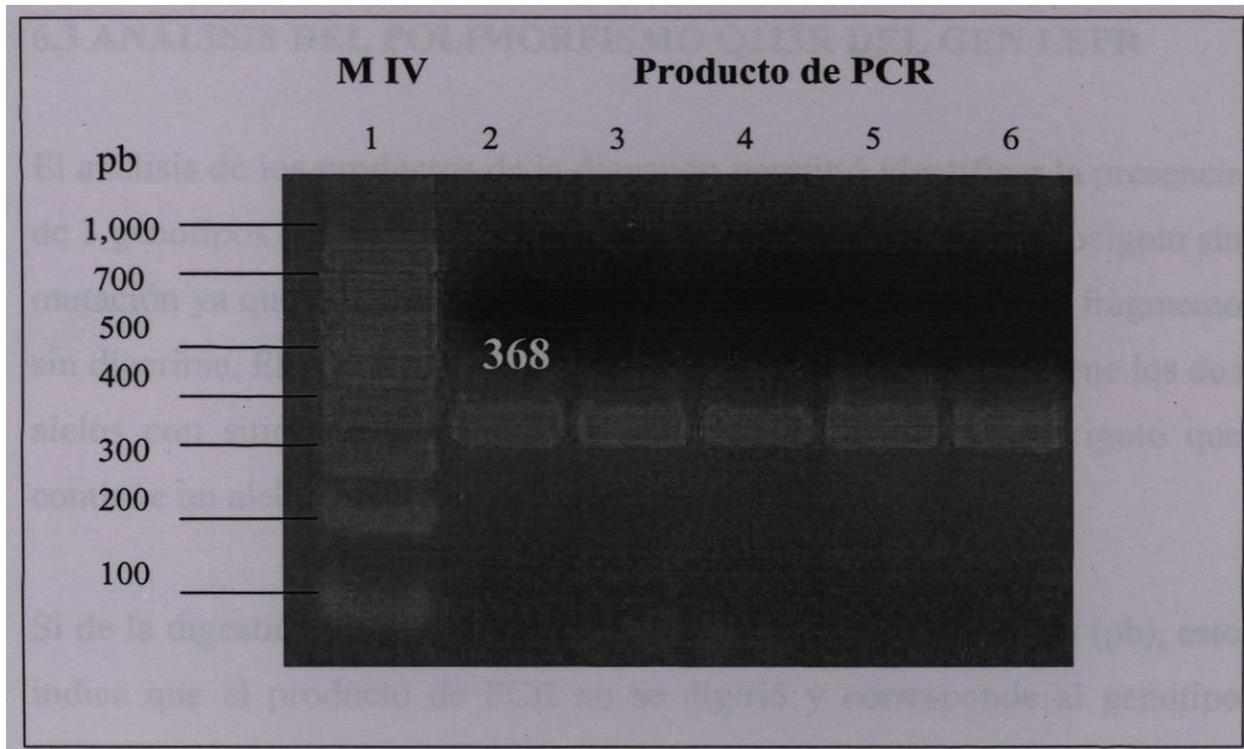


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 3% de productos amplificados por PCR usando como templado el ADN obtenido de las muestras de sangre. Carril 1: marcador de pares de bases (pb), carril 2 al 6: productos amplificados de muestras de ADN aislados de niños con y sin obesidad.

6.2.2 DIGESTIÓN DEL PRODUCTO AMPLIFICADO POR PCR

Los productos amplificados se sometieron a una digestión enzimática con la endonucleasa de restricción *MspI*. Se probaron diferentes tiempos de digestión a 37°C (12, 16 y 24 h). En las digestiones realizadas durante 24 h. se observó la digestión total de las muestras mientras que a 12 y 16 h aún se observaron productos de PCR sin digerir. Se decidió usar un tiempo de 24 h para las digestiones.

6.3 ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO Q223R DEL GEN LEPR

El análisis de los productos de la digestión permitió identificar la presencia de 3 genotipos que corresponden al genotipo A/A que es el homocigoto sin mutación ya que al carecer de sitio de restricción, se mantiene el fragmento sin digerirse. El genotipo G/G corresponde al homocigoto que tiene los dos alelos con sitios de digestión. El genotipo A/G es el heterocigoto que contiene un alelo con mutación y otro normal.

Si de la digestión se obtiene un fragmento de 368 pares de bases (pb), esto indica que el producto de PCR no se digirió y corresponde al genotipo homocigoto A/A. Si la digestión de este segmento por la enzima *MspI* resulta en 2 fragmentos, uno de 245 y otro de 123 pb, a la muestra corresponde al homocigoto G/G y por último, cuando está presente el genotipo heterocigoto A/G, como producto de la digestión se obtienen 3 bandas, una de 368 pb (alelo sin digerir) y 2 mas de 245 y 123 pb (alelo digerido).

En la figura 7 se muestra una electroforesis de los RFLP's con los 3 genotipos posibles.

GENOTIPO

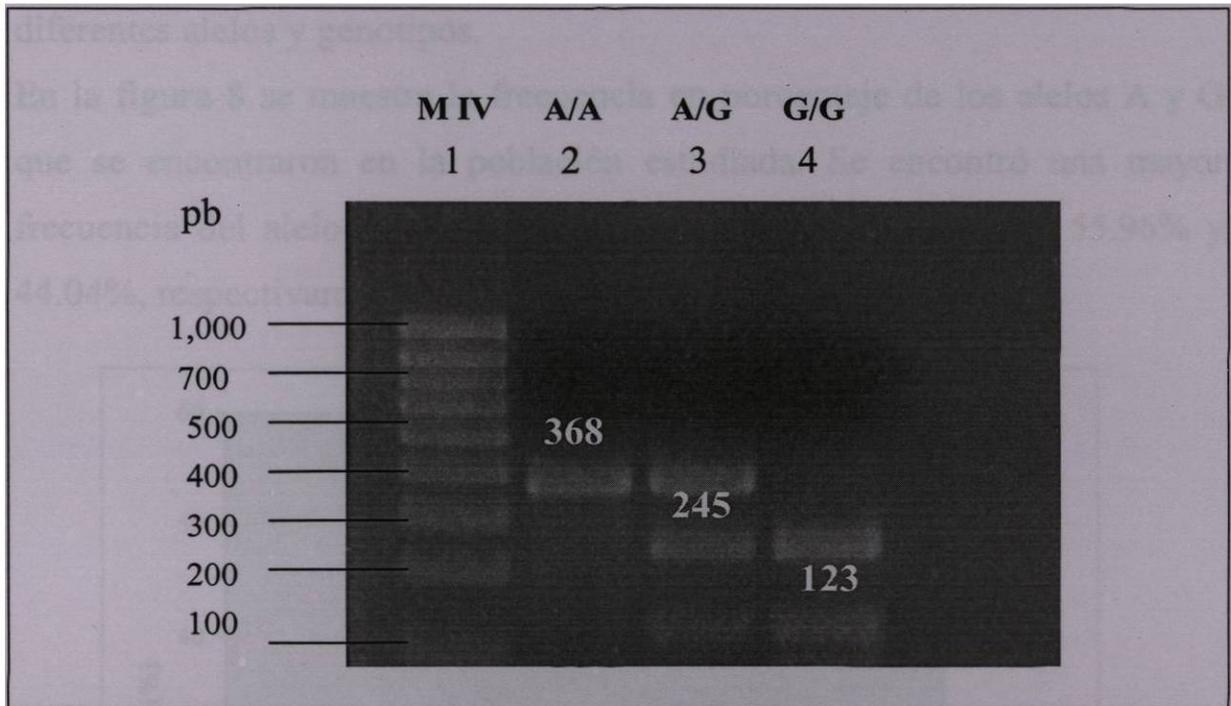


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 3.5% de las digestiones de los productos de PCR con *MspI*. Carril 1 marcador de pares de bases (pb). Carril 2 genotipo homocigoto sin mutación, carril 3 genotipo heterocigoto con un alelo con mutación y en el carril 4 genotipo homocigoto con los dos alelos mutados.

6.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

A continuación se muestran graficados los resultados obtenidos de los diferentes alelos y genotipos.

En la figura 8 se muestra la frecuencia en porcentaje de los alelos A y G que se encontraron en la población estudiada. Se encontró una mayor frecuencia del alelo A que del alelo G, con un porcentaje del 55.96% y 44.04%, respectivamente.

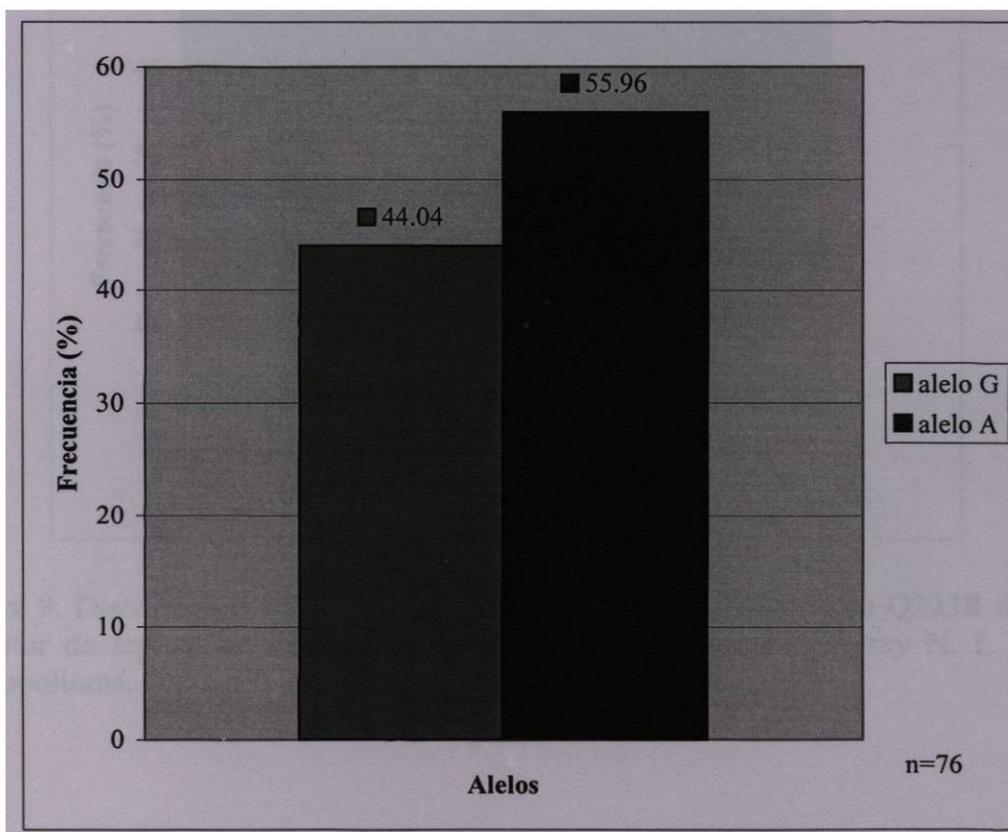


Figura 8. Porcentaje de distribución de los alelos A (glutamina) y G (arginina) del polimorfismo Q223R del gel del receptor de leptina en niños de 6 – 12 años en Monterrey, N. L. y su área metropolitana.

En relación a la distribución de los diferentes genotipos se observó una mayor prevalencia del genotipo A/G heterocigoto con un 43.42%, siendo en esta población de niños de Monterrey Nuevo León el genotipo más común; con un 36.84% se encontró el genotipo A/A y con un 19.74% el genotipo G/G (figura. 9).

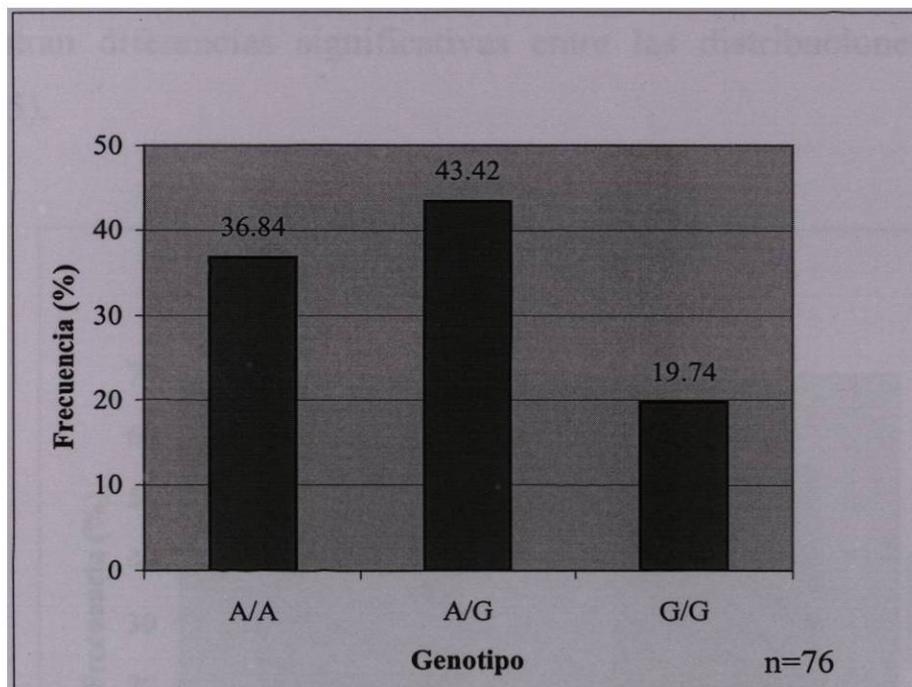


Figura 9. Distribución de los diferentes genotipos del polimorfismo Q223R del gen del receptor de leptina en niños de 6 a 12 años de edad en Monterrey N. L. y su área metropolitana.

La comparación entre los alelos de los niños con obesidad y sin obesidad muestra que en los dos grupos hay una mayor prevalencia del alelo A (Fig.10). Los niños con obesidad tienen un 55.07% y los niños sin obesidad tienen un 58.06%. Con valores inferiores a los del alelo A se encontró los valores porcentuales para el alelo G con un 44.93% en niños con obesidad y 41.94% en niños sin obesidad. Al realizar el análisis estadístico, no se encuentran diferencias significativas entre las distribuciones analizadas ($p>0.05$).

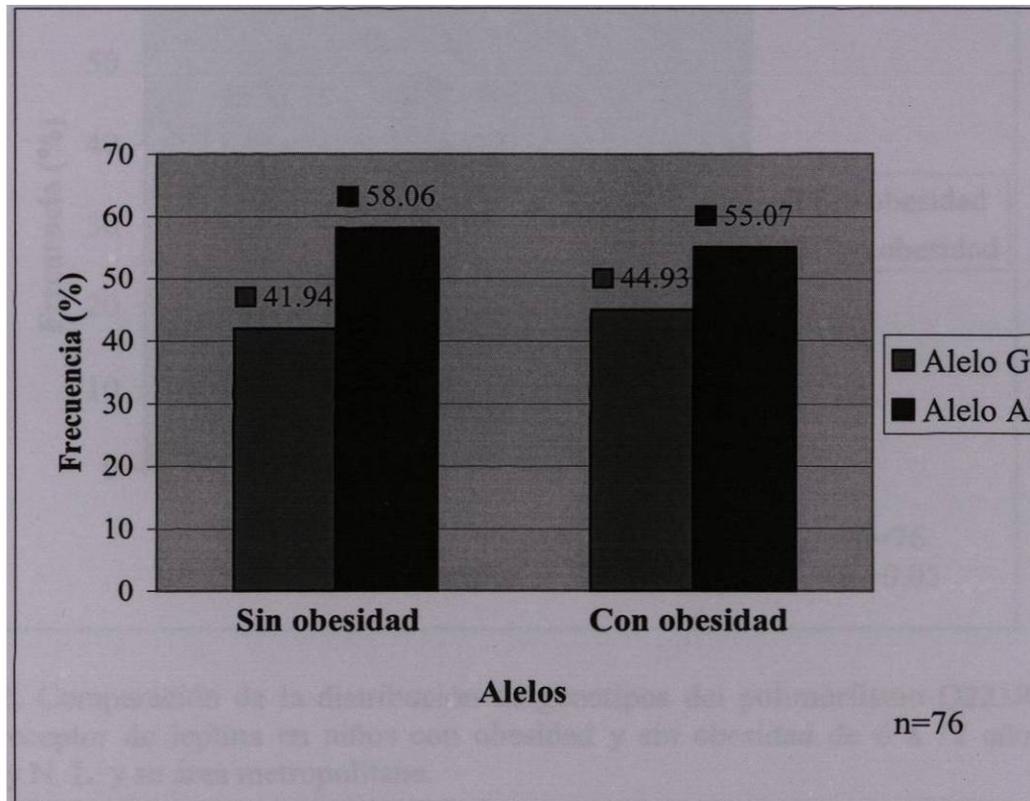


Figura 10. Comparación de la distribución de alelos del polimorfismo Q223R del gen del receptor de leptina en niños de 6 a 12 años de Monterrey N. L. y su área metropolitana $p>0.05$.

Realizando una comparación de los genotipos de niños con obesidad y sin obesidad, se observó que el genotipo A/G fue el de mayor prevalencia en los dos grupos. En niños con obesidad fue de 40.82% y sin obesidad fue de 48.20%; siguiendo el genotipo A/A con porcentajes muy parecido en los dos grupos. El genotipo con menor prevalencia fue el G/G. Al hacer el análisis estadístico se observó que no hay diferencia en la distribución de los genotipos entre ambos grupos ($p > 0.05$).

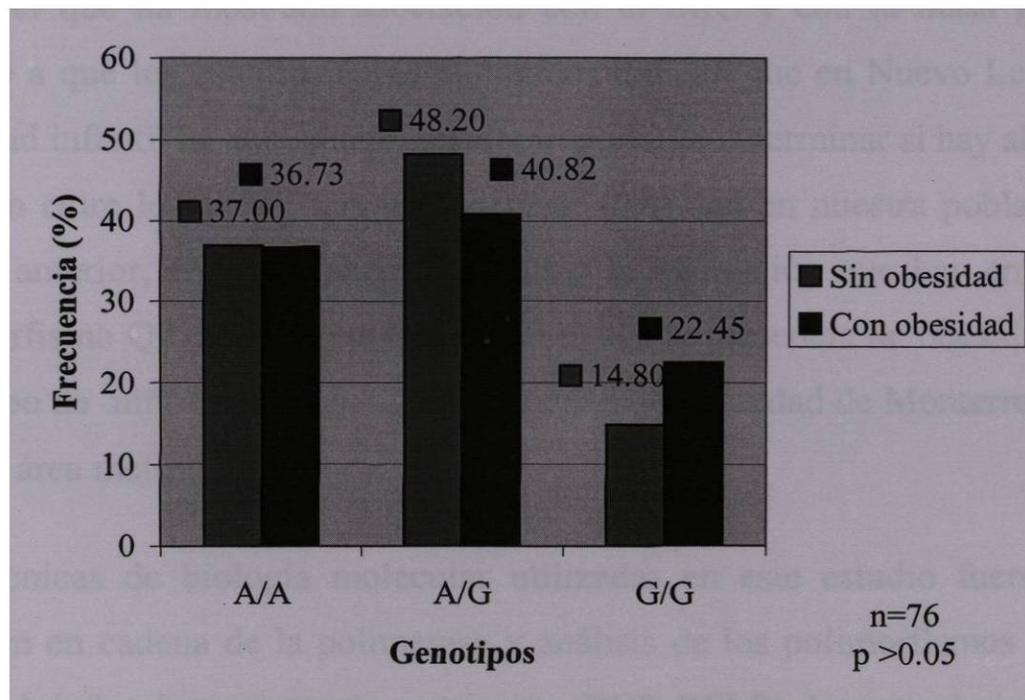


Figura 11. Comparación de la distribución de genotipos del polimorfismo Q223R del gen del receptor de leptina en niños con obesidad y sin obesidad de 6 a 12 años en Monterrey N. L. y su área metropolitana.

VII.- DISCUSIÓN

La obesidad se debe al efecto combinado de genes, ambiente y estilo de vida. El descubrimiento de la leptina y su receptor han propiciado un gran avance en la comprensión de los mecanismos que regulan la ingesta dietética y el gasto energético. Numerosas investigaciones han tratado de asociar algunos polimorfismos del gen que codifica para la leptina con variables relacionadas a obesidad, siendo el polimorfismo Q223R del gen LEPR el que ha mostrado asociación con el IMC y con la masa grasa. Debido a que los estudios epidemiológicos indican que en Nuevo León la obesidad infantil ha aumentado, resulta importante determinar si hay alguna relación entre los genes y la presencia de obesidad en nuestra población. Por lo anterior, en este trabajo se analizó la asociación que hay entre el polimorfismo Q223R del receptor de leptina y la presencia de obesidad en un grupo de niños entre 6 y 12 años de edad de la ciudad de Monterrey, N. L. y su área metropolitana.

Las técnicas de biología molecular utilizadas en este estudio fueron la reacción en cadena de la polimerasa y análisis de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP). La estandarización de la técnica de PCR fue realizada utilizando las condiciones descritas por Silver y col. (1997). Cabe indicar que se probaron varias temperaturas de apareamiento a 62°C, se obtuvieron los mejores resultados, se observaron productos amplificados bien definidos y no se encontraron bandas de amplificación inespecíficas. Para el análisis de RFLP se utilizaron las

condiciones descritas por Wauters y col. (2001), los productos de PCR se digirieron con 5 unidades de *MspI* durante 24 h a 37°C. De esta manera se obtuvieron los productos de digestión utilizados para identificar los genotipos estudiados.

En la tabla 4 se muestra la distribución de las frecuencias de alelos y genotipos encontrados en este estudio y se compara con las reportadas previamente. La frecuencia de alelos encontrada en la muestra total analizada, correspondió a un 44% del alelo G contra un 56% del alelo A que son semejantes a las reportadas para poblaciones de australianos, griegos, belgas, británicos y sujetos de raza blanca, pero contrasta con los resultados para japoneses y sujetos de raza negra.

Por otra parte, en este trabajo, al analizar la distribución de las frecuencias de los diferentes genotipos se encontró que el genotipo heterocigoto A/G es el de mayor frecuencia (43%), seguido por el homocigoto A/A (37%), y por último el de menor frecuencia (20%), fue el homocigoto G/G. Como se muestras en la tabla 4, estos resultados coinciden con los descritos para poblaciones de individuos australianos, griegos, belgas, británicos y sujetos de raza blanca, pero contrasta con los descritos para japoneses y sujetos de raza negra.

Estos resultados parecen confirmar que la población estudiada tiene una gran semejanza genética con poblaciones europeas y americanas. Probablemente el contraste encontrado con la población de japoneses y sujetos de raza negra

se deba a que son poblaciones genéticamente diferentes (Yiannakouris *et al*, 2001), por lo que las frecuencias alélicas y genotípicas varían significativamente entre diferentes razas. Además, cabe la posibilidad de que la diferencia de las distribuciones genotípicas entre las razas impliquen un efecto fisiológico del polimorfismo Q223R.

Tabla 4. Frecuencia (%) de los alelos y genotipos del polimorfismo Q223R del gen LEPR descrito para diversas poblaciones

Población (n)	Alelos		Genotipos			Referencia
	Gln A	Arg G	Q223 (A/A)	Q223R (A/G)	R223 (G/G)	
Japoneses (n= 201)	14	86	4	19	77	Takahashi- Yasuno <i>et al.</i> , 2003
Australianos (n= 335)	58	42	32	52	16	De Silva <i>et al.</i> , 2001
Griegos (n= 118)	68	32	44	47	9	Yiannakouris <i>et al.</i> , 2001
Belgas (n=280)	52	48	27	50	23	Wauters, <i>et al.</i> , 2001
Británicos (n=322)	56	44	29	55	16	Gotoda, <i>et al.</i> , 1997
Sujetos de raza negra (n=77)	49	51	23	51	26	Chagnon, <i>et al.</i> , 2000
Sujetos de raza blanca (n=190)	54	46	32	45	23	Chagnon, <i>et al.</i> , 2000
Niños de Monterrey N. L. (n=76)	56	44	37	43	20	Presente estudio

En la tabla 5 se presenta una relación de los estudios que analizan la asociación entre el polimorfismo Q223R del gen LEPR con la presencia de obesidad; se compararon los resultados obtenidos en sujetos con obesidad y sin obesidad.

En el presente estudio se encontró un 55% de sujetos homocigotos para el alelo A entre los sujetos con obesidad, resultados que son semejante a los publicados por Gotoda y col. (1997) y Yiannakouris y col. (2001).

En este estudio no se encontró una diferencia significativa al comparar la distribución de las frecuencias de los genotipos entre sujetos obesos y no obesos, siendo la distribución de las frecuencias muy semejantes a las observadas en el estudio de Gotoda y col. mientras que los resultados reportados por Yiannakouris y col. difieren, observando frecuencias mas altas en ambos grupos.

Tabla 5. Frecuencia (%) de los alelos y genotipos del polimorfismo Q223R del gen LEPR descrito para diversas poblaciones de sujetos con y sin obesidad

Poblaciones (n)	Con obesidad				Sin obesidad				Referencia		
	Genotipos		Alelos		Genotipos		Alelos				
	A/A	A/G	G/G	A	G	A/A	A/G	G/G	A	G	
Británicos (322)	29	53	18	56	44	28	58	14	57	43	Gotoda <i>et al.</i> , 1997
Griegos (118)	45	35	20	62	38	44	51	5	70	30	Yiannakouris <i>et al.</i> , 2001
Niños de Monterrey N. L. (76)	37	41	22	55	45	37	48	15	58	42	Presente estudio

Con los resultados encontrados en este trabajo es difícil explicar la presencia de obesidad en nuestra muestra de estudio como resultado de la mutación Q223R del gen LEPR. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que algunas otras mutaciones del gen LEPR sean la causa de formas familiares raras de obesidad hereditaria.

Un polimorfismo causa un cambio en la secuencia del ADN, y este cambio puede ser conservativo o no conservativo. Al estudiar los diferentes polimorfismos del gen LEPR, se encontró que para ciertos polimorfismos el cambio es conservativo, lo cual no afecta en la funcionalidad de la proteína (Gotoda *et al.*, 1997). También se vieron mutaciones silenciosas las cuales tampoco afectan en la composición y secuencia alélica del gen, por lo tanto estas mutaciones no fueron estudiadas debido a que son cambios no significativos y mínimos. Pero en el caso del polimorfismo Q223R del gen LEPR se observó un cambio no conservativo el cual si afecta en la expresión del gen, al cambiar el aminoácido glutamina por arginina que puede dar lugar a alteraciones funcionales. Por lo tanto se ha propuesto que este polimorfismo puede jugar un papel importante en la patogénesis de la obesidad, debido a que este único cambio de aminoácido, con el cambio de carga de neutra a positiva, pudiera afectar la funcionalidad del receptor y alterar su capacidad de señal, similar a lo que se ha observado en la mutación *fa* en las ratas obesas Zucker (Gotoda *et al.*, 1997). En éstas, la mutación en *fa* genera una resistencia a la leptina lo que lleva al fenotipo observado de obesidad. Pero en los humano esta mutación no se ha detectado. De cualquier forma, la similitud del polimorfismo Q223R con la mutación Q269P, que causa obesidad en el modelo de la rata Zucker, deja

abierta la posibilidad de que el polimorfismo Q223R puede generar cambios que predisponen un estado de resistencia a la leptina.

Existen publicaciones que reportan la relación entre el polimorfismo Q223R y la obesidad como es el caso de Chagnon y col. (1999), hallando asociaciones significativas entre el polimorfismo Q223R del gen LEPR y la masa grasa, además de asociaciones débiles con las otras variables.

En otro estudio realizado con un grupo de sujetos de raza blanca y uno de raza negra, Chagnon y col. (2000) estudiaron las variables de adiposidad y composición corporal, asociándolas con 3 polimorfismos del gen LEPR, encontrando una distribución diferente de las frecuencias entre las 2 razas y el polimorfismo K109R, pero si observaron una fuerte asociación entre estas variables y el polimorfismo Q223R en los sujetos de raza blanca.

Por último Stefan y col. (2002) realizaron una investigación con indios pima en el cual reportaron que el polimorfismo Q223R del gen LEPR influye significativamente en el gasto energético, niveles de actividad física y tamaño del adiposito subcutáneo.

A pesar de todo esto, en nuestro estudio no se encontró asociación entre el polimorfismo Q223R del gen LEPR con la obesidad. Considerando que un solo gen contribuye en menor grado a una variación fenotípica y la combinación de muchos genes es muy probable que contribuyan o predispongan a la obesidad y considerando que la obesidad humana es poligénica, los resultados de este estudio no deben ser sorprendentes.

No hay que olvidar los trabajos previos que al igual que el en nuestro no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de sujetos con obesidad y sin obesidad, como es en el caso del trabajo propuesto por Gotoda y col. (1997), en el cual se estudiaron 5 polimorfismos del gen receptor de leptina en una población de ingleses y no hallaron diferencias significativas entre ambos grupos, por lo que concluyen que las mutaciones no son causa de obesidad en individuos europeos. Por último en el estudio realizado por Silver y col (1999), en sujetos de Norteamérica, tampoco encontraron asociación entre los polimorfismos Q223R y K656N con variables relacionadas con obesidad.

La ventaja de este estudio cuando se compara con otros estudios genéticos es que se muestrearon solamente niños de 6-12 años, lo que limita el efecto de determinantes no genéticos de la obesidad tales como el estilo de vida. Aunque no se exploraron asociaciones entre variables como en otros estudios, cabe indicar que se ajustó la población en base a IMC, para el análisis estadístico.

Con nuevos estudios se podrá ampliar el conocimiento en relación a los genes asociados a la obesidad y estudios posteriores serán útiles para asociar mutaciones de genes con características bioquímicas y antropométricas que permitan mayores conocimientos acerca de la obesidad infantil en Nuevo León.

VIII. CONCLUSIONES

1. Se implementó en el laboratorio la metodología para realizar el análisis del polimorfismo Q223R del gen que codifica para el receptor de leptina.
2. Se formó un banco de ADN de personas con y sin obesidad que será útil para analizar otros marcadores genéticos y relacionarlos con obesidad.
3. A cada muestra del banco de ADN se le determinó el genotipo del polimorfismo Q223R.
4. El polimorfismo Q223R no se asocia con el fenotipo de obesidad en la población estudiada.

IX. BIBLIOGRAFÍA

Auwerx J., Staels B. 1998. Leptin. *Lancet*, **351**: 737-741.

Carrascosa A., Yeste D. 1999. Leptina: Una hormona del tejido adiposo. *Revista Chilena de Nutrición*; **26** (1) 1-3.

Cecilia K. 2000. Leptin- a slimmer's dream that crashed?. Research Centre for Endocrinology and Metabolism. **12**:3.

Clément K., Vaisse C., Lahlou N., Cabrol S., Pelloux V., Cassuto D., Gourmelen M., Dina C., Chambaz J., Lacorte JM., Basdevant A., Bougneres P., Lebouc Y., Froguel P., Guy-Grand B. 1998. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature*. **392**: 398-401.

Chagnon YC., Chung WK., Perusse L., Chagnon M., Leibel RL., Bouchard C. 1999. Linkages and association between the leptin receptor (LEPR) gene and human body composition in the Quebec Family Study. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **23**:278-286.

Chagnon YC., Wilmore J., Borecki I., Gagnon J., Perusse L., Chagnon M., Collier G., Leon A., Skinner J., Rao D., Bouchard C. 2000. Associations Between the Leptin Receptor Gene and Adiposity in Middle-Age Caucasian Males from the HERITAGE Family Study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* **85**:1, 29-35.

Chua SC., Koutras IK., Han L., Liu S-M., Kay J., Young SJ., Chung WK., Leibel R.L. 1996. Fine structure of the murine leptin receptor gene: splice

site supression is required to from two alternatively splice transcripts. Genomics. **45**:264-270.

De Silva A., Walder K., Boyko E., Whitecross K., Nicholson G., Kotowicz M., Pasco J., Collier G. 2001. Genetic Variation and Obesity in Australian women: A prospective study. Obesity Research. **9** (12): 733-739.

Dietz WH. 1998. Prevalence of obesity in children. En: Bray G, Bouchard C, James P. Handbook of obesity. New York: Marcel Dekker. **1**, 93-102.

Erickson JC.1996. Sensitivity to leptin and susceptibility to seizures of mice lacking NPY. Nature. **381**:414-518.

Garrow JS. 1981. Treat obesity seriously: a dinamical manual. London: Churchill Livingstone. **15**(1): 62-67.

Gómez Fernández L. 2003. Niveles de leptina en plasma en una población infantil normal: desde el periodo fetal hasta la adolescencia. Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de medicina. Departamento de pediatría, obstetricia, ginecología y medicina preventiva. Tesis presentada para optar al grado en medicina. **2**(10):10 2-45.

González-Barranco J. 2002. Leptina y obesidad. Rev Invest Clin, **52** (2): 113-114.

Gotoda T., Manning B., Goldstone A., Imrie H., Evans A., Strosberg D., McKeigue P., Scott J., Aitman T. 1997. Leptin receptor gene variation and obesity: lack of association in a while British male population. Human Molecular Genetics. **6**(6): 869-876.

Isse N., Ogawa Y., Tamura N., Masuzaki H., Mori K., Okazaki T., Satoh N., Shigemoto M., Yoshimasa Y., Nishi S., Hosoda K., Inazawa J, Nakoa K. 1995. Structural organization and chromosomal assignment of the obese gene. *J. Biol. Chem.* **270**:27728-27733.

Jeffrei M., Friedman JM. 2002. The Function of Leptin in Nutrition, Weight, and Physiology. *Nutrition Reviews.* **60** (10): 1-14; 68-84, 85-87.

Kalra SP. 1996. The role of the interconnected hypothalamic neuropeptide Y-galanin-opioid network. *Nutrition infertility. Front. Neuroendocrinol.* **17**:371-401.

Marti A., Nieto O., Moreno A., Martínez JA. 2003. Aspectos genéticos de la obesidad infantil. Departamento de Fisiología y Nutrición, Universidad de Navarra, Pamplona. **4** (1): 51-68.

Martinez JA. 1999. Body weight regulation: causes of obesity. *J. Physiol. Biochem.* **55**: 100-103

Martínez Murado P., De Pablos Velasco PL. 1997. Nuevas perspectivas de la obesidad. *Rev. Clin. Esp.* **197**: 303-305.

Mockus I. 2001. Leptina: Regulación y Asociaciones en la Obesidad. *Salud UIS.* **33**:84-89.

Ovies G. 1999. Leptina y reproducción. *Rev. Cubana Endocrino.* **10**(3): 191-97.

Pisabarro R. 1999. Leptina: una hormona secretada por el tejido adiposo. Primer estudio en muestra poblacional uruguaya. *Revista Médica de Uruguay*; **15**: 43-48.

Phillips M., Lui Q., Hammond H., Dugan V., Hey P., Caskey C., Hess J. 1996. Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat. *Nat Genet.* **13**:18-19.

Recabarren SE. 2000. Leptina y reproducción. Laboratorio de fisiología y endocrinología animal. Unidad de concepción campus Chillán.

Rivera Dommarco J., Shamah Levy T., Villalpando Hernández S., González de Cossío T., Hernández Prado B., Sepúlveda J. 2001. Encuesta Nacional de Nutrición Instituto Nacional 1999. Estado nutricional de niños y mujeres en México. Cuernavaca, Morelos, México: Instituto Nacional de Salud Pública.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual/second edition* Cold Spring Harbor NY Cold Spring Harbor Laboratory.

Serrano A., Prieto G. 2002. *Obesidad en los niños. Documento Informativo. Terapeutas Alternativas.*

Silver K., Walston J., Chung W., Yao F., Parikh V., Andersen R., Cheskin L., Elahi D., Muller D., Leible R., Shudiner A. 1997. The Gln 223 Arg and Lys 656 Asn Polymorphisms in the Human Leptin Receptor Do Not

Associate With Traits Related to Obesity. Brief Genetics Reports. Diabetes. **46**: 1898-1900.

Woods AJ., Stock MJ., Halaas JL. 1996. Leptin activation in hypothalamus. Nature. **81**:745.

Simón E., Del Barrio S. 2002. Leptina una hormona relacionada con la obesidad. Anales Sis San Navarra. **25** (Supl. 1): 53-64.

Solís-Pérez E. 2004. Relationship of leptin concentration with insulin, glucose, lipoproteins, cholesterol, triglycerides, and body mass index in obese children in Monterrey, México. Tesis Doctoral. Texas Woman's University, Denton Texas.

Stefan N., Vozarova B., Del Parigi A., Ossowski V., Thompson DB., Hanson RL., Ravussin E., Tataranni PA. 2002. The Gln223Arg polymorphism of the leptin receptor in Pima Indians: influence on energy expenditure, physical activity and lipid metabolism. International Journal of Obesity. **26**:1629-1632.

Stephens TW. 1995. The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. Nature. **337**:530-534.

Stephens TW. 1996. Life without NPY. Nature. **381**:377-378.

Tartaglia LA., Dembski M., Weng X., Deng N., Culpepper J., Devos R., Richards GJ., Campfield LA., Clark FT., Deeds J., Muir, C., Sanker, S., Moriarty, A., Moore, K. J., Smutko, J. S., Mays, G. G., Woolf, E. A., Monroe, C. A. Tepper, R. I. 1995. Identification and

expression cloning of a leptin receptor, OB-R. Cell. **83**: 1263-1271.

Takahashi-Yasuno A., Masuzaki H., Miyawaki T., Ogawa Y., Matsuoka N., Hayashi T., Hosoda K., Inoue G., Yoshimasa Y., Nakao K. 2003. Leptin receptor polymorphism is associated with serum lipids level and impairment of cholesterol lowering effect by simvastatin in Japanese men. Diabetes Reserch and clinical practice. 62:3, 169-175.

Thompson D., Edelsberg J., Colditz GA., Bird A., Oster G. 1999. Lifetime health and economic consequences of obesity. Arch Intern Med , **159**: 2.177-2.183.

Villaseñor A. 2002. El papel de la leptina en el desarrollo de la obesidad. Revista de Endocrinología y Nutrición.**10**(3): 135-139.

Wauters M., Mertens I., Chagnon M., Rankinen T., Considine RV., Van Gaal LF., Bouchard C. 2001. Polymorphisms in the leptin receptor gene, body composition and fat distribution in overweighth and obese women. Nature Publishing group. International Journal of Obesity. **25**: 714-720

Wayne D. 2002. Bioestadística. Distribución Ji-cuadrada y análisis de frecuencia. Ed. Limusa Wiley. 4a edición. 186-188.

Yiannakouris N., Yannakoula M., Melistas L., Chan J., Klimis-Zacas D., Mant Zoros Ch. 2001. The Q223R polymorphism of the leptin receptor gene is significantly associated with obesity and predicts a small percentage

of body weight and body composition variability. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. **86**(9): 4434-4439.

Zhang F., Basinski MB., Beals JM., Briggs SL., Churgay LM., Clauson DK., DiMarchi RD., Furman TC., Hale JE., Hsiung HM., Schoner BE., Smith DP., Zhang XY., Wery JP y Schevitz RW. 1997. Crystal structure of the obese protein leptin-E100. *Nature*. **387**:206-9.

Zhang Y., Proenca R., Maffei M., Barone M., Leopold L., Friedman J. M. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. **372**: 425-432.

