



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL

*Asociación entre las isoformas del receptor de Leptina en sangre con la Diabetes
Tipo 2 e Hipertensión arterial*

Tesis

Tesis para obtener el grado de:

Maestría en ciencias en Biomedicina

Presenta:

Guadalupe Antonio Loera Castañeda

Directores de Tesis:

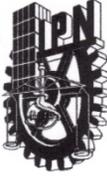
PhD. Francisco Daniel Hernández Velázquez

Profesor titular "A" CIIDIR-IPN Unidad Durango

Dra. en C. Verónica Loera Castañeda

Investigador titular "B" CIIDIR-IPN Unidad Durango

Victoria de Durango, Dgo., Abril del 2010



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Durango, Dgo. siendo las 13:35 horas del día 8 del mes de Junio del 2010 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR-IPN DGO para examinar la tesis titulada:

"Asociación entre las isoformas del receptor de Leptina en sangre con la Diabetes tipo 2 e hipertensión arterial."

Presentada por el alumno:

LOERA

Apellido paterno

CASTAÑEDA

Apellido materno

GUADALUPE ANTONIO

Nombre(s)

Con registro:

A	0	8	0	0	4	2
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dra. Verónica Loera Castañeda

Ph D. Francisco Daniel Hernández Velázquez

Dr. José Ismael Antonio Lares Asef

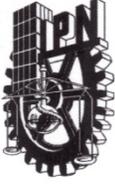
Dra. Martha Rodríguez morán

Dr. Carlos Galaviz Hernández

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

DR. JOSÉ BERNARDO PROAL NAJERA





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTOR DE TESIS

México, D.F. a 19 de junio del 2009

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR-IPN en su sesión Unidad Durango ordinaria No. 5 celebrada el día 12 del mes de Mayo conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

LOERA CASTAÑEDA ANTONIO
Apellido paterno Apellido materno Nombre (s)
Con registro:

A	0	8	0	0	4	2
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de: Maestría en Ciencias en Biomedicina

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:
"Asociación entre las Isoformas del Receptor de Leptina en Sangre con la Diabetes Tipo 2 e Hipertensión Arterial"

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:

2.- Se designa como Director de Tesis al C. Profesor:
Phd. Daniel Hernández Velázquez, Dra. Verónica Loera Castañeda

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesis será elaborado por el alumno en:
CIIDIR IPN UNIDAD DURANGO

que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

El Director de Tesis

Phd. Daniel Hernández Velázquez

Dra. Verónica Loera Castañeda

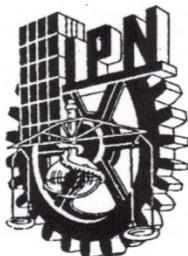
El Aspirante

Loera Castañeda Guadalupe Antonio

El Presidente del Colegio

Dr. José B. Proal Nájera

CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACION PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
C.I.I.D.I.R.
UNIDAD DURANGO
I.P.N.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de **DURANGO, DGO.**, el día **8** del mes **JUNIO** del año **2010**, el (la) que suscribe **GUADALUPE ANTONIO LOERA CASTAÑEDA** alumno (a) del Programa de **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA** con número de registro **A080042**, adscrito a **CIIDIR IPN UNIDAD DURANGO**, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la **DRA. VERÓNICA LOERA CASTAÑEDA** y del **PHD. FRANCISCO DANIEL HERNÁNDEZ VELÁZQUEZ** y cede los derechos del trabajo intitulado **ASOCIACIÓN ENTRE LAS ISOFORMAS DEL RECEPTOR DE LEPTINA EN SANGRE CON LA DIABETES TIPO 2 E HIPERTENSIÓN ARTERIAL**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **antonloera@yahoo.com.mx**. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


GUADALUPE ANTONIO LOERA CASTAÑEDA

Nombre y firma

Dedicatoria

Con todo mi corazón este trabajo está dedicado a la mujer de mi vida y apoyo, a mi esposa Mónica que me ha acompañado en este viaje lleno de recovecos que nos ha dejado muchas experiencias de todo tipo, por el tiempo que se le arrobado a nuestra relación para poder cumplir esta meta a como diera lugar por su comprensión a la falta de tiempo y de compañía, por su fe en mi y su constante apoyo para que este trabajo se realizara mil gracias.

También un agradecimiento a mi hermana Verónica por su paciencia y dedicación por su apoyo y empuje, por su compromiso conmigo y su tenacidad, por su ser mi mentora y compañera de investigación. Por su trabajo que supero por mucho a su responsabilidad profesional, porque sin ella este trabajo jamás hubiera llegado a término, mi admiración y respeto como profesional y como persona. Que Dios te compense con creses toda tu inversión en tu paciencia y apoyo.

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del **CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL** unidad Durango bajo la supervisión del *PhD. Francisco Daniel Hernández Velázquez* Profesor titular “A” CIIDIR-IPN Unidad Durango y la *Dra. en C. Verónica Loera Castañeda* Investigador titular “B” CIIDIR-IPN Unidad Durango

CONTENIDO

Glosario	I
Lista de acrónimos	III
Relación de figuras	V
Relación de cuadros	VI
Resumen	VII
Abstract	VIII
Introducción	1
I Antecedentes	2
1.1 Diabetes	2
1.2 Diabetes tipo 2 (DT2)	3
1.3 Complicaciones de la diabetes	4
1.4 Epidemiología de la Diabetes	4
1.5 Diagnóstico de la DT2	5
1.6 Hipertensión arterial (HTA)	6
1.7 Etiología	9
1.8 Epidemiología de la Hipertensión (HTA)	11
1.9 Leptina	11
1.10 Biología de la leptina	13
1.11 Actividad de la leptina	16
1.12 La leptina y la hipertensión arterial	17

1.13	La leptina y diabetes	18
1.14	Receptor de leptina	18
1.15	8.13 Receptores de citoquinas	19
1.16	Isoformas del receptor de leptina	20
1.17	Actividad del receptor de leptina	21
1.18	Receptor de leptina en diabetes	24
II	Justificación	25
III	Planteamiento del problema	26
IV	Pregunta de investigación	27
V	Hipótesis	27
VI	Objetivos	27
6.1	Objetivo general	27
6.2	Objetivos específicos	27
VII	Materiales y métodos	28
7.1	Diseño metodológico	28
7.2	Universo muestral	28
7.3	Población de estudio	28
7.4	Tamaño de muestra	28
VIII	Criterios de selección	29
8.1	Criterios de inclusión	29
8.2	Criterios de exclusión	29

8.3	Criterios de eliminación	29
IX	Variables	30
9.1	Variable independiente	30
9.2	Variable dependiente	30
9.3	Variables confusoras	30
9.4	Variables intervinientes	31
X	Procedimientos	35
XI	Diagrama de flujo	37
XII	Resultados	38
XIII	Discusión	45
XIV	Conclusiones	47
XV	Perspectivas	48
	Bibliografía	49
	Anexos	56
	Extracción de ARN	56
	Procedimiento de Retro transcripción	58
	Condiciones de PCR para las diferentes isoformas de LEPR	59

GLOSARIO

Casos y controles	Diseño metodológico donde se pretende establecer una asociación. Requiere de un grupo conformado por individuos sanos (controles) y otro grupo de individuos enfermos (casos) ambos expuestos a un factor de riesgo para ser comprobables.
Catecolaminas	Grupo de sustancias sintetizadas por glándulas tienen un grupo catecol y un grupo amino. Tienen actividad hormonal
Citocinas	Sustancias de origen proteico segregadas por células con actividad hormonal
Cromosoma	Fragmento de material genético organizado y compactado con proteínas histonas y no histonas
Daño tisular	Cualquier evento que modifique o afecte el epitelio o estructura de un tejido
Dislipidemias	Falta de homeostasis en el sistema de metabolismo de lípidos
Dominio transmembranal	Porción de un receptor que actúa sobre el espacio inter-membrana de una célula
Dominio intramembranal	Porción de un receptor que actúa sobre el espacio intra celular
Exones	Región codificante del ADN en secuencias génicas
Glucosa post carga	Administración de una concentración conocida de glucosa para análisis de metabolismo de carbohidratos

Haplotipo	Combinación particular de alelos en una región definida de un cromosoma
Hb glucosilada	Producto de la glucosilación de la hemoglobina por parte de la glucosa que permite estimar los valores de glucosa de los últimos tres meses
Hiperglicemia	Niveles por encima de 110mg/dl en estado de ayuno el cual se considera el valor normal de glucosa en sangre
Hiperinsulinemia	Niveles por encima de 20 μ U/ml en estado basal en sangre el cual se considera el valor normal de insulina
Intrones	Región no codificante del ADN en secuencias génicas
Metabolismo	Conjunto de reacciones físicas y químicas que efectúan los sistemas biológicos para construir (anabolismo) o degradar sustancias (catabolismo) con el fin de aprovecharlas
Polimorfismos	Presencia simultánea de genomas que presentan variaciones alélicas en una población
Prevalencia	Proporción de individuos de una población que presentan el evento al que se hace referencia
Síndrome mielodisplásico	Trastornos donde la función de la medula ósea no es adecuada

LISTA DE ACRÓNIMOS

a.a	Amino ácidos
ADA	American Diabetes Association
AGT	Renina, angiotensinógeno
AMP	Adenosin mono fosfato
AT1R	Receptor tipo I de la angiotensina II
DT1	Diabetes tipo 1
DT2	Diabetes tipo 2
EASD	Sociedad Europea Para el Estudio de la Diabetes
ECA	Enzima convertidora de la angiotensina
ECV	Enfermedad Cardio Vasular
FIA	Federación Internacional De Diabetes
G0	Estado de latencia de la célula
G1	Estado de crecimiento y nutrición de la célula
HbA1c	Hemoglobina glucosilada
HNF-4α	Factor 4 alfa nuclear de hepatocitos
HTA	Hipertensión arterial
IFN-γ	Interferon
IL-1	Interleucina 1
IL-12	Interleucina 12
IL-2	Interleucina 2

IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de masa corporal
INSP	Instituto nacional de salud
JNC VII	Del inglés <i>The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure</i>
K	Potasio
LEP	Leptina
LEPR	Receptor de leptina
LEPRc	Isoforma corta del receptor de leptina
LEPRI	Isoforma larga del receptor de leptina
LEPRs	Isoforma soluble del receptor de leptina
mmHg	Milímetros de mercurio
Na	Sodio
NO	Oxido nitroso
SRA	Sistema renina-angiotensina
T3	Triyodotironina
T4	Tetrayodotironina
TA	Tensión arterial
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
TSH	Hormona estimulante de tiroides

RELACIÓN DE FIGURAS

Figura .1	Diagrama del gen de leptina (<i>LEP</i>)	12
Figura 2	Configuración estructural de la leptina	12
Figura 3	Segregación y señalización de la leptina	14
Figura 4	Sistema endocrino modulador de la segregación y función de la leptina	15
Figura 5.	Diagrama del gen del receptor de leptina (<i>LEPR</i>)	19
Figura 6	Estructura general de los receptores de la familia de las citoquinas	20
Figura 7	Isoformas del receptor de leptina y dominios conservados	21
Figura 8	Diagrama de flujo	36
Figura 9.	Gel de agarosa al 1.5% teñido bromuro de etidio LEPRs	39
Figura 10	Gel de agarosa al 1.5% teñido bromuro de etidio LEPRl	40
Figura 11	Gel de agarosa al 1.5% teñido bromuro de etidio LEPRc	40

RELACIÓN DE CUADROS

Cuadro 1	Clasificación y tratamiento de la hipertensión arterial	8
Cuadro 2	Estadística descriptiva de controles y diabéticos con prueba de homogeneidad	37
Cuadro 3	Estadística descriptiva de controles y diabéticos con prueba de homogeneidad separado por sexo	38
Cuadro 4	Estadística descriptiva de controles e hipertensos con prueba de homogeneidad	39
Cuadro 5	Estadística descriptiva de controles e hipertensos con prueba de homogeneidad separado por sexo	40
Cuadro 6	Distribución de las isoformas en la sangre de los tres grupos analizados	41
Cuadro 7	Resultados de asociaciones obtenidas en tablas de contingencia	42
Cuadro 8	Resultados de la prueba de hipótesis de X^2 con corrección de Yates	42

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue identificar la asociación entre las isoformas del receptor de la leptina en sangre con diabetes tipo 2 e hipertensión arterial bajo un diseño metodológico de casos y controles para el cual se reclutaron hombres y mujeres no embarazadas mayores de 18 años asignados en tres grupos de la siguiente manera: un grupo con Diabetes Tipo 2 pero sin Hipertensión arterial, otro grupo que incluyó pacientes con Hipertensión arterial pero sin Diabetes tipo 2, y un tercer grupo de pacientes aparentemente sanos sin ninguna de las dos enfermedades. Se realizó análisis de glucosa, Hb glucosilada, triglicéridos, perfil de lípidos, urea y creatinina, así como mediciones antropométricas de cintura, cadera y de expresión de RNA mensajeros de LEPR utilizando iniciadores específicos para las diferentes isoformas. Los pacientes fueron pareados por sexo e Índice de masa corporal para controlar variables confusoras comunes. Dentro de los resultados encontramos asociaciones específicas entre RNAm de las isoformas LEPR con la DT2 y la HTA esencial. En pacientes con DT2 la Isoforma corta se asoció con un OR= 18.04 (18.08-17.99) mientras que la Isoforma larga presentó un OR= 5.53 (5.88-5.17). Por otro lado en pacientes con HTA la isoforma corta se asoció con un OR= 12.03 (12.14-11.91) mientras que la isoforma larga presentó un OR= 9.7 (9.86-9.53). De ahí que se concluye que existe una elevada asociación entre la presencia de RNA mensajero de las isoformas larga y corta de receptor de leptina en sangre con la DT2 y la HTA

Palabras clave. Receptor de leptina (LEPR), diabetes tipo 2, hipertensión arterial, expresión ectópica

ABSTRACT

The objective of this study was to identify the association between leptin receptor (LEPR) isoforms in blood of patients with Type 2 Diabetes (T2D) and Hypertension (HBP) using a case control methodological design. Men and non-pregnant women 18 years or older were recruited and assigned into any of the following three groups, depending on their health status: one group comprising patients with T2D without HBP, a second group with patients with HBP without T2D, and a third group of apparently healthy subjects to be used as control. Analysis of glucose, glycated hemoglobin, triglycerides, lipid profile, urea and creatinine, and anthropometric measurements were carried out, as well as determination of messenger RNA expression of LEPR with specific primers for each isoform. Patients were matched by sex and Body Mass Index to control confounding variables in common. We found that in patients with T2D the short LEPR isoform was associated with the disease with an OR= 18.04 (18.08-17.99) while the long LEPR isoform had an OR= 5.53 (5.88-5.17). Furthermore, in patients with HBP the short LEPR isoform was associated with the disease with an OR= 12.03 (12.14-11.91), while the long LEPR isoform had an OR= 9.7 (9.86-9.53). We conclude that the presence of messenger RNA for the short and long LEPR isoforms in blood was strongly associated with the presence of T2D or HBP in patients.

Keywords. Leptin receptor (LEPR), type 2 diabetes, hypertension, ectopic expression

INTRODUCCIÓN

La diabetes y la hipertensión son dos de los problemas de salud pública que más aquejan a la población mundial (WHO 2007). En México las prevalencias de ambas enfermedades ocupan el primer y segundo lugar respectivamente como causas de enfermedad de origen no infeccioso, cifras que se reflejan en una pobre calidad de vida de quien la padece y sus familiares (Olaiz 2006). Ambas enfermedades mantienen una asociación recíproca no equiparable, pero fuerte de ambos lados; se sabe que las personas con diabetes tienen mayor probabilidad de desarrollar hipertensión arterial que el resto de la población, mientras que las personas con hipertensión tienden a presentar mayor incidencia de diabetes que el resto de la población (Pou 2001).

Ambas enfermedades son multifactoriales y metabólicas por lo que un gran número de estudios las han analizado desde el punto de vista metabólico.

La Leptina es una citocina con actividad hormonal que actúa regulando la homeostasis energética del organismo, por lo que es uno de los candidatos más prometedores para encontrar relaciones con ambas enfermedades. Se han descrito diversos desórdenes que involucran a la Leptina como agente causal de resistencia a la insulina en la diabetes y con excitación del sistema simpático en la hipertensión, así como, en la ausencia de la sensación de saciedad que a su vez genera obesidad mórbida.

Al ser el Receptor de Leptina (LEPR) el agente ejecutante de la señalización de la Leptina; éste también es un candidato a asociar con ambas enfermedades (Frigolet 2006). En estudios previos la expresión ectópica y las diferencias en la expresión de las isoformas de LEPRreceptores de Leptina se han asociado con la diabetes tipo 2 y la hipertensión arterial.

I.- ANTECEDENTES

1.1 Diabetes

Actualmente la diabetes se define como un grupo de enfermedades metabólicas crónicas y complejas que se caracterizan por un estado elevado de los niveles de glucosa en sangre como resultado de defectos en la acción de la insulina, defecto de la secreción de la insulina, o ambos (ADA 2008). Este grupo de enfermedades es un problema de salud pública a nivel mundial debido a su alta morbi-mortalidad, así como la afectación en cuanto a la calidad de vida de los individuos que la padecen. Se han creado grupos de especialistas y asociaciones que investigan la etiopatología de la enfermedad y su tratamiento. Destacan entre ellas la American Diabetes Association (ADA), la Sociedad Europea para el Estudio de la Diabetes (EASD) y la Federación Internacional de Diabetes (FIA) (OMS 2004).

La clasificación y criterios diagnósticos utilizados en este trabajo están basados en los criterios del ADA:

- a) Diabetes Tipo 1; caracterizada por destrucción de las células β pancreáticas que provoca deficiencia o total ausencia de insulina.
- b) Tipo 2 (DT2); caracterizada por defectos de secreción o acción de la insulina o Ambas.
- c) Otros tipos específicos de diabetes; que pueden ser ocasionados por factores asociados con la actividad de la insulina y su receptores tales como: factores genéticos, desordenes exocrinos, inducción por drogas, trasplante de órganos etc.
- d) Diabetes gestacional; que se caracteriza por presentarse en el embarazo (Diabetes Care 2008).

De todos estos tipos de diabetes, la DT2 es la más frecuente ya que ocupa aproximadamente el 90%-95% de la frecuencia de este tipo de enfermedades en la población y sigue en aumento (WHO 2006, ADA 2008); y es esta misma la que abordamos en este estudio para nuestro análisis.

1.2 Diabetes tipo 2 (DT2)

La etiología de la DT2 es multifactorial, incluyendo factores ambientales tales como la alimentación, el sedentarismo y el porcentaje de grasa corporal; todo esto a su vez se traduce en el fenómeno conocido como obesidad, la cual es considerada un factor de riesgo de gran importancia para el desarrollo de diabetes (González 2001, Guzmán 2003). Se ha comprobado que la grasa visceral está fuertemente asociada a hiperinsulinemia, tanto en estado de alimentación como en ayuno. El mecanismo para el desarrollo de este estado ya está descrito. Este comienza con los adipocitos viscerales que incrementan la actividad del receptor β -3-adrenérgico, estimulando la lipólisis dependiente de catecolaminas y liberando cantidades elevadas de ácidos grasos libres a la circulación; además los adipocitos de las personas obesas producen factor de necrosis tumoral (TNF- α) el cual incrementa la lipólisis en tejido adiposo y muscular liberándose como producto final más ácidos grasos libres que generan una resistencia periférica y hepática a la insulina que trata de compensar el organismo mediante un incremento en la secreción de insulina dependiente de glucosa. (González 2001). Por otra parte, dentro de los factores genéticos para el desarrollo de DT2 están los involucrados con defectos del gen de insulina, del gen del receptor de insulina (Cromosoma 20), Factor 4 alfa nuclear de hepatocitos (HNF-4 α); (Cromosoma 7), y glucosidasa (Cromosoma 12) por mencionar algunos de ellos (Guzmán 2003).

La DT2 se caracteriza por una afectación directa sobre el metabolismo de los carbohidratos, factor importante en la comprensión de su patogenia (Guzmán 2003).

La investigación sobre el metabolismo energético del cuerpo ha propuesto a la leptina y su receptor como elementos participantes en la patogenia de la DT2 al estar asociados a su vez con la obesidad mórbida. Seufert (2004) demostró una relación directa entre los niveles de leptina y la secreción de insulina, evidenciando que la insulina promueve la liberación de leptina; sin embargo la acumulación de esta última ocasiona resistencia celular a la insulina provocando que se liberen ácidos grasos que sustituyen a la glucosa como fuente de energía. Mientras tanto,

esta resistencia a la insulina ocasiona niveles altos de glucosa e insulina en sangre generando estados de hiperinsulinemia e hiperglucemia (Seufert 2004). Farooqi y colaboradores (2007) establecieron la relación entre la homeostasis energética y el receptor de leptina, al estudiar una cohorte con individuos carentes del receptor de leptina quienes expresaban obesidad extrema y deficiencia en el desarrollo sexual. Se han asociado mutaciones en el receptor de leptina con la diabetes en población del norte de china, donde diferentes haplotipos que generan cambios de nucleótidos en la secuencia del gen, que producen cambios de sentido en la traducción y se asocian con la DT2 (Qu 2008).

1.3 Complicaciones de la diabetes

La diabetes es la principal causa de padecimientos oculares (retinopatías, edema macular, ceguera, etc.), nefropatías, falla renal crónica terminal, neuropatías y pie diabético, así como amputación de las extremidades inferiores; de la misma manera la diabetes está reconocida como un factor de alto riesgo para enfermedad cardiovascular (ECV) (Villegas 2004).

1.4 Epidemiología de la Diabetes

Se estima que la diabetes afecta a 285 millones de personas a nivel mundial. En México existen aproximadamente 67,317,000 personas afectadas, lo que representa una prevalencia de 10.1% (IDF 2007). Estudios realizados en México establecen que la prevalencia de la DT2 se eleva con respecto a la edad de la población pues en adultos jóvenes se encontró una prevalencia media de 7%, que por genero es más alta en mujeres (7.3%) que en los hombres (6.5%); en el grupo de mayores de 50 y menores de 59 la prevalencia alcanza 13.5 % en mujeres y 14.2 % en hombres y por último en mayores de 60 pero menores 69 se incrementa hasta 21.3% en mujeres y 16.8% en hombres (Olaiz 2006). No obstante estos datos se encuentran por debajo de la media nacional del 22% establecido mediante la encuesta nacional de salud y nutrición 2006 (Olaiz 2006).

La prevalencia nacional se ve afectada por la alta incidencia que presentan los estados del centro y del noroeste del país que sobrepasan la media nacional, destacando: Nayarit, Zacatecas, Sinaloa, Coahuila, Baja California Sur, Durango y Sonora (Olaiz 2006). Durango es uno de los estados de mayor afectación por diabetes ya que existe una prevalencia del 18.9% (Olaiz 2006. INSP 2007) y se ha tenido un aumento del 4.2% de prevalencia con relación a la encuesta nacional de salud y nutrición del año 2000 (INSP 2007).

1.5 Diagnóstico de la DT2

Conocer los niveles plasmáticos de glucosa ayuda a comprender mejor el metabolismo de los carbohidratos, por lo que del análisis de estas cifras de glucemia se han descrito fenotipos normales, fenotipos con predisposición a la pérdida de homeostasis y fenotipos que se consideran patológicos. Los cuerpos colegiados han dado los siguientes parámetros para categorizarlas:

1. Hipoglucemia con cifras menores a 60 mg/dl,
2. Glicemia normal de 70-100 mg/dl,
3. Pre-diabetes o deterioro del metabolismo de la glucosa, que son cifras de glucosa que se consideran un factor de riesgo para generar diabetes, de 101 mg/dl a menos de 126 mg/dl
4. Diabetes, con cifras iguales o superiores a 126 mg/dl que deben ser confirmadas (ADA 2008)

El diagnóstico de la diabetes se basa en la determinación de glucosa post carga (100 o 75 gr de sucrosa) en la cual cifras menores de 140 mg/dl se consideran normales. Valores iguales o mayores de 140 mg/dl pero menores de 200 mg/dl se consideran como estado pre diabético donde hay problemas en el metabolismo de carbohidratos, mientras que cifras mayores o iguales a 200 mg/dl sugieren diabetes, aunque estas deben ser confirmadas (Diabetes Care 2008).

Por otro lado existen pruebas de monitoreo de la evolución, deterioro o control del metabolismo de la glucosa, dentro de las cuales destaca la Hemoglobina glucosilada (Hb) la cual nos proporciona una aproximación del promedio de las

cifras de glucosa que ha presentado un individuo los últimos tres meses. La Hb glucosilada se forma por la condensación de la glucosa en la porción N-terminal de la cadena beta de la hemoglobina por la adición de residuos de glucosa: a mayor glucemia, mayor glucosilación de la hemoglobina. En diabetes las cifras altas de Hb glucosilada se han asociado con un mayor riesgo de generar complicaciones en la DT2. La Hb glucosilada en conjunto con el estudio de glucosa de ayuno se utilizan como pruebas de escrutinio en pacientes con factores de riesgo preexistentes aceptada por los grupos colegiados (Pérez 2009).

La prueba que se considera como el estándar de oro es la curva de tolerancia a la glucosa aunque no es la más utilizada por disparar el costo del diagnóstico así como la incomodidad del paciente y la poca reproducibilidad. Sin embargo es la más sensible para determinar el manejo de la glucosa y en forma indirecta la resistencia a la insulina (Trujillo 2007)

1.6 Hipertensión arterial (HTA)

La HTA se considera tanto una enfermedad como un factor de riesgo cardiovascular. La HTA se define como una elevación persistente de los valores de tensión arterial por encima de los límites considerados como óptimos (120/80) aunque estos valores se encuentran en constante actualización a la luz de la información que se genera en forma continua (Berjón 1998). Actualmente la HTA se clasifica y se trata de acuerdo a los criterios del séptimo informe del Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure (JNC VII) del 2003, que contempla la medición de cifras tanto para la tensión sistólica como para la diastólica (Chobaniam 2003). Aunque hay que contemplar las cifras de ambas tensiones arteriales para evaluar el riesgo de generar complicaciones algunos médicos prefieren analizarlas por separado ya que se creía que la tensión diastólica era un mejor indicador de la resistencia periférica que la tensión diastólica; hecho que no ha sido apoyado del todo. La mayoría de las complicaciones, incluyendo la enfermedad coronaria, el ictus, la enfermedad arterial periférica y la insuficiencia cardíaca se han mostrado estar más relacionadas con la presión arterial sistólica que con la diastólica, al igual que

en evento cerebrovascular (G.E.H.A. 2005). Aunque las cifras de tensión arterial normales se encuentran en el rango de los 120 a 129 mmHg para la presión sistólica y de 80 a 84 mmHg para la diastólica, las cifras de tensión arterial consideradas como óptimas se encuentran en 120 mmHg para la tensión sistólica y de 80 mmHg en la tensión diastólica o ligeramente por debajo. Cifras por encima de los 120/80 mmHg se consideran un factor de riesgo de pre-hipertensión que predispone a que el individuo genere un estado patológico hipertensivo. En general, estas cifras se organizan y se dividen en cuatro estadios que se basan en la sintomatología, el riesgo al desarrollo de complicaciones posteriores, así como en la forma en que el médico los puede abordar para su tratamiento. La clasificación actual se muestra en el cuadro 1:

Cuadro 1. Clasificación y tratamiento de la hipertensión arterial

Clasificación	Presión arterial sistólica (mmHg)	Presión arterial diastólica (mmHg)	Manejo		
			Modificación del estilo de vida	Tratamiento inicial con drogas	
				Sin indicaciones precisas	Con indicaciones precisas
Normal	<120	<80	Estimular		
Pre-Hipertensión	120-139	80-89	Si	No indicar drogas antihipertensivas	Drogas indicadas en la urgencia
Hipertensión estadio 1	140-159	90-99	Si	Diuréticos tiazídicos para la mayoría; se puede considerar inhibidores de la ACE, bloqueadores de los receptores de angiotensina, Beta bloqueantes, bloqueadores de los canales de calcio, o combinación.	Drogas para las indicaciones precisas. Otras drogas antihipertensivas (diuréticos, inhibidores de la ACE, bloqueadores de los receptores de angiotensina, Beta bloqueantes, bloqueadores de los canales de calcio) según necesidad.
Hipertensión estadio 2	>160	>100	Si	Combinación de 2 drogas para la mayoría (usualmente diuréticos tiazídicos y inhibidores de la ACE, o bloqueadores de los receptores de angiotensina, o Beta bloqueantes, o bloqueadores de los canales de calcio)	Drogas para las indicaciones precisas. Otras drogas antihipertensivas (diuréticos, inhibidores de la ACE, bloqueadores de los receptores de angiotensina, Beta bloqueantes, bloqueadores de los canales de calcio) según necesidad.

(Chobaniam 2003)

La HTA para fines de este estudio se clasificó como esencial o sistémica y secundaria o de etiología indefinida (Ruesga 2005), siendo desconocida la participación de ésta última en las prevalencias mencionadas anteriormente. En general, la HTA sistémica es de desarrollo lento y gradual, y se ha descrito que en sus inicios los mecanismos compensadores que controlan a los factores presores, pierden actividad dando lugar a el incremento en la frecuencia cardiaca, volumen

circulante que se traducen en un mayor volumen por latido y por ende en un mayor gasto cardiaco lo que en consecuencia origina el fenómeno hipertensivo (Ruesga 2005)

Estudios epidemiológicos han documentado una correlación entre la edad y las cifras de tensión arterial concluyendo que conforme aumentaba la edad, las cifras de tensión arterial aumentan; sin embargo este hallazgo no es normal ni benéfico para el sujeto lo que indica que personas mayores de edad deben de tener mayor cuidado de conservar sus cifras de tensión arterial en niveles óptimos (G.E.H.A. 2005).

1.7 Etiología

La etiología de la HTA es multifactorial, dentro de los factores ambientales modificables se pueden identificar: tabaquismo (acelerador de la aterosclerosis y generador de aumento del colesterol sérico), alcoholismo (eleva la tensión arterial mediante una respuesta simpática central), alto consumo de sodio y potasio electrólitos que pueden generar HTA por elevación de catecolaminas o aceleración de la bomba de Na/K, el consumo de cafeína estimula la actividad del sistema simpático, el sedentarismo, las hiperlipidemias, la diabetes, la obesidad, el estrés (Huerta 2001) y niveles elevados de Leptina. Shek y colaboradores (1998) describieron esta última, al establecer de forma experimental que al inyectar leptina de manera crónica a ratas vía arterias aorta y femoral a altos niveles se elevó la tensión arterial (TA). Por otro lado se encuentran los hallazgos descritos por Vecchione y colaboradores (2002) en donde las células endoteliales y los anillos aórticos responden a los altos niveles de leptina con la generación de óxido nítrico que es un agente hipotensor. El óxido nítrico es un factor anti-aterogénico y funciona como neurotransmisor y que es liberado en la circulación cerebral, pulmonar y coronaria. Es sintetizado por las células del endotelio vascular produciendo vasodilatación (Drucker 2005) y es dependiente de la sintasa de NO, enzima que se activa por la presencia de iones calcio en el medio intracelular. De ahí que estímulos que incrementan la concentración del calcio intracelular son

considerados vasodilatadores dependientes del endotelio. Se cree que la liberación de NO modula el efecto de los vasoconstrictores, dentro de los que destacan: Angiotensina II, Agonistas adrenérgicos α y Endotelina I. Sin embargo, el estímulo fisiológico más importante de la síntesis y liberación de óxido nítrico es la fricción del flujo sanguíneo sobre la superficie endotelial, pues la sintasa de óxido nítrico endotelial es sensible a las variaciones de presión parcial de oxígeno, activándose cuando ésta disminuye (Drucker 2005)

Existen otros factores que se consideran como no modificables, dentro de los cuales están : la raza (habiendo mayor riesgo en los Afroamericanos), género (al ser más propenso el sexo masculino) (Huerta 2001, Simone 2006) y aspectos genéticos como los que involucran las modificaciones de la actividad de la leptina y su receptor así como y alteraciones en los sistemas renina-angiotensina (SRA), renina, angiotensinógeno (AGT), enzima convertidora de la angiotensina (ECA) y receptor tipo I de la angiotensina II (AT1R), que son considerados como los más importantes debido a su relación con la regulación de la tensión arterial (TA) a través de su influencia en la homeostasis sodio-agua y en el tono vascular (Puras 1995). Otro regulador de los niveles de TA es la angiotensina II que es un péptido vasoconstrictor muy potente que tiene un marcado efecto hipertensor. Esta hormona se forma a partir del angiotensinógeno del plasma mediante una serie de reacciones enzimáticas que se inician con la renina que producida en el aparato yuxtaglomerular del riñón, cuya acción sobre el angiotensinógeno produce la angiotensina I que después es convertida en la angiotensina II por acción de la enzima convertidora de angiotensina (ECA). La angiotensina II modifica las cifras de tensión arterial cuando la homeostasis del sistema cardiovascular no es ideal (Drucker 2005).

Otros factores genéticos asociados con la hipertensión son la hiperinsulinemia e hiperglucemia ya que se ha descrito que niveles elevados de glucosa ocasionan remodelación del epitelio que recubre las paredes del sistema circulatorio ocasionando esclerosis estando ambos factores asociados a la acción que tiene la leptina a nivel celular y en diferentes niveles en el sistema cardiovascular y renal, así como el aumento de la descarga simpática (López 2006).

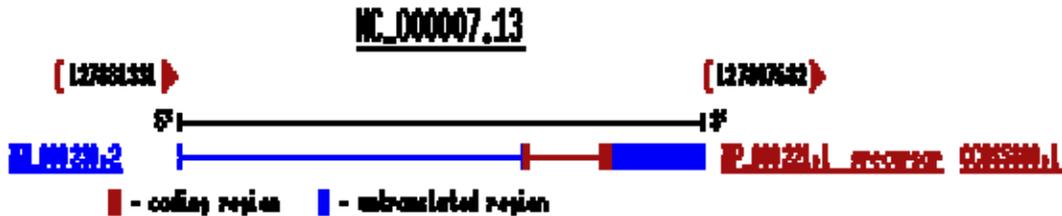
1.8 Epidemiología de la Hipertensión (HTA)

La prevalencia de hipertensión arterial a nivel mundial no es del todo clara aunque a nivel nacional se estima una prevalencia del 32.2%, de la cual los hombres son más propensos ya que presentan una prevalencia del 20.1% mientras que las mujeres presentan una prevalencia del 12.1%. Además se cree que el 50% de los hombres mayores de 60 años padecen HTA y que la mayoría de ellos lo desconoce (Olaiz 2006).

Al igual que la DT2 la prevalencia de HTA es más alta en los estados del centro y del noroeste del país (Nayarit, Zacatecas, Sinaloa, Coahuila, Baja California Sur, Durango y Sonora) sobrepasando la media nacional (Olaiz 2006). En lo particular el estado de Durango presentó una prevalencia en el 2006 a dos puntos por encima de la media nacional (INSP 2007), incrementándose 25.9% desde el 2000 (INSP Dgo. 2006).

1.9 Leptina

Uno de los reguladores del metabolismo energético es la leptina, la cual es una proteína codificada por el gen *LEP* el cual se ubica en el cromosoma 7 en la región q31.3 (NCBI.LEP). El gen consta de más de 15000 pares de bases y posee tres exones separados por dos intrones. En los exones 2 y 3 es dónde se lleva a cabo la síntesis de leptina (Zahng 1994). En su homólogo del ratón la región promotora tiene una secuencia C/EBP, la cual es un factor de transcripción, seguido de una caja Timina Adenina Timina Adenina (TATA) (Fabienne 1996).

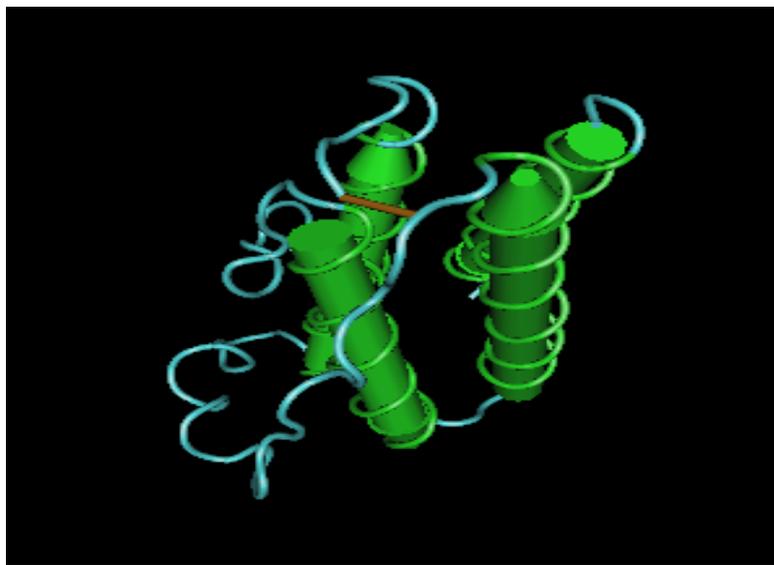
Figura .1 Diagrama del gen de leptina (*LEP*)

Fuente: <http://ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/leptin>

En los seres humanos la Leptina es regulada por diversos elementos tales como AMP-cíclico o los glucocorticoides. El gen posee 650 kilobases, aunque el ácido ribonucleico mensajero (ARNm) sólo cuenta con 4.5 kilobases (Sánchez 2005). La proteína consta de 167 a.a con un peso molecular de 16KD y contiene un puente disulfuro necesario para su actividad biológica.

La resonancia magnética nuclear y el análisis estructural por cristalografía, revelaron que la leptina está compuesta por cuatro hélices- α antiparalelas unidas por dos brazos largos cruzados y un pequeño bucle (Keiichi 1998; Ren 2004; Fruhbeck 2006).

Figura 2. Configuración estructural de la leptina



Fuente: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?uid=55396>

En 1994 Zhang y su equipo de colaboradores lograron la clonación de este gen que actualmente se conoce como *Lep* debido a que a la proteína identificada como su producto dieron el nombre de “*leptina*” que en su raíz griega “*leptos*” significa delgado. Sin embargo, en ciertos ensayos matemáticos, como el metaanálisis realizado por Paracchini y cols (2005) no se encontró ninguna asociación entre la leptina y la obesidad. Las expectativas que se tenían sobre este elemento fueron posteriormente confirmadas demostrándose su importancia en el control de la ingesta alimentaria y el peso corporal, ya que tanto en humanos como en roedores la ausencia de leptina causa obesidad severa e hiperfagia (Friedman 1998). Aunque esta no sea la única causa de la obesidad, sus mutaciones o ausencia pueden ser determinantes para presentar el fenotipo de obesidad que es una de las enfermedades más importantes de la vida moderna (Simon 2002).

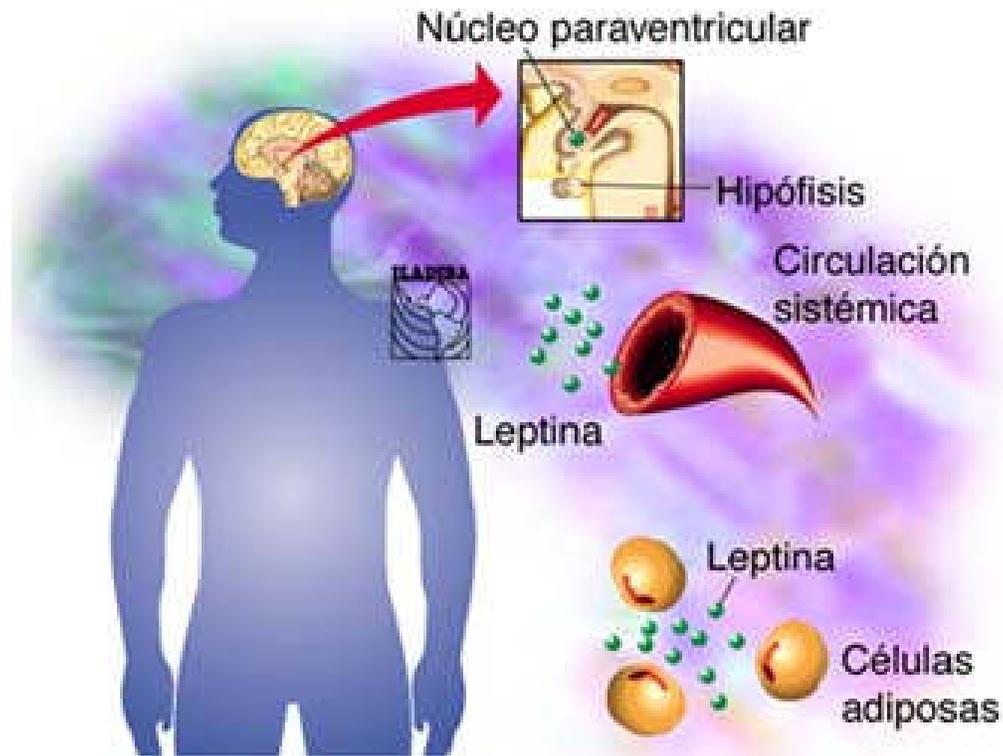
1.10 Biología de la leptina

La leptina es producida principalmente por los adipocitos, aunque también se expresa en menor proporción en placenta, hipotálamo, musculo esquelético, mucosa gástrica y epitelio mamario (Sánchez 2005). La leptina se encuentra en la circulación sanguínea de forma libre y ligada a proteínas tales como el receptor soluble de leptina y alpha2-macroglobulina (Kratzch 1995, Landt 2000).

Su secreción varía de acuerdo a un ritmo circadiano en forma de pulsos aproximadamente cada 45 minutos. Su concentración aumenta conforme avanza el día alcanzando su pico máximo aproximadamente a la media noche para luego decrecer e iniciar un nuevo ciclo; las concentraciones de este ciclo dependen de la alimentación ya que un estado de ayuno puede hacer que la concentración de leptina disminuya, aunque se ha reportado que también esta disminución es determinada por los niveles de insulina en plasma (Sánchez 2005). En el caso de la leptina endógena su vida media es de aproximadamente 25 minutos, mientras

que en la exógena es de 90 minutos aproximadamente y su eliminación se lleva a cabo por vía renal (Sánchez 2005; San Miguel 2005).

Figura 3. Segregación y señalización de la leptina

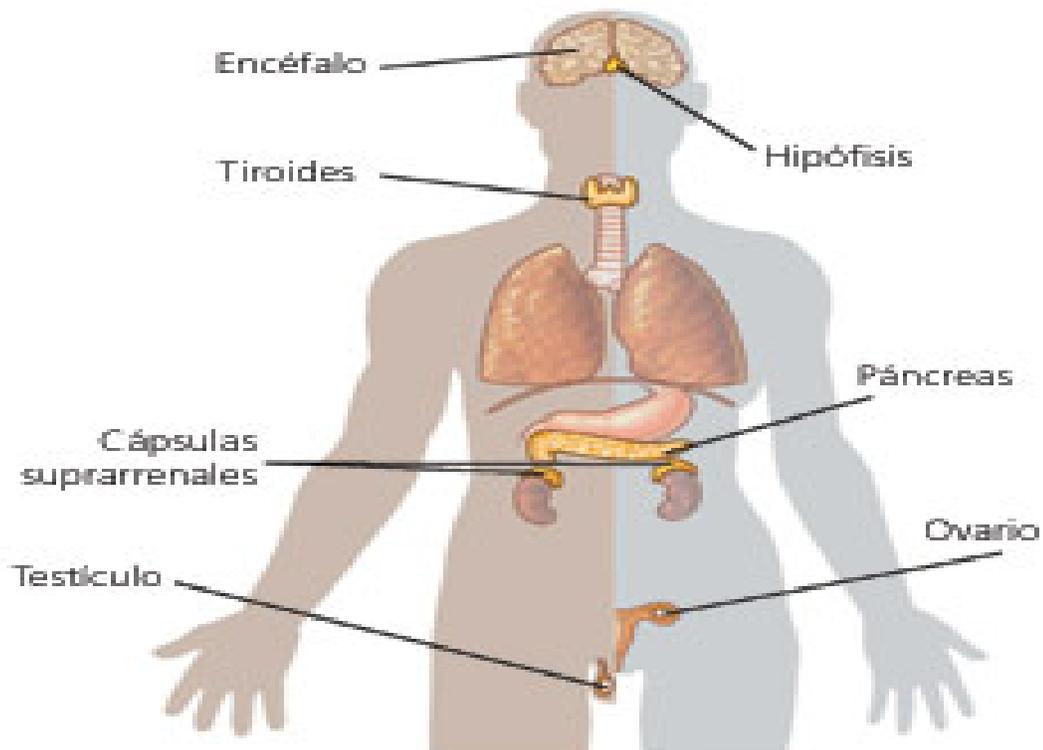


Fuente: <http://ilevolucionista.blogspot.com/2008/11/el-mono-obeso-entrevista-jos-enrique.html>

Se sabe que la expresión de la leptina es promovida por algunas hormonas como el cortisol, la insulina y la glucosa e inhibida por otras como la testosterona, la epinefrina y la norepinefrina (Kraemer 2002). También se ha descrito la inhibición de la expresión de leptina por la proteína SOCS-3, la cual pertenece a una familia de proteínas con dominios SH2 que tienen sitios específicos de unión para residuos fosforilados de tirosina. La estructura general está conformada por una región amino terminal variable, un dominio central SH2 y un dominio carboxilo terminal llamado caja SOCS, esta estructura aparentemente se une a Jak-2 sólo si la leptina se encuentra presente inhibiendo la autofosforilación de la cinasa y la fosforilación del receptor de esta manera inhibe la señalización de la leptina a su receptor generándose la resistencia a la leptina (Frigolet 2006). En otros estudios se observó que para mantener los niveles de leptina se necesita Zinc, afectando

también la producción de $TNF\alpha$ e IL-2, además de que la leptina es una influencia necesaria para la actividad de algunas hormonas tiroideas (Botella-Carretero 2001). La leptina tiene una regulación endocrina, por ejemplo el ciclo circadiano que presenta está asociado a la regulación de la hormona estimulante de tiroides (TSH); no obstante, la deficiencia de TSH responde a la administración de leptina exógena. Sin embargo, las hormonas tiroideas triyodotironina (T3) y tetrayodotironina (T4) a su vez regulan la expresión y acción de la leptina durante el periodo de inanición dejando evidencia de la relación que mantiene la leptina con el sistema endocrino (Blüher 2004)

Figura 4. Sistema endócrino modulador de la segregación y función de la leptina



Fuente: <http://biologiamza.blogspot.com/2009/06/sistema-endocrino-u-hormonal.html>

1.11 Actividad de la leptina

La leptina tiene múltiples funciones en la regulación del metabolismo aparte de actuar sobre diferentes órganos y tejidos, por ejemplo se sabe que la leptina se expresa en el útero y placenta. Se ha documentado la expresión variable de leptina en el endometrio y trofoblasto en el cerdo (Smolinska 2007).

La función más conocida de la leptina es la regulación del peso corporal, que involucra la actividad de la leptina sobre el hipotálamo donde actúa mediante dos vías: una orexigénica, inductora de apetito, donde la leptina actúa sobre las neuronas NPY y AGRP; y una vía anorexigénica, inductora de saciedad, donde la leptina actúa sobre neuronas POMC, α MSH y CART generando anorexia o bulimia (Fruhbeck 2006, Godínez 2004). Las células POMC producen una hormona peptídica alfa anorexígeno estimulante de melanocitos que actúan a través de los receptores melanocortina que regulan la actividad de la leptina (Bjorbek 2004).

Se sabe que la leptina tiene una influencia sobre la activación de las vías JAK /STAT. En ensayos experimentales se ha descrito a la leptina como una hormona con propiedades anti apoptóticas ya que ejerce su acción mediante señalización de las vías JAK/STAT y ISR-PI 3-kinase-Akt generando la inactivación de la muerte celular programada. Mansour sometió a células de timo de ratas a tratamiento generador de apoptosis y a la par tratando a un grupo con leptina exógena encontrado disminución significativa de la apoptosis celular en las muestras tratadas con leptina (Sweeney 2002, Mansour 2006) También se ha descrito la leptina como un factor de proliferación asociado a un mal pronóstico de cáncer endometrial al actuar sobre las vías MAPK, AKT, STAT3 generando promoción de la invasión del cáncer (Sharma 2006). También se ha descrito su participación en el crecimiento de tumores mamarios al actuar sobre el factor de crecimiento endotelial y la expresión de la ciclina D por lo cual se le considera como factor de riesgo para cáncer de mama (Gonzalez 2006). Otros autores han descrito que la leptina aumenta la actividad de HER2 en el cáncer de mama ocasionando mayor resistencia a los tratamientos para este tipo de cáncer (Fiorio

2008). En estudios *in vitro* sobre carcinoma hepato celular se observó que la leptina impulsaba a las células cancerosas a pasar de G0 o G1 a fase S y mayormente a G2 lo que corrobora su capacidad como agente mitógeno (Zhou 2008). En la esclerosis múltiple se ha reportado que en la evolución de la enfermedad aumenta la expresión de la leptina (Matarese 2005). Se han descrito otras funciones tales como la regulación de la inflamación, la hematopoyesis y el sistema inmune. En cuanto a la inflamación se le ha asociado con el factor de necrosis tumoral (TNF- α), el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), la interleucina 1 (IL-1), la interleucina 2 (IL-2), la interleucina 6 (IL-6), la interleucina 12 (IL-12), el interferon (IFN- γ), células T y macrófagos, ya que aumentó su actividad durante la respuesta inflamatoria (Fantuzzi 2000). En la hematopoyesis la leptina juega un papel importante ya que activa a los monocitos macrófagos, aumenta la cantidad de linfocitos circulantes y regula la producción de células T, CD4 y CD8, además se han descrito algunas mutaciones que pueden afectar los niveles de estas células y otras líneas celulares (Sanchez-Margalet 2003, Fantuzzi 2000). Otras funciones de la leptina están asociadas con el inicio de la pubertad y la maduración sexual, ya que tiene propiedades como factor de crecimiento debido a su relación con eventos mitógenos, con la respuesta inmune, eventos pro-inflamatorios, aumento de masa mineral ósea y eventos cardiovasculares (Sánchez 2005).

1.12 La leptina y la hipertensión arterial

Shek (1998) describe un aumento de la tensión arterial tras la infusión de leptina vía intra-femoral o carótida por siete días en un modelo murino, al igual que un fenómeno de diuresis que vuelven a su estado basal después de retirar el estímulo de la leptina. Por otro lado, en los experimentos *in vitro* con células de anillos aórticos se asocia a la leptina con la producción de óxido nítrico (NO) que tiene un efecto hipotensor (Vecchione 2002). Se ha llegado a la conclusión que la leptina genera contracción cardíaca que es compensada por factores tales como la generación de óxido nítrico (Wold 2002) además induce la producción de proteína C reactiva (PCR) la cual es un marcador de inflamación y de daño en músculo

cardiaco (Singh 2002). A partir de este hallazgo se han descrito diferentes mecanismos para explicar el aumento de la TA, entre los que destaca la acción simpática ejercida por la leptina sobre el sistema cardio-renal (Rahmouni 2004). Imatoh 2003 describe por estudio de casos y controles que niveles altos de leptina son factor de riesgo para desarrollar HTA (Imatoh 2008).

1.13 La leptina y diabetes

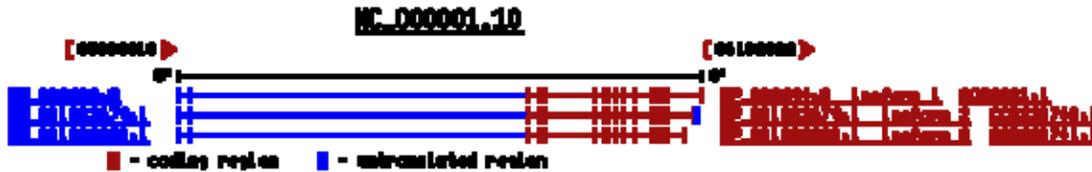
Al ser una proteína reguladora del sistema energético del cuerpo, la leptina también se ha considerado una de las proteínas candidatas para asociarse con la Diabetes. La actividad de la leptina sobre la función del páncreas ha sido de gran importancia ya que se ha demostrado que niveles disminuidos de leptina producen estados de hiperinsulinemia que se revierten cuando se administra leptina exógena (Seufert 2004). En estudios posteriores se identificó que la leptina inhibía la transcripción del gen de la insulina disminuyendo la generación de la pre-proinsulina y por lo tanto la insulina circulante produciendo estados de hiperglicemia (Seufert 2004). Además se ha descrito que la leptina modifica el metabolismo de los lípidos del organismo mediante modelos animales que al ser tratados con leptina exógena disminuye la concentración de triglicéridos plasmáticos (Prieur 2008). En las dislipidemias se ha observado que disminuye las fracciones proteicas de colesterol (Prieur 2008). La leptina actúa en forma directa sobre la beta oxidación de músculo, la cual ayuda a que los lípidos plasmáticos sean aprovechados para la generación de energía, la glucólisis, además de que aumenta las enzimas de la beta oxidación como el PPAR α (Prieur 2008).

1.14 Receptor de leptina

La identificación del receptor de leptina se llevó a cabo en forma inicial en el ratón por medio de proteínas híbridas administradas al torrente sanguíneo y rastreando la señalización, encontrándose la distribución del receptor de leptina (*Lepr*) (Tartaglia 1995). La ubicación del receptor de leptina en: ratones, ratas y humanos no está conservada por lo que el modelo animal debe de ser tratado y extrapolado antes de sacar conclusiones (Chung 2006). Este receptor es codificado en el gen

LEPR que se encuentra en la región p31 del cromosoma 1, posee 18 exones y 19 intrones, y pertenece a la súper familia de receptores de citoquinas (Baumann 1996).

Figura 5. Diagrama del gen del receptor de leptina (*LEPR*)



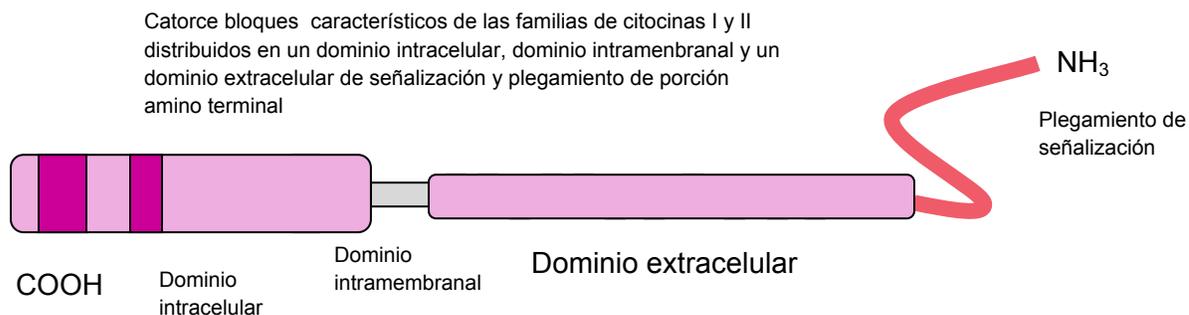
Fuente: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/receptorleptin>

1.15 Receptores de citoquinas

Esta familia de receptores tiene dominios conservados y funciones relacionadas; se caracterizan por plegarse sobre si mismas para formar algo similar a un sandwich. Se dividen en dos grupos los receptores de citoquinas tipo 1 y los receptores de citoquinas tipo 2, ambos fueron relacionados por conservar secuencias de aminoácidos idénticas en sus estructuras básicas, distribuidos en 14 bloques de secuencias altamente conservados (Bazan 1990),

Las citoquinas generan cascadas de señalización por fosforilación de su hormona señaladora (Bazan 1990) y por tanto se creía que todos los receptores de citoquinas estaban situados en la periferia celular. Sin embargo se empezaron a reportar diversos receptores que eran solubles y estaban en sangre abriendo nuevas líneas de investigación sobre estos nuevos receptores (Eelson 1998). Por su naturaleza y estructura el receptor de leptina se considera una citoquina del tipo I (Baumann 1996).

Figura 6. Estructura general de los receptores de la familia de las citoquinas



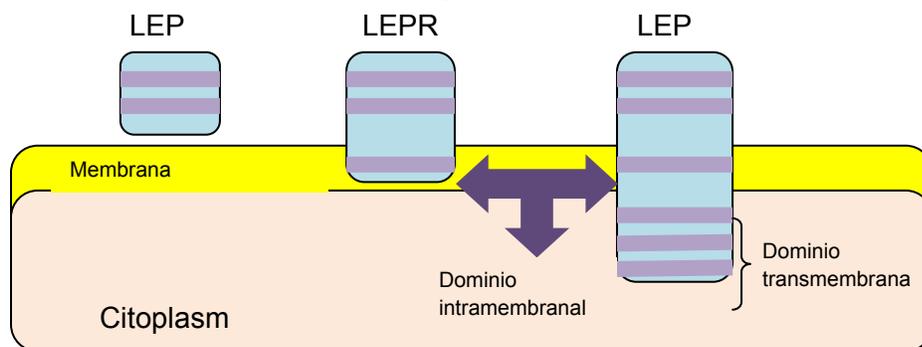
Fuente: BAZAN J.F. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990; 87:6934-6938.

1.16 Isoformas del receptor de leptina

El receptor se presenta en tres diferentes isoformas en el humano dadas por *splicing* alternativo denominadas: isoforma soluble, isoforma corta, e isoforma larga; cada una con longitud y actividad diferente (NCBI GeneID:3952).

La isoforma larga tiene una extensión de 3,824 pb que se traducen en un producto de 1,165 a.a. con un peso molecular de 132,493 Dalton. La isoforma corta tiene una extensión de 3,096 pb que se traducen en un producto de 958 a.a con un peso molecular de 109,393 Dalton. Ambas isoformas tienen una similitud cercana al 100% hasta el aminoácido 816 donde inician las diferencias a nivel del residuo 839 su similitud se reduce al 70%. Ambas isoformas presentan un dominio intramembranal de 23 a.a. (Tartaglia 1997); sin embargo, su dominio transmembranal es muy diferente ya que la isoforma larga posee una extensión de 302 a.a. mientras que la isoforma corta solo posee 34 residuos (Bjorkbaek 1997). La isoforma soluble por su parte tiene una extensión de 5,157 pb que se traducen en un producto de 896 a.a. con un peso molecular de 10,490 Dalton (Haniu 1998). A pesar de su nombre esta última no es la única que se ha observado en circulación. La expresión en sangre de las otras isoformas se han visto asociadas a dolor lumbar y otras patologías, y la presencia ectópica de estas isoformas propias de membrana se han asociado a proteólisis de la membrana (Maamra 2001).

Figura 7. Isoformas del receptor de leptina y dominios conservados



Fuente: Tartaglia L. the Leptin Receptor. The journal of biological chemistry 1997;272(10):6093-6096

La expresión de otras isoformas en plasma también ha sido sugerida como la vía alterna para la segregación del receptor soluble a la circulación evadiendo la maduración en el aparato de Golgi y vaciamiento, como lo hacen la mayoría de las proteínas que se vacían al torrente, sin que esto este del todo confirmado (Ge 2002). No obstante la isoforma soluble es ubiquitinizada en forma normal para su degradación por la proteína clatrina en la endocitosis (Belouzard 2006)

1.17 Actividad del receptor de leptina

La acción que inicia la leptina a través de sus receptores, depende enteramente de los dominios que pose cada una de las isoformas y su sitio de expresión. Sin embargo; estas funciones están relacionadas con el control de la homeostasis de la energía del cuerpo y de la función neuroendocrina (Gong 2007). Se ha descrito que el receptor de membrana posee regiones altamente conservadas divididas en dos cajas con un segmento intracelular de 29 aminoácidos que están ubicados a 15 aminoácidos del grupo carboxilo terminal, el cual se considera indispensable para la transducción de señales. Dentro de esta secuencia se ha identificado un par de aminoácidos hidrófobos (Leu896/Phe897) que son cruciales para la señalización, al igual que tres glutamatos distales de la primera porción conservada los cuales cumplen con la generación de cascada de señalización a STAT3 (Bahurenberg 2002) La señalización requiere 44 aminoácidos básicos más

la presencia de 21 aminoácidos adicionales del dominio citoplasmático (Bahurenberg 2002). Las regiones intrónicas del gen *LEPR* también han sido estudiadas y se ha encontrado que el tamaño exacto de cada intrón es conservado, a excepción de los intrones entre exones 7 y 8, y entre los exones 11 y 12, que miden 153 y 80 pares de bases, respectivamente; además se han descrito dos secuencias polimórficas candidatas a su utilización para genética de poblaciones (Chung 1996).

La isoforma larga se expresa principalmente en: hipotálamo, cerebelo, corteza piriforme, tálamo, hipocampo, amígdalas y tracto respiratorio (Sánchez 2005).

La Leptina activa vías alternas para generación de energía y aunque el cerebro es uno de los órganos que se alimenta principalmente de glucosa su actividad en cerebro no está del todo dilucidada (Golden 1997). La señalización de *LEPR* en el Sistema Nervioso Central (SNC) ya ha sido descrita, y de acuerdo con Leshan y colaboradores (2006) se sabe que genera estas cascadas de señalización al fosforilar a JAK2 mediante varios residuos de tirosina, activando a STAT3 lo que provoca diversas reacciones a nivel del SNC como activación de la vía anorexigénica, orexigénica y excitación del sistema simpático (Leshan 2006). Aunque se ha tratado de asociar los niveles de expresión de *LEPR* con los niveles de leptina se ha descrito que el receptor de leptina en músculo se expresa sin correlación directa con los niveles de leptina en suero (Borja 2007).

La acción de la isoforma larga (*LEPRI*) se basa en la activación de sistemas en los que intervienen los receptores STAT5 (Gong 2007), y de la proteína Janus-Kinasa por fosforilación (Bjorbaek 1997, Gong 2007). La isoforma corta se presenta en: riñones, pulmones, plexo coroide e hipotálamo y su acción también puede deberse sólo a la activación de algunos tipos de proteínas Janus (Janus2) por fosforilación débil y superficial (Bjorbaek 1997)

La isoforma soluble se expresa en plasma y su principal función es el mantenimiento de los niveles de leptina en sangre. Las mutaciones o ausencia del este receptor, pueden generar problemas de balance metabólico y afectar sistemas como el de la insulina.

Se han realizado diversos estudios relacionando mutaciones en el gen con los niveles de expresión de LEPR. El grupo indígena Pima en México se caracteriza por presentar un fenotipo con alto contenido de tejido adiposo y resistencia a la insulina, lo cual ha sido asociado con la presencia de siete polimorfismos con cambio de sentido relacionados con obesidad extrema y resistencia a la insulina (Thompson 1997). Li y colaboradores (2005) correlacionaron los niveles de leptina con la expresión del receptor soluble de la leptina y la insulina, así como con la aparición de la pubertad y el inicio de la menarca, el porcentaje de tejido magro en la maduración del ser humano. La leptina es regulada por el receptor soluble, el cual puede estar unido a la leptina plasmática (Zastrow 2003; Huang 2000). En animales, específicamente el cerdo, la leptina y su receptor son determinantes para el éxito en la fecundación del óvulo (Aquila 2008).

Algunos estudios han considerado utilizar el receptor soluble como tratamiento del cáncer gástrico ya que se le han encontrado acciones inhibitorias de ciertas hormonas retrasando el avance del mismo (Wiwanitkit 2007). Por otra parte, en el cáncer de mama se ha encontrado que tanto LEP como LEPR presentan sobreexpresión, asociándose particularmente con un mal pronóstico de dicho cáncer (Garofalo 2006). De hecho se ha propuesto su medición como un factor pronóstico de la evolución de este cáncer, posiblemente por su efecto sobre el estradiol y otras hormonas que ayudan a la proliferación celular (Revillon 2006).

La expresión ectópica de las isoformas del receptor de la leptina se han asociado con la presencia de cáncer de estómago (Mix 2000), leucemia mielocítica y síndrome mielodisplásico debido a proliferación celular y su actividad anti-apoptótica (Konopleva 1999).

En estudios de expresión proteica de la isoforma soluble se ha descrito que está ausente en plasma de sujetos con hipofagia dejando en claro que la presencia atípica de cualquier isoforma puede ocasionar diferentes tipos de enfermedades. También se ha descrito que pueden ser menguados en su expresión por algunos factores como son los autoinmunes y el síndrome Bardet-Biedl al igual que en estados de dietas ricas o en ayuno (Farooqi 2007; Gallardo 2005; Seo 2009).

1.18 Receptor de leptina en diabetes

La leptina se asocia con el balance energético a través de la señalización llevada a cabo por su receptor (LEPR) actuando sobre varias proteínas secundarias que intervienen en el balance energético, como por ejemplo, la insulina y el glucagon también asociado con la expresión de hormonas tiroideas, que actúan, entre otras cosas, sobre el balance energético en el organismo (Bailleul 1997; Santaniemi 2004).

Algunos autores han asociado la cantidad de receptor soluble libre, así como el unido a la leptina, con la diabetes tipo 1 (Zacharov 2005, Kotajima 2005, Kratzsch 2004). De la misma manera Qu y colaboradores (2007) encontraron que en una población del norte de China algunos haplotipos de LEPR se asocian con la presencia de DT2.

Actualmente se sabe que el receptor de la insulina y LEPR tienen características compartidas, por lo que al ser activados actúan conjuntamente modificando el metabolismo de carbohidratos tanto desde el sistema nervioso como desde la célula (Benomar 2005).

II. JUSTIFICACIÓN

Actualmente la DT2 y la HTA son problemas de salud pública, ya que ocupan los primeros lugares de morbilidad y mortalidad en el mundo, ambos se han tratado de atender y prevenir con poco éxito. Se sabe que la etiología de ambas enfermedades es de origen multifactorial y que la información recopilada a la fecha es insuficiente para establecer todos los factores que se asocian con ambas enfermedades. Desde hace algunos años las mutaciones en los genes de la leptina y su receptor han sido candidatos prometedores para ser asociados con estas dos entidades; también se ha documentado que la presencia ectópica de las isoformas corta y larga se relacionan con diferentes enfermedades neoplásicas y metabólicas. Con base en lo anterior proponemos identificar la posible asociación entre las isoformas del receptor de la leptina en sangre y la diabetes tipo 2 e hipertensión arterial.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La información poco concluyente sobre la etiopatogenia de la diabetes tipo 2 y la hipertensión arterial sistémica esencial, complica en forma importante la prevención y el tratamiento de las mismas. Por lo que la investigación enfocada a conocer y comprender más los factores de riesgo que se asocien con ambas enfermedades es de vital importancia para avanzar en el alcance de una mejor calidad de vida para los individuos.

IV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existe asociación entre las isoformas del receptor de la Leptina presentes en sangre con la diabetes tipo 2 e hipertensión arterial?

V. HIPÓTESIS

La presencia de las isoformas del receptor de leptina en sangre está asociada con DT2 e HTA

VI. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Identificar la asociación entre las isoformas del receptor de la leptina en sangre de pacientes con DT2 e HTA

6.2 Objetivos específicos

- Identificar las diferentes isoformas del receptor de leptina en sangre de pacientes con HTA
- Identificar las diferentes isoformas del receptor de leptina en sangre de pacientes con DT2
- Identificar las diferentes isoformas del receptor de leptina en sangre de personas sin HTA ni DT2
- Establecer si existe asociación entre las isoformas del receptor de la leptina en sangre con DT2
- Establecer si existe asociación entre las isoformas del receptor de la leptina en sangre con HTA

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Diseño metodológico

Casos y controles

Donde casos pacientes con DT2 o HTA

Y controles individuos aparentemente sanos

7.2 Universo muestral

Pacientes de los Hospitales: Santiago Ramón y Cajal del ISSSTE, Unidad de Investigación del IMSS y Clínica Cardio-Prevent, de la ciudad de Durango, México.

7.3 Población de estudio

- Pacientes con HTA sin DT2, pacientes con DT2 sin HTA y sujetos sin DT2 ni HTA atendidos en el Hospital Santiago Ramón y Cajal del ISSSTE, Clínica Cardio-Prevent y de la Unidad de Investigación del IMSS, de la ciudad de Durango, México

7.4 Tamaño de muestra

El tamaño de muestra se calcula a partir de la formula

$$n = \frac{\left[z_{1-\alpha/2} \sqrt{2p(1-p)} + z_{1-\beta} \sqrt{p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)} \right]^2}{(p_1 - p_2)^2}$$

En donde:

n = tamaño de la muestra.

Z α = 1.96 que equivale a una probabilidad de error tipo alfa de 5%

o un significancia del 95%.

p = ½ (p₁ + p₀)

$$p1 = p2 R \div [1 + p2 (R-1)]$$

$p2$ = Frecuencia relativa esperada en controles que en el peor de los casos sería del 0.5.

R = Razón de momios esperada de la asociación, que en este caso fue de 4 unidades.

$Z\beta = 0.84$ que equivale a una probabilidad de error beta del 20% o poder del 80%.

El tamaño de muestra, desarrollando la fórmula, resulta en 38 sujetos por grupo

VIII. CRITERIOS DE SELECCION

8.1 Criterios de inclusión

- Hombres y mujeres no embarazadas mayores de 18 años con diagnóstico previo de: DT2 sin HTA, HTA sin DT2, y sin DT2 ni HTA

8.2 Criterios de exclusión

- Enfermedad vascular diferente a HTA
- Enfermedades mieloproliferativas
- Enfermedades oncológicas
- Discrasias sanguíneas

8.3 Criterios de eliminación

- Pérdida involuntaria de la muestra y sea imposible su recuperación
- Petición de exclusión del estudio por parte del participante

IX. Variables

9.1 Variable independiente

Presencia de RNAm de las isoformas del receptor de la leptina en sangre periférica.

Tipo de variable: nominal dicotómica

Valores obtenidos: presencia / ausencia

Tipo de comportamiento: Bernulli

9.2 Variables dependientes

Diabetes tipo 2 determinados por encuesta y análisis refractométrico de glucosa bajo los criterios del ADA los cuales en normo glicemia incluyen glucosas de ayuno menores a 126mg/dl según los criterios del ADA

Hipertensión arterial esencial determinado por encuesta y medición de la tensión arterial y clasificados según los criterios del JNCVII, considerando como normo tensión valores iguales o por debajo de 120/80 mmHg

Tipo de variable: nominal dicotómica

Valores obtenidos: presencia / ausencia

Tipo de comportamiento: Bernulli

9.3 Variables confusoras

Obesidad: fenotipo de los individuos con un IMC igual o mayor a un índice de 25, según la clasificación de Garrow, que se obtiene al dividir el peso entre la estatura en metros al cuadrado

Temporalidad de enfermedad: definida como en la diferencia entre la fecha de hallazgo de la enfermedad a la fecha obtenida por entrevista y expediente clínico del examinado.

Hipertensión concomitante con DT2: pacientes que tengan dentro de sus características fenotípicas glucosas en ayuno mayores a 126 mg/dl determinada por refractometría enzimática y Hb glucosilada >5.5 determinada por refractometría con cifras de tensión arterial sistólica >135 y diastólica >85 obtenidas por medición con baumanómetro manual.

9.4 Variables intervinientes

Edad

Definición: Tiempo en años que comprende desde el nacimiento a la fecha de la entrevista

- ✓ Tipo de variable: variable cuantitativa discreta
- ✓ Valores obtenidos: valores con numeración natural
- ✓ Tipo de comportamiento: χ^2

Sexo

Definición: fenotipo que identifica al individuo como hombre o mujer

- ✓ Tipo de variable: nominal dicotómica
- ✓ Valores obtenidos: hombre / mujer
- ✓ Tipo de comportamiento: Bernoulli

Perímetro de cintura

Definición: medida en centímetros de la circunferencia de la cintura obtenidos por medición directa de la circunferencia abdominal tomado del punto medio entre las crestas iliacas y las costillas flotantes

- ✓ Tipo de variable: variable cuantitativa continua
- ✓ Valores obtenidos: valores con numeración racional
- ✓ Tipo de comportamiento: normal

Presión sistólica

Definición: presión máxima desarrollada durante la expulsión de sangre por el corazón donde son determinantes el gasto sistólico y la elasticidad aortica . tomadas con un baumanometro de brazalete y clasificándose según los criterios de la JNCVII

- ✓ Tipo de variable: variable cuantitativa discreta
- ✓ Valores obtenidos: valores con numeración natural
- ✓ Tipo de comportamiento: normal

Presión diastólica

Definición: presión mínima que se puede registrar en el sistema arterial siendo determinantes las resistencias periféricas, tomadas con un baumanometro analógico de brazalete y clasificándose según los criterios de la JNCVII

- ✓ Tipo de variable: variable cuantitativa discreta
- ✓ Valores obtenidos: valores con numeración natural
- ✓ Tipo de comportamiento: normal

Glucosa

Definición: carbohidrato simple con estructura de seis carbonos utilizado como fuente primaria de energía en los tejidos obtenida por análisis de refracción

enzimática tras ayuno de 12 hrs considerando valores normales entre los 70 y los 99 mg/dl según la ADA

- ✓ Tipo de variable: variable cuantitativa continua
- ✓ Valores obtenidos: valores con numeración racional
- ✓ Tipo de comportamiento: normal

Colesterol

Definición: lípido esteroide con base en el ciclopentanoperhidrofenantreno localizado en diversos órganos y tejidos forma parte de membranas celulares y de las hormonas esteroides sus valores normales están por debajo de los 200mg/dl obtenida por refractometría enzimática.

- ✓ Tipo de variable: variable cuantitativa continua
- ✓ Valores obtenidos: valores con numeración racional
- ✓ Tipo de comportamiento: normal

Triglicéridos

Definición: compuestos lípidicos compuesto de tres ácidos grasos y un alcohol de bajo peso molecular (glicerol) generados como parte del metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas en el hígado. Utilizados como fuente de almacenamiento de energía con valores normales en sangre por debajo de los 150mg/dl medidos por refractometría enzimática

- ✓ Tipo de variable: variable cuantitativa continua
- ✓ Valores obtenidos: valores con numeración racional
- ✓ Tipo de comportamiento: no paramétrico

Hb glucosilada

Definición: compuesto generado por la glucosilación de la hemoglobina en los extremos carbonilos terminales, la determinación de este analito nos da idea de los valores de glucosa que ha manejado un individuo los últimos tres meses. Es determinada por espectrofotometria. Los valores considerados normales son inferiores al 5%

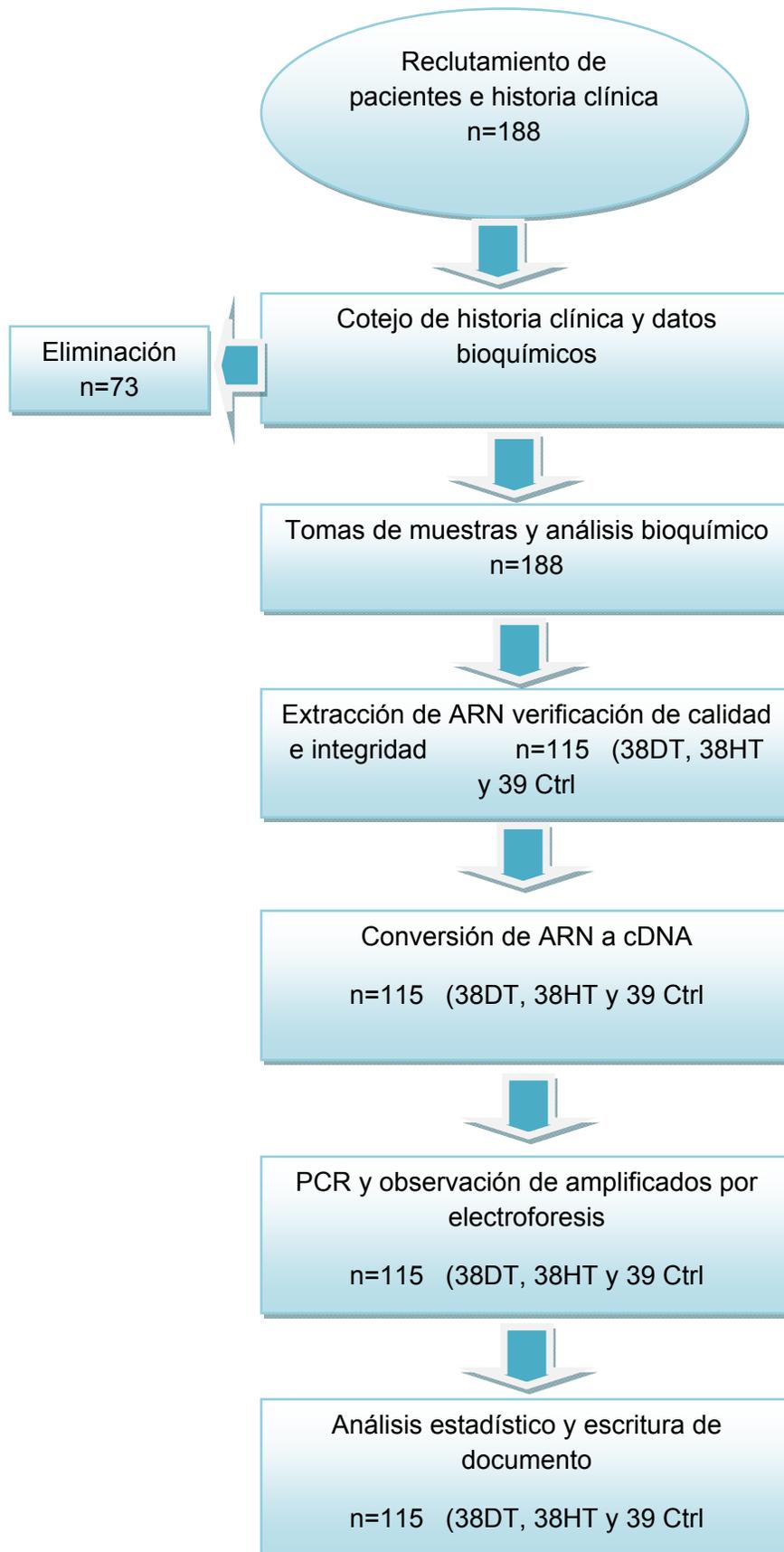
- ✓ Tipo de variable: variable cuantitativa continua
- ✓ Valores obtenidos: valores con numeración racional
- ✓ Tipo de comportamiento: no paramétrico

X. PROCEDIMIENTOS

1. Se procedió reclutar a los pacientes que cubrieran los criterios de inclusión en población abierta por parte de colaboradores del Hospital Santiago Ramón y Cajal del ISSSTE, la clínica Cardio Prevent y de la Unidad de Investigación del Instituto Mexicano del Seguro Social. En la ciudad de Durango. Se les leyó la carta de consentimiento informado y se les entregó por escrito se la firmó la carta de consentimiento informado tanto por el paciente dos testigos y el colaborador.
2. Se procedió a abrir el archivo clínico del paciente que incluyó aspectos heredofamiliares, antropometría e identificación de hábitos alimenticios y recreativos que fueran factores de riesgo para las enfermedades analizadas. Seguido se procedió a enviar al paciente a el área de laboratorio
3. Se procedió a la toma de muestra en las instalaciones del Hospital General de Durango. la muestra se tomó por punción venosa obteniendo muestras tanto para análisis de laboratorio clínico y análisis molecular. El análisis químico se realizó en el equipo automatizado de química seca Vitros 950 de Johnson & Johnson del Hospital General de Durango
4. La extracción de ARN total el cual se realizó por el kit comercial Fluka en un periodo no mayor a 40 minutos después de tomada la muestra.
5. La extracción se mantuvo a -70°C hasta el análisis molecular
6. Se analizó la calidad e integridad del ARN por medio de geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio y geles de poliacrilamida 29:1 teñidos con nitrato de plata.
7. Se procedió a la obtención de cDNA por medio de retrotranscripción de cada una de las muestras
8. Se confirmó la retrotranscripción por medio de geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio

9. Se procedió a la realización de PCR de punto final con *primers* específicos para cada una de las isoformas. en todas las reacciones de amplificación se utilizó un control interno de amplificación que correspondió a una muestra positiva para cada una de las isoformas, las cuales están cuantificadas a 200 ng por μl y en cada pozo se colocaron 3 μl lo que equivale a 600 ng de amplificado
- 10.** Se verificó la presencia de los productos de amplificación de PCR los cuales se visualizaron en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio o Sybr green en trans-iluminador de luz UV mostrando las isoformas de LEPR

XI. DIAGRAMA DE FLUJO



XII. RESULTADOS

De manera general, los pacientes diabéticos mostraron dislipidemia marcada ya que sus niveles de triglicéridos fueron aproximadamente un 62% mayores que los controles (Cuadro 2). Al estratificar por género fue notorio que las mujeres diabéticas fueron las que presentaron dicha diferencia significativa en los niveles de triglicéridos con respecto a las mujeres del grupo control aparte de mostrar una diferencia significativa en el perímetro de cintura que en los hombres no se presenta (Cuadro 3). Este comportamiento no fue notorio en el grupo de pacientes con HTA (Cuadro 4), sin embargo, al estratificar por género, similarmente a los grupos anteriores, pudimos observar que las mujeres hipertensas también presentaron niveles significativamente elevados de triglicéridos cuando se comparan con el grupo control (Cuadro 5).

Cuadro 2. Estadística descriptiva de controles y diabético con prueba de homogeneidad

	Controles (n=39)	Diabéticos (n=38)	P
Género	26 mujeres/13 hombres	26 mujeres/12 hombres	
Edad (años)	47.3 ± 14.8	50.3 ± 12.7	0.17
IMC (Kg/m ²)	27.6 ± 4.2	29.54 ± 5.5	0.30
Cintura (cm)	90.5 ± 10.3	97.8 ± 12.2	0.01
PAS (mmHg)	111.1 ± 7.8	115.63 ± 6.4	0.03
PAD (mmHg)	77.3 ± 5.2	73.57 ± 6.6	0.01
Glucosa (mg/dL)	77.5 ± 10.1	157.66 ± 66.3	<0.001
Colesterol (mg/dL)	194.8 ± 29.9	203.87 ± 51.8	0.32
Triglicéridos (mg/dL)	140.5 (100-207)	228 (115-317)	<0.01

Media ± Desviación Estándar, Rango intercuartil (P25-P75), T de student, *Wilcoxon
 IMC*-índice de masa corporal
 PAS*- presión arterial sistólica
 PAD*- presión arterial diastólica

Cuadro 3. Estadística descriptiva de controles y diabético con prueba de homogeneidad separado por sexo

	Mujeres			Hombres		
	Controles n= 26	Hipertensas n=24	P	Controles n=13	Hipertensos n=12	P
Edad (años)	45.6 ± 12.8	49.4 ± 12.3	0.2	50.1 ± 17.3	53.3	0.7
IMC (Kg/m ²)	27.5 ± 4.69	29.6 ± 5.6	0.6	24.8 ± 9.64	101.4 ± 11.6	0.3
Cintura (cm)	88.2 ± 11.2	96.7 ± 12.4	<0.001	95.94 ± 4.8	101.3 ± 11.6	0.5
PAS (mmHg)	110.2 ± 8.04	115.3 ± 4.7	0.2	113.3 ± 7.07	116.6 ± 4.23	0.3
PAD (mmHg)	77.4 ± 4.2	72.2 ± 5.9	0.01	77 ± 7.3	77.5 ± 3.5	0.8
Glucosa (mg/dL)	76.3 ± 10	171.6 ± 65.4	<0.001	81 ± 9	114 ± 36	<0.01
Colesterol (mg/dL)	193 ± 29.4	201.7 ± 2.9	0.5	198.4 ± 32.9	210.6 ± 39.9	0.5
Triglicéridos (mg/dL)	134.5 (90-187)	211 (162-296)	<0.001*	155 (113-261)	232 (122-168)	0.2*

Media ± Desviación Estándar, Rango intercuartil (P25-P75), T de student, *Wilcoxon
 IMC*-índice de masa corporal, PAS*- presión arterial sistólica, PAD*- presión arterial diastólica
 Col*- colesterol, Tg*- triglicéridos

Cuadro 4. Estadística descriptiva de controles e hipertensos con prueba de homogeneidad

	Controles (n=39)	Diabéticos (n=36)	P
Género	26 mujeres/13 hombres	24 mujeres/12 hombres	
Edad (años)	47.3 ± 14.8	50.02 ± 13	0.06
IMC (Kg/m ²)	27.6 ± 4.3	29.8 ± 5.1	0.1
Cintura (cm)	90.5 ± 10.3	96.3 ± 11	0.03
PAS (mmHg)	111.1 ± 7.8	128.1 ± 13.8	<0.001
PAD (mmHg)	77.3 ± 5.2	87.7 ± 7.9	<0.001
Glucosa (mg/dL)	77.5 ± 10.1	85.9 ± 12.5	<0.01
Colesterol (mg/dL)	194.8 ± 29.9	205.1 ± 38.8	0.3
Triglicéridos (mg/dL)	140.5 (100-207)	181.5 (147-226)	0.23*

Media ± Desviación Estándar, Rango intercuartil (P25-P75), T de student, *Wilcoxon
 IMC*-índice de masa corporal
 PAS*- presión arterial sistólica
 PAD*- presión arterial diastólica

Cuadro 5. Estadística descriptiva de controles e hipertensos con prueba de homogeneidad separado por sexo

	Mujeres			Hombres		
	Controles n= 26	Hipertensa s n=24	P	Controles n=13	Hipertenso s n=12	P
Edad (años)	45.57 ±12.8	51.2 ±10.2	0.13	50.1 ±17.3	60.5 ±15.2	0.10
IMC (Kg/m ²)	27.5 ±4.7	30.7±5.2	0.17	24.8 ± 9.6	29.34 ± 5	0.21
Cintura (cm)	88.2±11.2	93.6±8.7	0.04	95.9±4.8	100.5±13.1	0.58
PAS (mmHg)	110.21 ± 8.04	125.5 ± 11.5	<0.001	113.3 ± 7.1	132.41 ± 16.5	0.02
PAD (mmHg)	77.39±4.22	86.5 ± 5.9	<0.001	77 ±7.3 (58-80)	88.75±10.7	0.01
Glucosa (mg/dL)	76.25±10	87.95 ±13.4	<0.01	81 ±9.0	83 ±11	0.65
Colesterol (mg/dL)	193±29.5	216.9±39.9	0.41	98.4 ±32.9	188.21 ± 31.3	0.45
Triglicéridos (mg/dL)	134.5(90-187)	216(177-292)	0.01*	155 (113-261)	147 (122-168)	0.50*

Media ± Desviación Estándar, Rango intercuartil (P25-P75), T de student, *Wilcoxon

IMC*-índice de masa corporal

PAS*- presión arterial sistólica

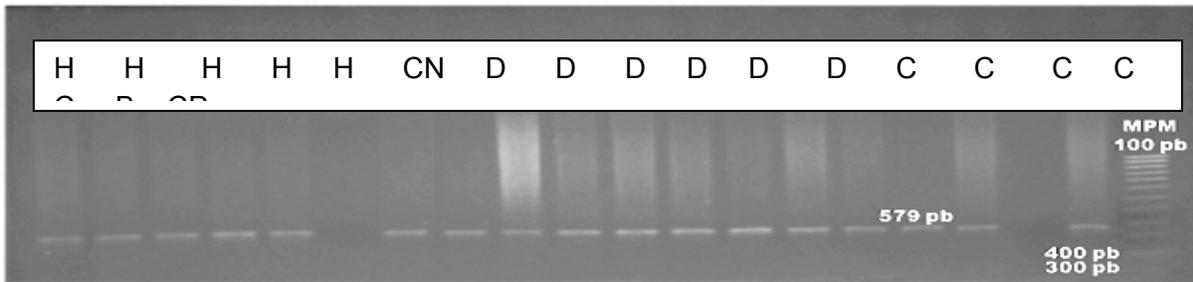
PAD*- presión arterial diastólica

Col*- colesterol

Tg*- triglicéridos

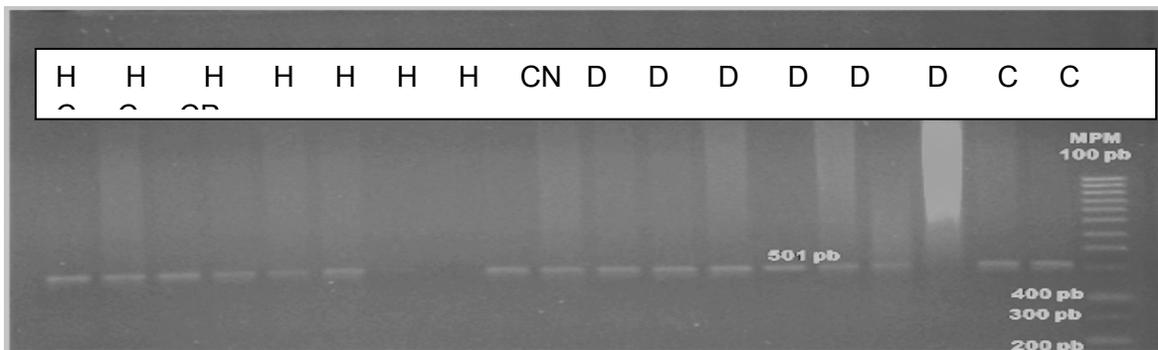
Una vez establecida la homogeneidad de los grupos a comparar se procedió al análisis molecular de las muestras, de este se logro obtener amplificado de la isoforma soluble de LEPR en el 100% de las muestras de controles, hipertensos y diabéticos. No obstante las isoformas corta y larga presentaron una expresión diferencial. En cuanto al grupo de controles la isoforma corta se expresó en el 10.2% (n=4) mientras que la larga solo en el 7.7% (n=3). En los diabéticos la isoforma corta se expresó en el 86.8% (n=33) de las muestras mientras que la isoforma larga se expresó en el 31.6% (n=12), y en los hipertensos la isoforma corta se expresó en el 57.8% (n=22) de las muestras mientras, que la isoforma larga lo hizo en el 44.7% (n=17) (cuadro 5).

Figura 9 Amplificación de la isoforma soluble de LEPR



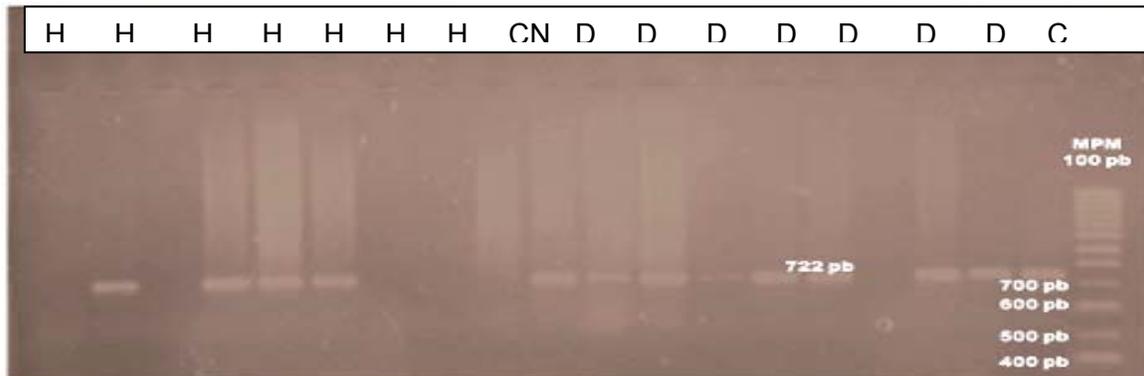
Gel de agarosa al 1.5% teñido bromuro de etidio donde se observa la banda correspondiente a la isoforma soluble con un peso molecular de 579 pb en ambos grupos. Se identifican con H los del grupo de hipertensos y con D el grupo de Diabéticos. Las siglas CP corresponden al control positivo

Figura 10 Amplificación de la isoforma larga de LEPR



Gel de agarosa al 1.5% teñido bromuro de etidio donde se observa la banda correspondiente a la isoforma larga con un peso molecular de 501 pb en ambos grupos. Se identifican con H los del grupo de hipertensos y con D el grupo de Diabéticos. Las siglas CP corresponden al control positivo y CN corresponden al control negativo

Figura 11 Amplificación de la isoforma corta de LEPR



Gel de agarosa al 1.5% teñido bromuro de etidio donde se observa la banda correspondiente a la isoforma corta con un peso molecular de 722 pb en ambos grupos. Los carriles correspondientes a los números 1 al 9 corresponden a muestras de hipertensos y del 10 al 13 y del 15 al 17 corresponden a muestras de diabéticos, carril (-) corresponde al control negativo y el carril 14 al control positivo. Se usó un marcador de peso molecular de 100 pb .

Cuadro 6. Distribución de las isoformas en la sangre de los tres grupos analizados

Isoformas	No. de muestras positivas (%)		
	Soluble	Corta	Larga
Hipertensos (38)	38 (100)	22 (57.8)	17 (44.7)
Diabéticos (38)	38(100)	33 (86.8)	12 (31.6)
Controles (39)	39(100)	4 (10.2)	3(7.7)

Cabe resaltar que en algunos pacientes existió la expresión concomitante de alguna de las isoformas ectópicas con la isoforma soluble de expresión silvestre en sangre. En el grupo de los hipertensos se encontró que el 55.2% presentó la expresión concomitante de la isoforma soluble y la corta; el 42.1% presentaban a la par la expresión de la isoforma soluble y la larga, mientras que solo el 2.7% restante presentaban las tres isoformas al mismo tiempo. Por otro lado, en el grupo de los diabéticos se encontró que el 65.8% de los diabéticos presentaban expresión de la isoforma soluble y la corta en el análisis, en tanto que la isoforma

larga se expresaba concomitante a la soluble en el 10.5% de la muestra y la expresión de las tres isoformas se llevaba a cabo en el 23.7% de la muestra.

Es de importancia señalar que el 17.9% de los controles presentaron expresión concomitante de soluble y corta, o larga pero nunca ambas.

Para el análisis estadístico se sometieron los datos a tablas de contingencia para la prueba de hipótesis obteniéndose la razón de momios también se sometieron a la chi cuadrada con corrección de Yates para hacer el análisis más estricto obteniéndose los siguientes resultados

Cuadro 7. Resultados de asociaciones obtenidas en tablas de contingencia

	Razón de momios	Intervalo de confianza
Isoforma corta		
controles & diabéticos	OR=18.0	(17.9-18.1)
Isoforma larga		
controles & diabéticos	OR=5.5	(5.17-5.9)
Isoforma corta		
controles & Hipertensos	OR=12.0	(11.91-12.1)
Isoforma larga		
controles & Hipertensos	OR=9.7	(9.53-9.9)

Cuadro 8 resultados de la prueba de hipótesis por χ^2 con corrección de Yates

	χ^2	Valor de p
Isoforma corta		
controles & diabéticos	$\chi^2=42.21$	<0.001
Isoforma larga		
controles & diabéticos	$\chi^2=5.56$	0.02
Isoforma corta		
controles & Hipertensos	$\chi^2=17.46$	<0.001
Isoforma larga		
controles & Hipertensos	$\chi^2=11.88$	<0.001

XIII. DISCUSION

Los resultados aquí reportados son los primeros que reportan asociaciones entre la expresión ectópica de las diferentes isoformas en sangre con la diabetes tipo 2 y la HTA debido a que la expresión ectópica de LEPR se ha analizado anteriormente como factor de riesgo en procesos mieloproliferativos tales como las leucemias (Konopleva 1999), así como eventos relacionados al cáncer.

Este estudio se basó en las premisas reportadas por varios autores que determinaron en sus estudios la participación en forma directa o indirecta de LEPR en la pérdida de la homeostasis metabólica. Algunos ejemplos de ello son el estudio de Qu y colaboradores (2008) en el cual ellos hallaron que ciertos haplotipos de SNPs de *LEPR* soluble se asocian con la presencia de diabetes tipo 2, alcanzando un OR de 1.69; de igual forma Farooqi y colaboradores (2007) describieron que en una población con hiperfagia y dislipidemia en el norte de China se encontraba una deficiencia en la expresión de la isoforma soluble del receptor de leptina. Este último rasgo de manejo del metabolismo de lípidos fue también descrito entre otros por Prieur en el 2008 estableciendo que la acción de la leptina sobre el metabolismo de los lípidos es llevada a cabo por medio de la señalización de sus receptores. Por su parte, Nain-Fegn y colaboradores (2001) y Paragano y colaboradores (2006) vieron que la HTA se asocia con la activación del sistema nervioso simpático por LEP produciendo una sobre excitación en estados de hiperleptinemia, aunque la cascada de señalización directa aún no se conoce.

Actualmente se conocen con exactitud los sitios de expresión normales de las diferentes isoformas de *LEPR* a lo largo de la economía del organismo y sus funciones se han descrito para diversos órganos y sistemas; por ejemplo la expresión de la isoforma larga en el hipotálamo, que genera una transducción de señales; la expresión de la isoforma corta en riñones, la cual está encargada de generar cascadas de señalización y facilitar la internalización de la leptina; o la expresión de la isoforma soluble en plasma donde se hace cargo principalmente del transporte y mantenimiento de las concentraciones normales de leptina en

sangre (Sanchez 2005) sin embargo Maamra y colaboradores (2001) han descrito que la presencia de isoformas no propias de la sangre (i.e. larga y corta) generadas por medio del corte del receptor en la membrana celular por parte de familias de metaloproteinasas que de forma normal escinden la isoforma soluble. Sin embargo, en este estudio no se puede determinar la razón de la presencia ectópica de estas isoformas en pacientes con enfermedades metabólicas como la HTA y la DT2 ya que no se realizaron estudios de rastreo molecular ni señalización in vitro.

Otra de las posibles razones de las asociaciones encontradas es que al ser inhibida la acción del receptor soluble por parte de las isoformas ectópicas la leptina se acumula generando hiperleptinemia que se ha asociado a resistencia periférica a la insulina la cual ocasiona estados de hiperglicemia y por ultimo una remodelación del epitelio que se traduce en aterosclerosis, aumentando la resistencia a la insulina y niveles cada vez mayores de glucosa en sangre lo que se podría traducir en DT2 e HTA

En cuanto a la expresión ectópica de las isoformas de LEPR en nuestros grupos de controles cabe destacar que al compararlos con el resto del grupo no se hallaron tendencias que indique que estos sujetos tengan predisposición genética o ambiental para generar DT2 o HTA según lo muestran sus antecedentes heredo familiares y bioquímicos.

XIV. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados podríamos interpretar la presencia de la isoforma soluble en sangre como una isoforma de expresión constitutiva de sangre considerándola como un parámetro normal y de comparación con la expresión de las otras isoformas de LEPR.

También podemos concluir que la presencia en sangre de la isoforma corta genera 18.04 veces mayor probabilidad de padecer DT2 y 12.03 veces mayor predisposición de padecer HTA que el resto de la población, mientras que la presencia de la isoforma larga de LEPR en sangre la podemos asociar con una predisposición que eleva 5.53 veces mayores probabilidades de que un individuo presente DT2 y eleva el factor de riesgo en un 9.7% para hipertensión con respecto al resto de la población

XV. PERSPECTIVAS

El siguiente paso a realizar en propuesta sería el análisis de los niveles de expresión de cada isoforma con el fin de complementar el análisis realizado en este estudio, pues una de las limitantes en este trabajo es: que si la transcripción del mensajero se lleva a cabo en cantidades mínimas pero que la célula limite su progresión eliminando a dichos mensajero por ser un defecto de transcripción, el método utilizado en este diseño experimental no discriminaría la expresión ectópica de un error de transcripción que la célula puede arreglar por si sola.

Por otro lado la expresión protéica es otro de los pasos a seguir pues se pueden generar expresiones del gen en forma de trascritos pero que la célula puede bloquear en su traducción y expresión protéica lo cual podría generar resultados diferentes a los obtenidos en este estudio, una de las líneas generadas en este estudio es el análisis de la expresión de la isoforma corta por medio de una cohorte para saber si la relación que mantiene la diabetes como factor de riesgo para hipertensión y vice versa se puedan deber a la expresión de esta isoforma de LEPR

BIBLIOGRAFÍA

1. American Diabetes Association. (2008) Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 31(Suppl 1):S55-S60
2. Aquila S, Rago V., Guido C., Casaburi I., Zupo S., Carpino A. (2008) Leptin and leptin receptor in pig spermatozoa: Evidence of their involvement in sperm capacitation and survival. *Reproduction*. 136: 23–32
3. Bahurenberg G., Behrmann I., Barthel A., Hekerman P., Heinrich P. C., Joost H.G., Baker W.. (2002) Identification of the critical sequence element in the cytoplasmic domain of leptin receptor isoforms required for janus/kinase signal transducer and activator of transcription activation by receptor heterodimers. *Molecular Endocrinology*. (4):859-872.
4. Bailleul B., Akerblom I., Strosberg A. D. (1997) The leptin receptor promoter controls expression of a second distinct protein. *Nucleic Acids Research*. 25(14):12752–2758
5. Baumann H., Morella K. K., White D.W., Dembski M., Bailon P.S., Kim H., Lai C. F., Tartaglia L. A. (1996) The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 93:8374-8378.
6. Bazan J.F. (1990) Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 87:6934-6938.
7. Belouzard S., Rouille Y. (2006) Ubiquitylation of leptin receptor OB-Ra regulates its clathrin-mediated endocytosis. *The EMBO Journal*. 25:932–942.
8. Benomar Y, Roy A-F., Aubourg A., Djiane J., Taouis M. (2005) Cross down-regulation of leptin and insulin receptor expression and signalling in a human neuronal cell line. *Biochemistry Journal*. 388:929–939
9. Berjon J, Olaz F. (1998) Diagnóstico de la Hipertensión arterial. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. 21(1):29-38.
10. Bjørnbæk Ch, Uotani S, Silva B, Flier J. (1997) Divergent Signaling Capacities of the Long and Short Isoforms of the Leptin Receptor. *The Journal Of Biological Chemistry* . 272(51):32686–32695.
11. Bjørnbæk Ch. Kahn B. (2004) Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Progress In Hormone Research*. 59:305-331
12. Blüher S, Mantzoros Ch. (2004) The Role of Leptin in Regulating Neuroendocrine Function in Humans. *Journal of Nutrition*. 134:2469s-2474s.
13. Borja-Guerra., Santana A., Fuentes T., Delgado-Guerra., Cabrera-Socorro, Dorado C., Calbet .J. (2007) Leptin receptors in human skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*. 102: 1786–1792
14. Botella-Carretero J.I., Lledín Barbancho M.D., Valero González M. A., Varela Dacosta C. (2001) Leptina: implicaciones fisiológicas y clínicas. *Anales de Medicina Interna*. 18(3):152-160
15. Chobaniam AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL and the National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. (2003) The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection,

- Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. The JNC 7 Report. *Journal of the American Medical Association*. 289:2560-2572
16. Chomczynski P., Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Annals of Biochemistry*. 162:156-159.
 17. Chu N.-F., Wang D.-J., Shieh S.-M. Obesidad, leptina y presión arterial en niños de Taiwan: estudio sobre el corazón de los niños de Taipei. *American Journal of Hypertension* (Ed. Esp.) 2001; 3: 210-215
 18. Chung W., Power-Kehoe L., Chua M., Lee R., Leibel R. (1996) Genomic structure of the human OB receptor and identification of two novel intronic microsatellites. *Genome Research*. 6:1192-1199.
 19. Chung W., Power-Kehoe L., Chua M., Leibel R. L. (1996) Region of Nonconserved Gene Order from Mouse and Rat to Human. *Genome Research*. 6: 431-438
 20. De La Brousse F., Shan B., Chent J.L. (1996) Identification of the promoter of the mouse obese gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 93:4096-4101
 21. Elson G., Grabber P., Losberger C., Herren S., Gretener D. (1998) Cytokine-like factor-1, a novel soluble protein, shares homology with members of the cytokine type 1 receptor family. *The Journal of Immunology*. 161:1371-1379.
 22. Fantuzzi G., Faggioni R. (2000) Leptin in the Regulation of Immunity, Inflammation, and Hematopoiesis. *Journal of Leukocyte Biology*. 68:437-445
 23. Farooqi S., Wangensteen T., Collins S., Kimber W., Matarese G., Keogh J., Lang E., Bottomley B., Lopez-Fernandez J., Ferraz-Amaro I., Dattany M. T., Ercan O., Myhre A. G., Retterstol L., Stanhope R., Edge J. A., McKenzie S., Lessan N., Ghodsi M., De la Rosa V., Perna F., Fontana S., Barroso I., Undlien D. E., O'Rahilly S. (2007) Clinical and molecular genetic spectrum of congenital deficiency of the leptin receptor. *The New England Journal of Medicine*. 356(3):237-247
 24. Fiorio E., Mercanti A., Terrasi M., Micciolo R., Remo A., Auriemma A., Molino A., Parolin V., Diestefano B., Bonetti F., Giordano A., Cetto G. L., Surmacz E. (2008) Leptin/HER2 crosstalk in breast cancer: in vitro study and preliminary in vivo analysis. *BMC Cancer*. 8(305):1-11
 25. Friedman J. M., Halaas J. L. (1998) Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*. 395:763-770
 26. Frigolet M. (2006) Señalización de la Leptina. *Revista de Educacion Bioquimica*. 25(2):50-54
 27. Frühbeck G. (2006) Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochemistry Journal*. 393:7-20
 28. Gallardo N., Arribas C., Villar M., Ros M., Carrascosa J., Martínez C., Andrés A. (2005) ObRa and ObRe are differentially expressed in adipose tissue in aged food-restricted rats: Effects on circulating soluble leptin receptor levels. *Endocrinology*. 146(11):4934-4942
 29. Garofalo C., Koda M., Cascio S., Sulkowska M., Kanczuga-Koda L., Golaszewska J., Russo A., Sulkowski S., Surmacz E. (2006) Increased expression of leptin and the leptin receptor as a marker of breast cancer progression: possible role of obesity-related stimuli. *Clinical Cancer Research*. 12(5):1447-1453.

30. Ge H., Huang L., Pourbahrami T., Li C. (2002) Generation of Soluble Leptin Receptor by Ectodomain Shedding of Membrane-spanning Receptors *in vitro* and *in vivo*. *The Journal of biochemistry*. 227(48):45896-45903
31. Godinez S. (2004) Fisiopatología de la obesidad ¿Cuáles son las bases moleculares de la obesidad? *Revista de endocrinología y nutrición*. 12(4): s102-s108
32. Golden P., J. Maccagnan T. Pardridge W. (1997) Human blood-brain barrier leptin receptor binding and endocytosis in isolated human brain microvessels. *Journal of Clinical Investigation*. 99(1):14–18
33. Gong Y, Ishida-Takahashi R, Villanueva E, Fingar D, Münzberg H, Myers M. (2007) The Long Form of the Leptin Receptor Regulates STAT5 and Ribosomal Protein S6 via Alternate Mechanisms. *The Journal of Biological Chemistry*. 282(42):31019–31027
34. Gonzalez R. R., Cherfils S., Escobar M., Yoo J. H., Carino C., Styer A. K., Sullivan B. T., Sakamoto H., Olawaiye A., Serikawa T., Lynch M. P. Rueda B. R. (2006) Leptin signaling promotes the growth of mammary tumors and increases the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor type two (VEGF-R2). *The Journal of Biological Chemistry*. 281(36):26320-26328
35. Guzmán-Juárez N, Madrigal-Bujaidar E. (2003) Revisión de las características clínicas, metabólicas y genéticas de la diabetes mellitus. *Bioquímica*. 28(2):14-23.
36. Haniu M, Arakawa T, Bures E, Young Y, Hui J, Rohde M, Welcher A. A., Horan T. (1998). Human leptin receptor. *The Journal of Biological Chemistry*. 273(44):28691–28699.
37. Huang L., Wang Z., Li C. (2001) Modulation of circulating leptin levels by its soluble receptor. *The Journal of Biological Chemistry*. 276(9):6343–6349.
38. Huerta B. (2001) Factores de riesgo para la hipertensión arterial. *Archivos de Cardiología de México*. 71(1):S208-S210.
39. Imagawa K., Numata Y., Katsuura G., Sakaguchi I., Morita A., Kikuoka S., Matumoto Y., Tsuji T., Tamaki M., Sasakura K., Teraoka H. Hosoda K., Ogawa Y., Nakao K. (1998) Structure-Function Studies Of Human Leptin. *The Journal of Biological Chemistry*. 273(52):35245–35249
40. Imatoh T, Miyazaki M, Momose Y, Uryu Y, Tanihara S, Une H, Doi H. (2008) Hyperleptinemia is associated with hypertension in Japanese males. *Acta Medical of Okayama*. 62(3):169-174.
41. Instituto Nacional de Salud Pública. Encuesta nacional de salud y Nutrición 2006. Resultados por entidad federativa, Durango. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública-Secretaría de Salud, 2007.
42. International diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas. IDF Diabetes Atlas 4 edition 2009.
43. International *Diabetes Federation*. Resolución 61/225 de las naciones unidas : Día mundial de la diabetes 2007 [online] [cited] 2008-10-07 [URL:http://www.worlddiabetesday.org](http://www.worlddiabetesday.org)
44. Konopleva M., Mikhail A., Estrov Z., Zhao S., Harris D., Sanchez-Williams G., Kornblau M. S., Dong J., Kliche K. O., Jiang S., Snodgrass R., Estey E. H., Adreeff M. (1999) Expression and function of leptin receptor isoforms in myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes: Proliferative and anti-apoptotic activities. *Blood*. 93(5):1668-1676

45. Kotajima N., Takahashi T., Ito H., Sumino H., Fukumura Y., Kurabayashi M., Murakami M., Kanda T. (2005) Clinical features associated with circulating concentration of soluble leptin receptor in patients with diabetes. *The Journal of International Medical Research*. 33:61–67
46. Kote-Jarai Z., Singh R., Durocher F., Easton D., Edwards S.M., Ardern-Jones A., Dearnaley D.P., Houlston R., Kirby R., Eeles R. (2003) Association between leptin receptor gene polymorphisms and early-onset prostate cancer. *British Journal of Urology International*. 9(2):109–112
47. Kraemer R, Chu H, Castracane V. (2002) Leptin and Exercise. *Experimental Biology and Medicine*. 227:701–708
48. Kratzsch J., Selisko T., Birkenmeier G. (1995) Identification of transformed alpha 2-macroglobulin as a growth hormone-binding protein in human blood. *Clinical Endocrinology and Metabolism*. 80:585-590.
49. Kratzsch J., Deimel A., Galler A., Kapellen T., Klinghammer A., Kiess W. (2004) Increased serum soluble leptin receptor levels in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. *European Journal of Endocrinology*. 151: 475–481
50. Landt M. Leptin binding and binding capacity in serum. *Clinical Chemistry*. 2000; 46(3):379-384
51. Leshan R., Bjönholm M., Münzberg H., Myers M. Jr. (2006) Leptin receptor signaling and action in the central nervous system. *Obesity*. 14:208s-212s.
52. Li H., Ji C., Wang W., HuY-H. (2005) A twin study for serum leptin, soluble leptin receptor, and free insulin-like growth factor-I in pubertal females. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 90(6):3659–3664
53. Maamra M., Bidlingmaier M., Postel-Vinay M. C., Wu Z., Strasburger C. J., Ross R. J. M. (2001) Generation of human soluble leptin receptor by proteolytic cleavage of membrane-anchored receptors. *Endocrinology*. 142(10):4389–4393
54. Mansour E., Pereira F. G., Araújo E. P., Amaral M. E. C., Morari J., Ferraroni N.R., Ferreira D. S., Lorand-Metze I., Velloso L. A. (2006) Inhibits apoptosis in thymus through a janus kinase-2-independent, insulin receptor substrate-1/ phosphatidylinositol-3 kinase-dependent pathway. *Endocrinology*. 147(11):5470–5479
55. Matarese G., Carrieri P. B., La Cava A., Perna F., Sanna V., De Rosa V., Aufiero D., Fontana S., Zappacosta S. (2005) Leptin increase in multiple sclerosis associates with reduced number of CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 102(14): 5150–5155
56. Mix H., Widjaja A., Jandl O., Cornberg M., Kaul A., Göke M., et al. (2000) Expression of leptin and leptin receptor isoforms in the human stomach. *Gut*. 47:481-486.
57. NCBI. LEP leptin. Homo sapiens. GeneID:3952 Entrez Gene. (on line)(cited) URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=text&db=gene&dopt=genlep&uid=3952>.
58. NCBI. LEPR leptin receptor. Homo sapiens. GeneID:3953 Entrez Gene. (on line)(cited) URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=text&db=gene&dopt=genlepr&uid=3953>

59. Olaiz G., Rivera J., Shamah T., Rojas R., Villalpando S., Hernández M., Sepúlveda J. (2006) Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública.
60. Paracchini V., Pedotti P., Taioli E. (2005) Human genome epidemiology (HUGE) Review. Genetics of leptin and obesity: a HUGE review. *American Journal of Epidemiology*. 162:101–114
61. Pérez-Páez I, Rodríguez-Weber F, Díaz-Greene E, Jardines Pérez R. (2009) Mitos y realidad de la hemoglobina glucosilada. *Medicina Interna de México*. 25(3):202-209.
62. Pou-Torelló J., Rigla M. (2001) Hipertension arterial como factor de riesgo cardiovascular en la diabetes. *Cardiovascular Risk Factors*. 5:288-294.
63. Prieur X., Tung Y. C. L., Griffin J. L., Farooqi I. S., O'Rahilly S., Coll A. P. (2008) Leptin regulates peripheral lipid metabolism primarily through central effects on food intake: Effect of leptin on lipid metabolism. *Endocrinology*. 149(11): 5432–5439
64. Puras A, Cooper R. S. (1995) Marcadores genéticos de la hipertensión arterial: un largo camino ya iniciado. *Medicina Clínica de Barcelona*. 104:780-783.
65. Qu Y, Yang Z, Feng Jin, Sun L, Feng Jie, Tang L, et al. (2008) The haplotype identified in *LEPR* gene is associated with type 2 diabetes mellitus in northern Chinese. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 81:33-37
66. Rahmouni K., Haynes W. (2004) Leptin and the Cardiovascular System. *Recent Progress in Hormone Research*. 59:225-244
67. Ren J. (2004) Leptin and hyperleptinemia – from friend to foe for cardiovascular function. *Journal of Endocrinology*. 181:1-10
68. Révillion F., Charlier M., Lhotellier V., Hornez L., Giard S., Baranzelli M-C., Djiane J., Peyrat J-P. (2006) Messenger RNA expression of leptin and leptin receptors and their prognostic value in 322 human primary breast cancers. *Clinical Cancer Research*. 12(7):2088-2093.
69. Ruesga Zamora A. (2005) Cardiología. México Manual Moderno. Pg. 650-655
70. San Miguel A., Calvo B., Alonso M., Iglesias R., Mazón M. A. (2005) Leptina: implicaciones fisiológicas y clínicas. *Asociación Española de Farmacéuticos Analistas. Actualidades*. Pg 79.
71. Sánchez J. (2005) Perfil fisiológico de la leptina. *Colombia Médica*. 36(1):50-59.
72. Sánchez-Margalet V., Martín-Romero C., Santos-Alvarez J., Goberna R., Najib S., Gonzalez-Yanes C. (2003) Role of leptin as an immunomodulator of blood mononuclear cells: Mechanisms Of Action. *Clinical Experimental Immunology*. 133(1): 11–19.
73. Santaniemi M., Ukkola O., Kesa Y. (2004) Niemyrosine phosphatase 1b and leptin receptor genes and their interaction in type 2 diabetes. *Journal of Internal Medicine*. 256:48–55
74. Seo S., Guo D.-F., Bugge K., Morgan D., Rahmouni K., Sheffield V. (2009) Requirement of Bardet-Biedl syndrome proteins for leptin receptor signaling. *Human Molecular Genetics*. 18(7):1323–1331
75. Seufert J. (2004) Leptin effects on pancreatic β -cell gene expression and function. *Diabetes*. 53(S1):S152-S158.
76. Sharma D., Saxena N K., Vertino P M. Anania F A. (2006) Leptin promotes the proliferative response and invasiveness in human endometrial cancer cells by

- activating multiple signal-transduction pathways. *Endocrine-Related Cancer*. 13(2):629-640
77. Shek E.W, Brands M.W, Hall J.E. (1998) Chronic leptin infusion increases arterial pressure. Hypertension. *American Heart Association*. 31:409-414.
 78. Simon E., Del Barrio A.S. (2002) Leptina y obesidad. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. 25(1):53-64.
 79. Simone G, Devereux RB, Chinali M, Roman M, Best LG et al. (2006) Risk factors for arterial hypertension in adults with initial optimal blood pressure: The strong heart study. *Hypertension*. 47:162-167.
 80. Singh P., Hoffmann M., Wolk R., Shamsuzzaman A., Somers V. (2007) leptin induces C-reactive protein expression in vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 27:E302-E307
 81. Smolinska N, Siawrys G, Kaminski T, Przala J. (2007) Leptin gene and protein expression in the trophoblast and uterine tissues during early pregnancy and the oestrous cycle of pigs. *J Physiol Pharmacol*. 58(3):563-81.
 82. Sweeney G. (2002) Leptin signalling. *Cellular Signalling*. 14: 655– 663
 83. Tartaglia L. (1997) The leptin receptor. *The Journal of Biological Chemistry*. 272(10):6093-6096
 84. Tartaglia L.A., Dembski M., Weng X., Deng N., Culpepper J., Devos R. (1995) Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*. 83:1263-1271.
 85. Thompson B., Ravussin E., Bennett P., Bogardus C. (1997) Structure and sequence variation at the human leptin receptor gene in lean and obese Pima Indians. *Human Molecular Genetics*. 6 (5): 675-679
 86. Vecchione C, Maffei A, Colella S, Aretini A, Poulet R, Frati G, et al. (2002) Leptin effect on endothelial nitric oxide is mediated through AKT–endothelial nitric oxide synthase phosphorylation pathway. *Diabetes*. 51:168-173.
 87. Villegas P. A., Gómez A.M., Bedoya G. C. (2004) Control y complicaciones crónicas de la diabetes mellitus en el centro de atención ambulatorio central, Instituto del Seguro Social 1998-2001. *IATREIA*. 17(1):11-23.
 88. Wiwanitkit V. (2007) Interaction between leptin and leptin receptor in gastric carcinoma: Gene ontology analysis. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*. 99(4):201-205,
 89. Wold L. E., Relling D.P., Duan J., Norby F. L. Ren J. (2002) Myocytes under spontaneous hypertension: role of JAK/STAT pathway. *Hypertension*. 39; 69-74
 90. World Health Organization. Diabetes. Fact Sheet Who/312.2006 [on Line] [cited] URL: <http://www.who.int/chp/en/> September 2008.
 91. Zacharov J., Chiasson J-L., Laakso M. (2005) Leptin receptor gene variation predicts weight change in subjects with impaired glucose tolerance. *Obesity Research*. 13 (3):501-506
 92. Zastrow O., Seidel B., Kiess W., Thiery J., Keller E., Böttner A. Kratzsch J. (2003) The soluble leptin receptor is crucial for leptin action: Evidence from clinical and experimental data. *International Journal Of Obesity*. 27:1472–1478
 93. Zhou J., Lei W., Shen L., Luo H. S., Shen Z. X. (2008) Primary study of leptin and human hepatocellular carcinoma in vitro. *World Journal Gastroenterology*. 14(18): 2900-2904

ANEXOS

Extracción de ARN

PASOS ESPECÍFICOS PARA CÉLULAS EN SUSPENSIÓN

- 1) Prepare la solución D añadiendo 100 μ l de β -mercaptoetanol por cada 14ml de solución de desnaturalización por cada gramo 10^8 células a tratar (esta se puede conservar a temperatura ambiente hasta por un mes)
- 2) Añada 10 ml de solución D por cada 10^8 células y mezcle por un minuto a temperatura ambiente
- 3) Añada 1 ml de cetato de sodio 2 M pH 4.0 y mezcle por inversión.

PASOS GENERALES PARA EXTRACCIÓN

- 4) Añada 10 ml de agua saturada de fenol (evitando tomar de la fase acuosa) y mezcle por inversión
- 5) Añada 2 ml de cloroformo:isoamilalcohol 49:1 y mezcle
- 6) Sacuda enérgicamente por 10 segundos y enfríe con hielo por 15 minutos.
- 7) Transfiera la muestra a un tubo de 50 ml previamente enfriado y centrifugue a 10,000 g durante 20 minutos a 4⁰C. El ARN estará presente en la capa superior acuosa mientras que el ADN y proteínas estarán presentes en la interfase y bajarán la fase de fenol

PRECIPITACION

8. Trasfiera la fase acuosa a un tubo frío y mezcle con un volumen equivalente de isopropanol.
9. Precipite el ARN por enfriamiento a -20⁰C por lo menos 1 Hr
10. Recupere el precipitado de ARN centrifugando a 10,000g por 20 minutos a 4⁰ C y descarte el sobrenadante
11. Disuelva el RNA en 3 mL de solución D. (pipetee de forma delicada para recuperar la mayor cantidad de material)

12. Repita la precipitación añadiendo 3 ml de isopropanol, mezcle bien y enfríe a -20°C por una hora
13. Centrifugue a 10,000 g por 10 minutos a 4°C

LAVADO

14. Descarte el sobrenadante y lave la bola generada de ARN con etanol previamente enfriado a -20°C y centrifugue en seco y con vacío por 15 minutos

SOLUBILIZACION

- a. La solubilización se realiza en 500 μl de SDS a 65°C por 10 minutos

Procedimiento de Retro transcripción

1. Se procede a generar una cama de hielo para trabajar las muestras en frío
2. Se descongelan las muestras y se procede a la mezcla de reacción de la siguiente manera

Buffer 5 μ L

Primers 4 μ L

DNTPs 3 μ L

M-MLVRT 1 μ L

Agua 3 μ L

ARN 9 μ L

3. Las condiciones de la RT son:

39⁰C 60 minutos

70⁰C 5 minutos

4⁰C por periodo indefinido

Condiciones de PCR para las diferentes isoformas de LEPR

	<i>Isoforma soluble</i>	<i>Isoforma corta</i>	<i>Isoforma larga</i>
	Sentido:	Sentido:	Sentido:
Iniciadores	5' GTCAGAAGATGTGGGAAA 3'	5' GACTCATGTGCAGTGTTTCAG 3'	5' GCTATTTTGGGAAGATGT 3'
	Antisentido:	Antisentido:	Antisentido:
	5' GTGCCCAAGGAACAATTCTT 3'	5' TGGCACATTGGGTTTCATC 3'	5' TGCCTGGGCCTCTATCTC 3'
	30 ciclos	32 ciclos	33 ciclos
Programa de Amplificación	95°C x 2 min	95°C x 2 min	95°C x 2 min
	95°C x 45 seg	95°C x 45 seg	95°C x 45 seg
	54°C x 45 seg	53°C x 45 seg	58°C x 45 seg
	72°C x 45 seg	72°C x 45 seg	72°C x 45 seg
	extensión final a 72°C x 5 min	extensión final a 72°C x 5min	extensión final a 72°C x 5min
	y conservadas a -4°C	y conservadas a -4°C	y conservadas a -4°C