

## **Análisis de las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo q223r del gen receptor de la leptina en el estado de Sinaloa México**

Enrique Martínez\*´, Noemi García´, Eliakym Arámbula`` y Fred Luque``

´Ingeniería en Biotecnología, Universidad Politécnica de Sinaloa, Mazatlán Sinaloa;

´Laboratorio de Genética y Biología Molecular, Universidad Autónoma de Sinaloa, Culiacán, Sinaloa.

\*eromo@upsin.edu.mx

M. Ramos., V.Aguilera., (eds.).Ciencias Naturales y Exactas, Handbook -©ECORFAN- Valle de Santiago, Guanajuato, 2014.

## Abstract

Obesity is a risk factor for the development of several diseases such as hypertension, metabolic syndrome, diabetes mellitus type 1 and 2, cardiovascular diseases, among others. In Mexico, these diseases are very common and information about the polymorphisms in genes encoding proteins involved in lipid metabolism is poor. The aim of the study was to determine the frequency and analyze the distribution of Q223R polymorphism in the gene for leptin receptor LEPR. Q223R has been associated with obesity, diabetes mellitus and cancer. 102 unrelated individuals from Sinaloa state were studied. Genotyping was performed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) and genotype frequencies were obtained: AA (0.4059), AG (0.4852) and GG (0.1089) Allele frequencies for A (0.6485) and G (0.3515) were also determined.

## 1 Introducción

La obesidad y el sobrepeso se definen como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud. Una forma simple de medir la obesidad es el índice de masa corporal (IMC), esto es el peso de una persona en kilogramos dividido por el cuadrado de la talla en metros. Una persona con un IMC igual o superior a 30 es considerada obesa y con un IMC igual o superior a 25 es considerada con sobrepeso. El sobrepeso y la obesidad son factores de riesgo para numerosas enfermedades crónicas, entre las que se incluyen la diabetes, las enfermedades cardiovasculares y el cáncer (OMS, 2011). La obesidad es una condición muy común en sociedades industrializadas y su frecuencia se incrementa con rapidez. Su etiología es compleja y resulta del efecto combinado de genes, ambiente, estilo de vida y sus interacciones (Murugesan et al, 2010).

A nivel mundial, un estudio realizado por la Organización Mundial de la Salud mostro que 1500 millones de adultos de 20 y más años tenían sobrepeso. De esta cifra, más de 200 millones de hombres y cerca de 300 millones de mujeres eran obesos. En general, más de una de cada 10 personas de la población adulta mundial eran obesas. En 2010, alrededor de 43 millones de niños menores de cinco años de edad tenían sobrepeso (OMS, 2011).

En México, el sobrepeso y la obesidad son problemas que afectan a cerca de 70% de la población (mujeres, 71.9 %, hombres, 66.7%) entre los 30 y 60 años, en ambos sexos. Sin embargo, entre las mujeres existe un mayor porcentaje de obesidad –índice de masa corporal igual o mayor a 30– que entre los hombres. La prevalencia de obesidad en los adultos mexicanos ha ido incrementando con el tiempo. En 1993, resultados de la Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas mostraron que la prevalencia de obesidad en adultos era de 21.5%, mientras que con datos de la ENSA 2000 se observó que 24% de los adultos en nuestro país la padecían y, actualmente, con mediciones obtenidas por la ENSANUT 2006, se encontró que alrededor de 30% de la población mayor de 20 años (mujeres, 34.5 %, hombres, 24.2%) tiene obesidad. La prevalencia nacional de sobrepeso y obesidad en niños de 5 a 11 años, es de alrededor de 26%, para ambos sexos, 26.8% en niñas y 25.9% en niños, lo que representa alrededor de 4 158 800 escolares. Además, uno de cada tres hombres o mujeres adolescentes tiene sobrepeso u obesidad. Esto representa alrededor de 5 757 400 adolescentes en el país. Estas cifras deben tomarse en consideración sobre todo debido a que el sobrepeso y la obesidad son factores de riesgo importantes para el desarrollo de enfermedades crónicas, incluyendo las cardiovasculares, diabetes y cáncer (Olai-Fernández et al, 2006).

La leptina, una proteína de 16 kD, tiene una participación muy importante en la regulación del peso corporal actuando sobre el cerebro regulando el apetito, cuando se almacena suficiente energía en el tejido adiposo y el individuo está bien alimentado, las señales aferentes de adiposidad, entre ellas la leptina, se liberan en las unidades procesadoras neuronales centrales, en el hipotálamo donde las señales de adiposidad inhiben los circuitos anabólicos y activan los circuitos catabólicos.

Las ramas efectoras de estos circuitos centrales impactan a continuación en el balance energético inhibiendo la ingestión y promoviendo el gasto energético (Kane, 2005). La leptina está formada por 167 aminoácidos y esta codificada en el gen *LEP* cuyo locus es 7q31.3. El gen *LEP* mide aproximadamente 20 kb y está formado por 3 exones separados por 2 intrones. La leptina es expresada principalmente tejido adiposo, sin embargo, es posible encontrarla en otros tejidos como placenta, glándula mamaria, testículo, ovario, endometrio, estomago, hipotálamo, entre otros.

Defectos en la leptina causan graves casos de obesidad hereditaria en humanos y ratones (Kelesidis et al, 2010; Blüher et al, 2009).

Además de sus efectos en el peso corporal, la leptina tiene otras funciones que incluyen regulación de hematopoyesis, angiogénesis y las respuestas inmune e inflamatoria (OMIMa; Kelesidis et al, 2010; Blüher et al, 2009).

La leptina actúa a través de la unión con un receptor específico (LEPR) expresado en el cerebro y en tejidos periféricos. El LEPR es un receptor con solo dominio transmembrana de la familia de los receptores de citocinas que puede encontrarse en diversas formas de empalme alternativo. El gen mide 216503 pb y está formado por 20 exones (18 codificantes), su locus es 1p31. El LEPR es un miembro de la familia gp130 de receptores de citocinas los cuales estimulan la transcripción por medio de la activación de la proteína STAT citosólica (OMIMb; Kelesidis et al, 2010; Yiannakouris et al, 2001).

Diversos estudios han indagado la asociación entre diferentes polimorfismos del gen *LEPR* y obesidad con resultados contradictorios (Ben Ali et al, 2009). El polimorfismo Q223R ha mostrado algunos estudios una asociación significativa con la obesidad (Yiannakouris et al, 2001; Furusawa et al, 2010; Murugesan et al, 2010) sin embargo, en otros casos no se encontró dicha asociación (Stratigopoulos et al, 2009; Constantin et al, 2010). Lo anterior puede ser explicado por variaciones genéticas y/o ambientales entre las diferentes poblaciones de estudio y deja de manifiesto la necesidad de contar con la mayor información posible de la estructura genética de cada población. Por lo tanto, es importante conocer la frecuencia y distribución del polimorfismo Q223L en la población general Mexicana para poder realizar estudios de asociación entre dicho polimorfismo y enfermedades crónicas.

## 1.1 Materiales y métodos

### Extracción de DNA:

El DNA genómico se obtuvo a partir de sangre periférica total en tubos con EDTA como anticoagulante. Para la extracción, se utilizó el método de Miller que consta de lisis celular con SDS, precipitación proteica con NaCl y precipitación de DNA con etanol. El DNA extraído fue disuelto en una solución de TE (Tris-HCl y EDTA). La cuantificación y determinación de pureza del DNA se realizó por espectrofotometría y electroforesis en gel de agarosa.

### Genotipificación:

Se realizó mediante una PCR-RFLP utilizando los oligonucleótidos 5'CTTTAAGCTGGGTGTCCCAAATAGT 3' y 5'GAAGCCACTCTTAATACCCCGAGTA 3', sentido y anti-sentido respectivamente, y la enzima de restricción HpaII. Los fragmentos obtenidos de la digestión fueron analizados por electroforesis en gel de poliacrilamida. Todos los ensayos incluían un control negativo para descartar contaminación y los genotipos fueron interpretados por tres personas de forma independiente. Asimismo, se utilizaron como controles de digestión muestras previamente genotipificadas por secuenciación.

## Análisis estadístico:

Las frecuencias alélicas y genotípicas fueron obtenidas por conteo directo. El equilibrio de Hardy-Weinberg se evaluó a través de una prueba de X<sup>2</sup>.

### 1.2 Resultados y discusión

Se realizó la genotipificación de 102 individuos de la población general de Sinaloa y se encontraron los siguientes resultados:

- Homocigotos silvestres (AA): 41
- Heterocigotos (AG): 49
- Homocigotos mutados (GG): 11

Asimismo, la frecuencias alélicas encontradas son 0.6485 para A y 0.3515 para G.

A partir de las frecuencias genotípicas se evaluó el equilibrio de Hardy-Weinberg y se obtuvo una X<sup>2</sup> de 0.4161 que corresponde a valor p de 0.5189 por lo que el polimorfismo se encuentra en equilibrio para la población de estudio.

Los estudios de asociación con genes candidatos son muy relevantes en diversas áreas de la biología y medicina (clínica, farmacología, epidemiología, farmacogenómica, etc.).

A medida que aumente la cantidad de información de los genes candidatos y sus polimorfismos se incrementara también la posibilidad de realizar estudios de asociación de dichos factores genéticos con diferentes enfermedades y poblaciones con la finalidad de indagar su participación en la susceptibilidad o respuesta al tratamiento. Los polimorfismos del gen *LEPR*, como Q223R, han demostrado tener una participación importante en obesidad y diabetes mellitus, sin embargo, algunos resultados son contradictorios posiblemente debido a diferencias ambientales, culturales y genéticas entre las 4 poblaciones estudiadas. En la tabla 1 se muestran las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo Q223R en diversas poblaciones:

**Tabla 1.** Frecuencias alélicas y genotípicas para Q223R por población

Población	Genotipo AA, n (%)	Genotipo AG, n (%)	Genotipo GG, n (%)	Alelo A n (%)	Alelo G n (%)	Referencia
Noroeste de México (Sinaloa)	41 (40.59)	49 (48.52)	11 (10.89)	131 (64.85)	71 (35.15)	Este estudio
Centro de México (Guanajuato)	42 (40.78)	54 (52.43)	7 (6.80)	138 (66.99)	68 (33.01)	Guzfar-Mendoza 2005
Brasil	109 (31.14)	191 (54.57)	50 (14.29)	409 (58.43)	291 (41.57)	Duarte 2007
España	379 (43.92)	381 (44.15)	103 (11.94)	1139 (65.99)	587 (34.01)	Portolés 2006
España	61 (47.29)	52 (40.31)	16 (12.40)	186 (67.44)	84 (32.56)	Marti 2009
Euro-americanos	69 (37.00)	78 (42.00)	39 (21.00)	219 (58.06)	156 (41.94)	Podolsky 2007
EUA	12 (33.33)	18 (50.00)	6 (16.67)	42 (58.33)	30 (41.67)	Ragin 2009
Inglaterra	234 (31.03)	387 (51.33)	133 (17.64)	855 (56.70)	653 (43.30)	Willett 2005
Reino Unido	101 (35.82)	131 (46.45)	50 (17.73)	333 (59.04)	231 (40.96)	Rand 2001
Republica Checa	51 (27.57)	94 (50.81)	40 (21.62)	196 (52.97)	174 (47.03)	Bienertova 2008
Turquía	157 (39.25)	202 (50.50)	41 (10.25)	516 (64.50)	284 (35.50)	Mergen 2007
Japón	15 (2.71)	134 (24.23)	404 (73.06)	164 (14.83)	942 (85.17)	Endo 2000

### 1.3 Conclusiones

Se analizaron un total de 102 muestras y se obtuvieron las frecuencias genotípicas para AA (0.4059), AG (0.4852) y GG (0.1089) del polimorfismo Q223R en el gen *LEPR* de población general del Estado de Sinaloa México. Asimismo se determinaron las frecuencias alélicas para A (0.6485) y G (0.3515). El polimorfismo Q223R se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg para la población estudiada.

### 1.4 Agradecimientos

El trabajo fue apoyado por el PROMEP a través del proyecto 103.5/11/6727.

### 1.5 Referencias

Ben Ali S, Kallel A, Sediri Y, Ftouhi B, Feki M, Slimene H, Jemaa R, Kaabachi N. (2009). *LEPR* p.Q223R Polymorphism influences plasma leptin levels and body mass index in Tunisian obese patients. *Arch Med Res*, 40(3), 186-90.

Blüher S, Mantzoros CS. (2009). Leptin in humans: lessons from translational research. *Am J Clin Nutr*, 89(3), 991S-997S.

Constantin A, Costache G, Sima AV, Glavce CS, Vladica M, Popov DL. (2010). Leptin G-2548A and leptin receptor Q223R gene polymorphisms are not associated with obesity in Romanian subjects. *Biochem Biophys Res Commun*, 391(1), 282-6.

Furusawa T, Naka I, Yamauchi T, Natsuhara K, Kimura R, Nakazawa M, Ishida T, Inaoka T, Matsumura Y, Ataka Y, Nishida N, Tsuchiya N, Ohtsuka R, Ohashi J. (2010). The Q223R polymorphism in *LEPR* is associated with obesity in Pacific Islanders. *Hum Genet*, 127(3), 287-94.

Kelesidis T, Kelesidis I, Chou S, Mantzoros CS. (2010). Narrative review: the role of leptin in human physiology: emerging clinical applications. *Ann Intern Med*, 152(2), 93-100.

Kane AB and Kumar V. Capítulo 9 en *Patología estructural y funcional* de Robbins y Cotran. 7ed, Año: 2005 Editorial: Elsevier.

Murugesan D, Arunachalam T, Ramamurthy V, Subramanian S. (2010). Association of polymorphisms in leptin receptor gene with obesity and type 2 diabetes in the local population of Coimbatore. *Indian J Hum Genet*, 16(2), 72-7.

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.

OMIM(a), Online Mendelian Inheritance in Man: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/164160> . 15 de marzo de 2011..

OMIM(b), Online Mendelian Inheritance in Man: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/601007>. 15 de marzo de 2011. 6 Organización Mundial de la Salud, OMS. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/index.html>. Consultado: 14 de Julio de 2011.

Stratigopoulos G, LeDuc CA, Matsuoka N, Gutman R, Rausch R, Robertson SA, Myers MG Jr, Chung WK, Chua SC Jr, Leibel RL. (2009). Functional consequences of the human leptin receptor (LEPR) Q223R transversion. *Obesity (Silver Spring)*, 17(1), 126-35.

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