
POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

***“CARACTERIZACIÓN DE FACTORES GENÉTICOS QUE
CONFIEREN RIESGO PARA DESARROLLAR OBESIDAD EN
POBLACIÓN MEXICANA”.***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS GENÓMICAS

P R E S E N T A

Biol. EXP. José Alfredo Martínez Villagómez

TUTOR

ASESOR

Dra. LORENA OROZCO OROZCO

Dr. JOSÉ HUMBERTO NICOLINI

CO-TUTOR

M. en C. YOLANDA SALDAÑA ÁLVAREZ

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

UACMS 11678

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Genómica de Enfermedades Multifactoriales del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), SS., en colaboración con el hospital del Instituto de Seguridad Social al Servicio de los Trabajadores del Estado (ISSSTE) Primero de Octubre y Licenciado Adolfo López Matéos, bajo la dirección general de la Dra Lorena Orozco, Investigadora titular del INMEGEN y de la M. en C. Yolanda Saldaña Álvarez, Investigadora asociada del INMEGEN, además de la asesoría del Dr Humberto Nicolini Sánchez, Profesor de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM).

Agradezco a toda la planta de profesores del Posgrado en Ciencias Genómicas por todo el apoyo otorgado durante mi estancia en el posgrado, y también agradezco a mi casa de estudios, la Universidad Autónoma de la Ciudad de México por el apoyo económico recibido durante mis estudios de maestría. Esta maestría la hicieron posible todos ustedes. ¡Muchas Gracias!

DEDICADO A:

Primeramente a mi hermana Margarita Martínez Villagómez

Para ti hermana, que siempre nos apoyaste desinteresadamente y enseñarnos a luchar en esta vida y....mira los efectos tan profundos que han tenido todas tus buenas acciones. ¡Hasta donde me impulsaste! Que dios te bendiga y no olvides que no "Hay un Héroe como tu" dentro de nuestra familia, que dios me permita seguir aprendiendo de ti.

A mi madre.

Que me diste la vida, me diste todo tu ser, y me enseñaste que no importa las adversidades de la vida, siempre hay una solución. A ti mamita dedico este trabajo. Que dios te siga conservando para mí y mis hermanos por mucho tiempo más.

A mi padre

Que aunque ya no estas con nosotros, te dedico este trabajo de un hijo que siempre lo impulsaste a desafiar una idea tuya que siempre nos inculcaste: El estudio no....y bueno tuviste entre tus hijos, alguien que siempre desafío esa idea y gracias por eso, ha sido un motor interno ha llegar hasta aquí. Que dios te bendiga donde quiera que estés. ¡Te quiero mucho mi "canta recio"!

A todos mis Hermanos

He sido bendecido con todos mis hermanos, tener tanta variedad de donde aprender. Creo que sí no llevo un pedacito de cada uno de ustedes, créanme no hubiera tenido las agallas suficientes al enfrentarme ante las adversidades de la vida. Los amo a todos. ¡Lo logramos! Misión cumplida. ¡Muchas gracias!

A los Pacientes

Que participaron en este proyecto desinteresadamente, y que lamentablemente han sido mi razón de mi crecimiento profesional. Gracias a todos ellos.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Lorena

Dra. agradezco todas las atenciones que tubo hacia mi, por todo el conocimiento aprendido en su laboratorio, por haberla conocido, le agradezco por creer en mi, gracias por aguantarme tanto tiempo. La admiro como profesional. Es usted un buen ejemplo para muchos estudiantes que queremos incursionar en esta área tan padre que es la investigación biológica. ¡Ha! y perdón por todas las canas verdes que le saque por todos los disgustos y corajes que la hice pasar. ¡Gracias!

A la M. en C. Yolanda

Gracias por confiarme este proyecto en el cual en un momento has incubado con mucho cariño y esmero. Gracias por permitirme formar parte del “Obesity Research Group” y que en algún momento tu me dijiste:”alfred este es nuestro proyecto y vamos los dos a poderlo sacar adelante”, esto me habla de la confianza que me depositaste para apoyarte en este proyecto que es algo que de alguna manera has deseado en tu vida profesional. Y gracias por enseñarme tanto y aguantarme tanto.

Al Dr. Humberto Nicolini

Gracias Dr. por todo el apoyo que me brindo al iniciar este proyecto, y gracias por apoyarme con la asesoría y dedicarme algo de su valioso tiempo. Gracias.

A la Dra. Rosa María del Carmen

Le doy gracias a la Dra. que todo el tiempo que fungió como mi asesora, siempre estuvo al pendiente de mi en el aprendizaje y superación académica. Dra. gracias por su apoyo desinteresado, y por su tiempo valioso cedido para mi orientación.

Dra. Esther Orozco

Por esa convicción que tiene de que en la ciencia esta el desarrollo de una nación, de un pueblo, de una persona. Le agradezco a la Dra. Esther por su ímpetu de seguir apoyando a todos los jóvenes entusiastas de querer hacer algo por ellos y por los demás. En este país debería de existir mas personas como ella, para impulsarnos unos a otros como mexicanos y no lo contrario. Gracias Dra. Esther.

A mis compañeros de laboratorio

Tengo que agradecerles sinceramente a todos por haber me aguantado todo este tiempo y por todo el apoyo académico recibido, a Silvia que me apoyo mucho en mis presentaciones, rafa también por su apoyo incondicional y por hacerme reír por sus comentarios tan atinados. A Lupita que siempre tuvo siempre la paciencia de que aprendiera hacer bien las cosas. A mi colega Julián, que no se por que la vida ha hecho que nos encontremos de nuevo, pero hasta ahorita ha sido para puras cosas buenas y positivas. A el “Sensei” Emilio, que me ha apoyado mucho académicamente y por su buen sentido del humor. La verdad lo admiro como profesional y también de a pesar de saber tanto y ser lo que es, tiene la sencillez ante todo. Al otro “Sensei”, Federico que nunca me nego nada y siempre estuvo disponible para lo que sea en el laboratorio. ¡Gracias por la compu! ¡Gracias por todo!

Al los demás compañeros estudiantes, a Humberto García, me has ayudado un buen, a Jesús también, a la “Dra.” Mirna, gracias por tu amistad y apoyo, a Juan gracias por los buenos ratos que hemos pasado. Gracias a Humberto Gutiérrez por su amistad y apoyo, sobre todo en Internet. ¡Gracias colega!

A los profesores del Posgrado

Agradezco a cada uno de los profesores de la planta académica del posgrado. Todos me han brindado su ayuda en todo lo académico, incluso alguno de ellos en lo personal. Gracias a ustedes he podido mantenerme en este medio profesional por que me han sabido guiar en tomar las herramientas necesarias académicas que se necesitan para hacer un excelente profesional. ¡Gracias a todos!

A mis compañeros de generación

Gracias a todos ustedes, por aguantarme, por soportar mi música etc. Cada uno de ustedes también ha contribuido a mi crecimiento profesional. Entre ustedes hay gente que admiro: Olga, Sergio, Jorge, Itzel, el “ñoño” de Omar, Jaquelin, Jonatan y Areli. Gracias por su valiosa amistad

A Ticitl

Por ser mi compañera inseparable al arrancar este proyecto. Por aguantar mis locuras y por ser un motor más en mi vida, lo cual se le agregan más caballos de fuerza a mi motor para seguir adelante. Gracias por hacer que me la crea de quien soy ahora, Gracias, te quiero mucho.

A Dios

Gracias por dejarte conocer y reconocirme que sigo siendo tu hijo también. No me dejes ir. Tú sabes lo que significas para mí. ¡Gracias Dios!

ÍNDICE

Dedicatoria	3
Agradecimientos	4
Abreviaturas	8
Lista de Figuras	11
Lista de Tablas	12
Resumen	13
I. Introducción	16
Prevalencia de la obesidad en México	17
Clasificación clínica de la obesidad	25
Obesidad Etiológica	25
Obesidad por IMC	27
Disposición topográfica de la acumulación de grasa	28
Genética de la obesidad	29
Bases fisiológicas de la obesidad	29
Principales vías de señalización en las neuronas NPY/AGRP y POMC/CART del receptor de leptina	33
Cascada de transducción de señales de la vía JAK/STAT	33
Transporte de la leptina al cerebro	44
Otras hormonas involucradas en la homeostasis de la energía y regulación del peso corporal	44
Clasificación genética de la obesidad	46
Los estudios en familias	46
Los estudios de adopción	46
Estrategias para la búsqueda de genes en la obesidad multifactorial	48
Análisis de ligamiento	48
Análisis de asociación	52
Polimorfismos de un solo nucleótido	54
Genes candidatos involucrados en la etiología de la obesidad	57
Genes candidatos analizados en este estudio: <i>lep</i> , <i>lepr</i> , y <i>pomc</i>	59
Leptina	59
Epidemiología genética de la leptina	61
Receptor de Leptina	62
Epidemiología genética del receptor de leptina	64
Proopiomelanocortina	65

Epidemiología genética de la proopiomelanocortina	67
II Justificación	69
III Objetivos	70
Objetivo General	70
Objetivos particulares	70
IV Material y Métodos	71
Estrategia experimental	71
Clasificación de la investigación	71
Población de estudio	71
Cálculo del tamaño de la muestra	71
Criterios de inclusión	71
Criterios de exclusión	72
Análisis molecular	72
Extracción de DNA	72
Cuantificación del DNA	74
Diluciones del DNA y producción de las placas para TAQMAN	74
PCR y discriminación alélica	76
Diseño de oligonucleótidos	80
Análisis estadístico	80
QUANTO: software para calcular el tamaño de la muestra	80
Finetti: software para el análisis del equilibrio de H-W	80
Construcción de haplotipos	82
HAPLOVIEW: software para la construcción de haplotipos	82
Ubicación del estudio	83
Consideraciones éticas	83
V Resultados	85
Estudio clínico	85
Número de pacientes analizados	86
Análisis de los SNPs - 4118A/G, -3233C/A, -2548G/A, y +19 A/G del gen <i>LEP</i>	87
Análisis del los SNPs K109R A/G, K656N G/C y P1019P T/C del gen <i>LEPR</i>	94
Análisis de los SNPs 3755 C/T 3' UTR y 7069A/G 3'UTR del gen <i>POMC</i>	100
VI Discusión	105
VII Conclusiones y Perspectivas	113
IX Bibliografía	115

ABREVIATURAS

ACTH	Hormona Adrenocorticotrofina
AGPR	Proteína relacionada con agouti
AHL	Área neuronal hipotálamo lateral
Ans	Asparagina
Arg	Arginina
ATP	Adenosinatrifosfato
ATP III	Panel de tratamiento del adulto III
CART	Transcrito regulado por cocaína-anfetamina
CCK	Colecistocinina
CDC	Centros para el control de enfermedades
cDNA	DNA Complementario
Cys	Cisteína
CRH	Hormona liberadora de corticotropina
DZ	Dicigoto
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
ENEC	Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas
ENEN	Encuesta Nacional de Salud
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
ERK	Cinasa reguladora de las señales extracelulares
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GHSR	Receptor de hormona del crecimiento
Gln	Glutamina
HapMap	Mapa de Haplotipos
HDL	Lipoproteína de alta densidad
IBD	Idéntico por descendencia
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
Ile	Isoleucina
IMC	Índice de Masa Corporal
INMEGEN	Instituto Nacional de Medicina Genómica
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
ISSSTE	Instituto de Seguridad Social al Servicio de los Trabajadores del Estado
IOFT	Internacional Obesity Task Force
IRS-PI(3)K	Insulin Receptor Substrate-Phosphatidylinositol 3-Kinase
JAK/STAT	Janus Kinases/Signal Transducer and Activators of Transcription
kDA	Kilodaltons
LD	Desequilibrio de Ligamiento

LDL	Lipoproteína de Baja Densidad
LEP	Gen de leptina
LEPR	Gen del Receptor de Leptina
Lys	Lisina
MCH	Hormona Concentradora de Melanocitos
MC4R	Receptor de Melanocortinas tipo 4
MC3R	Receptor de Melanocortinas tipo 3
MC2R	Receptor de Melanocortinas tipo 2
MC1R	Receptor de Melanocortinas tipo 1
□-MSH	Hormona Estimuladora de Melanocitos – □
□-MSH	Hormona Estimuladora de Melanocitos - □
γ-MSH	Hormona Estimuladora de Melanocitos - γ
MZ	Monocigoto
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
NCHS	Centro Nacional para las Estadísticas de la Salud
NPY	Neuropéptido Y
Ob-R	Receptor de Leptina
OMS	Organización Mundial de la Salud
PC-1	Proconvetasa 1
PC-2	Proconvertasa 2
PFA	Área Perifornical
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PIP2	Fosfatidil-inositol-4,5 bifosfato
PIP3	Fosfatidil-inositol-3,4,5 trifosfato
PKB	Proteíncinsa B
PKC	Proteíncinasa C
POMC	Proopiomelanocortina
PPARG2	Receptor Activado Proliferativo de Peroxisomas 2
Pro	Prolina
PTP1B	Proteínfosfatasa de Tirosina 1B
PVN	Núcleoparaventricular
P YY ₃₋₃₆	Péptido YY ₃₋₃₆
QTL	Locus de Rasgo Cuantitativo
RNA _m	Mensajero del Ácido Ribonucleico
SNP	Polimorfismo de un Solo Nucleótido
SOCS	Supresores de Señalización de Citocinas
SSA	Secretaría de Salud
STC	Repeticiones Cortas en Tandem
TDT	Prueba de Desequilibrio de Transmisión
TFBS	Sitios de Unión a Factores de Transcripción

TNF- □	Factor de Necrosis Tumoral – □
TRH	Hormona Liberadora de Tirotropina
Trp	Triptofano
Tyk2	Tirocincinasa 2
Tyr	Tirosina
UTR	Región No Traducida
Val	Valina
VNTR	Número Variable de Repeticiones en Tandem

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Prevalencia de sobrepeso y obesidad

Figura 2. Prevalencia de sobrepeso en niños menores de cinco años

Figura 3. Comparativo de la prevalencia nacional de sobrepeso y obesidad en población de 5 a 11 años

Figura 4. Comparación de la prevalencia de sobrepeso y obesidad entre 1999 y 2006 en mujeres de 12 a 19 años

Figura 5. Regulación fisiológica del balance de energía

Figura 6. Señalización intracelular de la leptina en Ob-Rb

Figura 8. Modelo propuesto de la participación de SOCS3 en la resistencia a leptina

Figura 9. Inducción de las vías IRS-PI(3)K por la leptina e insulina

Figura 10. Regulación de la expresión de POMC y AGRP por el factor de transcripción FOXO1

Figura 11. Estudios de ligamiento en familias relacionadas

Figura 12. El mapa genético de la obesidad

Figura 13. Diseño de estudios de casos y controles

Figura 15. Prueba de desequilibrio de transmisión

Figura 16. Estructura de la hormona leptina

Figura 17. Receptor de leptina

Figura 18. Estructura del gen de proopiomelanocortina (POMC) y su procesamiento post-traducciona

Figura 19. Péptidos derivados de POMC y los síndromes asociados a la deficiencia de POMC

Figura 20. Discriminación alélica mediante el método de fluorescencia de 5' exonucleasa

Figura 21. Plot que muestra los genotipos de un SNP

Figura 22. Desplegado de Haploview

Figura 23. Estrategia experimental seguida en este estudio

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Prevalencia de circunferencia de cintura

Tabla 2. Evaluación del peso corporal

Tabla 3. Obtenida de FINETTI

Tabla 4. Características de la población mexicana en estudio

Tabla 5. SNPs que se analizaron en el presente estudio

Tabla 6. Análisis alélica y genotípica del SNP -4118 A/G del gen *LEP*

Tabla 7. Análisis alélica y genotípica del SNP -3233 C/A del gen *LEP*

Tabla 8. Análisis alélica y genotípica del SNP -2548 G/A del gen *LEP*

Tabla 9. Análisis alélica y genotípica del SNP +19 A/G del gen *LEP*

Tabla 10. Haplotipos identificados de los SNPs -4118 A/G, -3233 C/A, -2548 G/A, y +19 A/G del gen *LEP*

Tabla 11. Análisis alélica y genotípica del SNP K109R A/G del gen *LEPR*

Tabla 12. Análisis alélica y genotípica del SNP K656N G/C del gen *LEPR*

Tabla 13. Análisis alélica y genotípica del SNP P1019P T/C del gen *LEPR*

Tabla 14. Haplotipos identificados de los SNPs, K109R A/G, K656N G/C, P1019P T/C del gen *LEPR*

Tabla 15. Análisis alélica y genotípica del SNP 3755 C/T del gen *POMC*

Tabla 16. Análisis alélica y genotípica del SNP 7069 A/G del gen *POMC*

Tabla 17. Haplotipos identificados de los SNPs, 3755 C/T y 7069 A/G del gen *POMC*

RESUMEN

La obesidad es el producto de un balance energético positivo, ya sea por medio de un elevado aporte energético o por una reducción del gasto de energía mantenido a lo largo del tiempo y que se caracteriza por la acumulación excesiva de grasa corporal en el tejido adiposo que compromete la salud del individuo. La prevalencia de la obesidad está aumentando rápidamente en los países desarrollados, y mientras los países en vías de desarrollo, como México, sigan adoptando un estilo de vida semejante a los países industrializados, entonces la obesidad se va a convertir en una pandemia global. En México se tiene una prevalencia del 30 % de la población en adultos mayores de 20 años, siendo México el país que ocupa el segundo lugar en obesos a nivel mundial. Se han realizado varios estudios epidemiológicos donde se ha demostrado la participación genética importante en el desarrollo de esta patología. Gracias a los estudios de epidemiología genética, se tiene la clasificación genética en obesidad monogénica, que es muy rara y se presenta durante la niñez; la obesidad sindrómica, donde la obesidad es una manifestación clínica de algún síndrome mendeliano y por último se tiene la obesidad multifactorial que es la más común, la cual se caracteriza por la participación de múltiples genes de susceptibilidad cuya expresión está influenciada por los factores ambientales. La obesidad multifactorial es el resultado de la interacción del ambiente que influye en la expresión de los genes que codifican las proteínas involucradas en las vías del control de la homeostasis de la energía. Existen variaciones en el DNA en las regiones codificadoras y reguladoras en estos genes los cuales se han visto asociadas a la susceptibilidad a padecer obesidad. Tanto en la obesidad monogénica como recientemente en la multifactorial, se han visto involucrados los genes que codifican para las proteínas de la vía de la leptina/melanocortina. Este hecho coloca a la vía de la leptina como la principal en el control del peso corporal y una de las primeras y mejor descritas en la regulación de la ingesta calórica. En este estudio, se analizaron los polimorfismos de un solo

nucleótido (SNPs) de los genes que codifican para la leptina, receptor de leptina y proopiomelanocortina en una muestra de pacientes mexicanos con obesidad. Ya en estudios previos en distintas poblaciones se han encontrado SNPs de susceptibilidad asociados a desarrollar obesidad. Los SNPs analizados en este estudio fueron: -4118 A/G, -3233 C/A, -2548 G/A y 19 A/G del gen *LEP*. Nuestros resultados sugieren que de estos cuatro SNPs del gen de *LEP*, no tienen relevancia en la susceptibilidad a desarrollar obesidad en la población mexicana. Tampoco se mostró relevancia en la susceptibilidad a desarrollar obesidad cuando son parte de haplotipos. En estudios previos, estos SNPs se asociaron como parte de haplotipos a susceptibilidad a padecer obesidad específicamente en hombres. Del gen del receptor de leptina (*LEPR*), los SNPs analizados fueron: K109R A/G, K656N T/C, y P1019P T/C, de los cuales en este estudio no se encontró relevancia en la susceptibilidad a desarrollar obesidad. Sólo cuando se compararon los genotipos A/A vs A/G del SNP K109R del gen *LEPR* se presentó una diferencia estadísticamente significativa [OR=1.647 95% IC (1.089-2.492) $\chi^2=5.63$ p=0.01764]. Esta diferencia posiblemente está dada por que los controles no se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg. Se tendrá que comprobar la genotipificación por secuenciación o descartar que este resultado se derive de la estratificación de los controles por ser dirigidamente seleccionados por su bajo IMC. En el análisis de estos SNPs cuando son parte de haplotipos, no se observó asociación para la susceptibilidad a desarrollar obesidad. De los tres marcadores, sólo el haplotipo ACT mostró una diferencia estadísticamente significativa (p=0.0275) y similar a los reportado en otros estudios, este se asoció a un IMC menor de 25 Kg/m². Este haplotipo fue el menos frecuente del gen *LEPR*. Del gen de la prohormona, proopiomelanocortina los SNPs que se analizaron fueron dos, el 3755 C/T y el 7069 A/G localizados en la región 3' UTR del gen *POMC*. Estos SNPs en un estudio previo en población México-Americana ya habían presentado asociación a la susceptibilidad a padecer obesidad tanto como SNPs individuales como formando parte

de haplotipos. En nuestro análisis, el SNPs 3755 C/T de la región 3' UTR, mostró una asociación estadísticamente significativa a obesidad [OR = 0.632; 95 % IC (0.418-0.955) $\chi^2=4.80$, $P=0.02841$] confiriendo protección en nuestra población. El SNP 7069 A/G 3' UTR del gen de la proopiomelanocortina no mostró relevancia en la susceptibilidad a padecer obesidad en la población mexicana. En este SNP cuando se encuentra formando parte de haplotipos, mostró asociación a la distribución de grasa visceral y subcutánea en población México-Americana. En el análisis de estos SNPs cuando son parte de haplotipos, no se observó relevancia en la susceptibilidad a desarrollar obesidad. Sólo el haplotipo AA de los dos marcadores, mostró una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.0303$) pero se puede considerar de protección por tener una mayor frecuencia en los controles que en los casos. Este haplotipo fue el menos frecuente del gen de *POMC*.

Introducción

La obesidad es el resultado de un balance energético positivo mantenido a lo largo del tiempo que se caracteriza por la acumulación excesiva de grasa corporal en el tejido adiposo que compromete la salud del individuo (O'Brien P, Dixon J., 2002). Actualmente la obesidad se ha convertido en un serio problema de salud pública a nivel mundial debido a su elevada prevalencia (> de 25 %), su alarmante incremento en niños (Troyano & Flegal, 1998; Flodmark et al. 2004), su estrecha vinculación con las principales causas de morbilidad y sus consecuencias psicológicas y sociales. En los últimos años, el interés por la obesidad ha incrementado de manera importante debido a que es un factor de riesgo para enfermedades comunes como aterosclerosis, alteraciones metabólicas como resistencia a la insulina, diabetes mellitus, alteraciones de los lípidos, hipertensión arterial, padecimientos oncológicos como cáncer de colon, mama, ovario y próstata, así como trastornos gastrointestinales (Calle y col., 1999).

El marcado incremento en la prevalencia de la obesidad en los Estados Unidos durante los últimos 20 años, está bien documentado en los reportes del *Sistema de Vigilancia de Factores de Riesgo del Comportamiento* (Behavioral Risk Factor Surveillance System) llevado a cabo anualmente en los estados unidos por los centros para el control y prevención de enfermedades (Centers for Disease Control and Prevention; <http://www.cdc.gov/nccdphp/dnpa/obesity/trend/>).

En el 2004, Hedley y cols. reportaron los datos colectados en el periodo de 1999-2002 donde estiman que el 30.4 % de la población adulta estadounidense tiene un Índice Masa Corporal mayor de 30 Kg. /m², considerándose clínicamente obeso (Hedley et al. 2004). Por otro lado, en los países en vías de desarrollo, la prevalencia de la obesidad va aumentando dramáticamente; por ello la obesidad se considera como una pandemia global (Christopher G. Bell, et al. 2005). En Europa y otros países se estima que la prevalencia de la obesidad

es de 15-20 % (Wilborn C. et. al. 2005), siendo esta más elevada en mujeres que en hombres (26 % vs 31 %,). En niños se calcula una prevalencia hasta del 22 % (Wilborn C. et. al. 2005). Existen variaciones importantes en la prevalencia de la obesidad entre los diferentes países (Kopelman 2000). La prevalencia de la obesidad es alta toda América, especialmente en los Estados Unidos, Argentina, Chile, Paraguay y México, así como en muchos países europeos occidentales (Kopelman 2000; James et al. 2001; James 2004). Existen ciertas islas del Pacífico tales como Samoa, Nauru, Tonga, las islas Cook y de la Polinesia Francesa, donde la obesidad es muy común con una prevalencia hasta del 75 % (Bjorntorp 1997).

Prevalencia de la Obesidad en México

En México el sobrepeso y la obesidad son problemas que afectan cerca de 70 % de la población (mujeres: 71.9%, hombres: 66.7%) entre los 30 y 60 años (ENSA 2006). En 1993, la Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas (ENEC 1993) mostró que la prevalencia de la obesidad en adultos era de 21.5%, mientras que en el año 2000, la Encuesta Nacional de Salud (ENSA 2000) se reportó una prevalencia de 24 %. Recientemente la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006 , 24.2%), se encontró que alrededor de 30 % de la población mayor de 20 años padece de obesidad (ENSANUT 2006; mujeres: 34.5 %; hombres: 24.2%; Figura 1).

En esta misma encuesta, se propuso conocer el estado nutricional en toda la República Mexicana, es decir, establecer la prevalencia de desnutrición, sobrepeso y obesidad en preescolares, escolares, adolescentes y adultos. Mediante índices antropométricos contruidos con base en las mediciones de peso, talla y edad.

En el caso de preescolares y escolares, los indicadores utilizados fueron el peso esperado para la edad, la talla esperada para la edad y el peso esperado para la talla en individuos

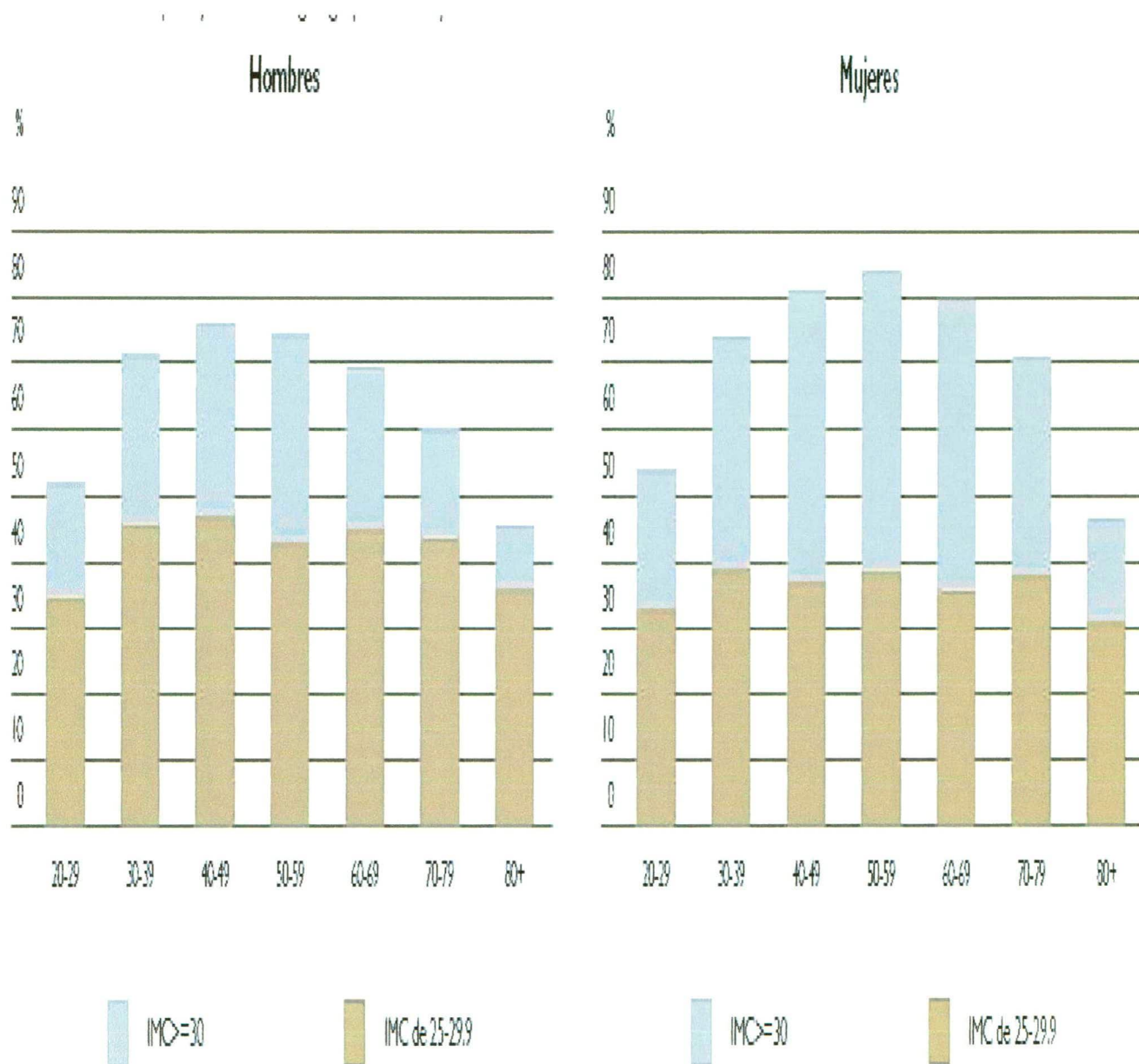


Figura 1. **Prevalencia de sobrepeso y obesidad**, según grupo de edad y sexo. México, ENSANUT 2006.

Mexicanos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha recomendado utilizar como referencia internacional una población de niños sanos y bien alimentados de Estados Unidos [OMS/NCHS (Nacional Center for Health Statistics)/CDC (Centers for Disease Control)] para construir los indicadores antropométricos, sin embargo, con base en las variaciones existentes entre los diferentes grupos raciales, cada población debe de establecer sus propios parámetros.

En adolescentes, el estado nutricional de la población de 12 a 19 años de edad se evaluó calculando el IMC mediante la distribución y puntos de corte propuestos por el Internacional Obesity Task Force (IOTF; Cole T 2000), ajustado para la población mexicana. ENSANUT 2006. En adultos la evaluación del estado nutricional de la población mayor de 20 años de edad se realizó mediante dos indicadores; el IMC, y la circunferencia de cintura. Para la circunferencia de cintura se utilizaron dos clasificaciones: a) la propuesta por un panel de expertos convocados por los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos (ATPIII), la cual establece que una circunferencia como punto de corte >102 cm., en hombres y >88 cm. en mujeres, es indicador de riesgo de síndrome metabólico. En la actualidad este indicador es considerado también por el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS); y b) la propuesta por la Secretaría de Salud (SSA), cuyo índice de circunferencia abdominal es >80 cm. en mujeres y >90 cm. en hombres.

Los resultados del ENSA 2006 muestra la comparación de los datos obtenidos en 1999 y el 2006 con respecto a la prevalencia de sobrepeso (puntaje z de peso para la talla >2) en niños menores de cinco años (figura 2), tanto en el ámbito nacional, como por las diferentes regiones del país, mostrando que en el periodo de 1999 a 2006, a nivel nacional hubo un pequeño decremento de 0.2 de puntaje de peso en la prevalencia de sobrepeso en niños menores de cinco años.



Figura 2. Prevalencia de sobrepeso ($ZPT > 2$) en niños menores de cinco años, por región en 1999 y 2006. México.

Por otra parte, la prevalencia nacional combinada de sobrepeso y obesidad en niños de 5 a 11 años de edad, utilizando los criterios de la IOTF, fue de alrededor de 26% (26.8% en niñas y 25.9% en niños; figura 3). La prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad en 1999, bajo el mismo criterio, fue de 18.6% (20.2% en niñas y 17% en niños). Entre 1999 y 2006, la prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad en los sexos combinados aumentó un tercio, aunque el mayor incremento estuvo a expensas de la obesidad y se observó en el sexo masculino.

En la encuesta del 2006, uno de cada tres hombres o mujeres adolescentes tiene sobrepeso u obesidad. La comparación de los datos obtenidos en los años 1999 y 2000 en las mujeres de 12 a 19 años, mostró un incremento del 7.8 % (de 21.6 % a 23.3%) en la prevalencia de sobre peso y un 33.3 % (de 6.9% a 9.2%) en la prevalencia de la obesidad (figura 4).

Y por último, según la ENSANUT 2006, la prevalencia de sobrepeso en adultos fue más alta en hombres (42.5%) que en mujeres (37.4%, 5 puntaje de peso mayor); en cambio, la prevalencia de la obesidad fue mayor en mujeres (34.5%) que en hombres (24.2%, 10 puntaje de p mayor). De manera relevante la prevalencia de sobrepeso y de obesidad llega al 71.9% en las mujeres mayores de 20 años de edad (alrededor de 24 910 507 mujeres en todo el país) y a 66.7% en los hombres (representativos de 16 231 820 hombres).

Por otra parte, el que 83.6% de las mujeres presentaron una circunferencia de cintura de >80 cm, mientras que en los hombres el porcentaje con cintura de >90 cm. fue de 63.8 %, lo cual quiere decir que este alto porcentaje de la población mexicana se encuentra en un alto riesgo de desarrollar síndrome metabólico o cualquiera de las comorbilidades de la obesidad.

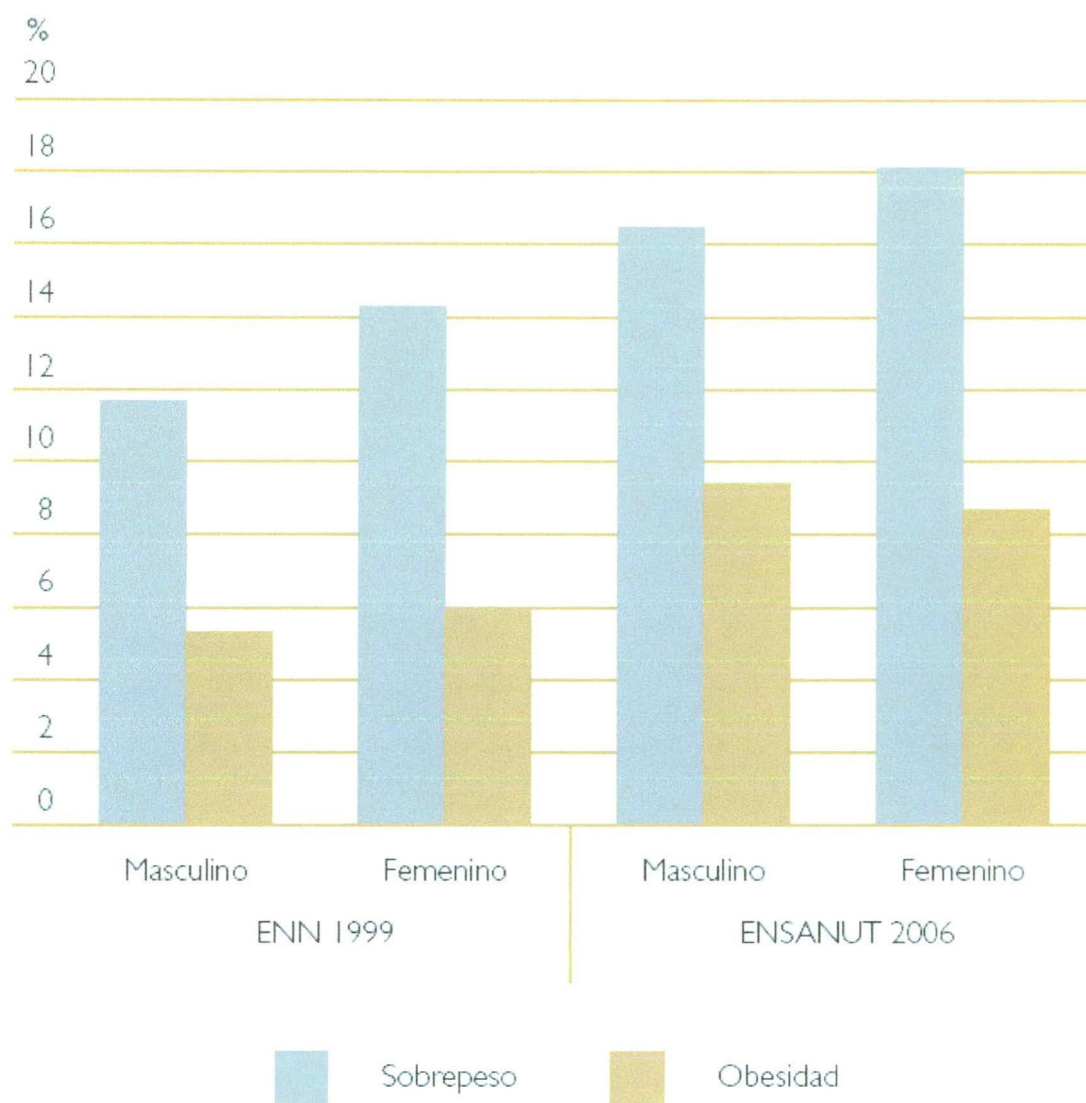


Figura 3. Comparativo de la prevalencia nacional de sobrepeso y obesidad en población de 5 a 11 años de edad de la ENN 1999 y ENSANUT 2006, por sexo, de acuerdo con los criterios propuestos por el Internacional Obesity Task Force (IOTF). México

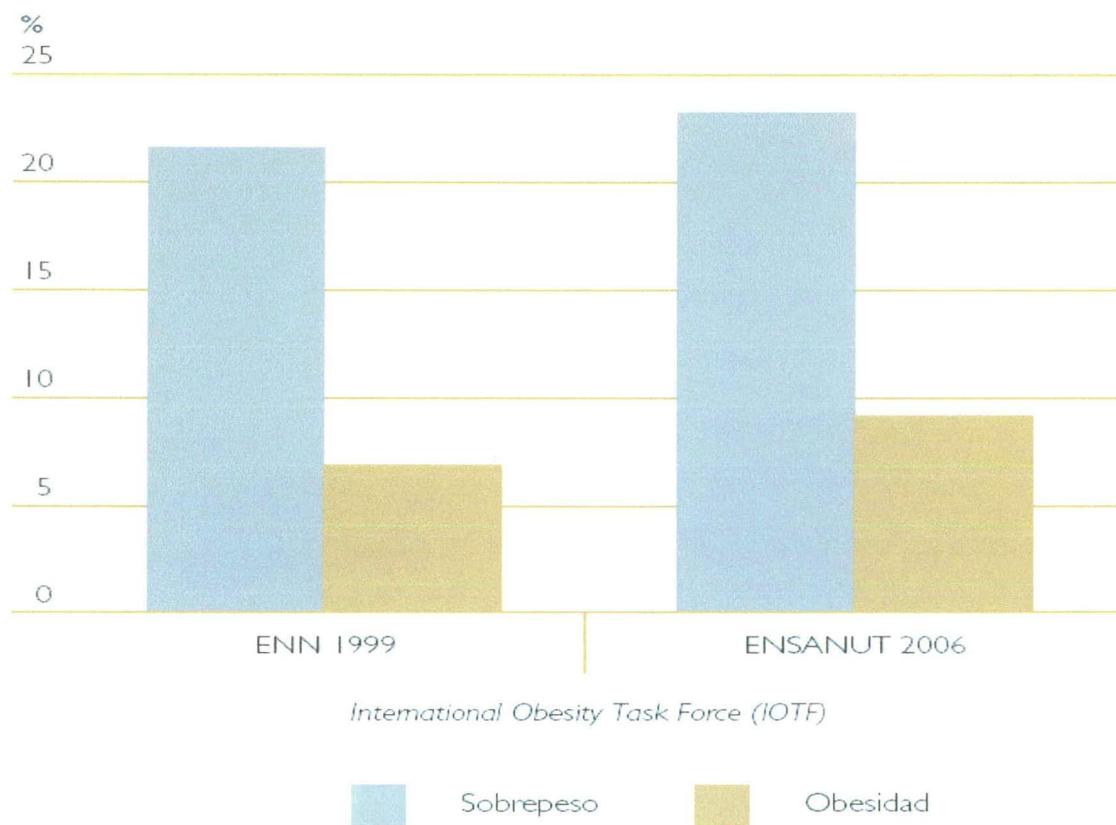


Figura 4. Comparación de la prevalencia de sobrepeso y obesidad entre 1999 y 2006 en mujeres de 12 a 19 años de edad de acuerdo con los criterios propuestos por el IOTF. México.

Tabla 1

Edad en años	Masculino							
	Adecuada (≤ 90 cm)				Excesiva (> 90 cm)			
	Muestra número	Número (miles)	Expansión %	IC95%	Muestra número	Número (miles)	Expansión %	IC95%
20 a 29	1 323	2 843.9	59.0	(55.9, 62.0)	1 061	1 977.4	41.0	(38.0, 44.1)
30 a 39	1 226	2 036.9	38.2	(35.2, 41.2)	2 047	3 300.5	61.8	(58.8, 64.7)
40 a 49	759	1 222.6	26.4	(23.8, 29.0)	1 945	3 416.8	73.6	(70.9, 76.1)
50 a 59	457	840.4	23.3	(19.8, 27.1)	1 314	2 772.6	76.7	(72.8, 80.2)
60 a 69	355	668.6	27.6	(23.8, 31.5)	947	1 757.1	72.4	(68.4, 76.1)
70 a 79	274	426.3	29.0	(24.4, 34.1)	572	1 041.9	71.0	(65.8, 75.5)
80 o más	173	228.0	42.2	(35.1, 49.5)	221	312.7	57.8	(50.4, 64.8)
Total	4 567	8 266.8	36.2	(34.7, 37.6)	8 107	14 579.0	63.8	(62.3, 65.2)

Edad en años	Femenino							
	Adecuada (≤ 80 cm)				Excesiva (> 80 cm)			
	Muestra número	Número (miles)	Expansión %	IC95%	Muestra número	Número (miles)	Expansión %	IC95%
20 a 29	1 280	2 446.6	31.9	(29.5, 34.3)	2 866	5 226.6	68.1	(65.7, 70.5)
30 a 39	879	1 472.5	17.9	(16.2, 19.8)	4 746	6 759.6	82.1	(80.2, 83.8)
40 a 49	399	698.5	9.9	(8.5, 11.4)	3 617	6 379.1	90.1	(88.6, 91.5)
50 a 59	163	319.7	7.2	(5.6, 9.2)	2 242	4 145.2	92.8	(90.8, 94.4)
60 a 69	139	237.4	7.7	(6.1, 9.7)	1 581	2 843.0	92.3	(90.3, 93.9)
70 a 79	108	164.5	8.7	(6.0, 12.5)	1 043	1 718.8	91.3	(87.5, 94.0)
80 o más	64	95.8	12.6	(9.1, 17.2)	420	665.3	87.4	(82.8, 90.9)
Total	3 032	5 435.0	16.4	(15.4, 17.4)	16 515	27 737.6	83.6	(82.6, 84.6)

Prevalencia de circunferencia de cintura excesiva utilizando los criterios propuestos por la SSA en hombres y mujeres, por grupos de edad. México, ENSANUT 2006

El aumento en la prevalencia de obesidad en los últimos siete años en México es alarmante, ya que ocurre en todos los grupos de edad. Es urgente aplicar estrategias y programas dirigidos a la prevención y control de la obesidad del niño, el adolescente y el adulto.

Clasificación Clínica de la Obesidad

La obesidad se puede clasificar en tres grupos: la etiológica, la dependiente del Índice de Masa corporal (IMC) y la disposición topográfica de la acumulación de grasa (M. Barbany y M. Foz 2002). **Obesidad etiológica:** Origen endocrino:

- a. Obesidad ovárica; como se observa en el síndrome de Stein-Leventhal el cual se caracteriza por oligomenorrea o amenorrea, hirsutismo y aumento progresivo de peso. La causa de la alteración endocrina del ovario es compleja y no del todo conocida y con frecuencia existe también una hiperfunción adrenal.
- b. Hiperinsulinemia: en diabetes tipo 2 con hiperinsulinemia o bien diabetes tipo 2 en pacientes que requieren insulina. Esto es por que la insulina es una hormona anabolizante que favorece la síntesis de grasa y su depósito en el tejido adiposo.
- c. Hiperfunción Suprarrenal: con aumento de la producción de glucocorticoides como sucede en la enfermedad o síndrome de Cushing que conlleva un incremento de peso con una distribución característica de la grasa en la región faciotroncular del cuerpo.
- d. Hipotiroidismo: cursa con incremento de peso. Origen hipotalámico: este tipo de obesidad ha sido repetidamente demostrado en modelos animales, pero es poco frecuente en humanos. Se obtiene, en animales de laboratorio, cuando se lesiona el núcleo ventromedial del hipotálamo.

Esta lesión provoca hiperfagia y, como consecuencia, obesidad. Se asocia a traumatismos, tumores, infecciones, cirugía, etc.

2. Origen genético (monogénica y sindromática): está causada por anomalías cromosómicas. Son síndromes de rara aparición que cursan con obesidad (Prader-Willi, Älstrom, Carpenter, Cohen, Bardet-Biedl). Más adelante se dan mas detalles de la clasificación genética de la obesidad.
3. Por medicamentos: algunos fármacos pueden provocar o aumentar el grado de obesidad. Algunos son glucocorticoides empleados como inmunosupresores para tratar enfermedades autoinmunes, en pacientes con órganos transplantados, como antiinflamatorios en enfermedades reumáticas o como broncodilatadores en el asma bronquial. Así :
 - a. La insulina, especialmente cuando es utilizada en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2.
 - b. Antidepresivos y en particular la amitriptilina; las fenotiacinas y otros psico fármacos también pueden favorecer el depósito de grasa en el tejido adiposo.
 - c. Los estrógenos (anticonceptivos orales). Se piensa que el aumento de peso puede ser más debido a una retención hídrica que a un incremento de tejido adiposo.
 - d. Las hidracinas, empleadas en el tratamiento de la tuberculosis, son responsables del aumento de peso que padecen todos los enfermos poco después de iniciar el tratamiento.

Obesidad por IMC:

El diagnóstico de la obesidad se establece con base en el índice de masa corporal (IMC), en el cual se calcula dividiendo el peso de la persona en kilogramos entre su talla elevada al cuadrado: Kg / m^2 . El IMC ideal oscila entre 20 y 25, considerándose como sobrepeso entre 25 y 29.9; obesidad grado I de 30-34.9; obesidad grado II de 35.0 a 39.9 y obesidad mórbida grado III cuando existe un IMC mayor de 40.0 (WHO, 1995; Kuller y cols., 1993). En la tabla 2 se muestra la clasificación clínica de la obesidad según el Í.M.C. propuesta por la Organización Mundial de la Salud.

Tabla 2. Evaluación del peso corporal. (Clasificación de la OMS; 1997).

<i>CLASIFICACIÓN DEL PESO</i>	<i>ÍNDICE DE MASA CORPORAL (Kg/m^2)</i>	<i>CLASIFICACIÓN DEL RIESGO</i>
Bajo peso	Menor de 18,5	Bajo
Normal	18,5 – 24,9	Promedio
Sobrepeso	25 – 29,9	Aumentado
Obesidad grado I	30 – 34,9	Moderado
Obesidad grado II	35 – 39,9	Severo
Obesidad grado III	Mayor o igual a 40	Muy severo

Disposición topográfica de la acumulación de grasa:

La distribución del acumulo de grasa puede tener un predominio superior, -obesidad central o androide- o inferior –obesidad periférica o ginoide-. En la primera, más propia de los varones, la grasa se acumula sobre todo en la cara, región cervical, tronco y región supraumbilical, y también aumenta de modo notable la grasa abdominal profunda (obesidad visceral). Este tipo de acumulación grasa es el que está ligado a las complicaciones metabólicas y cardiocirculatorias vinculadas a la resistencia insulínica y que da lugar al síndrome plurimetabólico. Por otra parte, en la obesidad periférica o ginoide, más propia de las mujeres, la grasa se acumula en la parte inferior del cuerpo: región infraumbilical del abdomen, caderas, región glútea y muslos.

Desde el punto de vista antropométrico, esta valoración suele hacerse mediante la medición del cociente cintura/cadera (C/C). Valores superiores al percentil 90 de este cociente en la población estudiada representa un riesgo importante para la salud. Aunque en la actualidad, existe una tendencia a utilizar sólo la circunferencia de la cintura, valor más importante que el de la cadera, para valorar el riesgo de la acumulación central de la grasa. (M. Barbany, M. Foz, 2002).

Además de la circunferencia de cintura, circunferencia de cadera o la proporción cintura/cadera, se pueden emplear otras medidas antropométricas para estimar la adiposidad, como el análisis de bioimpedancia, medición de peso bajo el agua, absorptiometría de rayos X de energía dual, mediciones del grosor de los pliegues de la piel, y métodos de imagen, tales como tomografía computarizada e imágenes de resonancia magnética. Dado que estas técnicas son más laboriosas y caras, no son muy utilizadas en la rutina clínica. La más útil y práctica es la estimación del IMC, por lo que es la más utilizada en la práctica medica. Así, además de que el IMC se correlaciona con varios factores de

riesgo relacionados con la obesidad (Willett et al. 1999; Steinberger et al. 2005), este es el método más confiable para establecer el diagnóstico de la obesidad, aunque recientemente se ha sugerido que la circunferencia de cintura es el mejor predictor del riesgo a padecer enfermedades relacionadas con la obesidad (Janssen et al. 2004).

Genética de la obesidad:

Monogénica: Rara, se manifiesta durante la niñez y se caracteriza por fenotipos muy graves.

Obesidad Sindrómica: Manifestación clínica de algún síndrome mendeliano.

Obesidad Multifactorial: Múltiples genes de susceptibilidad cuya expresión está influenciada por factores ambientales.

Bases Fisiológicas de la obesidad.

La obesidad es causada por perturbaciones en el balance en la ingesta de alimentos y el gasto de energía, el cual es regulado por un complejo sistema fisiológico que requiere la integración de varias señales periféricas y una coordinación central en el cerebro.

La hipótesis de la existencia de un circuito de retroalimentación endocrina, que incluye factores que circulan en proporción al contenido de grasa corporal y actúan en el cerebro para regular la ingesta calórica, fue confirmada por el descubrimiento de la hormona leptina en 1994 (Zhang et al. 1994). Esta hormona está codificada en el gen *LEP*, se sintetiza principalmente en los adipositos, y forma parte del complejo mecanismo de señales hormonales que alcanzan el hipotálamo.

La leptina secretada por el tejido adiposo, circula en el torrente sanguíneo a niveles que son proporcionales a la cantidad de grasa corporal (energía) almacenada, y a través de su receptor (LEPR), ubicado en las neuronas del hipotálamo (Núcleo Arcuato), inhibe la síntesis del neuropéptido “Y” (NPY) y la proteína relacionada con el agouti (AGPR), que son sintetizadas exclusivamente por un grupo de neuronas orexigénicas ubicadas en el núcleo arcuato. Por otro lado, otro grupo de neuronas localizadas adyacentemente a las neuronas NPY/AGPR, la leptina al unirse a su receptor estimula la síntesis de proopiomelanocortina (POMC) y el transcrito regulado por la cocaína y anfetamina (CART). La activación del NPY y AGPR tienen efecto orexigénico, esto es, promueve la ingesta de alimentos e inhibe la quema de calorías, mientras (POMC) y el transcrito regulado por cocaína y anfetamina (CART) tiene el efecto opuesto, es decir inhiben la ingesta de alimentos y promueven el gasto energético (anorexigénico). La proopiomelanocortina es un precursor de varios neuropéptidos, es activado a través de modificaciones post-traduccionales, principalmente por las enzimas Proconvertasa-1 (PC-1) y Proconvertasa 2, generándose diferentes tipos de la hormona estimulante de melanocitos (α -MSH, β -MSH y γ -MSH), así como los péptidos adrenocorticotrofina (ACTH), y β -endorfina (Figura 5; Le Pritchard et al. , 2002; Raffin et al. 2003)

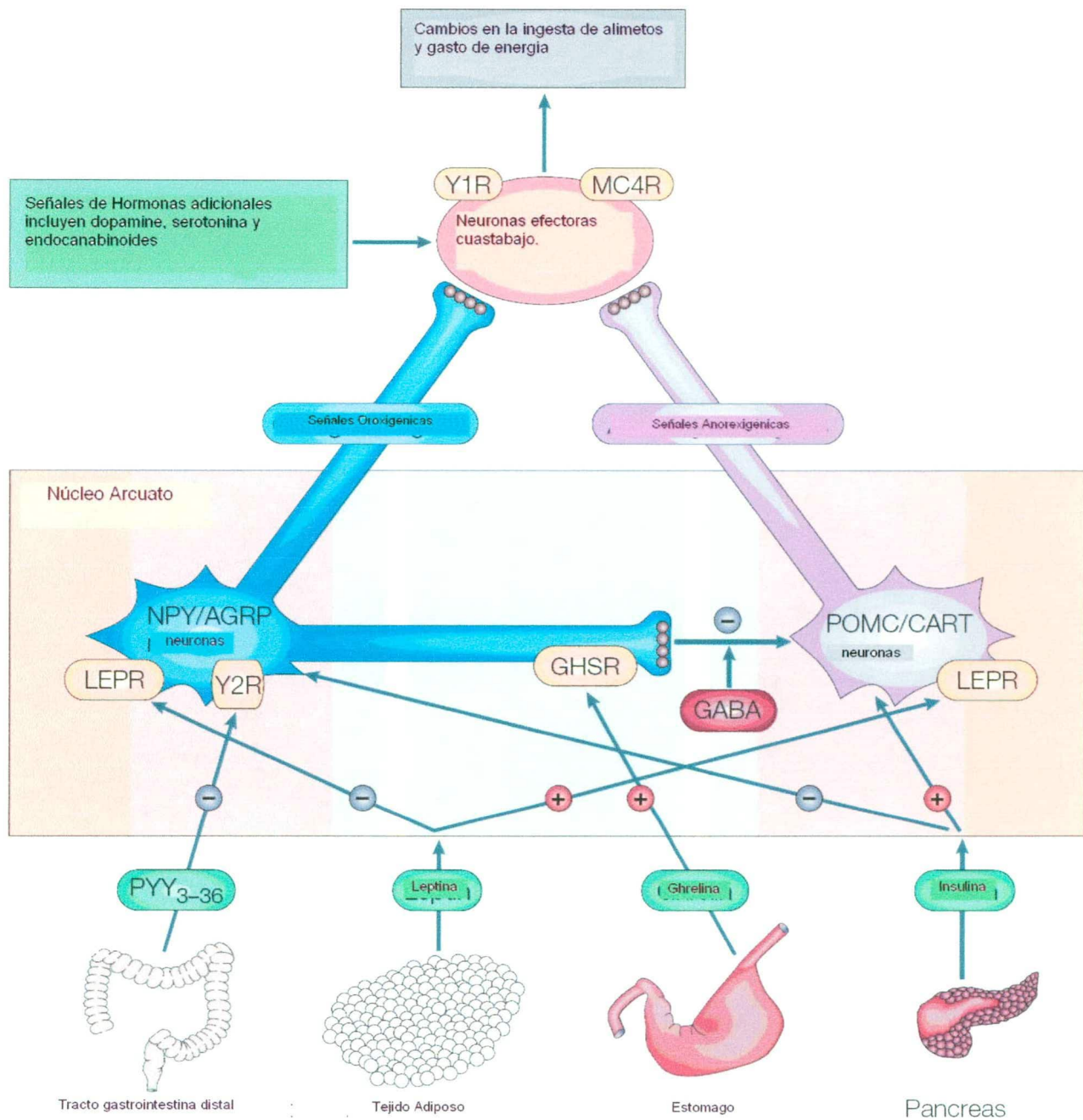


Figura 5. Regulación fisiológica del balance de energía. La activación de las neuronas NPY/AGRP tienen un efecto orexigénico, promoviendo la toma de alimentos, mientras las neuronas POMC/CART inhiben el gasto energético y toma de alimentos. POMC es activado a través de sus modificaciones post-traduccionales a la hormona estimuladora de α -melanocitos (α -MSH). La leptina es secretada del tejido adiposo en cantidades proporcionales a la cantidad de grasa corporal almacenada, y ejerce sus efectos a través del receptor de leptina (LEPR), inhibiendo las neuronas NPY/AGRP y estimulando las neuronas POMC/CART. Existen otras señales hormonales como la ghrelina, PYY o la insulina, que contribuyen a dar un resultado total al balance de energía y peso corporal en los seres humanos (Froguel P. Nature Reviews Genetics. The Genetics of Human Obesity 2005).

El neuropéptido α -MSH se une al receptor 4 de la melonocortina (MC4R) en el núcleo paraventricular (PVN). Cuando se une la melanocortina o CART en una neurona de segundo orden del área PVN, estas neuronas van a producir Hormona Liberadora de Corticotropina (CRH) y Hormona Liberadora de Tirotrópina (TRH), las cuales reducen la ingesta calórica. Estas hormonas en el PVN son inhibidas por las señalizaciones generadas por NPY. En cambio cuando se une NPY y AGRP a las áreas neuronales hipotálamo lateral (AHL) y área perifornical de segundo orden (PFA), estas van a producir la Hormona Concentradora de Melanocitos (MCH) y que junto con las orexinas A y B, promueven a promover la ingesta de alimentos e inhibir la quema de calorías. Cuando la melanocortina o CART se une a estas áreas hipotalámicas, se inhiben las hormonas MCH y las orexinas A y B (Schwartz M., 2000).

Existen otras hormonas que participan en la composición corporal y regulación del peso corporal como la insulina, la primera hormona descrita con efectos anorexigénicos (Schwartz, M., 2000).

La Ghrelina otra proteína producida por el estómago y el duodeno, cuyos niveles aumentan antes de los alimentos, estimulando la secreción de dos hormonas orexigénicas, el neuropéptido Y y la AGRP a través del receptor de la hormona de crecimiento (GHSRs). Mientras que el péptido YY₃₋₃₆

(PYY₃₋₃₆) es secretado desde el tracto gastrointestinal distal y la señal llega a través de los receptores Y2 (Y2Rs) donde inhibe el efecto de NPY/AGRP (Figura 5). Los cuales a su vez regulan la acción de NPY/AGRP que tienen también un efecto inhibitorio sobre los péptidos POMC/CART mediante la liberación del ácido γ -amino butírico (GABA), el cual puede ser estimulado por la unión de la ghrelina a GHSRs. Las señales producidas por NPY/AGRP como por POMC/CART que son mandadas a un grupo de neuronas efectoras de segundo orden, las cuales también reciben señales modificadoras por parte de la

dopamina, serotonina y señales de endocannabinoides. Estas neuronas efectoras expresan receptores que incluyen al receptor Y1 (Y1R) y el receptor de la melanocortina 4 (MCR4; Figura 5). El objetivo primordial de este complejo mecanismo es mantener un balance total entre la ingesta de alimentos y el gasto energético.

Principales vías de señalización en las neuronas NPY/AGRP y POMC/CART del receptor de leptina.

La homología de Ob-R con otros receptores de citocinas de clase I, tal como la subunidad gp130 (Glicoproteína 130) de la familia del receptor de IL-6, sugiere la posibilidad de que la unión de la leptina puede mediar las señales semejantes a el receptor de citocinas, incluyendo la activación de la vía JAK/STAT (Janus kinasas/signal transducers and activators of transcription; Baumann, H. et al. 1996; Ghilardi, N. et al. 1996; Heinrich, P. C., et al. 2002). El receptor de leptina (Ob-R) es producido por corte y empalme en alternativamente varias formas del receptor, designadas como OB-Ra, OB-Rb, OB-Rc, OB-Rd, OB-Re y OB-Rf, que tienen un dominio extracelular común de 800 a.a., un dominio transmembranal de 34 a.a. y un dominio intracelular variable, característico de cada una de las isoformas. Se ha mostrado por varios estudios que solo la isoforma larga completa, OB-Rb, contiene motivos intracelulares requeridos para la activación de la vía de transducción de señales JAK/STAT (Björbæck, C. et al. 2004; Myers, Jr, M. G. 2004; Björbæck, C et al. 1997).

Cascada de transducción de señales JAK/STAT

La vía JAK/STAT comprende una familia de cuatro tirocincinasas (JAKs) y siete factores de transcripción (STATs) de 85-95kDA, regulados por fosforilación en residuos específicos de

serina y tirosina. Típicamente, la señal de la cascada de transducción JAK/STAT es activada por interferones, interlucinas o otras citocinas cuyos receptores carecen de una actividad de cinasa. Los receptores de citocinas funcionales contienen un motivo rico en prolina llamado 'box 1' que es requerido para la interacción y la activación de las JAKs (Ihle, I. N. y Kerr, I. M. 1995). Secuencias menos conservadas, llamadas 'box 2', también juega un papel en las interacciones con JAK y la selectividad de las isoformas. De los cuatro miembros conocidos de la familia de JAK, como JAK1, JAK2 y TYK2 (tirosincinasa 2) que son ampliamente expresados, mientras que solo JAK3 es encontrado en células del sistema inmune hematopoyético (Ihle, I. N. 1995). El Ob-Rb no tiene un dominio intrínseco de tirosinacinas, y por ello se unen cinasas citoplasmáticas, principalmente JAK2 (Ghilardi, N. y Skoda, R. C. 1997). Se ha reportado que para la activación de JAK, por la leptina se requiere de la secuencia box 1 (Ob-Rb también incluye el motivo box 2 y sitios de unión a STAT). Las isoformas cortas y largas del receptor de leptina tienen la capacidad de la formación de homodímeros, cuya dimerización parece estar activamente implicado en la señalización post-receptor de la vía de la leptina.

Debido a la falta de actividad enzimática intrínseca de Ob-Rb, las señales se llevan a cabo por la activación no covalente de la asociación de JAK2, el cual se autofosforila en numerosos residuos de tirosinas al mismo tiempo como él fosforila residuos de tirosina en el receptor de leptina funcional. La unión de la leptina con su receptor (Ob-Rb) estimula la fosforilación de STAT3 por la tirocincinasa JAK2, lo cual favorece la dimerización de STAT3, se dimeriza y subsecuentemente entra STAT3 dimerizado se trasloca al núcleo y estimula la transcripción de los genes de proteínas involucradas en la regulación del balance energético (Figura 6). La unión ligando-receptor activa a STAT3, STAT5 y STAT6, pero no activa STAT1, STAT2, y STAT4. Por otro lado, las STAT, como la STAT3, tienen un dominio SH-2[dominio SH-2(Src-like homology 2) que contiene una fosfatasa de proteintirosinas] que ha

demostrado unirse a una fosfotirosina del dominio intracelular de Ob-Rb con la habilidad de abatir la regulación de la fosforilación de los residuos de tirosina de Ob-Rb dependiente de la señalización de leptina.

La fosforilación de de tyr^{985} crea un sitio de unión para el C-Terminal del dominio SH2 de la fosfatasa de tirosina de SHP-2, conduciendo a la activación de la cascada de señalización p21^{Rasp} /cinasa regulada por señalización extracelular (ERK: extracelular-signal-regulated kinasa). El mecanismo canónico por el cual la tirosincinasa activa a ERK es a través de la proteína adaptadora que contiene el dominio SH2, Grb-2(Figura 6).

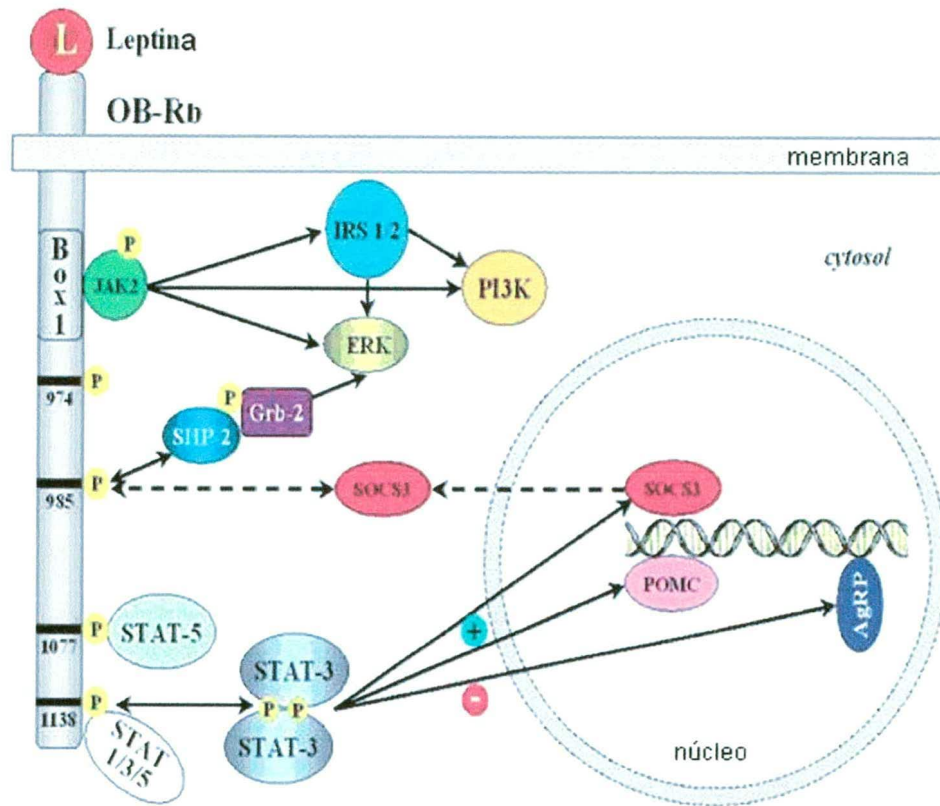


Figura 6. Señalización intracelular de la leptina en Ob-Rb. Jak2 se asocia con el receptor de leptina en el motivo box1. La forma larga del receptor de leptina tiene cuatro importantes residuos de tirosina (Tyr⁹⁷⁴, Tyr¹⁰⁷⁷ y Tyr¹¹³⁸). Estos residuos de tirosina fosforilados sirven de sitios de anclaje para proteínas de señalización con dominios SH2. El mas importante, Tyr¹¹³⁸ recluta el factor de transcripción STAT3, el cual subsecuentemente es fosforilado por la JAK2, se dimeriza y es traslocado al núcleo, donde induce la expresión de SOCS3 y POMC, y que a su vez reprime AgRP. Las proteínas SOCS inhiben la señalización uniéndose a las proteínas JAK fosforiladas o interactuando directamente con los receptores fosforilados en sus residuos de tirosina. La habilidad de SOCS para inhibir la fosforilación de JAK y ERK estimulada por la leptina, provee un mecanismo de retroalimentación negativa en el sistema de señalización de leptina. Grb-2, growth factor receptor binding-2.

Algunos estudios sugieren que el factor de transcripción STAT3 participa en la homeostasis de la energía a través de la vía melanocortina. Por otro lado existe suficiente evidencia que muestra que la vía JAK/STAT de la señalización de citocinas esta bajo el control de retroalimentación negativa de las proteínas SOCS (suppressors of cytokine signalling). Se ha reportado que la leptina induce la expresión de SOCS 3 (Sahu, A. 2004; Eyckerman, S., et al. 2000; Bjørbæck, C., et al. 1998). El residuo Tyr⁹⁸⁵ no es necesario para impedir la fosforilación de tirosina de JAK2 mediado por SOCS3, sugiriendo la existencia de más sitios de unión para SOCS3 dentro de los complejos de los receptores de citocinas activados (figura 7). Así, la expresión de SOCS endógeno inhibe la fosforilación de Ob-R, generando un importante mecanismo de retroalimentación en esta vía (Bjørbæck, C., et al. 2000). Cambio en la expresión de SOCS se han asociado con el proceso de la resistencia a la leptina.

La inhibición de realimentación independiente de Tyr⁹⁸⁵ y dependiente de Tyr¹¹³⁸ de la señalización de ERK, y probablemente de JAK2, yace en la acumulación de SOCS3 seguido por la estimulación prolongada del dominio extracelular de Ob-Rb (figura 8). Basado en estas observaciones, se ha propuesto un modelo donde la señalización de STAT3 por OB-Rb que regula la participación de la leptina en la ingesta de alimentos y del peso corporal, al mismo tiempo que controla el mecanismo de retroalimentación mediada por SOCS3 (figura 8).

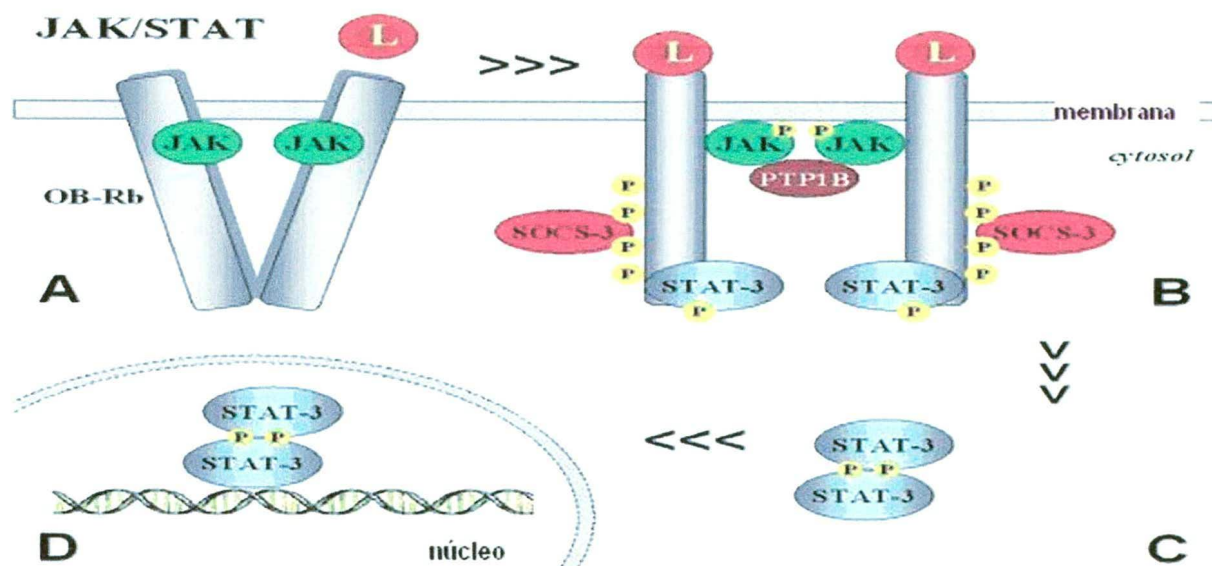


Figura 7. Mecanismo propuesto de activación de JAK/STAT a través de Ob-Rb. Cuando se une la leptina, ocurre un cambio conformacional en el receptor (A) que permite la yuxtaposición de JAKs, las cuales se activan y son capaces de fosforilar las tirosinas de otras JAKs y tirosinas del receptor de leptina (B). La activación de JAK2 ocurre por la transfosforilación y al subsiguiente fosforilación de los residuos de tirosina en la región citoplasmática del receptor de leptina. La fosforilación de Tyr¹³⁸ permite la asociación de las STATs, que después se hacen sustratos de las JAKs asociadas al receptor. La fosforilación de las STATs conduce a su disociación del receptor y la formación de dímeros activos (C), los cuales se traslocan al núcleo para regular la expresión de genes, uniéndose a las regiones promotoras de sus genes blanco (D).

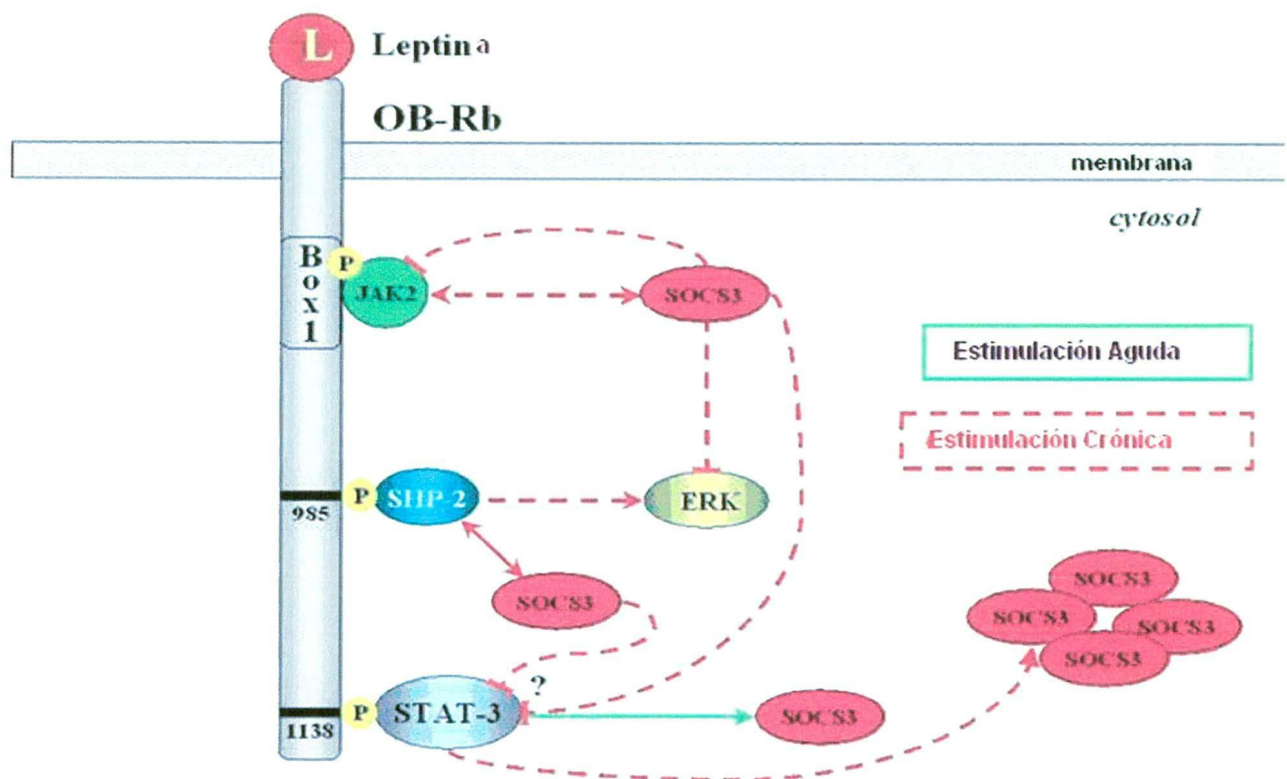


FIGURA 8. Modelo propuesto de la participación de SOCS3 en la resistencia a leptina. Durante la estimulación prolongada del receptor por la leptina, la inhibición de la fosforilación de JAK2 y ERK es controlada por SOCS independientemente de Tyr⁹⁸⁵ de Ob-Rb.

Otro regulador negativo de la señalización de la leptina esta representado por PTP1B (protein tyrosine phosphatase 1B; Figura 7), el cual ha mostrado en regular la transducción de la señal de leptina tanto in vivo como in vitro, principalmente vía desfosforilación de JAK2 (Bjørnbæck, C. et al. 2004; Zabolotny, J. M., et al. 2002; Kaszubska, W., et al. 2002; Cook, W. S. et al. 2002). En algunas células, incluyendo las neuronas hipotalámicas, la leptina también activa la vía IRS-PI (3) K (insulin receptor substrate-phosphoinositide 3-kinase), uno de varios puntos de convergencia y sinergismo entre las señalizaciones intracelulares usadas por la insulina y la leptina. Junto con la evidencia de que la señalización IRS-PI (3) K hipotalámica se incrementa con ambas hormonas (Niswender, K. D. et al. 2001; Niswender, K. D. et al. 2003), las acciones convergentes de leptina e insulina que implican la activación de PI (3) k y STAT3 se han propuesto en ser clave en los neurocircuitos de la homeostasis de la energía (figura 9).

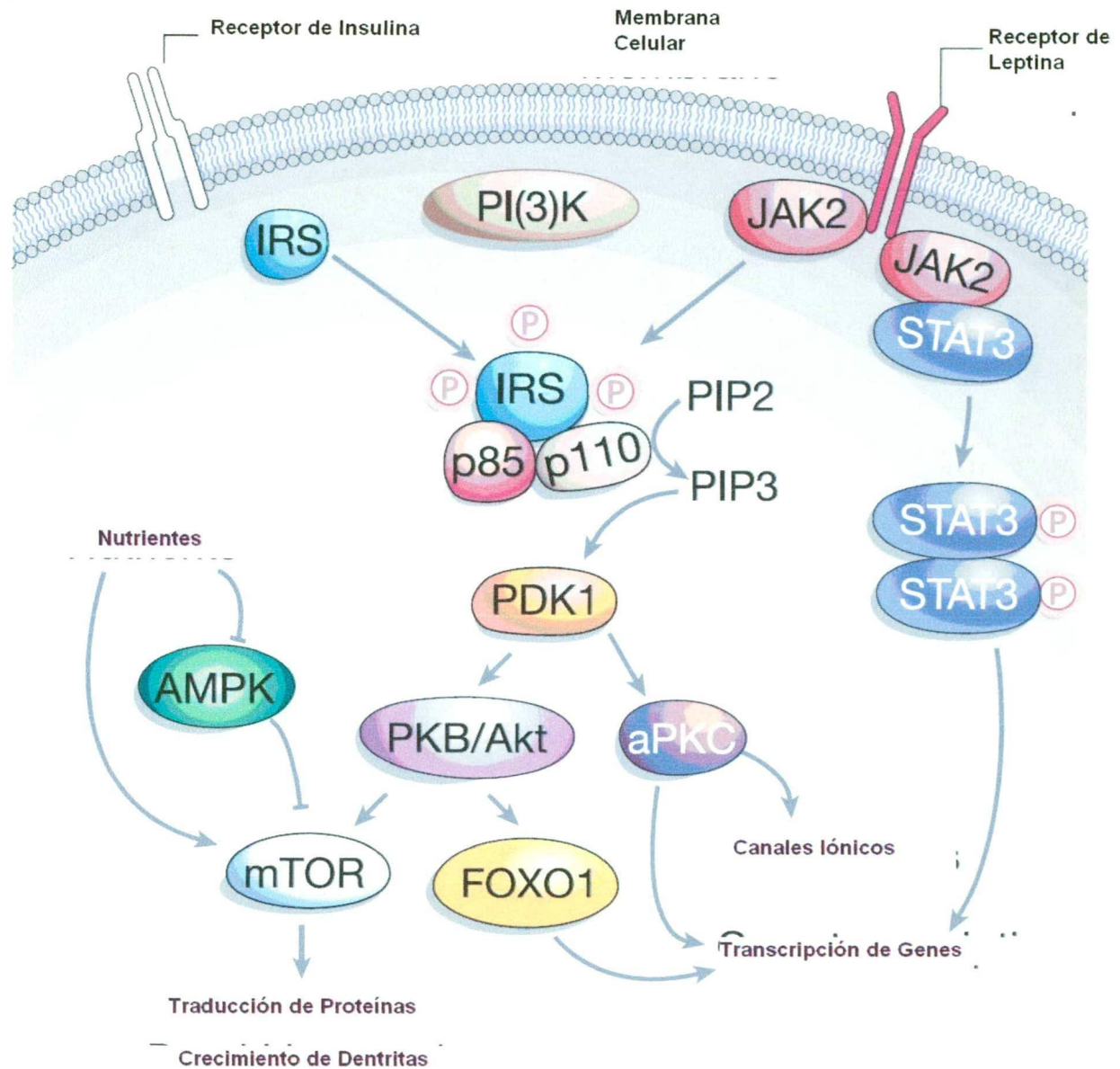
b

Figura 9. Inducción de las vías IRS-PI (3) K por la leptina e insulina. Cuando se unen la insulina y la leptina a sus respectivos receptores, activan la vía IRS-PI (3) K. La fosforilación de las proteínas IRS en sus residuos de tirosina está inducida por los receptores de insulina y por la JAK2 y permite a las proteínas IRS activar a PI (3) K. Al convertirse PIP2 a PIP3, PI (3) K activa a PDK1, el cual a su vez activa un sistema de enzimas que incluye a PKB y PKC. La activación del receptor de leptina de JAK2 también induce la fosforilación de tirosinas de STAT3, el cual se dimeriza para convertirse en un factor de transcripción.

Existe DNA consenso de secuencias de unión tanto para FOXO1 (un factor de transcripción que es inhibido por PI (3) k) como para STAT3 en la región promotora de AGRP y de POMC, en las cuales FOXO1 tiene la transcripción en ambos genes opuesto al efecto de STAT3 (Kitamura, T. et al. 2006). Así, la activación de PI (3) k en respuesta a la insulina se propuso para inhibir la transcripción de genes mediados por FOXO1 (como p. ej. *AGRP* y *POMC*). Esta respuesta se complementa con el efecto de la activación de STAT3 mediada por la leptina y provee una explicación factible de como, durante la pérdida de peso o otras condiciones de bajos niveles plasmáticos de insulina o leptina, si la expresión de AGRP incrementa, mientras por otro lado, los niveles de POMC declinan (Figura 10).

Además de la expresión de genes de neuropéptidos. Se ha reportado que la leptina e insulina pueden activar los canales de potasio sensibles a ATP (K_{ATP}) y por ello hiperpolarizar un subgrupo de neuronas del núcleo arcuato sensibles a glucosa vía mecanismo dependiente de PI (3) K (Spanswick, D., et al. 2000). Estos canales de K_{ATP} fueron subsecuentemente propuestos como clave de blancos celulares en las acciones de ácidos grasos y otras señales relacionadas con nutrientes en el núcleo arcuato. Sin embargo, recientes trabajos sugieren que aunque la insulina y la leptina activan la señalización de PI(3)k en las células POMC del núcleo arcuato, el efecto de despolarización de la leptina en estas células se ha reportado lo opuesto por una hiperpolarización por la acción de la insulina (Choudhury, A. I. et al. 2005).

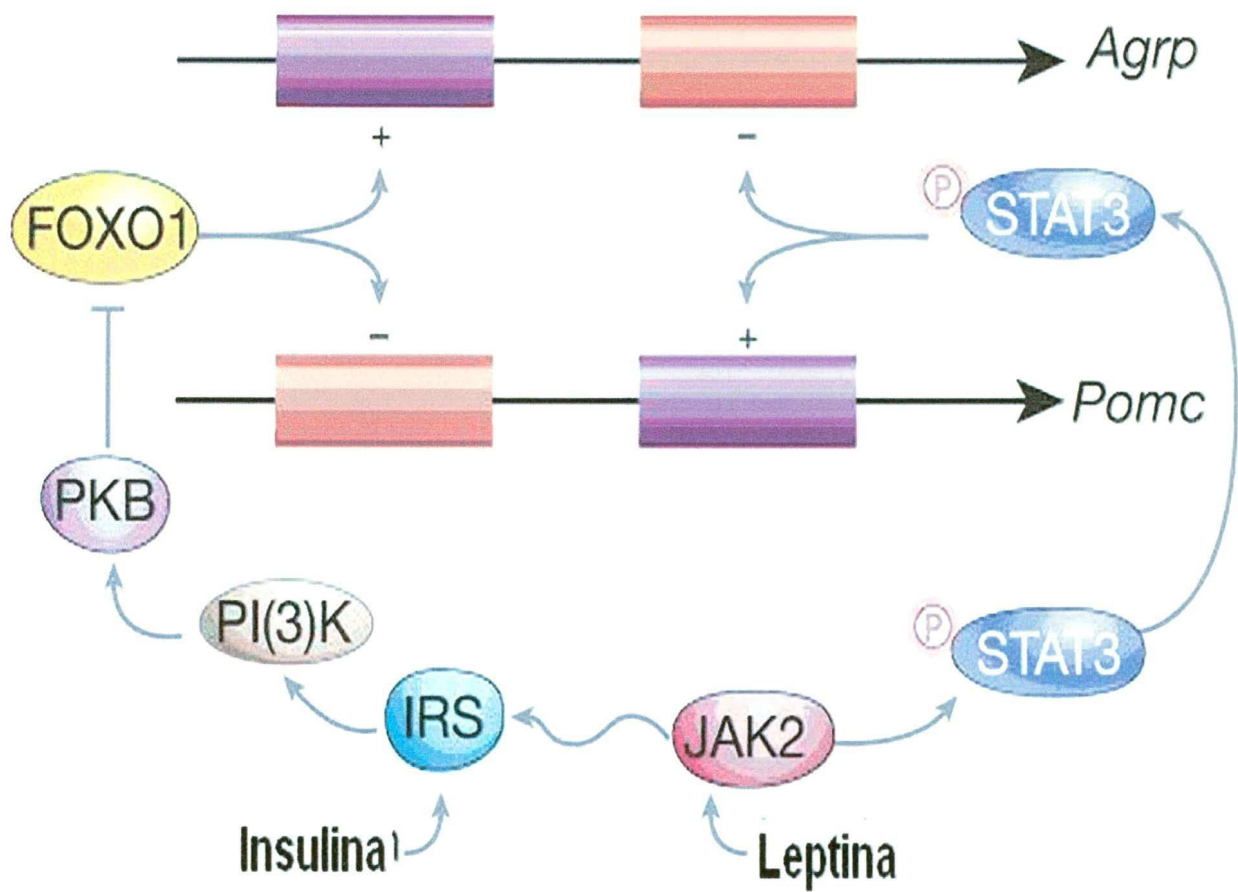


Figura 10. **Regulación de la expresión de POMC y AGRP por el factor de transcripción FOXO1** Modelo de regulación recíproca de la transcripción de los genes *POMC* y *AGRP* vía FOXO1 (el cual es inhibido por PKB).

Para entender mejor como las neuronas del núcleo arcuato están reguladas por la insulina, leptina y otras hormonas, varios grupos han buscado en medir el potencial de membrana, Un reciente descubrimiento es que la leptina activa la enzima sensora de nutrientes mTOR en las neuronas del núcleo arcuato (Cota, D. et al. 2006). Debido a que la inhibición central de mTOR bloquea la supresión de la ingesta de alimentos, la actividad de mTOR parece ser esencial para la acción de la leptina en esta área del cerebro.

Transporte de la leptina al cerebro.

Se piensa que la leptina entra en el cerebro por dos distintos mecanismos. Un sistema de transporte que se cree habilita a la leptina en cruzar la barrera hematoencefálica vía transcitosis mediado por el receptor (Banks et al, 1996). La isoforma corta del receptor de leptina, la cual es capaz de unir e internalizar la leptina, se ha detectado en microvasos del cerebro (Bjorbaek C, et al.1998a; Golden PL, et al.1997). Estudios recientes han mostrado que el transporte de la leptina esta regulado por epinefrina (Banks, 2001) y triglicéridos (Banks et al. 2004). La leptina también es probable que sea transportada a el cerebro por el fluido cerebroespinal (Schwartz et al. 1996), como el plexo coroide, sitio clave para la producción del fluido cerebroespinal, expresa altos niveles de Ob-Ra y de esta manera podría mediar el transporte de la leptina de la sangre al fluido cerebroespinal. (Bjorbaek et al. 1998).

OTRAS HORMONAS INVOLUCRADAS EN LA HOMOESTASIS DE LA ENERGÍA Y REGULACIÓN DEL PESO CORPORAL.

Hoy en día ya se tienen bien caracterizadas varias hormonas, péptidos y proteínas que participan en la regulación de la homeostasis de la energía y el peso del cuerpo como la

Adiponectina que es una mezcla de hormonas peptídicas anti-inflamatorias secretadas por los adipositos que controlan la homeostasis de la energía y el metabolismo de glucosa y lípidos. También se tiene la **Resistina**, recientemente descubierta, es una hormona producida por los adipositos y probablemente otros tejidos. Se han encontrado algunos polimorfismos en el gen de la resistina asociados a obesidad. La resistina tiene una acción anti-insulina, y es suprimida por la misma insulina y citocinas proinflamatorias. Las **citocinas pro-inflamatorias** (TNF- α , IL-6 y IL-1) actúan en el hipotálamo para reducir el apetito y aumentar la temperatura del cuerpo en respuesta a una infección, y muchas otras enfermedades. Primeramente fueron identificadas como productos del sistema inmune, especialmente por macrófagos, pero también son secretadas por los adipositos y muchos otros tejidos. La **Colecistocinina** (CCK) es el mejor miembro conocido del grupo de las hormonas secretadas por el duodeno en respuesta a lo parcialmente digerido salido del estomago, el cual es llamado quimo. CCK retrasa el vaciado gástrico, estimula la producción enzimática pancreática, causa la contracción de la vesícula biliar, promueve la liberación de insulina por el páncreas y produce una sensación de plenitud o saciedad. La **Amilina** se co-libera como una segunda hormona en las células β pancreáticas al mismo tiempo que la insulina. La amilina produce una sensación de saciedad, y puede asistir a la regulación de la ingesta de alimentos. Existen muchas otras hormonas como la **Apolipoproteína A-IV** que es sintetizada por los enterocitos en respuesta a una dieta de ácidos grasos de cadena larga, el **péptido YY** que reduce el consumo de alimentos y es secretada por el intestino delgado, páncreas y colon. Las 5 proteínas desacoplantes que ayudan al gasto energético en forma de calor (UCP1, UCP2, UCP3, BMCP1 y UCP4). Todas estas hormonas participan de alguna manera a la regulación del anabolismo y el catabolismo de sustratos para mantener un balance energético adecuado y no desbalancarse hacia la energía negativa (anorexia) o hacia la energía positiva (Obesidad).

Clasificación genética de la Obesidad.

La obesidad, no sólo es el resultado de malos hábitos alimenticios y de inactividad física,

Existen, múltiples evidencias que apoyan que la acumulación de grasa corporal tiene un importante componente genético. Estudios para determinar las bases genéticas de la obesidad se iniciaron en la década de 1920, estos se han determinado por diversos estudios epidemiológicos como: estudios en familias, estudios en gemelos así como gemelos dados en adopción. Los cuales han encontrado que los factores genéticos son responsables de 45-75 % de la variación interindividual de la grasa corporal (Maes HH. y cols., 1997; Sorensen TI. y cols., 1989; Stunkard AJ. y cols., 1986). Estos estudios, han encontrado una mayor correlación con el índice de masa corporal entre los hijos y sus padres biológicos que entre los hijos y sus padres adoptivos, lo que apoya la participación de un importante componente genético en esta entidad.

Los **estudios en familias**, se refiere a la estimación del riesgo de recurrencia de la enfermedad en familiares de casos índice afectados. Esta estimación se basa en que el riesgo a desarrollar una enfermedad en familiares de casos índice afectados con la enfermedad es mayor, que el riesgo a enfermar que la población general.

Los estudios de adopción, permiten determinar la magnitud de los efectos ambientales y genéticos en una enfermedad. En este caso, los niños adoptados son comparados tanto con sus padres biológicos como con los padres adoptivos. Las similitudes entre los niños adoptados y sus padres biológicos sugieren un componente genético, mientras que las similitudes con sus padres adoptivos son debido a que comparten el mismo ambiente (Stunkard y cols., 1986).

La base de los estudios en gemelos es la comparación de la frecuencia de la similitud fenotípica de pares de gemelos monocigotos (MZ) y los pares de gemelos dicigóticos. El efecto genético en una enfermedad es propuesto si una alta concordancia es encontrada en gemelos MZ que en gemelos DZ (concordancia: cuando dos individuos relacionados en una familia tienen la misma enfermedad). De estos estudios se ha estimado que la heredabilidad estimada para IMC varía entre 0.50 y 0.80 (Allison et al 1996; Herskind y cols., 1996).

De acuerdo a los factores genéticos, la obesidad se puede clasificar en :a) obesidad monogénica, la cual es muy rara, muy grave y generalmente inicia durante la niñez (Farooqi & O' Rahilly, 2004); b) obesidad sindrómica donde la obesidad es una de las manifestaciones clínicas de algún síndrome mendeliano y tiene una incidencia muy baja; y, c) obesidad multifactorial, la cual se desarrolla como consecuencia de la interacción de múltiples genes de susceptibilidad cuya expresión está influenciada por factores ambientales. Este tipo de obesidad es la más común, puede manifestarse en la infancia o en la adultez y presenta una expresividad muy variable (Lander, 1996).

En un número limitado de casos, se han logrado ligar defectos en solo un gen con la obesidad (Perusse L, cols., 2005), pero en la mayoría de los casos son atribuibles a la compleja interacción gen-ambiente.

A menudo, los genes específicos que están involucrados en alguna patología pueden ser diferentes entre dos personas que presentan fenotipos muy similares, cuando ocurre lo anterior se dice que existe una heterogeneidad del locus. Existen otros factores que pueden llevar a la confusión en los estudios de enfermedades multifactoriales, como la expresividad variable. La expresividad variable se refiere a que en una misma enfermedad, la gravedad de la misma (poco grave, medianamente grave y muy grave), se puede presentar diferencialmente entre diferentes individuos con un mismo genotipo. Aparte, los genes

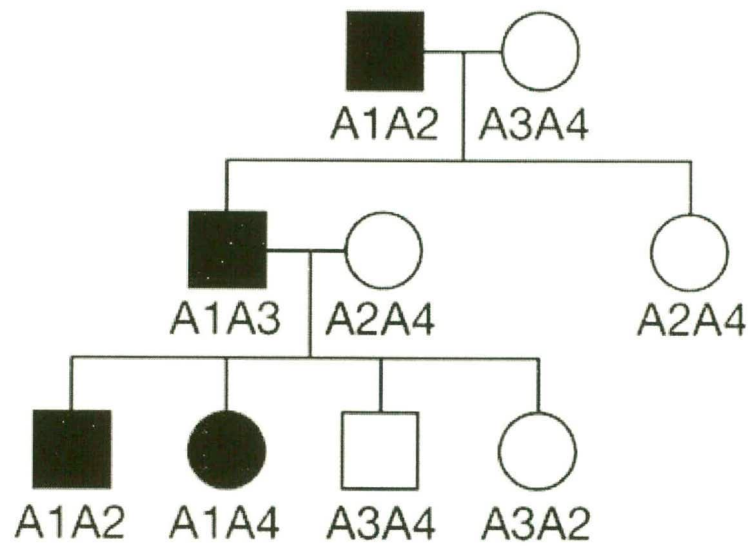
involucrados en la enfermedad común son más bien genes de susceptibilidad más que genes causales de la enfermedad.

Estrategias para la búsqueda de genes en la obesidad multifactorial

El conocimiento sobre los genes que confieren susceptibilidad a desarrollar obesidad se han derivado principalmente de estudios de ligamiento, estudios de asociación en genes candidatos y análisis amplio del genoma (Perusse y cols, 2005).

Análisis de ligamiento

Uno de los abordajes mas comúnmente utilizado para identificar regiones cromosómicas ligadas a alguna enfermedad, es el análisis de ligamiento en familias. Donde “ligamiento” se refiere a la cercanía física entre *loci* genéticos. En este abordaje, la localización cromosómica de un gen que predispone a una enfermedad, es buscado monitoreando la cosegregación de un marcador genético con un rasgo particular en las familias con individuos afectados (Figura 11). En el caso de que la enfermedad y un determinado alelo se transmitieran conjuntamente, se puede postular la existencia de un locus para la enfermedad. Los marcadores mas utilizados en los estudios de ligamiento son los STRs (repeticiones cortas en tandem). La transmisión a del marcador y del gen para la enfermedad se presenta conjuntamente dada su proximidad. Los estudios de ligamiento han sido muy exitosos en la identificación de genes relacionados con enfermedades mendelianas, donde un Lod Score mayor de 3.0 es considerada evidencia significativa de ligamiento (Ott y cols., 1991). Sin embargo, estos estudios no han sido tan efectivos en el estudio de enfermedades complejas donde la participación de cada gen en la enfermedad es por lo general desconocida.



El alélo A1 cosegrega con la enfermedad en esta familia.

Figura 11. **Estudios de ligamiento en familias relacionadas.** Se habla de ligamiento cuando dos alélos de dos loci son transmitidos juntos en la siguiente generación, debido a su estrecha proximidad. En esta familia el alélo A1 cosegrega con la enfermedad.

En obesidad se ha utilizado una variante de ligamiento; el análisis de un locus de un rasgo cuantitativo (Quantitative trait locus: QTL). El análisis de QTLs, se basa en la suposición de que la similitud fenotípica entre individuos relacionados correlaciona con alélos compartidos en un locus que determina un rasgo o característica. Se ha sugerido que el análisis de QTL utilizara mejor la información completa de rasgos continuos como el IMC los niveles de glucosa en sangre, hiperfagía, etc., donde la concurrencia entre un QTL y un exceso en la proporción de alélos idénticos por descendencia, sugieren ligamiento entre un rasgo específico y el marcador (Amos 1994; Almasy and Blangero 1998; Blangero y cols., 2001).

Se han realizado varios estudios de ligamiento con obesidad y fenotipos relacionados. De estos estudios además del estudio de genes candidatos se ha derivado el mapa genético de la obesidad (Figura 12).

El último mapa genético de la obesidad, ha reportado hasta este momento 204 QTLs para fenotipos relacionados con obesidad obtenidos de 61 escaneos en todo el genoma. Un total de 52 regiones genómicas con QTLs replicados de 2 a 4 estudios. El número de estudios que reportan asociación entre la variación de la secuencia de DNA en genes específicos y la obesidad se ha incrementado considerablemente, con 426 descubrimientos de asociaciones positivas con 127 genes candidatos (donde, 22 genes son apoyados por al menos 5 estudios positivos). El mapa genético de la obesidad muestra loci putativos en todos los cromosomas excepto en el cromosoma Y. En total, más 600 genes, marcadores, y regiones cromosómicas se han asociado o ligado con fenotipos de obesidad humana (Rankinen T. y cols., 2006).

Análisis de asociación

Otra herramienta ampliamente utilizada para el estudio de las enfermedades complejas además de los análisis de ligamiento son, los estudios de asociación. En los estudios de asociación en obesidad, se ha incluido el análisis de genes localizados en las regiones cromosómicas que han mostrado ligamiento con esta entidad, así como en genes que por su función son considerados como probables genes candidatos. Los estudios de asociación son una buena herramienta metodológica para identificar alélos de susceptibilidad con poca contribución genética a la obesidad. Los estudios de asociación a diferencia de los de ligamiento generalmente no dan una asociación causal, pero si contribuyen en la búsqueda de genes con poco efecto genotípico de las enfermedades comunes. Estos estudios, se compara la frecuencia de un marcador entre casos no relacionados y controles, una frecuencia significativamente mayor del éste, entre los casos, comparado con los controles, sugiere su participación en la etiología de la enfermedad (Figura 13).

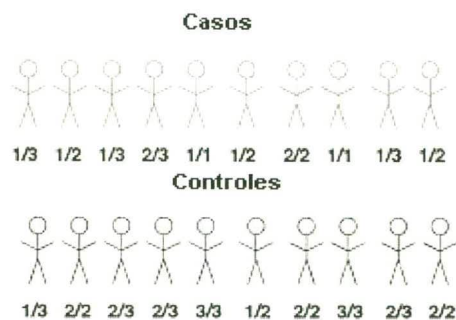


Figura 13. Diseño de estudios de casos y controles. En este análisis se compara las frecuencias de los alélos en la población de casos no relacionados (Obesos) y la población de individuos control (delgados). En este ejemplo mostrado, un marcador con tres diferentes alélos es valorado. El análisis muestra que el alelo 1 se encuentra en el 80 % de los casos y solo el 20% en los sujetos controles. Esta observación sugiere que el alelo 1 puede estar asociado a la susceptibilidad de la enfermedad (Susceptibilidad a Obesidad).

Sin embargo. A pesar de las ventajas que presenta este tipo de estudios, presenta dos limitaciones importantes: Los datos pueden mostrar falsas asociaciones debidas a que el locus de interés puede estar en desequilibrio de ligamiento (LD) con el marcador realmente asociado a la enfermedad y 2) estratificación de la población. El LD puede se causado por un efecto fundador o mutaciones recientes, mientras que la estratificación de la población se refiere a mezcla de dos o mas grupos étnicos puede conducir a falsos positivos (Shulze and McMahon 2002).

Otro abordaje muy utilizado en los estudios de asociación son los basados en familias, donde su principal ventaja es que evitan las falsas asociaciones debidas a la estratificación de la población (Figura 14). Uno de estos métodos se conoce como prueba de desequilibrio de transmisión (TDT; transmission disequilibrium test), en la cual se compara la frecuencia con la cual padres heterocigóticos, transmiten un alelo específico de un marcador bialélico o una de las variantes alternas al hijo afectado, y se compara con la frecuencia en que se transmite ese mismo marcador en los hijos no afectados (Figura 15; Terwilliger and Ott 1992). Los marcadores más ampliamente utilizados en los estudios de asociación son los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, del inglés Single Nucleotide Polymorphisms).

Polimorfismos de un solo nucleótido

Los polimorfismos de un solo nucleótido o SNPs se encuentran distribuidos a través de todo el genoma humano y actualmente son los marcadores más utilizados en los estudios de asociación. Estos polimorfismos son variaciones normales en el DNA que se transmiten de forma mendeliana y se encuentran en la población con una frecuencia mayor al 1 %, su distribución en el genoma es amplia y gracias a ellos se han realizado mapas físicos de alta

resolución (Sebastiani cols., 2003; Riva, A. & Kohane, 2002). Se estima que los SNPs se encuentran aproximadamente cada 500 bases (Riva, A Kohane, 2004). De hecho, se calcula que existen entre 10 y 20 millones de SNPs distribuidos a través de todo el genoma (Newton, E. M. 2005).

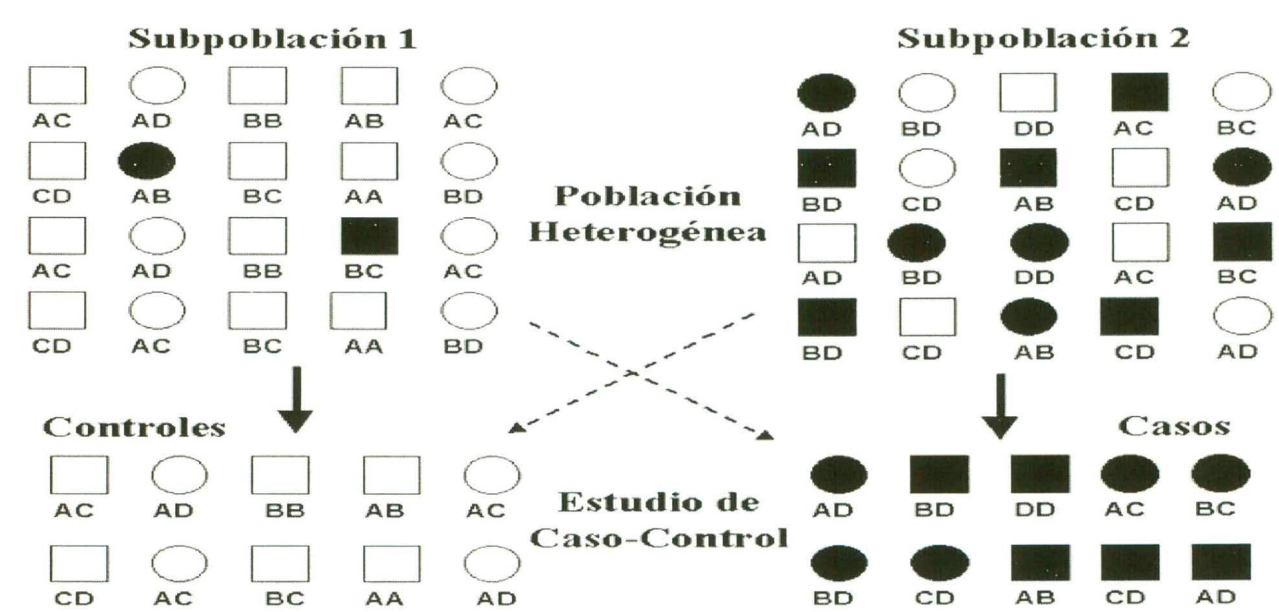


Figura 14. **Estratificación de la población.** Si en una población existen subgrupos que no tienden a mezclarse, esto puede condicionar a que tanto la enfermedad como algunos marcadores alélicos podrían ser más comunes entre los individuos de un subgrupo. En estos casos, los estudios de asociación pueden dar resultados falsos positivos.

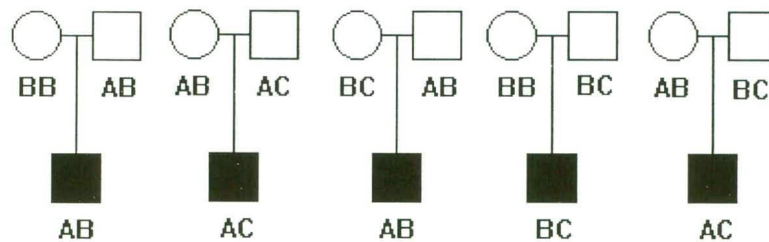


Figura 15. Prueba de desequilibrio de transmisión (TDT; transmission disequilibrium test).

En la prueba de desequilibrio de ligamiento (TDT), se prueba la hipótesis de que un alelo particular de un marcador es más frecuentemente transmitido a la descendencia afectada de los padres heterocigotos. En familias no relacionadas se observa el genotipo bialélico, encontrándose 8 padres heterocigotos (AB, AC y BC). El alelo (A) es transmitido 4 veces, mientras que los alelos (B) o (C) son transmitidos tres veces. Cuando un alelo es transmitido con mayor frecuencia que la esperada (50 %) en pacientes no relacionados, como es el caso del alelo (A), se puede inferir que éste se encuentra ligado al locus de la enfermedad, o que tiene un efecto directo en la susceptibilidad de la misma.

NOTA: los cuadros representan a los masculinos y los círculos a los femeninos.

Las características más relevantes para la utilización de los SNP en estudios genéticos, son: a) todos los SNPs son heredados de forma mendeliana de una generación a otra, de esta manera se puede estudiar la evolución de las especies y además de las poblaciones (Riva, A. & Kohane; 2002) , b) los SNPs pueden ser los responsables de causar enfermedades ya que pueden alterar la secuencia de DNA en una región codificante o reguladora; los SNPs no sinónimos han sido implicados en diversas enfermedades porque pueden alterar la función de la proteína, su estabilidad, los sitios de splicing, etc. (Riva, A. & Kohane, I. S., 2002; Stitzel y cols., 2004), c) finalmente los SNPs se pueden emplear para los estudios de ligamiento y asociación (Mayeux, R. 2005). Estos marcadores presentan algunas características importantes; son bialélicos, son muy abundantes en el genoma, tienen baja tasa de mutación, son fáciles de genotipificar con medios automatizados y no se requiere de una gran cantidad de DNA para su análisis (Zhang, K., Qin, Z. S., Liu, J. S., y cols., 2004).

Genes candidatos involucrados en la etiología de la obesidad

Dentro de los genes candidatos, que han mostrado asociación con obesidad se encuentran principalmente los implicados en diferentes vías metabólicas que participan en: a) control de la ingesta de alimentos, b) gasto energético y c) metabolismo de lípidos y carbohidratos (Perusse & Bouchard, 2000; Snyder y cols., 2004).

Algunos ejemplos de SNPs asociados con obesidad y fenotipos relacionados son: C315T, G19A, C276T, G387C y C2549A en el gen *LEP*; A1969C, A326G y A611G en *LEPR*; Trp64Arg en *ADRB3*, C55T en *UCPs*; C3804A, G3834C y C3840T en *POMC*; C105A, C142T y G48A en *MC4R*; C161T en *PPAR α 2*, La variante Trp64Arg localizada en el gen del receptor Beta 3 adrenérgico, la cual ha sido sujeto de análisis en más de 60 estudios independientes y 4 meta-análisis (Zhan S, et al 2005; Kurokawa N., y cols., 2001; Allison DB.,

y cols., 1998; Fujisawa T. 1998; Knowler WC. 1996), La variante Val103Il localizada en el gen que codifica para el receptor MC4R ha mostrado en varios meta-análisis, que Individuos heterocigotos A/G para este polimorfismo presentan una disminución significativa del IMC, por lo que este genotipo se considera que tiene un efecto protector para el desarrollo de obesidad (Heid IM y cols 2005).

Por otro lado también se han descrito polimorfismos asociados al riesgo de desarrollar, además de la obesidad o fenotipos relacionados, otras patologías concomitantes, como por ejemplo: T99C y C55T en el gen *UCPs* también se asocia con diabetes; W64R en el gen *ADRB3* con hipertensión; -G174C en *IL6* con afectación cardiovascular; UPC-I/D con síndrome metabólico e hipertensión; Q192R en el gen de la paraoxonasa 1 (*PON1*) con infarto al miocardio y diabetes mellitus; T279C y G104A en el gen de reparación *ERCC4* con cáncer de mama, sólo por mencionar algunos (Hao y cols., 2004; Lee y cols., 2005; Li y cols., 2005)

Por otro lado, se ha documentado que mutaciones en algunos de estos genes, son responsables etiológicos de obesidad monogénica, Por ejemplo; mutaciones en el gen *LEP* que causan una deficiencia de leptina, resultan en una obesidad grave desde los primeros meses de vida, al igual que mutaciones en el receptor de leptina (*LEPR*), pro-opimelanocortina (*POMC*), receptor de melanocortina 4 (*MC4R*) y proconvertasa 1 (*PC1*) (Barsh y cols., 2000; Lubrano-Bertheliey y cols., 2004). Donde mutaciones en el *MC4R* son responsables hasta del 6% de la forma de obesidad monogénica mas frecuente con un patrón de herencia autosómico dominante (Farooqi, I. S. y cols. 2003).

GENES CANDIDATOS ANALIZADOS EN ESTE ESTUDIO: *LEP*, *LEPR*, Y *POMC*

LEPTINA

El gen *LEP*, se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 7 en la región 31.1 y contiene 3 exones (2 de ellos codificantes), codifica para un péptido glicosilado de 167 a.a. que incluye una secuencia de señalización de 21 aminoácidos. Este gen posee un alto grado de homología entre especies (84 % entre la leptina humana y la murina; Zhang y cols., 1994), además de compartir algunas similitudes estructurales con las citocinas.

La estructura tridimensional de la leptina de 167 a.a. esta basada en cuatro α -hélices antiparalelas conectadas. Un puente disulfuro entre dos residuos de cisteínas (Cys⁹⁶-Cys¹⁴⁶) en el carboxilo terminal de la leptina y otra al inicio de una de las asas han mostrado ser importantes para el plegamiento de la estructura y la unión de su receptor (figura 16). Cualquier mutación en los residuos de cisteína, hace a la proteína biológicamente inactiva. Aunque la leptina es principalmente producida y secretada en el torrente sanguíneo por los adipocitos del tejido adiposo blanco, esta no es la única fuente potencial de esta hormona. La placenta, la mucosa gástrica, la medula espinal, el epitelio mamario, el músculo esquelético, la pituitaria, el hipotálamo y el hueso han mostrado también ser capaces de producir pequeñas cantidades de leptina en algunas circunstancias.

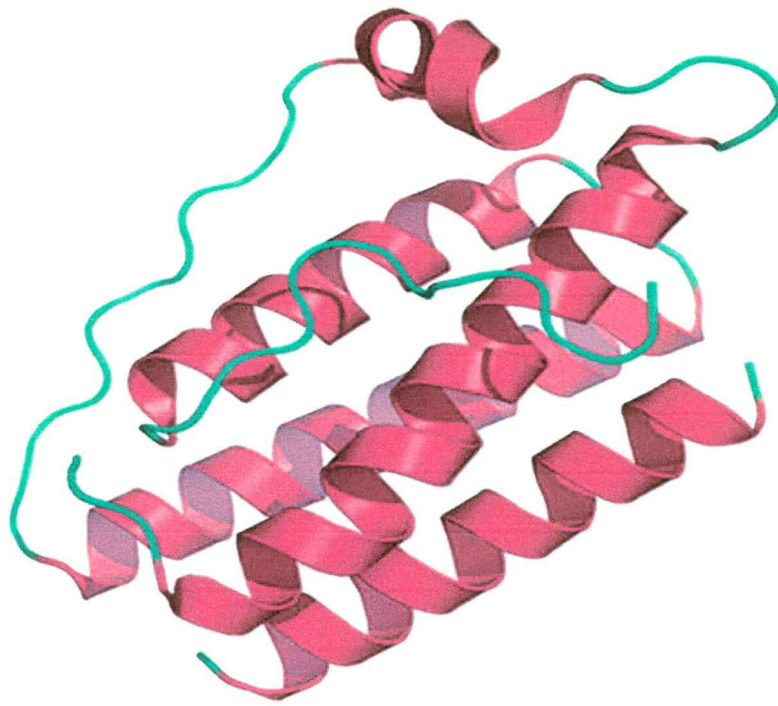


Figura 16. **Estructura de la hormona leptina.** Se muestran la molécula de la leptina y las cuatro α -hélices antiparalelas

Epidemiología genética de la leptina

Existen múltiples evidencias de la participación de la leptina en la etiología de la obesidad, de hecho éste fue el primer gen descrito como responsable de un fenotipo de obesidad monogénica (Zhang y cols., 1994). Un estudio en la población francesa, encontraron que varios polimorfismos localizados en la región 5' no codificante como el SNP -2548A mostraba una fuerte asociación con obesidad, en otro estudio, este grupo de investigación reportó que este SNP, se encontraba más frecuentemente en varones con sobrepeso (Mammés y cols., 1988 y 2000), mientras que en población Taiwanesa, esta variante mostró asociación con obesidad mórbida (Wang T. et al 2006). Sin embargo un análisis de este mismo SNP en la población española no mostró asociación con esta patología (Portolés O. y cols., 2006). Otro polimorfismo del gen *LEP*, que ha sido estudiado en diferentes poblaciones es el SNP A19G localizado en el primer del exon del gen *LEP*, mostró asociación con obesidad pero sólo en mujeres de origen francés, mientras que en la población italiana este SNP no mostró asociación (Mammés y Cols., 1998; Lucantoni y cols., 2000). En un estudio de TDT en población norteamericana y de Québec Canadá, el SNP A19G presentó asociación con una mayor sensibilidad al índice de insulina y mejor respuesta de la glucosa en sangre por ejercicio ligero, cuando estaba presente el SNP K109R del receptor de leptina, (Timo y col., 2004). Otro reporte en población estadounidense, confirmó la asociación de los polimorfismos -G2548A, A19G, y -C1887 con obesidad (Hager et al 1998; Mammés y cols., 1998,2000; Li y cols., 1999; Le Stunff y cols., 2000).

Jian y cols, en el 2004, documentaron por primera vez una fuerte asociación tanto individualmente como en haplotipos de tres SNPs (-A4118G, -C3233A y el marcador rs11770725 C/T) localizados a 2 Kb de la región promotora del gen *LEP* con bajos niveles de leptina, principalmente con el sexo masculino de pacientes estadounidenses. Análisis bioinformáticos revelaron que los tres SNPs pueden modificar los sitios de unión a factores

de transcripción, por lo tanto estos polimorfismos pueden ser variantes funcionales en la región 5' del gen *LEP*.

El interés en el gen *LEP* como un gen de susceptibilidad para el desarrollo de obesidad humana ha conducido al desarrollo de múltiples estudios de asociación, pero los resultados todavía son controversiales lo que sin duda evidencia la complejidad del componente genético involucrado en su etiología.

Receptor de la leptina

Tartaglia y cols., (1995), identificaron el receptor de la leptina, a partir de una librería de expresión preparada de plexos coroideos y seleccionado con una proteína de fusión con leptina. El receptor de leptina se es codificado por un locus al que se le denominó diabetes (*db*) localizado en el cromosoma 4 de ratón (Tartaglia y cols., 1995). El receptor de leptina presenta gran homología a la superfamilia de receptores de citocinas tipo I, los caracterizados por tener motivos extracelulares con residuos de cisteína y un dominio de fibronectina tipo III (IEM, 1996). El receptor de leptina se sabe que existe como homodímero y es activado por cambios conformacionales que ocurren cuando su ligando se une al receptor (Devos et al, 1997). Se han identificado seis isoformas del receptor de leptina, generadas por “splicing” alternativo (Wang et al, 1998; Lee et al, 1996). Aunque existen al menos seis isoformas del receptor, la forma activa corresponde al subtipo, Ob-Rb, asociado fundamentalmente en el sistema JAK2-STAT3 y con otras cascadas de señalización intracelular. Estas isoformas, llamadas Ob-Ra-Rf, comparten un dominio N-Terminal extracelular de alrededor de 800 amino ácidos, pero presentan diferencias importantes en la región Carboxi-Terminal. Todas las isoformas del receptor, excepto Ob-Re (Lee et al, 1997), contienen 34 amino ácidos de la región transmembranal, que forman la región soluble del receptor, sitio principal de unión de la leptina circulante en el plasma. Las isoformas restantes pueden ser clasificadas como isoformas cortas (Ob-Ra, c, d y f) con un dominio C-

terminal de 30–40 residuos, o la isoforma larga (Ob-Rb) con un dominio intracelular que comprende 302 amino ácidos de longitud (Figura 17).

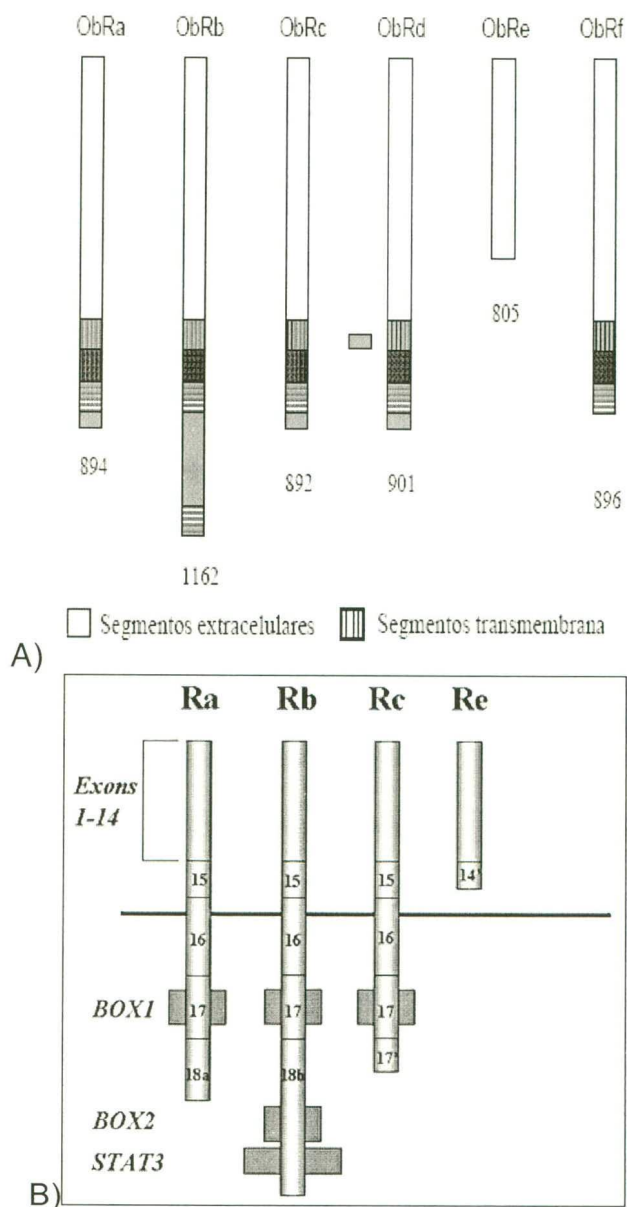


Figura 17. A) Representación esquemática de los diferentes subtipos de receptores de leptina (Ob-R). Las regiones de alta homología entre los diversos subtipos están representadas por los mismos símbolos; el número total de residuos de aminoácidos está indicado en la parte inferior del esquema correspondiente a cada subtipo. **B)** Representación esquemática de la estructura general de los diferentes subtipos de receptores de leptina (Ob-R) pero indicando los exones que codifican para las diferentes regiones del receptor.

Se ha detectado altos niveles de expresión del RNAm y proteína del receptor de leptina en el

hipotálamo tanto de roedor como humano. Particularmente, en el núcleo hipotalámico (hipotálamo ventromedial, núcleo arcuato y el hipotálamo dorsomedial), regiones implicadas en la regulación de la homeostasis de la energía (Hakansson ML, y cols., 1998; Schwartz MW, y cols., 1996; Elmquist JK, y cols., 1998; Savioz A, y cols., 1997). Este receptor es también altamente expresado en otras regiones del cerebro como el hipocampo, tallo cerebral, cerebelo, amígdala y sustancia nigra (Mercer JG, y cols., 1996; Hakansson y cols., 1998; Elmquist y cols., 1998; Grill HJ, y cols., 2002; Figlewicz DP, y cols., 2003).

Epidemiología genética de receptor de la leptina

Polimorfismos localizados en el gen que codifica para el receptor de leptina han mostrado asociación con obesidad en la mayoría de las poblaciones. Un estudio en familias de la población canadiense reportó que la variante Q223R se asociaba con IMC y porcentaje de grasa, dos características asociadas a obesidad al igual que en la población brasileña y población griega, pero en la población negra esta variante no mostró asociación (Mattevi y cols., 2002; Yiannakouris N. y cols., 2001). Además, en un estudio de asociación en obesos en la población holandesa los SNPs Lys 109Arg y Gln223Arg, se encontraron asociados a altos niveles de leptina (resistencia a leptina) (Wauters M. y cols., 2001). Por otro lado, un estudio en mujeres pre y posmenopáusicas, los SNPs Lys109Arg y Lys656Ans mostraron diferencias estadísticamente significativas en mujeres con alteraciones en el metabolismo de insulina y glucosa (T.M.C., et al 2002). Se ha encontrado que polimorfismos en este gen como el Lys656Ans también influyen la distribución topográfica del tejido graso (Jun Liu Y. et al 2005).

PROPIOMELANOCORTINA

La primera evidencia que la hormona estimuladora de melanocitos alfa (α -MSH) y la hormona adrenocorticotrofica (ACTH) tenia un papel funcional en el sistema nervioso central, surgió desde los años 1950s (Ferrari 1958), pero las observaciones que sustentaron su participación en la regulación de la homeostasis de la energía, fue propuesta por Poggioli y cols., hasta los años 80 (1986). Las hormonas α -MSH y ACTH, se derivan de un mismo péptido precursor, la proopiomelanocortina (POMC), la cual se expresa en la piel, glándula pituitaria, neuronas hipotalámicas y el sistema inmune (Bertanga 1994). POMC es el precursor de varios péptidos incluyendo a la hormona adrenocorticotrofica (ACTH), β -endorfina, y α - α - y α -MSH, a través del procesamiento por la enzima proconvertasa 1 (PC1) (Figura 18). El papel fisiológico de los péptidos generados, solo ha sido analizado en ratón y parcialmente en humanos. Se sabe, que la ACTH se une al receptor de Melanocortina tipo 2 (MC2R) central y periféricamente en la corteza adrenal y la β -endorfina interactúa con los receptores opioides. Aunado al efecto de la supresión de la ingesta de alimentos mediado por los receptores MC3R y MC4R, también se han visto implicados en la pigmentación de la piel en humanos, puesto que los variantes de MC1R en humanos se asocia al pelo rojo y al color de la piel clara (Valverde y cols., 1995).

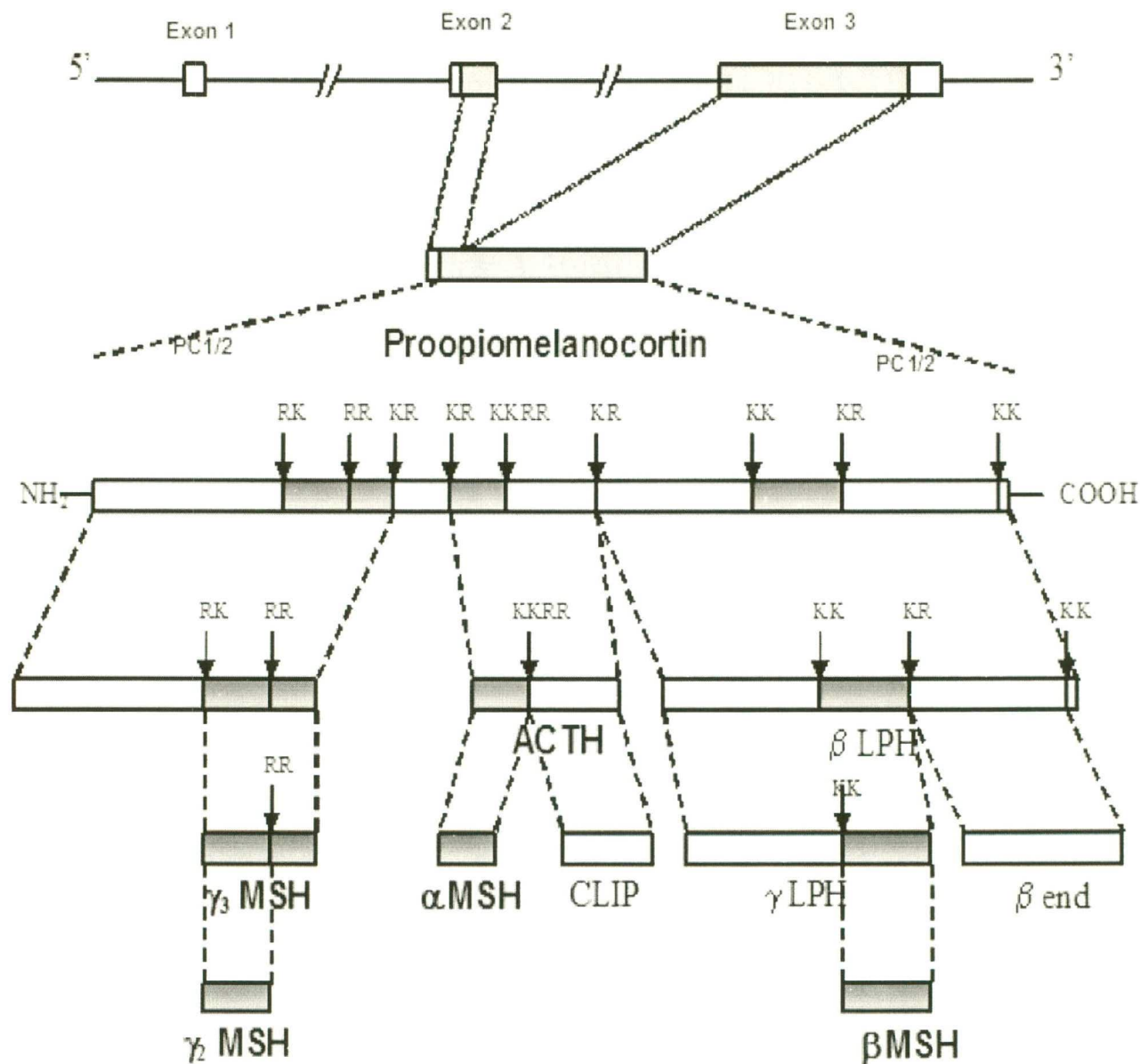


Figura 18. Estructura del gen de Proopiomelanocortina (POMC) y su procesamiento post-traduccionnal. POMC en los mamíferos consiste de 3 exones, de los cuales los exones 2 y 3 son traducidos. Las proconvertasas 1 y 2 (PC1/2) rompen el péptido inicial (POMC) en péptidos más pequeños sucesivamente, cortando en pares dibásicos en residuos que consisten de lisina (K) y/o arginina (R). Los productos finales son generados de manera tejido-específico, por ejemplo, α-MSH y ACTH no son producidos por las mismas células en la pituitaria. También α-MSH y ACTH están implicadas en modificaciones enzimáticas post-traduccionales, como la acetilación de α-MSH. Los productos finales incluyen las melanocortinas (MSHs y ACTH), β-endorfina (β-end) y el péptido intermediario semejante a corticotrofina (corticotrophin-like intermediate peptide; CLIP). Hay péptidos intermediarios cuyos funciones biológicas no están todavía muy claras, tales como γ y β lipotrofinas (γ-LPH, β-LPH).

La POMC consta de 3 exones, de los cuales sólo el 2 y 3 son traducidos. Las proconvertasas 1 y 2 (PC1/2), procesan el péptido inicial (POMC), cortando en pares dibásicos en residuos de lisina (K) y/o arginina (R). Las neuronas que expresan POMC en el núcleo arcuato se proyectan hacia las áreas del cerebro que se piensa, regulan el apetito (neuronas de segundo orden) y donde al menos 40 % de estas neuronas expresan RNAm para el receptor de leptina (Cheung et al 1997). La expresión de POMC es aumentado por la leptina y disminuye en procesos donde concentración de la misma se encuentra disminuida como en casos de ayuno y mutaciones en el gen *LEP* (Thornton y cols., 1997).

Epidemiología genética de proopiomelanocortina

Un papel putativo de POMC en la forma común de la obesidad ha sido apoyado por reportes positivos de estudios de ligamiento. Análisis de QTL amplio del genoma de población México-americana encontraron un ligamiento significativo a un locus en el cromosoma 2p21, el cual abarca al gen de POMC (Comuzzi y cols., 1997), y se estima que este locus explica el 47 % de la variación de los niveles de leptina en suero.

En estudios mas recientes, se investigo la asociación de cuatro SNPs de POMC (*RsaI*, 51G/C en la región 5'UTR y 8246 C/T y 7965 C/T en la región 3'UTR) con la composición corporal y niveles de leptina en mujeres caucásicas del reino unido. Se encontró asociación entre el alelo 8246 T y obesidad (Chen Yuanneng y cols., 2005). Como ya se tenía el antecedente de que el locus de POMC estaba ligado diferentes niveles de leptina, un predictor de obesidad, se hizo un estudio de TDT donde se analizaron familias caucásicas, México-Americanas, y Africanas-Americanas en los estados unidos. Se analizaron cinco polimorfismos de POMC (G-3460C, C17T, G3473A, C3755T, y A7069G), y solo el SNP C3755T mostró ser el mejor predictor en obesidad con varias mediciones antropométricas (asociación con IMC, circunferencia de cintura, tejido adiposo visceral y subcutáneo), y en menor grado lo fueron G-3460C, G3473A, y A7069G (Sutton B. et al 2005).

En otro estudio mas reciente, también se realizo un TDT en el reino unido y se encontró asociación entre tres polimorfismos a lo largo del gen de POMC y fenotipos relacionados con obesidad. Hubo significativa asociación entre los genotipos C8246T ($P < 0.0001$) y C1032G ($P = 0.003$) con el radio cintura-cadera corregido para la edad, sexo, fumadores, con ejercicio, y consumo de alcohol. El T alelo en C8246T (o el alelo G en C1032G) se asocio con un alto radio cintura-cadera en el modelo codominante. No se encontró asociación entre los genotipos en cualquier polimorfismo y los niveles de leptina e IMC. Estos datos muestran que las variantes del locus de *POMC* influyen en la distribución del tejido graso dentro de una variación normal, sugiriendo un nuevo papel de *POMC* en la regulación metabólica (Michelle Baker, y cols., 2005).

JUSTIFICACIÓN

Debido a que la obesidad y fenotipos relacionados afectan a más de 1,400 millones de personas en el mundo y en México cerca del 70% de la población general la padece, lo que hace de esta patología un problema de Salud Pública. En México, estudios epidemiológicos describen que más del 30% de los adultos mayores de 20 años y casi un tercio de la población infantil tiene sobrepeso u obesidad. La Encuesta Nacional de Salud 2006 (ENSA 2006) mostró que en nuestro país, la prevalencia de sobrepeso y obesidad en adultos están entre las más altas del mundo (Sánchez-Castillo, 2003). Por otro lado, se ha documentado que de los países de América Latina, México se encuentra entre los de más alta prevalencia de sobrepeso en niños (Del Rio-Navarro y cols, 2004). El hecho de tener sobrepeso u obesidad conlleva a un mayor riesgo de mortalidad o de desarrollo de múltiples padecimientos principalmente, enfermedad coronaria, diabetes tipo 2, cáncer y enfermedad vascular cerebral, que actualmente son las principales causas de muerte en nuestro país, y por lo tanto, es impostergable caracterizar los genes involucrados en la ganancia de peso y sus consecuencias fisiopatológicas.

La complejidad de la regulación del peso corporal pone en evidencia la importancia de dilucidar los mecanismos que pueden conducir a la pérdida de la homeostasis nutricional.

Así, la identificación y caracterización de los genes asociados con la obesidad y sus comorbilidades es sin duda la mejor vía para incrementar el conocimiento de la etiopatogénesis de esta entidad, lo cual permitirá mejorar las estrategias de prevención, diagnóstico y tratamiento, encaminadas a disminuir el alto costo social y económico de la obesidad y patologías asociadas.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si SNPs localizados en los genes leptina, receptor de leptina y proopiomelanocortina, que regulan se asocian al riesgo a desarrollar obesidad en la población mexicana.

Objetivos Particulares

Determinar la frecuencia de polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs) localizados en genes candidatos en una muestra de pacientes con obesidad y controles de la población mexicana.

Establecer si polimorfismos localizados en genes que regulan la homeostasis del aporte energético, se asocian al riesgo a desarrollar obesidad en pacientes mexicanos con obesidad

Construir haplotipos para determinar su asociación con la susceptibilidad al desarrollar obesidad.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.

CLASIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Este es un estudio de casos y controles transversal, prospectivo y comparativo.

POBLACIÓN DE ESTUDIO: Se incluyeron 350 pacientes con diagnóstico clínico de obesidad. Cada paciente fue evaluado por un médico endocrinólogo o internista, un médico genetista y un nutriólogo, quienes llenaron la hoja de captación de datos que contiene información demográfica de los pacientes (edad, sexo, origen geográfico, etc.), antecedentes familiares, pruebas de laboratorio y gabinete (química sanguínea, perfil de lípidos, etc.). Como controles se incluyeron 175 individuos sanos, pareados por sexo y origen geográfico.

Calculo del tamaño de muestra. El tamaño de muestra fue determinado con el programa *Quanto* tomando en cuenta que la prevalencia de la obesidad en la población mexicana es del 30% en adultos mayores de 20 años (ENSANUT 2006), con un poder estadístico del 80% y un nivel de significancia (α) de 0.05, así como la frecuencia alélica más baja de los polimorfismos que se analizaron (1.2%) y un OR de 3.

Criterios de inclusión

Se incluyeron pacientes mexicanos mayores de 18 años con diagnóstico clínico de obesidad. El diagnóstico clínico de la obesidad se realizó con base en el IMC, así como en la circunferencia de cintura y los pacientes se clasificaron como: obesidad grado I cuando el IMC fue de 30-34.9, obesidad grado II de 35.0 a 39.9 y obesidad mórbida grado III aquellos que presentaron un IMC mayor de 40.0 (WHO, 1995; Kuller y cols., 1993; NIH., 1998; González-Barranco, 2003 y Barquera y cols, 2002). Para el grupo control, se seleccionaron Individuos sanos con un IMC<25 sin enfermedades endocrinas,

mayores de 30 años, ambos sexos de acuerdo con los criterios establecidos por la OMS (WHO, 1995; Kuller y cols., 1993; NIH., 1998; González-Barranco, 2003 y Barquera y cols, 2002); una circunferencia de cintura: varones <102 cm. y mujeres < 88, que el peso actual sea igual o ± 5 Kg. al alcanzado después de la adolescencia (18 años) y que no refieran antecedentes personales de enfermedades crónicas. Todos los pacientes y controles fueron captados en la ciudad de México, pareados por sexo, con padres nacidos en México.

Criterios de exclusión. Se excluyeron todos aquellos casos de obesidad causada por disfunción endocrina, síndromes genéticos o secundarios a tratamiento farmacológico. Temporalmente se excluyeron a los pacientes transfundidos en los últimos tres meses.

METODOLOGÍA

Análisis Molecular

- I. Obtención de muestras y extracción de DNA
- II. Extracción de sangre periférica de casos y controles

A todos los pacientes y controles se les tomó una muestra de 20 ml de sangre periférica por venopunción. Se empleo EDTA como anticoagulante.

El DNA se obtuvo a partir de la muestra de 20 ml de sangre periférica.

Extracción del DNA genómico

El DNA se obtuvo a partir de la muestra de 20 ml de sangre periférica.

La extracción del DNA genómico se realizó a partir de los leucocitos totales de la muestra de sangre periférica, utilizando el Maxi-Kit Quiagen y Gentra (kit comercial).

1. En un tubo falcon de 15 ml se agregaron 5 ml de sangre periférica y 200 μ l de proteasa.

2. Al mismo tubo se le agregaron 6 ml de buffer AL (buffer de lisis) del Kit Quiagen, cuidando de que el buffer no entre en contacto directo con la proteasa, ya que esta puede quedar inactiva.
3. Se agitó ligeramente el tubo falcon durante 15 segundos y luego se mezcló vigorosamente con un vortex durante 1 minuto.
4. Se incubó el tubo falcon a 70 °C por 10 minutos en un baño maría.
5. Se le agregaron 10 ml de etanol absoluto frío y se agitaron durante 15 segundos y posteriormente se mezcló vigorosamente durante 1 minuto en un vortex.
6. Se pasó la mitad del producto a una columna puesta en un tubo falcon nuevo de 50 ml, y posteriormente se centrifugó a 5,000 r.p.m., durante 3 minutos.
7. Se desechó el filtrado y se vació a la columna el resto de producto que quedo en el tubo falcon original, y nuevamente se volvió a centrifugar a 5, 000 r.p.m., durante 3 minutos.
8. Se desechó el filtrado y se agregaron 5 ml de buffer AW1 (buffer de lavado) del kit Quiagen a la columna, posteriormente se centrifugó a 5, 000 r.p.m., durante 1 minuto.
9. Se decantó el filtrado y se agregó el segundo buffer AW2 (5 ml) del kit Quiagen a la

columna, posteriormente se centrifugó a 5, 000 r.p.m., durante 15 minutos.

10. Las columnas se pasan a tubos nuevos (del kit) y el otro tubo se desecha con el filtrado.

11. Al nuevo tubo se le agregaron 200 μ l de buffer AE del kit Quiagen.

12. Finalmente se incubó el tubo durante 24 horas a temperatura ambiente y se centrifugó a 5, 000 r.p.m., durante 2 minutos.

Cuantificación del DNA

Una vez que se obtuvo el DNA genómico de los casos y de los controles, se procedió a cuantificar el DNA total de cada caso y cada control. Para realizar la cuantificación de DNA se utilizó el equipo automatizado nanoDrop, modelo ND-1000 spectrophotometer. La cuantificación del DNA se leyó a una longitud de onda de 280 nanómetros. Los datos obtenidos de la cuantificación de cada muestra fue utilizada para realizar diluciones del DNA genómico para el análisis de diversos SNPs en los genes de interés al estudio.

Diluciones del DNA de los casos – Controles y producción de las placas de PCR para discriminación alélica

Para realizar los experimentos de discriminación alélica en el equipo de Tiempo Real, se hicieron diluciones del DNA de cada uno de los pacientes con obesidad y de los individuos sanos. Para obtener resultados confiables se homogenizaron las diluciones de los individuos que entraron a participar en este estudio. Para la obtención de las diluciones y las placas se realizó lo siguiente:

1. Las diluciones para la discriminación alélica en el equipo de tiempo real se hicieron a una concentración de 5 ng/μl. Por lo que todas las muestras se diluyeron con agua destilada libre de DNasa, proteasas, etc (Gibco).
2. Posteriormente se hizo una placa maestra de 96 pozos con un volumen de 100 μl a una concentración de 5ng/μl cada pozo. 92 pozos representan muestras de pacientes mientras 4 pozos son controles negativos (NTC: No Template Control).
3. A partir de esta placa maestra se tomaron 2 μl de cada pozo con una pipeta multicanal y se colocaron en varias placas siendo estas copias de la maestra para que el DNA se evaporara.
4. posteriormente el DNA liofilizado quedó listo para ser analizado con las diferentes sondas Taqman para los diferentes SNPs de los genes candidatos que fueron analizados en este estudio.

Discriminación alélica mediante el método fluorescente de 5' exonucleasa (Taqman).

En este estudio, del gen *LEP* se analizaron los SNPs -A4118G 5'flank/TFBS, -C3233A 5'flank/TFBS, -G2548A 5'flank/TFBS de la región promotora y +A19G del exón 1/5'UTR, del gen *LEPR*, los SNPs K109R del exón 4, K656N del exón 14 y P1019P del exón 20 y del gen *POMC*, los SNPs C3755T 3'UTR y A7069G 3'UTR, por ser los que han mostrado mayor asociación con obesidad en poblaciones diferentes. Además que aún no se conoce ni la distribución ni su frecuencia en la población mexicana.

Para la realización de esta técnica, se necesito la amplificación de las regiones en donde se

encuentra el SNP de cada gen que se analizó. Por lo tanto se necesito de la realización de una PCR convencional (Polimerase Chain Reaction) contando con un par oligonucleotidos que flanquearan el SNP a analizar así como dos sondas específicas de cada alelo analizado de cada gen analizado. Todos los reactivos anteriores fueron proporcionados por el proveedor Applied Biosystems (ver mezcla de reacción).

Condiciones de PCR

Pre-PCR

50 °C por dos minutos

95 °C por diez minutos

1. PCR

2 temperaturas, 45 ciclos

95 °C durante 0.15 segundos

60 °C durante 1 minuto

4 ∞

1. la mezcla de reacción para la discriminación alélica consistió en lo siguiente:

- a. 0.125 μ l de la sonda para analizar el SNP junto con el par de primers específicos para cada SNP
- b. 0.125 μ l de mezcla de reacción (enzima, buffer cloruro de magnesio)
- c. 0.375 μ l de agua.

2. a cada pozo de la placa de 96 pozos se le agregaron 5 μ l de mix.

3. las diferentes placas con el DNA liofilizado se analizaron para los diferentes SNPs – 4118A/G, – 3233C/A –2548G/A y +19 A/G en el gen *LEP*, K109R (A/G), K656N (G/C), y P1019P (T/C) en el gen *LEPR*, y 3755T C/T y 7069G A/G en el gen *POMC*.

4. cada placa fue leída por un láser del equipo de Tiempo Real y los datos escaneados fueron proporcionados por el software SDS 2.2 (Applied Biosystems; ver diagrama de

flujo; Figura de 20).

5. posteriormente se capturaron manualmente los genotipos de cada individuo (casos y controles) para analizar su frecuencia alélica y genotípica.
6. Finalmente se empleo el programa bioestadístico y bioinformático finetti para calcular el equilibrio de Hardy-Weinberg y los riesgos de cada SNP en la susceptibilidad o protección en la enfermedad.

Lo que ocurre en la reacción de la discriminación alélica mediante el método fluorescente de 5' exonucleasa (Taqman) es que las 2 sondas específicas para cada SNP, fueron marcadas en el extremo 5' con fluorocromos diferentes (Por Applied Biosystems), las cuales en el extremo 3' tendrán un "quencher" (TAMRA), que inhibe la emisión de fluorescencia mientras la sonda permanece intacta. Durante la reacción de PCR los oligonucleótidos y la sonda específica hibridan con la secuencia complementaria en el templado de DNA, al momento que se inicia la síntesis de la cadena de DNA. La DNA polimerasa AmpliTaq Gold, que tiene actividad tanto de DNA polimerasa como de exonucleasa 5'-3', digiere la sonda marcada, liberando al fluorocromo de la acción del "quencher", haciendo posible discriminar entre un alelo y otro con base en el tipo de fluorescencia emitida (Figura de 19).

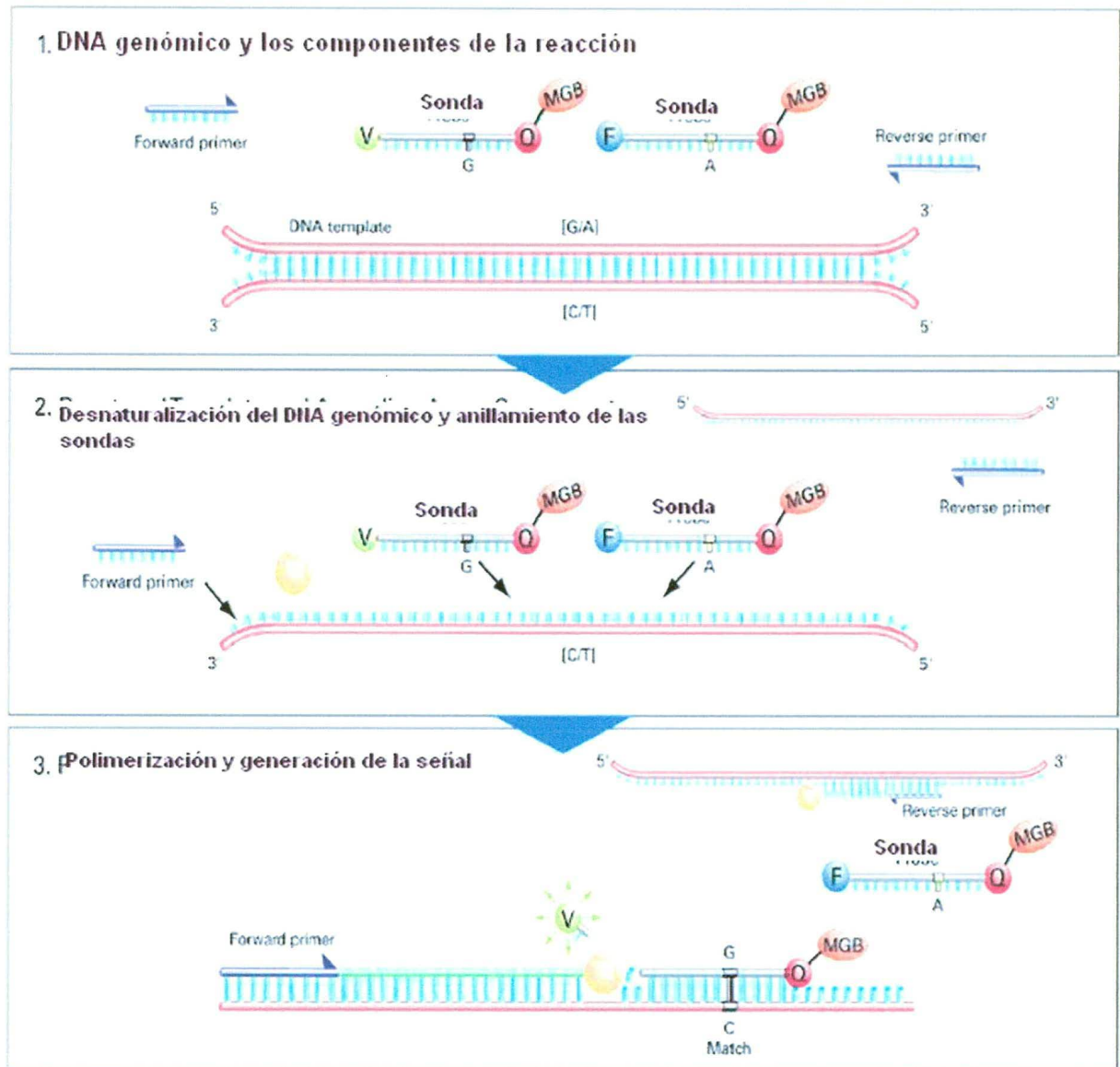


Figura 19. Discriminación alélica mediante el método fluorescente de 5' exonucleasa (Taqman). En esta técnica se utilizan 2 primers para flanquear el SNP y servir como cebadores para llevar a cabo la amplificación de un fragmento de 150-pb de largo, y 2 sondas con o sin el potencial de hibridar cerca de la Terminal 5' de la sonda. Cada sonda tiene un fluoróforo reportero como por Ej. FAM fijado a la Terminal 5', y un apagador en la Terminal 3'. Cuando la molécula de la enzima TAQ polimerasa se encuentra una sonda unida durante el ciclo de polimerización, digiere a la sonda en una dirección 5' a 3', liberando el fluoróforo reportero para fluorecer. Si las condiciones son las adecuadas, la sonda con una mala hibridación se unirá a su blanco en una manera significativamente menor, y no será digerido por la TAQ. Como consecuencia, el espectro de fluorescencia debido al fluoróforo es indicativo de cierto genotipo.

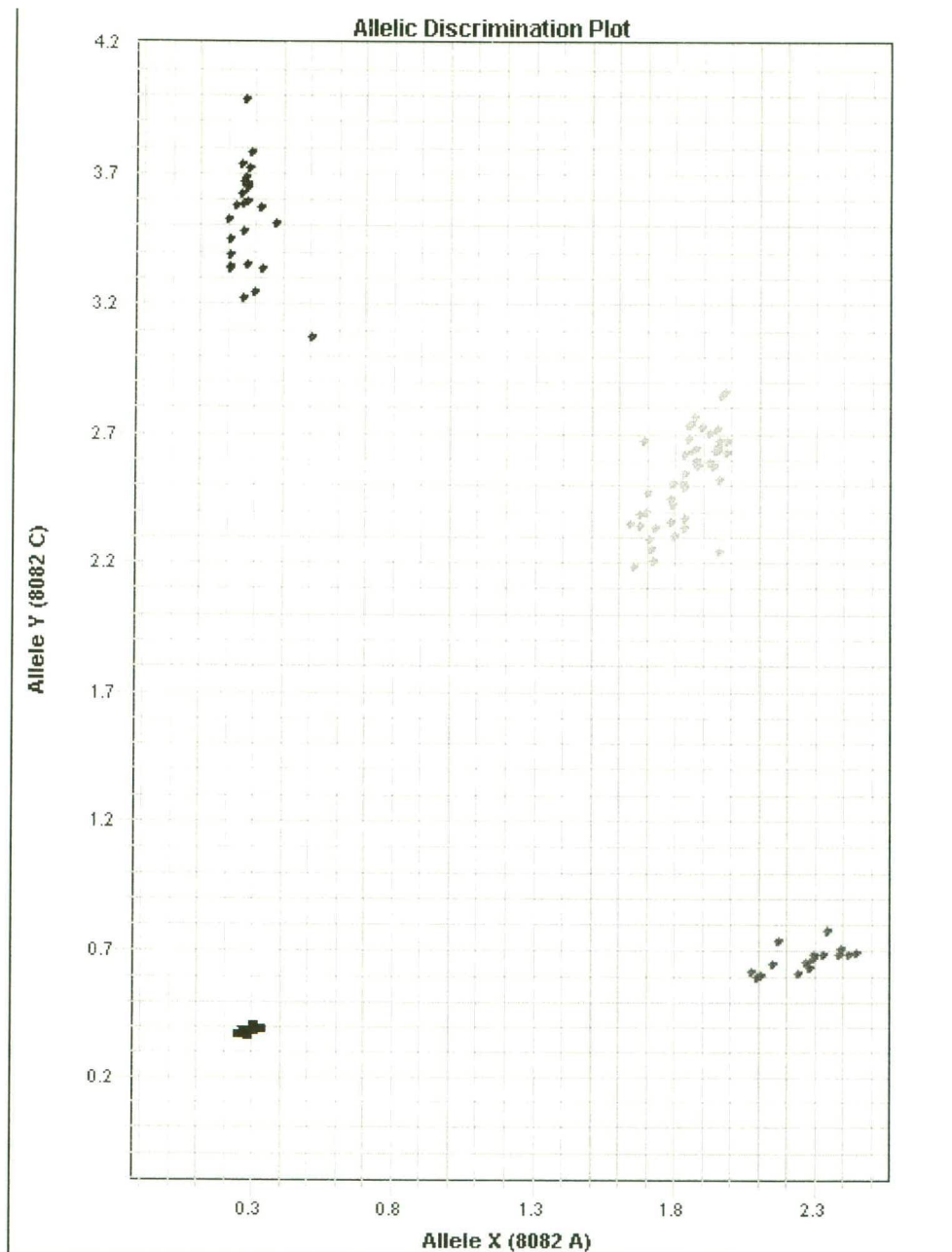


Figura 20 Plot que muestra los genotipos de un SNP. En esta imagen se muestra los genotipos de 92 individuos con obesidad. El SNP analizado en esta imagen es el -3233 C/A (8082) del gen de leptina. Los individuos que tienen el genotipo A/A son detectados por la sonda con el fluoróforo Vic, mientras que otros que son homocigotos para C/C son detectados por la sonda con el fluoróforo Fam. Por otro lado, también hay individuos que presentan ambos alélos, los cuales representan los individuos heterocigotos. Los cuadros negros que se presentan en la grafica son los controles negativos (NTCs).

Diseño de oligonucleótidos y sondas específicas.

Los oligonucleótidos y las sondas fueron diseñadas utilizando el software Primer Express 3.0 (Applied Biosystems).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO E INTERPRETACIÓN DE LOS DATOS

Calculo del tamaño de muestra.

El tamaño de muestra, minimo necesario para obtener resultados optimos con diferencias estadisticamente significativas, fue determinado con el programa **Quanto** (<http://hydra.usc.edu/gxe>). Se tomó en cuenta que la prevalencia de la obesidad en la población mexicana es del 30% en adultos mayores de 20 años (ENSANUT 2006), con un poder estadístico del 80% y un nivel de significancia (α) de 0.05, así como la frecuencia alélica más baja de los polimorfismos que se analizaron (1.2%) y un OR de 3. El tamaño de muestra requerida con un modelo de herencia recesivo para este estudio de acuerdo al numero de los 750 controles fue de 750 individuos con obesidad. Con este número minimo se esperan diferencias estadisticamente significativas ($p=0.05$), ademas de un poder estadistico del 80 %.

Análisis del Equilibrio de Hardy-Weinberg

La frecuencia de los SNPs analizados en una muestra de individuos mexicanos sanos y con obesidad fue reportada en porcentaje. Se evaluó el equilibrio de Hardy-Weinberg de los genotipos analizados mediante la prueba de Chi-cuadrada para determinar la significancia de las diferencias en las frecuencias alélicas entre casos y controles. El análisis de todos los SNPs y de todos los genes se realizó con el programa bioinformático y bioestadística **FINETTI**, el cual examina el equilibrio de Hardy-Weinberg, el riesgo relativo (OR) con un intervalo de confianza del 95% (95% IC), X^2 y la significancia estadística del valor de p.

Además analiza los valores de P comparando modelos de genotipos homocigoto y modelos de genotipos heterocigoto (Tabla 3).

En cada prueba de hipótesis se consideró como significativo un valor de $p < 0.05$.

SNP	Tests for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium		Tests for association (C.I.: 95% confidence interval)				
	Controls	Cases	allele freq. difference	heterozygous	homozygous	allele positivity	Armitage's trend test
2914	n11=80 (77.80) n12=30 (34.40) n22=6 (3.80) f_a1=0.82 +/-0.027 F=0.12782 p=0.168618 (Pearson) p=0.188640 (Llr) p=0.203548 (Exact)	n11=236 (232.53) n12=58 (64.93) n22=8 (4.53) f_a1=0.88 +/-0.014 F=0.10678 p=0.063500 (Pearson) p=0.084589 (Llr) p=0.100479 (Exact)	Risk allele 2				
			[1]<->[2]	[11]<->[12]	[11+]<->[22]	[11]<->[12+22]	common odds ratio
			Odds_ratio=0.632 C.I.=[0.418-0.955] chi2=4.80 p=0.02841 (P)	Odds_ratio=0.655 C.I.=[0.394-1.090] chi2=2.67 p=0.10196	Odds_ratio=0.452 C.I.=[0.152-1.342] chi2=2.14 p=0.14345	Odds_ratio=0.621 C.I.=[0.385-1.003] chi2=3.83 p=0.05038	Odds_ratio=0.665 chi2=4.29 p=0.03830
			Risk allele 1				
			[2]<->[1]	[22]<->[12]	[22]<->[11]	[11+12]<->[22]	common odds ratio
			Odds_ratio=1.583 C.I.=[1.047-2.394] chi2=4.80 p=0.02841 (P)	Odds_ratio=1.450 C.I.=[0.461-4.564] chi2=0.41 p=0.52378	Odds_ratio=2.212 C.I.=[0.745-6.570] chi2=2.14 p=0.14345	Odds_ratio=2.005 C.I.=[0.680-5.908] chi2=1.65 p=0.19915	Odds_ratio=1.501 chi2=4.29 p=0.03830

Tabla 3 .Obtenida de FINETTI. Ejemplo de análisis de equilibrio de Hardy-Weinberg y de asociación de casos y controles mediante el programa FINETTI.

Formación de Haplotipos

Un haplotipo es una serie de alélos en varios loci ligados en un mismo cromosoma, que por su cercanía tienden a segregar juntos.

Uno de los objetivos establecidos en el proyecto del mapa de haplotipos internacional (Internacional HapMap Consortium 2003) es desarrollar el mapa de haplotipos del genoma humano. El “HapMap”, el cual describirá los patrones comunes de variación de la secuencia del DNA humano, se espera una fuente clave para los investigadores en usar para encontrar genes que afecten, la salud, la enfermedad, y respuestas a fármacos y factores ambientales.

Los eventos de recombinación en el genoma no suceden de manera continua, en cambio ocurren mas en sitios de recombinación llamados “hot-spots” (sitios calientes), resultando en la formación de “bloques” a través de todo el genoma (Gabriel et al 2002). Dentro de un bloque es poca la evidencia histórica de recombinación. Los SNPs dentro de un bloque están en considerable desequilibrio de ligamiento (LD) y, así, para obtener la máxima información de la variación genética, no es necesario en genotipificar todos los SNPs dentro del bloque.

Dado el dramático incremento en el tamaño y el número de estudios de asociación en el mundo y la enorme cantidad de datos públicos de genotipos del HapMap, las herramientas para analizar, interpretar y visualizar estos datos son de crítica importancia para todos los investigadores.

HAPLOVIEW

El programa Haploview esta diseñado para proveer un sitio comprensivo de herramientas para el análisis de haplotipos para una amplia variedad de datos (Barret J.C., Fry B. Maller J. and Daly M.J., 2005) Haploview genera estadísticas de la cualidad de algún marcador, información de LD, bloques de haplotipos, frecuencias de haplotipos en la población y estadísticas de asociación de marcadores sencillos en un formato amigable para

el usuario. Haploview calcula varias maneras en pares de LD, el cual es usado para crear una representación grafica. Una vez en grupos de marcadores son seleccionados (automáticamente o manualmente), el programa genera haplotipos y sus frecuencias en la población (Figura 21).



Figura 21. Desplegado de Haploview de LD con la tasa de recombinación dibujada arriba (izquierda) y el desplegado de haplotipos (derecha).

En este estudio, se utilizó el programa Haploview para la formación de haplotipos para los SNPs de los genes *LEP*, *LEPR* y *POMC*, conocer su significancia estadística para saber si existe asociación de los Haplotipos, su frecuencia en la población y la formación grafica de LD.

Ubicación del estudio

El análisis genético y el estudio molecular se realizaron en el Laboratorio de Enfermedades Multifactoriales del INMEGEN dirigido por la Dra. Lorena Orozco.

El diagnóstico clínico se realizó en los Departamentos de Endocrinología y Medicina Interna del ISSSTE.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

Las muestras fueron obtenidas de los pacientes y de los individuos sanos que aceptaron firmar la carta de consentimiento informado.

ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL

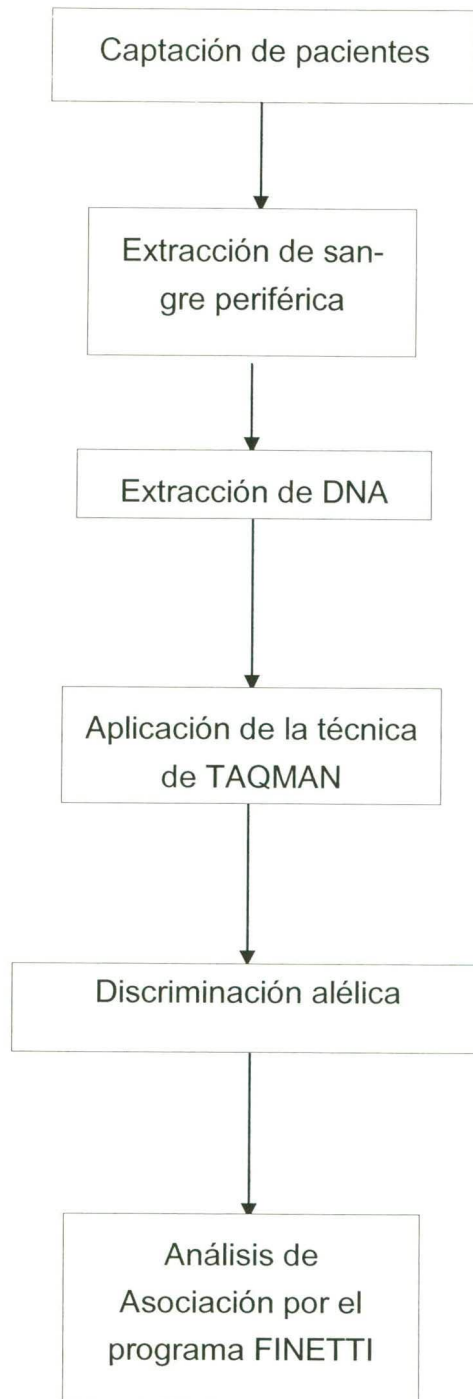


Figura 22. Estrategia experimental seguida en este estudio.

RESULTADOS

POBLACIÓN DE ESTUDIO

Características de los sujetos.

Las características de la población en estudio se muestran en la tabla 4. Todos los pacientes y controles fueron captados en la ciudad de México, en los Departamentos de Endocrinología y Medicina Interna, de los hospitales 1° de Octubre y Lic. Adolfo López Mateos del ISSSTE. Se incluyeron un total de 350 pacientes con diagnóstico de obesidad establecida mediante IMC mayor a 30 Kg/m² y 175 individuos con un IMC entre 18 y 25 Kg/m². El promedio de edad de los casos fue de 45.6 años mientras que de los controles fue de 36.2 años.

Genotipificación de los SNPs del gen *LEP*, *LEPR* y *POMC*.

Tanto en los casos como en los controles, la mayoría de los SNPs analizados en los genes de *LEP* (-4118A/G 5'flank/TFBS, -3233C/A 5'flank/TFBS, -2548G/A 5'flank/TFBS, y +19A/G del Exón 1/5'UTR), *LEPR* (K109R, K656N y P1019P) y *POMC* (3755C/T y 7069A/G), se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg, a excepción del SNP K109R del codón 4 del gen *LEPR*, el cual se encontró en desequilibrio en los controles.

Numero de pacientes y controles analizados en este estudio.

Las características de la población en estudio se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. **Algunas de las características de la población mexicana en estudio.**

<i>Características de la población en estudio.</i>					
Casos	Promedio	D.S.	Controles	Promedio	D.S
Edad años	45.6	13.3	Edad años	36.2	10.7
Peso Kg.	89.7	15.9	Peso kg	61.8	8.7
IMC Kg. /m	32	11.5	IMC Kg. /m	23.3	2.28
Grasa (%)	37.3	13	Grasa (%)	23.97	8.98

Gen *LEP*

SNP -4118A/G

La tabla 5 muestra la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo -4118A/G 5'flank/TFBS, localizado en el gen *LEP*, el cuál codifica para la proteína leptina. En ambos grupos el genotipo más común fue el heterocigoto A/G. Tanto en los casos como en los controles se observó una distribución similar en las frecuencias genotípicas y alélicas, por lo que no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

La tabla 5 muestra tanto el número de casos como controles analizados, los porcentajes, los valores de riesgo, intervalo de confianza, X^2 y valor de P fueron obtenidos con el programa Finetti.

SNP -3233C/A

Los resultados obtenidos del SNP -3233C/A 5'flank/TFBS del gen *LEP*, no mostraron asociación con susceptibilidad para padecer obesidad en la población mexicana estudiada (tabla 6). El genotipo más frecuente fue el C/A. En la tabla 6 se muestran el número total de pacientes y controles analizados, así como el porcentaje, los valores de riesgo, intervalo de confianza, X^2 y el valor de P .

Tabla 5. SNP Análisis del SNP – 4118A/G 5' flank/TFBS del gen *LEPTINA* en Obesidad (8084).

Genotipo	Controles n=161 (%)	Casos n=332 (%)	Genotipo comparado	OR (95% IC)	χ^2	P
A/A	40 (25)	104(31)	A/A vs. G/G	0.802(0.466-1.381)	0.63	0.42634
A/G	86(53)	155(47)				
G/G	35(22)	73(22)	A/A vs. A/G	0.693(0.442-1.087)	2.56	0.10962
Alelo	Controles n=322	Casos n=490		OR (95 % I.C.)	χ^2	P
A	166(52)	363(55)		0.882(0.676-1.152)	0.85	0.35751
G	156(48)	301(45)				

Tabla 6. Análisis del SNP – 3233C/A 5'flank/TFBS del gen *LEPTINA* en Obesidad (8082).

Genotipo	Controles n=172 (%)	Casos n=346 (%)	Genotipo comparado	OR (95% IC)	χ^2	P
C/C	53 (30.8)	94(27.1)	C/C vs. A/A	1.582(0.931-2.690)	2.89	0.08893
C/A	88(51.1)	165(47.6)				
A/A	31(18)	87(25.1)	C/C vs. C/A	0.693(0.442-1.087)	0.07	0.79742
Alelo	Controles n=344	Casos n=692		OR (95 % I.C.)	χ^2	P
C	194(56)	353(51)		1.242(0.958-1.611)	2.67	0.10210
A	150(44)	339(49)				

SNP -2548G/A

Las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo -2548G/A 5'flank/TFBS localizado en el gen de *LEP* no mostraron diferencias significativas cuando comparamos los pacientes con los controles (tabla 7). Al igual que los anteriores, el genotipo heterocigoto G/A fue el más frecuente. La tabla 7 contiene el número total de pacientes y controles analizados, así como el porcentaje, los valores de riesgo, intervalo de confianza, X^2 y el valor de P .

SNP 19A/G

Los resultados derivados de la genotipificación del SNP 19A/G localizado en el Exón 1/5'UTR del gen *LEP*, no mostraron diferencias significativas cuando se compararon las frecuencias de los genotipos y alélos entre los casos y los controles en la población estudiada (Tabla 8). La tabla muestra el número total de pacientes y controles analizados, así como el porcentaje, los valores de riesgo, intervalo de confianza, X^2 y P .

Después de que se analizaron los SNPs en forma individual y aislada se procedió a construir los haplotipos con estos los cuatro polimorfismos del gen *LEP* (4118 A/G, -3233 C/A, -2548 G/A y 19A/G). En ocasiones los SNPs de manera individual no dan asociación a obesidad, sin embargo cuando estos son parte de los haplotipos, pueden mostrar asociaciones positivas. La construcción de los haplotipos se realizó con el programa Haploview (Barret J.C., Fry B. Maller J. and Daly M.J., 2005).

Los resultados obtenidos mostraron 8 combinaciones de SNPs (haplotipos) entre estos 4 marcadores genéticos ubicados en la región aledaña a sitios de unión a factores de transcripción y del promotor del gen *LEP* (ver tabla 9).

Tabla 7. Análisis del SNP – 2548G/A 5' flank/TFBS del gen *LEPTINA* en Obesidad (8079).

Genotipo	Controles n=172 (%)	Casos n=338	Genotipo comparado	OR (95% IC)	χ^2	P
G/G	47(27.3)	117(34.6)	G/G vs. A/A	0.716(0.413-1.240)	1.43	0.23172
G/A	93(54)	164(48.5)				
A/A	32(18.6)	57(16.7)	G/G vs. G/A	0.708(0.464-1.082)	2.56	0.10986
Alelo	Controles n=344	Casos n=676		OR (95 % I.C.)	χ^2	P
G	187(54)	398(59)		0.832(0.640-1.081)	1.90	0.16804
A	157(46)	278(41)				

Tabla 8. Análisis del SNP 19 A/G Exon 1/5' UTR del gen *LEPTINA* en Obesidad (6471).

Genotipo	Controles n=166 (%)	Casos n=349 (%)	Genotipo comparado	OR (95% IC)	χ^2	P
A/A	36(21.6)	92(26.3)	G/G vs. A/A	1.407(0.837-2.366)	1.66	0.19701
G/A	81(48.7)	168(48)				
G/G	49(29.5)	89(25.5)	G/G vs. G/A	1.142(0.737-1.770)	0.35	0.55254
Alelo	Controles n=332	Casos n=698		OR (95 % I.C.)	χ^2	P
A	153(46)	352(50)		1.190(0.916-1.5447)	1.70	0.19229
G	179(54)	346(50)				

-4118 A/G	-2333 C/A	-2548 G/A	19 A/G	Frecuencias	Proporción caso-control	Valor de P
A	A	G	A	0.414	0.430, 0.381	0.1296
G	C	A	G	0.373	0.363, 0.395	0.3132
A	C	G	G	0.059	0.058, 0.063	0.7272
G	C	G	G	0.057	0.064, 0.043	0.1748
A	A	A	A	0.034	0.048, 0.006	5
A	C	A	G	0.024	0.013, 0.047	6
G	A	G	A	0.022	0.009, 0.049	4.9
A	C	G	A	0.012	0.013, 0.009	0.5586

Tabla 9. **Haplotipos identificados de los SNPs -4118 A/G, -3233 C/A, -2548 G/A, y 19 A/G del gen *LEP*.** De acuerdo con este estudio, se obtuvieron 8 haplotipos diferentes, en esta tabla se representa las diferentes combinaciones de los cuatro SNPs analizados del gen de *LEP*. Los haplotipos se presentan en la tabla en forma descendente de acuerdo con su frecuencia en la población mexicana.

Con el programa Haploview se identificaron varios haplotipos con diferentes porcentajes entre casos y controles, pero ninguno de ellos mostró diferencias estadísticamente significativas.

Gen *LEPR*

SNP K109R

El análisis de SNP K109R localizado en el exón 4 del gen *LEPR* se muestra en la tabla 10. Esta tabla contiene el número total de pacientes y controles analizados, así como el porcentaje, los valores de riesgo, intervalo de confianza, X^2 y P . La comparación de las frecuencias tanto de genotipos como de alélos fue analizada por conteo directo entre todos los casos y los controles.

Cuando se compararon las frecuencias de los alélos entre los casos y los controles, no se encontraron diferencias significativas. Así mismo, la comparación del genotipo homocigoto para A/A entre casos y controles, no se observaron diferencias en las frecuencias. Lo mismo ocurrió al comparar las frecuencias para el homocigoto G/G. Sin embargo, al comparar las frecuencias del genotipo heterocigoto (A/G), se encontró una frecuencia mayor en los casos que en los controles, mostrando una diferencia estadísticamente significativa (Tabla 10, $P=0.01764$). Cabe aclarar que en los controles la distribución de los genotipos no se encontró en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Tabla 10. Análisis del SNP K109R (A/G: Exon 4) del gen *LEPR* en Obesidad (8168).

Genotipo	Controles n=163 (%)	Casos n=337 (%)	Genotipo comparado	OR (95% IC)	χ^2	P
A/A	93(57)	167(49.5)	A/A vs. G/G	0.709(0.384-1.309)	1.22	0.26986
A/G	48(29.5)	142(42)				
G/G	22(13.5)	28(8.3)	A/A vs. A/G	1.647(1.089-2.492)	5.63	0.01764
Alelo	Controles n=326	Casos n=674		OR (95 % I.C.)	χ^2	P
A	234(72)	476(71)		1.058(0.790-1.418)	0.14	0.70571
G	92(28)	198(29)				

SNP K656N

Los resultados del análisis del SNP K656N del exón 14 del gen *LEPR* se muestran en la tabla 11, la cual contiene los valores de riesgo, intervalo de confianza, la X^2 y el valor de P . No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias genotípicas y alélicas entre los casos con obesidad y los controles.

SNP P1019P

El tercer SNP del gen de *LEPR* es el SNP P1019P localizado en el exón 20. Los resultados del análisis se muestran en la tabla 12. Al igual que los SNP anteriores de *LEPR*, para este SNP no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los casos con obesidad y los controles, tanto la comparación con los genotipos como la comparación de alélos. Los valores de riesgo, intervalo de confianza, X^2 y P se muestran en la misma tabla.

Al igual que el gen de leptina, ya que se analizaron los SNPs en forma individual y aislada se procedió a construir los haplotipos con los polimorfismos K109R A/G, K656N G/C, y P1019P T/C del gen *LEPR*. También la construcción de los haplotipos se realizó con el programa Haploview (Barret J.C., Fry B. Maller J. and Daly M.J., 2005).

Los resultados obtenidos mostraron 6 combinaciones de SNPs (haplotipos) entre estos 3 marcadores genéticos ubicados a través de lo largo de las regiones codificantes del gen *LEPR* (ver tabla 13).

El último haplotipo, ACT, que es el haplotipo menos frecuente, mostró una frecuencia significativamente mayor en los controles que en los casos ($P = 0.0275$), revelando una frecuencia de 0.011 en los casos y de 0.030 en controles. Estos hallazgos sugieren que este haplotipo podría conferir protección a la población mexicana para desarrollar obesidad.

Tabla 11. Análisis del SNP K656N G/C Exon 14 del gen *LEPR* en Obesidad (2378).

Genotipo	Controles n=165 (%)	Casos n=326 (%)	Genotipo comparado	OR (95% IC)	χ^2	P
G/G	108(65)	205(69)	G/G vs. C/C	0.474(0.187-1.202)	2.57	0.10867
G/C	49(29)	81(27)				
C/C	10(27.2)	9(3)				
			G/G vs. G/C	0.871(0.570-1.331)	0.41	0.52305
Alelo	Controles n=334	Casos n=590		OR (95 % I.C.)	χ^2	P
G	265(49)	491(83)		0.774(0.550-1.090)	2.16	0.14191
C	69(51)	99(17)				

Tabla 12. Análisis del SNP P1019P T/C Exon 20 del gen *LEPR* en Obesidad (2383).

Genotipo	Controles n=165 (%)	Casos n=326 (%)	Genotipo comparado	OR (95% IC)	χ^2	P
T/T	42(25.4)	70(21.5)	T/T vs. C/C	1.173(0.694-1.983)	0.36	0.55034
T/C	78(47.2)	168(51.5)				
C/C	45(27.2)	88(27)	T/T vs. T/C	1.292(0.810-2.062)	1.16	0.28170
Alelo	Controles n=330	Casos n=652		OR (95 % I.C.)	χ^2	P
T	162(49)	308(47.2)		1.077(0.826-1.404)	0.30	0.58323
C	168(51)	344(52.7)				

K109 A/G EXON 4	K656N G/C Exón 14	P1019P T/C Exón 20	Frecuencias	Proporción caso-control	Valor de P
A	G	T	0.409	0.416, 0.396	0.5449
G	G	C	0.232	0.244, 0.208	0.1984
A	C	C	0.162	0.158, 0.171	0.5789
A	G	C	0.122	0.121, 0.123	0.9277
G	G	T	0.054	0.048, 0.067	0.1997
A	C	T	0.017	0.011, 0.030	0.0275

Tabla 13. **Haplotipos identificados de los SNPs, K109R A/G, K656N G/C, y P1019P T/C del gen *LEPR*.** De acuerdo con este estudio, se obtuvieron 6 haplotipos diferentes, en esta tabla se representa las diferentes combinaciones de los tres SNPs analizados del gen de *LEPR*. Los haplotipos se presentan en la tabla en forma descendente de acuerdo con su frecuencia en la población mexicana.

Gen *POMC*

Otro de los genes analizados fue el *POMC* que codifica para la prohormona proopiomelanocortina. Las variantes alélicas que se analizaron en este estudio fueron: 3755C/T y 7069A/G localizadas en la región 3'UTR del gen.

SNP 3755C/T

En la tabla 14 se muestra el análisis del SNP 3755C/T 3' UTR. Las frecuencias obtenidas tanto de los genotipos como de los alélos fueron analizadas por conteo directo entre los casos y los controles. Los valores de riesgo, intervalo de confianza, X^2 , y el valor de P se presentan en la tabla 14. En ambos grupos, el genotipo más frecuente fue el homocigoto C/C. Cuando se compararon las frecuencias de los genotipos con el programa Finetti de los 302 pacientes obesos y los 116 individuos sanos, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los casos y los controles. Sin embargo, la distribución de los alélos mostró una frecuencia significativamente más alta del alelo de riesgo T en el grupo de los controles que en el grupo de pacientes obesos (**$P = 0.02841$**), con un OR de 0.632 y un intervalo de confianza de 0.418-0.995 (Tabla 14). Cabe hacer énfasis que nuestros resultados apoyan lo observado en estudios anteriores, los cuáles revelan que este alelo se encuentra asociado con valores bajos de IMC (Sutton B., et. al. 2005).

SNP 7069A/G

Los resultados del análisis del SNP 7069A/G 3'UTR del gen *POMC* se muestran en la tabla 15. Los valores de riesgo, intervalo de confianza, X^2 y el valor de P se muestran en la misma tabla. Para este SNP, la comparación de las frecuencias de los genotipos y de los

alélos no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los casos con obesidad y los controles.

Tabla 14. Análisis del SNP C3755T C/T 3' UTR del gen *POMC* en Obesidad (2914).

Genotipo	Controles n=116 (%)	Casos n=302 (%)	Genotipo comparado	OR (95% IC)	χ^2	P
C/C	80(67)	236(78)	C/C vs. T/T	0.452(0.152-1.342)	2.14	0.14345
C/T	30(26)	58(19)				
T/T	6(5)	8(3)	C/C vs. C/T	0.655(0.394-1.090)	2.67	0.10196
Alelo	Controles n=232	Casos n=604		OR (95 % I.C.)	χ^2	P
C	190(82)	530(88)		0.632(0.418-0.995)	4.80	0.02841
T	42(18)	74(12)				

Tabla 15. Análisis del SNP A7069G A/G 3' UTR del gen *POMC* en Obesidad (0399).

Genotipo	Controles n=154 (%)	Casos n=356 (%)	Genotipo comparado	OR (95% IC)	χ^2	P
G/G	45(29)	113(31.7)	G/G vs. A/A	0.878(0.516-1.496)	0.23	0.63327
G/A	75(49)	168(47)				
A/A	34(22)	75(21)				
			G/G vs. G/A	0.892(0.575-1.385)	0.26	0.61059
Alelo	Controles n=308	Casos n=712		OR (95 % I.C.)	χ^2	P
T	165(82)	394(55)		0.931(0.712-1.218)	0.27	0.60293
C	143(18)	318(45)				

Para la construcción de los haplotipos del gen *POMC*, se procedió de la misma manera que los genes anteriores, combinando los SNPs, 3755 C/T de la región 3' UTR y 7069 A/G de la misma región del gen *POMC*. La construcción de los haplotipos se realizó también con el programa Haploview (Barret J.C., Fry B. Maller J. and Daly M.J., 2005).

Los resultados obtenidos mostraron 3 combinaciones de SNPs (haplotipos) entre estos 2 marcadores genéticos ubicados en la región 3' UTR del gen *POMC* (ver tabla 16).

El haplotipo AA, que es el menos frecuente, presentó diferencia estadísticamente significativa al comparar los casos con los controles. La frecuencia de este haplotipo en los casos fue de 0.111, mientras que en los controles esta fue de 0.160. Estos resultados sugieren que al igual que el haplotipo ACT de *LEPR*, este podría ser un haplotipo que confiere protección.

3755 C/T	7069 A/G	Frecuencias	Proporción caso-control	Valor de P
G	G	0.546	0.557, 0.522	0.3068
A	G	0.321	0.328, 0.307	0.5165
A	A	0.127	0.111, 0.160	0.0303

Tabla 16. Haplotipos identificados de los SNPs, 3755 C/T de la región 3' UTR y 7069 A/G de la misma región del gen *POMC*. De acuerdo con este estudio, se obtuvo 3 haplotipos diferentes, en esta tabla se representa las diferentes combinaciones de dos SNPs analizados del gen de *POMC*. Los haplotipos se presentan en la tabla en forma descendente de acuerdo con su frecuencia en la población mexicana.

Discusión

La obesidad y sus fenotipos relacionados son patologías muy complejas y heterogéneas en cuya etiología participan de manera muy importante, diversos componentes genéticos, cuya expresión está influenciada por el medio ambiente.

El incremento de la incidencia de la obesidad es una observación mundial y México no es la excepción. En el mundo existen más de 1,400 millones de personas afectadas y en México cerca del 70% de la población general la padece. Estudios epidemiológicos describen que en nuestro país más del 30% de los adultos mayores de 20 años y casi un tercio de la población infantil tiene sobrepeso u obesidad. La Encuesta Nacional de Salud 2006 (ENSA 2006) mostró que la prevalencia de sobrepeso y obesidad en adultos está entre las más altas del mundo (Sánchez-Castillo, 2003). Por otro lado, se ha documentado que de los países de América Latina, México se encuentra entre los de más alta prevalencia de sobrepeso en niños (Del Rio-Navarro y cols, 2004). Aunado a esto, el hecho de tener sobrepeso u obesidad conlleva a un mayor riesgo de mortalidad o de desarrollo de múltiples padecimientos principalmente, enfermedad coronaria, diabetes tipo 2, cáncer y enfermedad vascular cerebral, que actualmente son las principales causas de muerte en nuestro país. Así, la obesidad y el sobrepeso se han convertido en un serio problema de salud pública en los países occidentalizados. Es evidente que el control de este desorden metabólico incide directamente en la morbo-mortalidad de muchos padecimientos, sin embargo a la fecha no se dispone de estrategias de prevención, diagnóstico y tratamiento suficientemente eficaces. Por lo tanto, es impostergable identificar los factores etiológicos involucrados en la ganancia de peso y sus consecuencias fisiopatológicas.

Gracias al extraordinario avance de la tecnología biomédica, la avalancha de conocimiento que ha surgido en los últimos años ha permitido una reducción de la brecha

existente entre el descubrimiento de los mecanismos moleculares y su aplicación en la práctica clínica. El desafío que afronta la medicina actual desde la secuenciación del genoma humano es la identificación de las diferencias genómicas (polimorfismos) en la secuencia del ácido desoxirribonucleico (ADN) que hacen que algunos individuos sean más susceptibles a padecer enfermedades comunes, como la obesidad. Estos avances han iniciado un desarrollo exponencial y abren la posibilidad de predecir el tipo y variante de enfermedad a desarrollar.

La identificación de genes involucrados en la obesidad de origen monogénico, sindromático y multifactorial han incrementado nuestro conocimiento de los mecanismos implicados en el fenotipo. La obesidad de origen multifactorial no sólo es la más común, sino la más compleja desde el punto de vista fisiopatológico. Aunado a esto, el gran número de genes que han mostrado un posible papel en la etiopatogenia de la obesidad, apoya la hipótesis de que este padecimiento existe una gran heterogeneidad genética y que esta varía entre los diferentes grupos étnicos, por lo que los genes candidatos deben ser estudiados en cada una de las poblaciones. A la fecha se han asociado más de 20 genes candidatos al fenotipo obeso, aunque con contribuciones discretas y de múltiples genes, los cuales han sido asociados de forma reproducible en varias poblaciones.

Si bien en los últimos años se ha avanzado vertiginosamente en la exploración genética de la obesidad, todavía estamos muy lejos de entender este complejo fenómeno de manera integral.

Inicialmente, la caracterización genética de la obesidad se derivó de modelos obesos de ratón (*ob/ob*, *db/db*, *fat*, y *tubby*). Estos ratones tenían separadamente mutaciones recesivas en los genes *Lep*, *Lepr*, *Pomc*, *Mc4r* y *Mc3r*, donde claramente estos genes clave pertenecían a la misma vía metabólica (vía de la Leptina/Melanocortina). La transferencia de estos conocimientos a los casos clínicos, validan el papel de estos genes en la obesidad

humana, poniendo las vías Leptina/Melanocortina como las vías primarias de la regulación de la homeostasis de la energía. Actualmente la vía de la Leptina está bien descrita y caracterizada y se están llevando a cabo varios estudios epidemiológicos en obesidad multifactorial.

En esta tesis se realizó un estudio de asociación en casos y controles, donde se comparó la frecuencia de un marcador entre casos no relacionados y un grupo control, y se investigó su coocurrencia con la enfermedad. Se analizaron SNPs localizados en los genes *LEP*, *LEPR* y *POMC* y se investigó su asociación con obesidad en la población mexicana en 350 casos y 175 controles.

En estudios previos en el gen *LEP*, los alélos -4118A/G, y -3233C/A, mostraron asociación con obesidad y niveles bajos de leptina (Jiang, Y. *et al.*, 2004). Estos resultados fueron sustentados en estudios en familias por la prueba de desequilibrio de transmisión, encontrándose la asociación en el género masculino. Mediante un análisis *in silico*, se predice que estos SNPs pueden modificar los sitios de unión a factores de transcripción en la región 5' UTR del gen, lo cual sugiere que pueden estar implicados en la regulación de la transcripción del gen de leptina. En nuestro estudio, los SNPs analizados, la distribución de los genotipos y los alélos fue similar tanto en el grupo control como en los pacientes con obesidad; sin embargo, no se realizó estratificación por género.

Los marcadores 19A/G y -2548G/A del gen *LEP*, los cuáles ya habían mostrado asociación con el IMC y rasgos relacionados al peso del cuerpo (Hager et al. 1998; Mammes et al. 1998, 2000; Li et al. 1999), tampoco mostraron asociación en la población mexicana estudiada. Tres de los SNPs examinados en *LEP*, (-4118A/G, -3233C/A y -2548G/A) se encuentran en secuencias aledañas a la región 5'/TFBS, mientras que el polimorfismo 19A/G se localiza en el primer exón del gen *LEP*. En resumen, los marcadores -4118A/G, -3233C/A, 19A/G y -2548G/A, del gen de leptina, no mostraron diferencias estadísticamente

del genotipo heterocigoto (A/G) en los casos que en los controles, con una diferencia estadísticamente significativa (Tabla 6, $P=0.01764$), sin embargo, esta asociación podría ser la consecuencia del desequilibrio de Hardy-Weinberg observada en los controles. Este hallazgo debe ser analizado con más profundidad, ya que de todos los genotipos analizados, éste fue el único que mostró desequilibrio en la distribución de los genotipos, y aunque debemos descartar presencia de estratificación de la población, también se debe de considerar la posibilidad de que este genotipo se encuentre asociado a un IMC bajo, ya que la selección de los controles está dirigida a un grupo de individuos con un rasgo fenotípico específico, como un IMC entre 18 y 25 Kg/m². De estas observaciones surge la necesidad de realizar estudios posteriores de asociación en familias utilizando la prueba de desequilibrio de transmisión, ya que en este trabajo no se captaron a los familiares de los pacientes.

Por otra parte, los polimorfismos K656N y P1019P no mostraron diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de los alélos o la distribución de los genotipos entre los casos y controles analizados.

En el análisis de estos SNPs cuando son parte de haplotipos, no se mostró relevancia en la diferencia estadísticamente significativa en la susceptibilidad a desarrollar obesidad. Los resultados obtenidos mostraron 6 combinaciones de SNPs (haplotipos) entre estos 3 marcadores genéticos ubicados a través de lo largo de las regiones codificantes del gen *LEPR*. Solo el haplotipo ACT de los tres marcadores, mostró una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.0275$) pero se puede considerar de protección por tener una mayor frecuencia en los controles que en los casos. Este haplotipo fue el menos frecuente del gen de *LEPR*. En estudios anteriores, el haplotipo GCA en población inglesa se asoció a obesidad (Yong L. et al. 2004).

significativas en la frecuencia de los alélos o la distribución genotípica observada entre sujetos con IMC normal y sujetos con obesidad en población mexicana.

Hay ocasiones que los SNPs analizados solos no dan asociación a susceptibilidad a padecer obesidad, sin embargo, muchas veces varios SNPs en el mismo gen siendo parte de los haplotipos, han mostrado asociarse a susceptibilidad a padecer obesidad (Yong L. et al. 2004; Jiang, Y. *et al.*, 2004).

Los resultados obtenidos mostraron 8 combinaciones de SNPs (haplotipos) entre estos 4 marcadores genéticos ubicados en la región flanqueante a sitios de unión a factores de transcripción y del promotor del gen LEP. En estudios previos, estos SNPs formando parte de haplotipos les resultó asociación a susceptibilidad a padecer obesidad específicamente en hombres (Jiang, Y. *et al.*, 2004).

Los SNPs analizados en el gen *LEPR* que codifica para el receptor de leptina fueron: K109R localizado en el exón 4, el cual implica un cambio en el codón 109 (AAG > AGG) que conlleva a un cambio conservativo de una lisina por una arginina en el receptor de leptina; K656N que se localiza en el exón 14 y afecta el codón 656 (AAG > AAC) generando un cambio no conservativo de una lisina por una asparagina en la proteína, y por último el SNP P1019P localizado en el exón 20 que implica una transición silenciosa G > A en el codón 1019. Estas variantes comunes, las cuales ya habían sido analizadas en población caucásica (Jun Liu Y et. al. 2004; Yvon C. et al. 2000) e indios pima (D. Bruce Thompson, et. al. 1997), se han asociado a altos niveles de leptina (resistencia a leptina), diferencias topográficas de la distribución de grasa, IMC, circunferencia de cintura, metabolismo de glucosa e insulina, ciertos desordenes en el control de la alimentación, etc. De hecho, ambos polimorfismos se encuentran en codones para la región extracelular de la proteína donde el receptor se une a su ligando leptina, lo que sugiere que estos cambios podrían modificar la función del receptor. En este trabajo el análisis del SNP K109R mostró una mayor frecuencia

El hecho de que no se haya encontrado asociación entre los SNPs examinados en este estudio en los genes de leptina y receptor de leptina y la obesidad en población mexicana, no descarta la posibilidad de que estos se encuentren asociados a otros fenotipos relacionados con la obesidad, tales como niveles de colesterol, triglicéridos, HDL, LDL, etc. Por otra parte, independientemente de que los polimorfismos de un solo nucleótido afecten la función de la proteína o no, en enfermedades comunes o con influencia multifactorial como la obesidad, la ausencia de asociación no necesariamente significa falta de efecto; la sustitución de algún aminoácido podría ser compensado por algún otro medio, ruta metabólica, o por factores genotípicos adicionales (epistasia), que puedan estar implicados y que necesitan ser tomados en cuenta antes de que el fenotipo (obesidad) se manifieste. Así mismo, es necesario ampliar el tamaño de la muestra, dado que muchas variantes que contribuyen al desarrollo de enfermedades complejas como la obesidad, tienen efectos modestos.

Otro de los genes analizados fue el *POMC* debido a su relevancia funcional en la vía de la leptina. El análisis del polimorfismo 7069A/G 3'UTR, en el gen *POMC*, no mostró diferencias estadísticamente significativas en la frecuencias alélicas o la distribución genotípica entre obesos y controles. Sin embargo, el polimorfismo 3755C/T, mostró asociación con un IMC $<25 \text{ Kg/m}^2$ (OR = 0.632, 95% IC 0.418-0.995; $P = 0.02841$; Tabla 9). Estos resultados son similares a los reportados por Sutton B., et. Al, donde el polimorfismo 3755C/T muestra evidencia de asociación con un bajo IMC y circunferencia de cintura. Combinando el alelo T en varios haplotipos se observa que esta asociación está dada a expensas de este alelo (Sutton B., et. al. 2005). Se sugiere que esta variante está en desequilibrio de ligamiento con algún otro polimorfismo cercano a una región reguladora del gen, ya que este SNP no parece participar directamente en la función de este gen, por lo que

sería importante estudiar el comportamiento en nuestra población de otros SNPs localizados en el gen *POMC*.

Los resultados obtenidos en el polimorfismo 3755C/T en la muestra analizada sugieren, que este alelo T se asocia con un IMC bajo y protege al desarrollo de obesidad en la población mexicana.

Para la construcción de los haplotipos del gen *POMC*, se procedió de la misma manera que los genes anteriores, ya que se habían analizado los SNPs en forma individual y aislada se procedió a construir los haplotipos con estos dos SNPs, 3755 C/T de la región 3' UTR y 7069 A/G de la misma región del gen *POMC*. Los resultados obtenidos mostraron 3 combinaciones de SNPs (haplotipos) entre estos 2 marcadores genéticos ubicados en la región 3' UTR del gen *POMC*. En el análisis de estos SNPs cuando son parte de haplotipos, no se mostró relevancia en la diferencia estadísticamente significativa en la susceptibilidad a desarrollar obesidad. Solo el haplotipo AA de los dos marcadores, mostró una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.0303$) pero se puede considerar de protección por tener una mayor frecuencia en los controles que en los casos. Este haplotipo fue el menos frecuente del gen de *POMC*. En estudios previos, en población México-Americana, el haplotipo TA se asocio a niveles bajos de IMC (Sutton et al. 2005).

Conforme el conocimiento genético en obesidad vaya avanzando junto con nuevos descubrimientos, y más estudios en obesidad con fenotipos bien definidos y más asociaciones con mutaciones genéticas se tengan más completas, se podrán elucidar los factores genéticos específicos que predisponen a obesidad en los seres humanos.

En resumen, en este trabajo se identificó un gen (*POMC*) asociado a un IMC <25 Kg/m² en la población mexicana. Los resultados de esta tesis apoyan la hipótesis de que en la obesidad existe una gran heterogeneidad genética y ésta varía de una población a otra, ya que polimorfismos que mostraron evidencia de asociación en otras poblaciones, no se encontraron asociados en este estudio, por lo que los genes candidatos deben ser estudiados en cada una de las poblaciones. Por otra parte, aún queda por realizar estudios adicionales en otros genes y correlacionar las variantes analizadas en este trabajo, con los fenotipos relacionados con la obesidad.

Conclusiones y Perspectivas

1. El análisis de los polimorfismos LEP-4118A/G, LEP-3233C/A, LEP-2548G/A, LEP19A/G, LEPRK656N, LEPRP1019P y POMC7069A/G, sugieren que estos no se encuentran asociados a la obesidad en población mexicana. Sin embargo no podemos descartar que estos polimorfismos se encuentren asociados con alguno de los fenotipos relacionados con la obesidad.
2. Los resultados obtenidos con el polimorfismo 3755C/T del gen *POMC* en la muestra analizada sugieren, que el alelo T se asocia con un IMC bajo y protege al desarrollo de obesidad en la población mexicana. Los resultados derivados de este polimorfismo confirman previas asociaciones descritas en otras poblaciones analizadas.
3. En este trabajo el heterocigoto A/G del SNP K109R se encontró con una frecuencia significativamente mayor en los casos que en los controles, sin embargo, está asociación podría ser la consecuencia del desequilibrio de Hardy-Weinberg observada en los controles. Se debe descartar la presencia de estratificación de la población, pero también se debe de considerar la posibilidad de que este genotipo se encuentre asociado a un IMC entre 18 y 25 Kg/m².
4. Este estudio apoya la hipótesis de que en la obesidad existe una gran heterogeneidad genética y ésta varía de una población a otra, por lo que otros genes candidatos deben ser estudiados con detalle en cada una de las poblaciones.
5. Es necesario aumentar la muestra.
6. El análisis de los haplotipos formados con los polimorfismos del gen *LEP*, no se encontraron asociados a obesidad en población mexicana.

7. La mayoría de los haplotipos formados con sus respectivos marcadores de los genes *LEPR* y *POMC*, no se encontraron asociados a obesidad en población mexicana
8. Solo el haplotipo ACT del gen de *LEPR*, en la muestra analizada sugiere se asocia a un IMC bajo y protege al desarrollo de obesidad en la población mexicana.
9. El haplotipo AA del gen *POMC*, en la muestra analizada sugiere se asocia a un IMC bajo y protege al desarrollo de obesidad en la población mexicana.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Allison DB, Heo M, Faith MS, Pietrobelli A. Meta-analysis of the association of the Trp64Arg polymorphism in the β 3 adrenergic receptor with body mass index. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1998; **22**: 559–566.

Allison DB, Heshka S, Neale MC, Lykken DT, Heymsfield SB. A genetic analysis of relative weight among 4,020 twin pairs, with an emphasis on sex effects. *Health Psychology* 1994; **13**:362-5

Allison DB, Kaprio J, Korkeila M, Koskenvuo M, Neale MC, Hayakawa K. The heritability of body mass index among an international sample of monozygotic twins reared apart. *Obes. & Rel. Met. Dis.* 20:501-506

Banks WA, Kastin AJ, Huang W, Jaspan JB, Maness LM. Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides* 1996; **17**:305–11.

Banks WA. Enhanced leptin transport across the blood brain barrier by alpha 1-adrenergic agents. *Brain Res* 2001; **899**:209–17.

Banks WA, Coon AB, Robinson SM, Moinuddin A, Shultz JM, Nakaoke R, Morley JE. Triglycerides induce leptin resistance at the blood brain barrier. *Diabetes* 2004; **53**:1253–60.

Barquera S, Rivera-Dommarco J. Sobrepeso y Obesidad. Panorama Epidemiológico, Evaluación Clínica y Tratamiento. Lito Grapo, 2002. Capítulos del 6 al 11.

Barret J.C., Fry B. Maller J. and Daly M.J. (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2005; 21:263-265.

Barsh GS, Farooqi IS, O'Rahilly S. Genetics of body-weight regulation. *Nature* 2000; 404:644-651.

Baumann, H., Morella, K. K., White, D. W., Dembski, M., Bailon, P. S., Kim, H., Lai, C.-F. and Tartaglia, L. A. The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1996; 93: 8374–8378

Bertagna X. Proopiomelanocortin-derived peptides. *Endocrinol & Met Clin of Nor Ame* 1994 23:467-85

Björbæck, C., Uotani, S., da Silva, B. and Flier, J. S. Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. *J Biol Chem* 1997; 272, 32686–32695

Björbæck, C., Elmquist, J. K., Frantz, J. D., Shoelson, S. E. and Flier, J. S. Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Mol. Cell* 1998; 1, 619–625

Bjorbaek C, Elmquist JK, Michl P, Ahima RS, van Bueren A, McCall AL, Flier JS. Expression of leptin receptor isoforms in rat brain microvessels. *Endocrinology* 1998a; 139:3485–91.

Bjørnbæk C., Lavery, HJ., Bates, SH., Olson, RK., Davis, SM., Flier, JS. and Myers, Jr, MG. SOCS3 mediates feedback inhibition of the leptin receptor via Tyr985. *J. Biol. Chem.* 2000; 275, 40649–40657

Bjørnbæk C. and Kahn, BB. Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Rec Prog Horm Res* 2004; 59, 305–331

Bjorntorp P (1997) Obesity. *Lancet* 350:423-426.

Boehnke M, Langefeld CD Genetic association mapping based on discordant sib pairs: the discordant-alleles test. *Am J Hum Genet* 1998;62:950-961

Bouchard C The genetics of obesity: from genetic epidemiology to molecular markers. *Molecular Medicine Today* 1995;1:45-50

Bouchard C, Perusse L, Leblanc C, Tremblay A, Theriault G Inheritance of the amount and distribution of human body fat. *Int J of Obes* 1988;12:205-15

Boutin P, Dina C, Vasseur F, Dubois S, Corset L, Seron K, Bekris L, Cabellon J, Neve B, Vasseur-Delannoy V, Chikri M, Charles MA, Clement K, Lernmark A, Froguel P. GAD2 on chromosome 10p12 is a candidate gene for human obesity. *Public Library Sci Biol* 2003; 1: E68.

Calle EE, Thun MJ, Petrelli JM, Rodriguez C, Heath CW JR. Body-mass index and mortality in a prospective cohort of US adult. *N Engl J Med* 1999; 341:1097-105.

Carninci P, Kasukawa T, Katayama S, Gough J, Frith MC, Maeda N, Oyama R, et al. The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science* 2005; 309:1559-1563

Cheung CC, Clifton DK, Steiner RA Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology* 1997; 138:4489-92

Choudhury, A. I. The role of insulin receptor substrate 2 in hypothalamic and b cell function. *J. Clin. Invest.* 2005;115, 940—950

Christopher G. Bell, Andrew J. Walley and Philippe Froguel. The Genetics of Human Obesity, *Nat Rev Genet* 6 2005. 221-231.

Cole T, Bellizzi M. Establishing a Standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *BMJ* 2000; 320:1-6.

Comuzzie, A. G. A major quantitative trait locus determining serum leptin levels and fat mass is located on human chromosome 2. *Nature Genet.* 1997;15, 273—276. The first genome scan that was done for obesity-related traits.

Comuzzie AG, Allison DB The search for human obesity genes. *Science* 1998; 280: 1374-1377 4.

Friedman JM A war on obesity, not the obese. *Science* 2003; 299:856–858

Cook, W. S. and Unger, R. H. Protein tyrosine phosphatase 1B: a potential leptin resistance factor of obesity. *Dev. Cell* 2002; 2, 385–387

Cota, D. Hypothalamic mTOR regulates food intake. *Science* 2006; 312, 927—930

Del Río-Navarro BE, Velásquez-Monroy O, Sánchez Castillo CP, Lara-Esqueda A, Berber A, Fanghanel G, Violante R, Tapia-Conyer R, James WPT, and The Encuesta Nacional de Salud (ENSA). The high prevalence of overweight and obesity in Mexican Children. *Obes. Res.* 2004: 215-23.

De silva A., Walder Ken R., Boyko Edward J., Whitecross Kate F., Nicholson G., Kotowicz M., Pasco J., and Collier Greg R., Genetic Variation and Obesity in Australian Women: A Prospective Study. *Obesity Research* 2001; Vol. 9 12:733-740.

Devos R, Guisez Y, Van der Heyden J, White DW, Kalai M, Fountoulakis M, Plaetinck G. Ligand-independent dimerization of the extracellular domain of the leptin receptor and determination of the stoichiometry of leptin binding. *J Biol Chem* 1997; 272:18304–10.

Elmqvist JK, Bjorbaek C, Ahima RS, Flier JS, Saper CB. Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *J Comp Neurol* 1998; 395:535–47.

Eyckerman, S., Broekaert, D., Verhee, A., Vandekerckhove, J. and Tavernier, J. Identification of the Y985 and Y1077 motifs as SOCS3 recruitment sites in the murine leptin receptor. *FEBS Lett.* 2000; 486: 33–37

Farooqi, I. S. *et al.* Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene. *N. Engl. J. Med.* 348, 1085–1095 (2003).

Farooqi I.S., O’Rahilly S. Monogenic human obesity syndromes. *Recent Prog Horm Res* 2004; 59:409-424.

Feitosa, M. F. *et al.* Quantitative-trait loci influencing body-mass index reside on chromosomes 7 and 13: the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study. *Am. J. Hum. Genet.* 2002; 70, 72–82

Ferrari W Behavioral changes in animals after intracisternal injection with adrenocorticotrophic hormone and melanocyte-stimulating hormone. *Nature* 1958;181:925-926

Figlewicz DP, Evans SB, Murphy J, Hoen M, Baskin DG. Expression of receptors for insulin and leptin in the ventral tegmental area/substantia nigra (VTA/SN) of the rat. *Brain Res* 2003; 964:107-15.

Flodmark CE, Bissau I, Moreno LA, Pietrobelli A & Widhalm K New insights into the field of children and adolescents' obesity: the European perspective. *International Journal of Obesity and related Metabolic Disorders* 2004;28, 1189-1196.

Froguel P. and Boutin P. Genetics of Pathways Regulating Body Weight in the Development of Obesity in Humans. *Exp Biol Med* 2001;Vol. 226 (11):991-996.

Fujisawa T, Ikegami H, Kawaguchi Y, Ogihara T. Meta-analysis of the association of Trp64Arg polymorphism of β 3-adrenergic receptor gene with body mass index. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; **83**: 2441–2444.

Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, Higgins J, DeFelice M, Lochner A, Faggart M, Liu-Cordero SN, Rotimi C, Adeyemo A, Cooper R, Ward R, Lander ES, Daly MJ, Altshuler D (2002) The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 296:2225-2229

Ghilardi N, Ziegler S, Wiestner A, Stoffel R, Heim MH and Skoda, RC Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996;93, 6231–6235.

Ghilardi, N. and Skoda, RC The leptin receptor activates Janus kinase 2 and Signals for proliferation in a factor-dependent cell line. *Mol. Endocrinol.* 1997; 11, 393–399

Golden PL, Maccagnan TJ, Pardridge WM. Human blood-brain barrier leptin receptor. Binding and endocytosis in isolated human brain microvessels. *J Clin Invest* 1997; 99:14–8.

González Barranco J. Obesidad. McGraw-Hill. 1a ed. México 2003. Capítulos del 12 al 15.

Gotoda T, Manning BS, Goldstone AP, Leptin receptor gene variation and obesity: lack of association in a white British male population. *Hum Mol Genet.* 1997; 6:869–76.

Grill HJ, Schwartz MW, Kaplan JM, Foxhall JS, Breininger J, Baskin DG. Evidence that the caudal brainstem is a target for the inhibitory effect of leptin on food intake. *Endocrinology* 2002; 143:239–46.

Hager J, Clement K, Francke S, Dina C, Raison J, Lahlou N, Rich N, Pelloux V, Basdevant A, Guy-Grand B, North M, Froguel P A polymorphism in the 5' untranslated region of the human OB gene is associated with low leptin levels. *Int J Obes. Relat. Metab. Disord.* 1998; 22:200–205.

Hakansson ML, Brown H, Ghilardi N, Skoda RC, Meister B. Leptin receptor immunoreactivity in chemically defined target neurons of the hypothalamus. *J Neurosci* 1998; 18:559–72.

Haseman JK, Elston RC The investigation of linkage between a quantitative trait and a marker locus. *Behav Genet* 1972; 2:3-19

Hasstedt, S. J., Ramirez, M. E., Kuida, H. & Williams, R. R. Recessive inheritance of a relative fat pattern. *Am. J. Hum. Genet.* 1989; 45, 917–925

He Y, Chen, Quon MJ, et. al. The mouse 'obese' gene: genomic organization, promoter activity, and activation by enhancer/CCAAT α . *J. Biol. Chem* 1995; 270:28887-91.

Hedley AA, Ogden CL, Johnson CL, Carroll MD, Curtin LR, Flegal KM Prevalence of overweight and obesity among US children, adolescents, and adults, 1999-2002. *Jama* 2004;291:2847-2850.

Heinrich, P. C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H. M., M"uller-Newen, G. and Schaper, F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem. J.* 2002; 374, 1–20.

Heim MH. The Jak-STAT pathway: specific signal transduction from the cell membrane to the nucleus. *Eur J Clin Invest* 1996; 26:1–12.

Herskind AM, McGue M, Sorensen TI, Harvald B Sex and age specific assessment of genetic and environmental influences on body mass index in twins. *International Journal of Obesity & Related Metabolic Disorders* 1996; 20:106-13

Ihle, I. N. and Kerr, I. M. Jaks and Stats in signalling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet.* 1995; 11, 69–74

Ihle, I. N. Cytokine receptor signalling. *Nature (London)* 1995;**377**, 591–594

James PT Obesity: the worldwide epidemic. *Clin Dermatol* 2004; 22:276-280

James PT, Leach R, Kalamara E, Shayeghi M The worldwide obesity epidemic. *Obes Res* 9 Suppl 2001; 4:228S-233S

Jiang, Y. *et al.* Common variants in the 5' region of the leptin gene are associated with body mass index in men from the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study. *Am. J. Hum. Genet.* 2004; 75, 220–230

Jun Liu Y., Rocha Sanchez S., Liu P., Long J., Lu Y., Elze L., Recker R., and wen Deng H., (2004). Tests of linkage and/or association of the LEPR gene polymorphisms with obesity phenotypes in Caucasian nuclear families. *Physiol. Genomics* 2004;17:101-106,

Kaszubska, W., Falls, H. D., Schaefer, V. G., Haasch, D., Frost, L., Hessler, P., Kroeger, P. E., White, D. W., Jirousek, M. R. and Trevillyan, J. M. Protein tyrosine phosphatase 1B negatively regulates leptin signaling in a hypothalamic cell line. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2002; 195, 109–118

Kitamura, T. *et al.* Forkhead protein FoxO1 mediates Agrp-dependent effects of leptin on food intake. *Nature Med.* 2006;12, 534—540

Knowler WC. Association of Trp64Arg mutation of the beta 3-adrenergic receptor gene with NIDDM. *Diabetologia* 1996; 39: 1411–1412.

Kopelman PG Obesity as a medical problem. *Nature* 2000; 404:635-643

Kuller LH, St Jeor ST, Dwyer J. Report of the American Institute of Nutrition (AIN) Steering Committee on Healthy Weight. Bethesda, MD, USA: American Institute of Nutrition; 1993.

Kurokawa N, Nakai K, Kameo S, Liu ZM, Satoh H. Association of BMI with the Beta3 Adrenergic Receptor Gene Polymorphism in Japanese: Meta-Analysis. *Obes Res* 2001; **9**: 741–745.

Lander ES. The new genomics: global views of biology. *Science* 1996; 274: 536-539.

Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409:860-921

Lee G, Li C, Montez J, Halaas J, Darvishzadeh J, Friedman JM. Leptin receptor mutations in 129 db3J/db3J mice and NIH facp/facp rats. *Mamm Genome* 1997; 8:445–7.

Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI, Friedman JM. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 1996; 379:632–5.

Le Stunff C, Le Bihan C, Schork NJ, Bougneres P A common promoter variant of the leptin gene is associated with changes in the relationship between serum leptin and fat mass in obese girls. *Diabetes* 2000; 49:2196–2200

Li WD, Reed RD, Lee JH, Xu W, Kilker RL, Sodam BR, Price RA Sequence variants in the 5' flanking region of the leptin gene are associated with obesity in women. *Ann Hum Genet* 1999; 63:227–234.

Lubrano-Berthelie C, Le Stunff C, Bougneres P, Vaisse C. A homozygous null mutation delineates the role of the melanocortin-4 receptor in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:2028-2032.

Lucantoni R., Ponti E, Berselli ME, Savia G, Minocci A, Caló G, De medici C, Liuzzi A, and Di blasio AM, (2000), The A19G Polymorphism in the 5' Untranslated Region of the Human Obese Gene Does Not Affect Leptin Levels in Severely Obese Patients. *J.C.E. & M.* 2000 Vol. 85 No. 10 3589-3591.

M. Barbany y M. Foz (2002). Obesidad: concepto, clasificación y diagnóstico. *ANALES Sis San Navarra* 2002, Vol. 25, Suplemento :7-16.

Maes HH, Neale MC, Eaves LJ. Genetic and environmental factors in relative body weight and human adiposity. *Behav. Genet.* 1997; 27:325-351.

Mammes O, Betoulle D, Aubert R, Giraud V, Tuzet S, Petiet A, Colas-Linhart N, Fumeron F Novel polymorphisms in the 5' region of the LEP gene: association with leptin levels and response to low-calorie diet in human obesity. *Diabetes* 1998; 47:487–489.

Mammes O, Betoulle D, Aubert R, Herbeth B, Siest G, Fumeron F Association of the G-2548A polymorphism in the 5' region of the LEP gene with overweight. *Ann Hum Genet* 2000; 64:391–394.

Martin N, Boomsma D, Machin G A twin-pronged attack on complex traits. *Nat Genet* 1997; 7:387-92

Mattevi VS, Zembruski VM, Hutz MH, Association of genes involved in the leptin-signaling pathway with obesity in Brazil. *International Journal of Obesity* (2002) 26, 1179-1185.

Mayeux, R. Mapping the new frontier: complex genetic disorders. *The J Clin of Inv* 2005; 115: 1404 – 1407.

Meyre D, Bouatia-Naji N, Tounian A, Samson C, Lecoecur C, Vatin V, Ghoussaini M, Wachter C, Hercberg S, Charpentier G, Patsch W, Pattou F, Charles MA, Tounian P, Clement K, Jouret B, Weill J, Maddux BA, Goldfine ID, Walley A, Boutin P, Dina C, Froguel P. Variants of ENPP1 are associated with childhood and adult obesity and increase the risk of glucose intolerance and Type 2 diabetes. *Nat Genet* 2005; **37**: 863–867.

Michelle Baker, Nicole Gaukrodger, Bongani M. Mayosi, Helen Imrie, Martin Farrall, Hugh Watkins, John M.C. Connell, Peter J. Avery, and Bernard Keavney Association Between

Common Polymorphisms of the Proopiomelanocortin Gene and Body Fat Distribution
diabetes, 2005; 54:2492-2496.

Myers, Jr, M. G. Leptin receptor signaling and the regulation of mammalian
physiology. *Rec. Prog. Horm. Res.* 2004; 59, 287–304

Newton, E. M. Linkage disequilibrium maps and association mapping. *Clin Inv* 2005; 115:
1425 – 1430.

NIH. National Heart, Lung and Blood Institute. Clinical Guidelines on the Identification and
Treatment of Overweight and Obesity in Adults: The evidence Report. National Institutes of
Health, USA. 1998.

Niswender, K. D. Intracellular signalling. Key enzyme in leptin-induced anorexia. *Nature* 2001;
413, 794—795

Niswender, K. D. Insulin activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the hypothalamic
arcuate nucleus: a key mediator of insulin-induced anorexia. *Diabetes* 2003; 52, 227—231

O'Brien P, Dixon J. Weight loss and late complications-the international experience. *Am J.
Surg* 2002; 184: 42S-45S.

Olaiz G, Rojas R, Barquera S, Shamah T, Aguilar C, Cravioto P, López P, Hernández M, Tapia R, Sepúlveda J. Encuesta Nacional de Salud 2000. Tomo 2. La salud de los adultos. Cuernavaca, Morelos, México. Instituto Nacional de Salud Pública, 2003.

Olaiz-Fernández G, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Rojas R, Villalpando-Hernández S, Hernández-Avila M, Sepúlveda-Amor J. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública, 2006.

Ott J Analysis of human genetic linkage. John Hopkins University Press, Baltimore 1991.

Paracchini V., Pedotti P. and Taioli E Genetics of Leptin and Obesity: A HuGe Review Am J Epidemiol 2005; 162:101-114

Perusse L, Bouchard C. Gene-diet interactions in obesity. Am J Clin Nutr 2000; 72(Suppl):1285S-1290S.

Perusse L, Rankinen T, Zuberi A, Yvon C, Chagnon S, Weisnagel J, Argyropoulos G, Walts B, Snyder EE, and Bouchard C. The human obesity gene map: the 2004 update. Obes. Res. 2005; 13:381-490.

Poggioli R, Vergoni AV, Bertolini A (1986) ACTH-(1-24) and alpha-MSH antagonize feeding behavior stimulated by kappa opiate agonists. Peptides 7:843-8

- Portolés O, Sorlí JV, Francés F, Coltell O, González JI, Sáiz C, Corella D. Effect of genetic variation in the leptin gene promoter and the leptin receptor gene on obesity risk in a population-based case-control study in Spain. *Eur. J Epidemiol.* 2006; 21(8):605-12.
- Raffin-Sanson M.L., de Keyzer Y. and Bertanga X. Proopiomelanocortin, a polypeptide precursor with multiple functions: from physiology to pathological conditions. *Europ J of End* 2003; 149 79-90.
- Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Argyropoulos G, Walts B, Perusse L, Bouchard C. The human obesity gene map: the 2005 update.
- Rice, T. *et al.* A genomewide linkage scan for abdominal subcutaneous and visceral fat in black and white families: The HERITAGE Family Study. *Diabetes* 2002 51, 848–855
- Risch N, Merikangas K The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 1996 273:1516-1517
- Riva, A. and Kohane, I. S. SNPper: retrieval and analysis of human SNP's. *Bioinformatics.* 2002; 18:1681 – 1685.
- Riva, A. Kohane, I. S. A SNP-centric database for the investigation of the human genome. *BMC Bioinformatics.* 2004; 5: 33 – 40.

Rossum C.T.M., Hoebee B., Baak M., Mars M. Saris Wim H.M. And Seidell J.C., Genetic Variation in the Leptin Receptor Gene, Leptin, and Weight Gain in Young Dutch Adults. Obesity Research Vol. 11 N. 3 March 2003, 377-386.

Sahu, A. Leptin signaling in the hypothalamus: emphasis on energy homeostasis and leptin resistance. Front. Neuroendocrinol. 2004; 24, 225–253

Sánchez-Castillo CP; Velásquez-Monroy O, Berber A, Lara-Esqueda A, Tapia-Conyers R, James WPT, and the Encuesta Nacional de Salud (ENSA) 2000 Working Group. Anthropometric cutoff points for predicting chronic disease in the Mexican National Survey 2000. Obes. Res 2003: 442-451.

Savioz A, Charnay Y, Huguenin C, Graviou C, Greggio B, Bouras C. Expression of leptin receptor mRNA (long form splice variant) in the human cerebellum. Neuroreport 1997; 8:3123–6.

Schulze TG, McMahon FJ Genetic association mapping at the crossroads: which test and why? Overview and practical guidelines. Am J Med Genet 2002; 114:1-11

Schwartz MW, Peskind E, Raskind M, Boyko EJ, Porte D Jr. Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans. Nat Med 1996; 2:589–93.

Schwartz M.: Nature, Volume 404(6778).April 6, 2000.661-671.

Sebastiani, P., Lazarus, R., Weiss, S. T. Minimal haplotype tagging. *Proc Nat Acad Sci*. 2003; 100:9900 – 9905.

SECRETARIA DE SALUD, 1993, Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas. Dirección de Epidemiología/Secretaria de Salud, México.

Seidell, JC and Flegal KM, Assessing obesity: classification and epidemiology. *Br Med Bull*, 1997. 53(2): 238-52.

Snyder EE, Walts B, Perusse L, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Rankinen T, Bouchard C. The human obesity gene map: the 2003 update. *Obes Res* 2004; 12:369-439.

Sorensen TI, Price RA, Stunkard AJ, Schulsinger F. Genetics of obesity in adult adoptees and their biological siblings. *BMJ* 1989; 298:87-90.

Spanswick, D., Smith, M. A., Mirshamsi, S., Routh, V. H. & Ashford, M. L. Insulin activates ATP-sensitive K_p channels in hypothalamic neurons of lean, but not obese rats. *Nature Neurosci*. 2000; 3, 757—758

Spielman RS, Ewens WJ. The TDT and other family-based test for linkage disequilibrium and association *Am J Hum Genet* 1996; 59:983-9.

Steinberger J, Jacobs DR, Raatz S, Moran A, Hong CP, Sinaiko AR Comparison of body fatness measurements by BMI and skinfolds vs. dual energy X-ray absorptiometry and their relation to cardiovascular risk factors in adolescents. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2005

Stitzel, NO., Binkowski, A., Tseng, YY., TopoSNP: a topographic database of non-synonymous single nucleotide polymorphisms with and without disease association. *Nucleic Acids Research*. 2004; 32: D520 – D522.

Strobel A, Issad T, Camoin L, Ozata M, Strosberg AD. A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nat Genet* 1998; 18: 213-5.

Stunkard AJ, Foch TT, Hrubec Z. A twin study of human obesity. *JAMA* 1986; 256:51-54.

Stunkard AJ, Sorensen TI, Hanis C, Teasdale TW, Chkraborty R, Schull WJ, Schulsinger F. An adoption study of human obesity. *N. Engl. J. Med.* 1986; 314:193-198.

Stunkard AJ, Harris JR, Pedersen NL, McClearn GE (1990) The body-mass index of twins who have been reared apart. *New England Journal of Medicine* 322:1483-1487

Sutton Beth S., Langefeld Carl D., Williams Adrienne H., Norris Jill M., Saad Mohammed F., Haffner Steven M., and Bowden Donald W. (2005). Association of Proopiomelanocortin Gene Polymorphisms with Obesity in IRAS Family Study. *Obesity Research* 2005;13 (N 9):1491-1498.

Suviolathi, E: The SLC6A14 gene shows evidence of association with obesity. *J. Clin. Invest.* 2003; 112, 1762-1772,

Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Identification and expression cloning of a leptin receptor, OBR. Cell 1995; 83:1263–71.

Terwilliger JD, Ott J A haplotype-based 'haplotype relative risk' approach to detecting allelic associations. Hum Hered 1992;42:337-346

Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). National Institutes of Health. NIH Publication No. 01-3670. May 2001.

Thompson D. B., Eric Ravussin, Peter H. Bennett and Clifton Bogardus, Structure and sequence variation at the human leptin receptor gene in lean and obese Pima Indians. Human Molecular Genetics, 1997, Vol. 6, No. 5 675–679.

Thornton JE, Cheung CC, Clifton DK, Steiner RA Regulation of hypothalamic proopiomelanocortin mRNA by leptin in ob/ob mice. Endocrinology 1997; 138:5063-6

Timo A. L. Tuomo Rankinen S. John Weisnagel, Yvon C. Chagnon, Hanna-Maaria Lakka, Olavi Ukkola, Normand Boulé, Treva Rice, Arthur S. Leon, James S. Skinner, Jack H. Wilmore, D.C. Rao, Richard Bergman, and Claude Bouchard (2004) Leptin and Leptin Receptor Gene Polymorphisms and Changes in Glucose Homeostasis in Response to Regular Exercise in Nondiabetic Individuals Diabetes, Vol. 53:1603-1607.

Triano RP & KM Flegal Overweight children and adolescents: description, epidemiology, and demographics. *Pediatrics* 1998;101, 497-504.

Valverde P, Healy E, Jackson I, Rees JL, Thody AJ Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nature Genetics* 1995;11:328-30

Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, The sequence of the human genome. *Science* 2001;291:1304-1351

Wang J, Liu R, Hawkins M, Barzilai N, Rossetti L. A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature* 1998; 393:684–8.

Wang T.N., Huang M., Chang W., Min-Shan A., Tsai E., Lui C.S., Lee C.H. and Ko Y.C., G-2548A Polymorphism of the *Leptin* Gene Is Correlated with Extreme Obesity in Taiwanese Aborigines. *Obesity* 2006;14:183-187.

Wauters M., Mertens I., Rankinen T. Chagnon M., Bouchard C. and Van Gaal L. Leptin Receptor Gene Polymorphisms Are Associated with Insulin in Obese Women with Impaired Glucose Tolerance. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2001;86 N. 7:3227-3232

Wauters M., Considine R.V., Chagnon M., Mertens I., Rankinen T. Bouchard C. and Gaal Luc F.V., Leptin Levels, Leptin Receptor Gene Polymorphisms, and Energy Metabolism in Women. *Obesity Research* 2002;10 N. 5, 394-400.

WHO Physical Status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. Geneva, Switzerland: World Health Organization (Technical Report Series, No. 854). 1995: 1-452.

Wilborn C., Beckham J., Campbell B., Harvey T., Galbreath M., La Bounty P., Nassar E., Wismann J., and Kreider R. Obesity: Prevalence, Theories, Medical Consequences, Management, and Research Directions. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*. 2005;2(2): 4-31,

Willett WC, Dietz WH, Colditz GA (1999) Guidelines for healthy weight. *N Engl J Med* 341:427-434

Yang Hypothalamic Glucose Sensor 1999;48, 1763–1772.

Yiannakouris N, Yannakouria M, Melistas L, Chan JL, Klimis-Zacas D, Mantzoros CS. The Q223R polymorphism of the leptin receptor gene is significantly associated with obesity and predicts a small percentage of body weight and body composition variability. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 4434-9.

Yong-Jun Liu, Sonia M.S. Rocha-Sanchez, Peng-Yuan Liu, Ji-Rong Long, Yan Lu, Leo Elze, Robert R. Recker and Hong-Wen Deng, Tests of linkage and/or association of the LEPR

gene polymorphisms with obesity phenotypes in Caucasian nuclear families. *Physiol. Genomics* 2004;17:101-106

Yuanneng Chen¹, Harold Snieder^{2, 4}, Xiaoling Wang², Bhavini Kaviya¹, Clare McCaffrey³, Tim D Spector⁴, Nicholas D Carter¹ and Sandra D O'Dell. Proopiomelanocortin gene variants are associated with serum leptin and body fat in a normal female population. *Eur J of Hum Genet* 2005;13: 772–780

Chagnon YC, Wilmore JH, Borecki IB, Gagnon J, Périusse L, Chagnon M, Collier GR, Leon AS, Skinner JS, Rao DC, and Bouchard C, Associations between the Leptin Receptor Gene and Adiposity in Middle-Aged Caucasian Males from the HERITAGE Family Study. *JCE & M*: 2000 ; 85:29-34.

Zabolotny, JM., Bence-Hanulec, KK., Stricker-Kongrad, A., Haj, F., Wang, Y., Minokoshi, Y., Kim, YB., Elmquist, JK., Tartaglia, LA., Kahn, BB. and Neel, BG. PTB1 regulates leptin signal transduction in vivo. *Dev. Cell* 2002; 2, 489–495

Zhan S, Ho SC. Meta-analysis of the association of the Trp64Arg polymorphism in the α -3 adrenergic receptor with insulin resistance. *Obes Res* 2005; **13**: 1709–1719.

Zhang, K., Qin, Z. S., Liu, j. S., Haplotype Block Partitioning and Tag SNP Selection Using Genotype Data and Their Applications to Association Studies. *Genome Research*. 2004; 14: 908 – 916.

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

El jurado designado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México aprobó esta tesis el día 12 de marzo del 2008 en la Ciudad de México D.F. para optar al Grado de Maestro en Ciencias Genómicas, al Biólogo Exp. José Alfredo Martínez Villagómez

Dra. Lorena Orozco Orozco _____

M. en C. Yolanda Saldaña Álvarez _____

Dra. Minerva Camacho Nuez _____

Dr. José Humberto Nicolini Sánchez _____