

POLIMORFISMOS G2548A DEL GEN DE LEPTINA Y GLN223ARG DEL GEN DEL RECEPTOR DE LEPTINA EN PRE-PÚBERES CON RIESGO CARDIOMETABOLICO

María Fátima Garcés (1), Bárbara Gomes (2), Hilda Stekman (3),
Celsy Hernández (4), Ana López (5), Ingrid Soto de Sanabria (5)

Recibido: 27-05-2016
Aceptado: 17-06-2016

RESUMEN

La obesidad resulta de los efectos combinados de los genes, el ambiente y el estilo de vida. La leptina (LEP) y el receptor de leptina (LEPR) son genes que han sido evaluados en la búsqueda de variantes que podrían estar relacionadas con la obesidad y sus complicaciones cardiometabólicas. Objetivo: Evaluar la posible asociación entre los polimorfismos G2548A del gen LEP y Gln223Arg del gen LEPR con el desarrollo de obesidad y resistencia a la insulina (RI) en niños y adolescentes pre-púberes. Métodos: Se estudiaron 314 niños de 2-11 años, clasificados según los parámetros antropométricos y bioquímicos en: a) sobrepeso/obesos sin RI (n=133), b) sobrepeso/obesos con RI (n=75) y c) controles sanos (n=70). La genotipificación fue realizada por reacción en cadena de la polimerasa-polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP); se estudiaron las asociaciones entre genotipo y riesgo, y se compararon los promedios de las medidas antropométricas y bioquímicas. Resultados: La frecuencia genotípica para el polimorfismo G2548A del gen LEP fue 51% G/A, 33% G/G y 16% A/A; para el polimorfismo Gln223Arg del gen LEPR fue Gln/Arg 49%, Gln/Gln 31% y Arg/Arg 20%. Se encontró diferencia significativa en la distribución de los diferentes genotipos del gen de LEPR en los niños con sobrepeso/obesidad y RI con respecto al grupo control (OR= 2,6; IC 95%=1,17-5,75; $p < 0.05$). Conclusión: Se observó una asociación entre la presencia del genotipo Gln/Gln del gen LEPR con la RI (factor de riesgo cardiometabólico), presentando los niños con sobrepeso/obesidad y RI 2,6 veces más riesgo a presentar RI.

Palabras clave: Obesidad, Resistencia a la Insulina, Polimorfismos genéticos, Leptina, LEP, Receptor de Leptina, LEPR.

POLYMORPHISM G2548A IN LEPTIN AND GLN223ARG IN THE LEPTIN RECEPTOR GENE IN PREPUBERTAL CHILDREN WITH CARDIOMETABOLIC RISK

SUMMARY

Obesity is a result of the combined effects of genes, environment and lifestyle. The Leptin (LEP) and leptin receptor (LEPR) are genes that have been extensively evaluated in search for variants that may be associated with obesity and cardiometabolic complications. Objective: To evaluate the possible association between polymorphisms G2548A of the LEP gene and Gln223Arg of the LEPR gene with the development of obesity and insulin resistance (IR) in prepubertal children and adolescents. Methods: We studied 314 children 2-11 years, grouped by anthropometric and biochemical parameters: a) overweight/obese without IR (n = 133), b) overweight/obese with IR (n = 75) and c) healthy controls (n = 70). Genotyping was performed by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphisms (PCR-RFLP) method. Genotype-risk associations were studied. We then compared the average values for anthropometric and biochemical parameters. Results: The genotypic frequency for polymorphism G2548A of LEP gene was 51% for the G/A genotype, 33% G/G and 16% A/A genotype; for polymorphism Gln223Arg of LEPR gene was of Gln/Arg 49%, Gln/Gln 31% and Arg/Arg 20%. Significant difference was found in the distribution of different genotypes of the LEPR gene in children with overweight/obesity with IR compared to the control group (OR = 2.6; 95% CI = 1.17 to 5.75; $p < 0.05$). Conclusion: We observed an association between the presence of Gln/Gln genotype of the LEPR gene with insulin resistance (cardiometabolic risk factor) children, rendering these children with overweight/obese with IR 2.6 times more likely to be with insulin.

Key words: Obesity, insulin resistance, genetic polymorphisms, leptin, LEP, leptin receptor LEPR

1. Licenciada en Bioanálisis. Dra. en Ciencias mención Bioquímica. Profesor Asociado Cátedra de Bioquímica "A" Escuela de Bioanálisis. Coordinador Laboratorio de Investigaciones Básicas y Aplicadas. Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas.
2. Licenciada en Bioanálisis. Laboratorio de Investigaciones Básicas y Aplicadas, Facultad de Medicina, Escuela de Bioanálisis, Universidad Central de Venezuela, Caracas.
3. Licenciada en Bioanálisis. MSc. en Ciencias mención Inmunología. Laboratorio de Investigaciones Básicas y Aplicadas, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas.
4. Licenciada en Bioanálisis. Profesor Agregado Cátedra de Bioquímica "B" Escuela de Bioanálisis. Laboratorio de Investigaciones Básicas y Aplicadas, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas.
5. Médico Pediatra. Servicio de Nutrición, Crecimiento y Desarrollo del Hospital de Niños J.M. de los Ríos, Caracas.

Premio Nacional de Pediatría.

LXII Congreso Nacional de Pediatría. Mayo 2016

Autor corresponsal: Dra. María Fatima Garcés
Teléfonos: 0212-6053308 / 0414-1363868, Fax 0212-6053312
Correo electrónico: mariafatimagarcés@hotmail.com

INTRODUCCION

La obesidad es una enfermedad multifactorial causada por la acumulación de grasa excesiva que resulta de un balance positivo entre el consumo de energía total y el catabolismo de las grasas (1). Durante las últimas décadas se ha convertido en una epidemia de alta incidencia en la población mundial, principalmente en las sociedades desarrolladas, en las que la abundancia de alimentos altamente energéticos, aunada a una disminución en la actividad física originada por el gran desarrollo tecnológico, han sido determinantes. La obesidad surge de una compleja interacción entre la variación genética, el medio ambiente y los cambios de estilo de vida (1).

Los niños obesos y con sobrepeso tienden a seguir siendo obesos en la edad adulta y tienen más probabilidades de desa-

rollar a edades más tempranas enfermedades no transmisibles tales como: hipertensión arterial, perfil lipídico anormal, resistencia a la insulina, DT2, enfermedad cardiovascular aterosclerótica (2-7). El sobrepeso, la obesidad y las enfermedades conexas son en gran medida prevenibles, es por ello que hay que dar una gran prioridad a la prevención de la obesidad infantil.

La leptina (LEP) es una hormona secretada principalmente por el tejido adiposo blanco, regula la ingesta de alimentos, la temperatura corporal y la homeostasis de energía a través de la interacción con el receptor de leptina (LEPR) expresada en el hipotálamo (8,9). La disminución de la capacidad de la leptina para regular el de apetito y la ganancia de peso corporal, se conoce como resistencia a la leptina, que puede conducir a fenotipos relacionados con la obesidad (10). Los defectos en el transporte de la leptina, a través de la barrera sangre-cerebro, en la señalización de LEPR y en las vías neuronales implicadas en la regulación de la homeostasis de la energía son algunos de los mecanismos implicados en la resistencia a la leptina (10).

Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en la leptina (LEP) y el receptor de leptina (LEPR) han demostrado estar relacionado con marcadores metabólicos relacionados con la obesidad y el fenotipo (11,12). Los estudios han sugerido que SNPs rs7799039 LEP (-2548G> A) y rs1137101 LEPR (Gln223Arg), están asociados con adiposidad, aumento del índice de masa corporal, ganancia de peso, hiperleptinemia o predisposición a la resistencia a la leptina en diferentes poblaciones (13-17).

Teniendo en cuenta estos antecedentes se exploró el papel de los polimorfismos -2548G> del gen LEP y Gln223Arg del LEPR en la susceptibilidad genética para el desarrollo de obesidad y resistencia a la insulina, en un grupo de niños pre-púberes.

MÉTODOS

El presente trabajo corresponde a un estudio descriptivo y correlacional de un grupo de niños pre-púberes con factores de riesgo para enfermedad cardiometabólica (obesidad, resistencia a la insulina y/o dislipidemias) y niños sanos.

Normas de bioética: El protocolo del estudio se realizó bajo las normas de ética establecidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para trabajos de investigación en humanos y la declaración de Helsinki ratificada por la 29th World Medical Assembly, Tokio 1995. Contó con la aprobación del Comité de Bioética de la institución y con el consentimiento informado de los padres o representantes de los niños del estudio.

Población de estudio: Estuvo conformada por 314 niños y adolescentes pre-púberes agrupados en 118 niñas y 196 niños, con edades comprendidas entre 2-11 años, con maduración sexual Tanner I determinado por las características de glándula mamaria, vello axilar y pubiano en las niñas, y genitales,

vello axilar y pubiano en los varones (18). Los niños con sobrepeso u obesidad acudieron al Servicio de Nutrición Crecimiento y los niños aparentemente sanos normopeso al Triaje del Hospital "Dr. J.M de los Ríos", de Caracas.

Los niños fueron clasificados según las variables antropométricas y bioquímicas en 3 grupos: a) grupo de niños con sobrepeso/obesidad exógena según el diagnóstico nutricional integral dado por signos clínicos y antropométricos de dimensión y composición corporal: Índice de Masa Corporal (IMC), Peso/Talla, Área Grasa, sin resistencia a la insulina. b) grupo de niños con sobrepeso/obesidad y resistencia a la insulina según los resultados obtenidos de glicemia e insulina en ayunas y aplicando el modelo de registro homeostático (HOMA IR = Insulina (mU/L) x Glicemia (mmol/L) / 22.5, se consideró RI si el HOMA > 3,0) (19); y c) grupo de niños control (normopeso, sin alteraciones bioquímicas, ni inmunológicas).

A cada niño del protocolo con sobrepeso/obesidad y niño sano, se le extrajo una muestra de 10 ml de sangre en ayunas (de 8 – 10 horas aproximadamente) de la vena antecubital para la determinación inmediata de glicemia basal y una parte de la muestra se centrifugó y se almacenó a -20°C hasta el posterior procesamiento. A los niños con sobrepeso/obesidad se les suministró una carga de glucosa oral (Glycolab®) a razón de 1,75 mg/kg de peso en 5 minutos, hasta una dosis máxima de 75 g de glucosa. Los participantes se mantuvieron en reposo; transcurridas dos horas se procedió nuevamente a extraer 5 ml de sangre que correspondió a la muestra postcarga para la determinación inmediata de glicemia y posterior de insulina.

Criterios de exclusión: Niños desnutridos, con infecciones agudas o crónicas, evidencia de inmunodeficiencia primaria o secundaria y obesidad endógena.

Evaluación y diagnóstico nutricional antropométrico: Todos los niños fueron pesados y tallados siguiendo las técnicas antropométricas del Programa Internacional de Biología (20). Para la evaluación antropométrica de la malnutrición por exceso se consideraron los siguientes indicadores: Peso/talla, IMC/edad, y Área Grasa/edad. La ubicación de estas variables se realizó en los gráficos correspondientes a la OMS y al Estudio Transversal de Caracas (empleados en el Servicio de Nutrición) (21) considerando como puntos límites: sobrepeso \geq p.90 -<p.97, obesidad \geq p.97 para ambas referencias. La intensidad de la Obesidad se determinó por el porcentaje de exceso de peso ideal para la talla: Sobrepeso >10% a 20%, Obesidad leve >20% a 30%, Obesidad Moderada >30% a 40% y Obesidad Grave >40% (22,23)

Evaluación socioeconómica: Se estimó la condición socio-económica de las familias de procedencia de los niños empleando el método Graffar-Méndez Castellano (24).

Recolección y procesamiento de muestras sanguíneas: A cada niño se le extrajo con jeringa estéril 8 mL de sangre total que se colocó en un tubo con anticoagulante EDTA y un tubo sin anticoagulante. Las muestras sin anticoagulante fue cen-

trifugada en un lapso no mayor de 30 minutos a 3000 xg en una centrifuga refrigerada a 4°C por 15 min y el suero congelado a -20°C hasta su procesamiento. Las muestras con anti-coagulante fueron conservadas en refrigerador a una temperatura no mayor de los 8°C hasta realizar la extracción del ADN.

Determinaciones de laboratorio: Se determinó glucosa, colesterol y triglicéridos empleando un equipo automatizado marca DuPont Dimension XL (DuPont companies, New Town, Escocia). Electroforesis de colesterol en equipo automatizado de Helena Laboratories SAS-1 (Helena Laboratories, Texas, USA). Empleando inmunoensayo enzimático adsorbente (ELISA), se determinó Insulina (DRG International, Marburg, Alemania). Los criterios de clasificación para las variables bioquímicas estudiadas se muestran en la Tabla 1.

Genotipificación: Se realizó extracción de ADN de las muestras por el método de "Bunce" (28) modificado y almacenadas a -20°C hasta la amplificación del ADN, la cual fue realizada por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en un termociclador (Lab Cycler de Senso Quest, Alemania). La amplificación del gen LEP se realizó por la técnica descrita por Boumaizai et al (29) que emplea

los siguientes primers: Forward 5'-TTT CTG TAA TTT TCC CGT GAG-3' y Reverse 5'-AAA GCA AAG ACA GGC ATA AAA A-3' que abarcan una región de 242 pares de bases y para el gen LEPR la técnica descrita por Durte et al (30) que emplea los siguientes primers: Forward 5'-ACC CTT TAA GCT GGG TGT CCC AAA TAG-3' y Reverse 5'-AGC TAG CAA ATA TTT TTG TAA GCA ATT-3' que abarcan una región de 416 pares de bases. Ambas PCR utilizan un volumen final de 25 µL, que contiene 0.4 µg de ADN genómico, 1,5 mmol/L de MgCl, 0,2 mmol/L de dNTPs, 0,4 µmol de cada primer, 5µL Buffer 5x Green (PROMEGA) y 1.25 U de Taq Polimerasa (PROMEGA). Las condiciones de la PCR constan de los siguientes pasos: desnaturalización a 94°C por 10 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización de 94 °C por 45 segundos, alineamiento a 52°C por 45 segundos, extensión a 72°C por 45 segundos y una extensión final a 72°C por 10 minutos.

La calidad del producto de amplificación fue verificada mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2%, en la cual se agregarán 8 µl del producto de PCR con 2 µL de búfer de carga, en búfer TAE 1x y coloreado con SYBR® SAFE, además de un ADN ladder de 25pb como marcador molecular y un control negativo.

Los polimorfismos fueron detectados a través de una RFLP (polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción), utilizando para el gen LEP la enzima de restricción HhaI y para el gen LEPR la enzima MspI. Las muestras digeridas fueron separadas por electroforesis en gel de poli-acrilamida y visualizadas por tinción con nitrato de plata y visualizadas en un sistema de fotodocumentación digital, equipo Uvitec (Gel Documentation Uvitec Limited, USA).

Análisis Estadístico

Los resultados se expresaron como la media (\bar{X}) más o menos una desviación estándar ($\bar{X} \pm 1DS$), se empleó el programa Excel 2007 (Copyright Microsoft Office, Washington, USA) para estadística descriptiva. La frecuencia alélica (FA) y frecuencia genotípica (FG) del gen en estudio, fue obtenida por contaje directo a partir de los fenotipos asignados a cada individuo. Las comparaciones entre variables se hicieron empleando la prueba ANOVA, se consideró la diferencia como estadísticamente significativa cuando $p < 0,05$. Para el análisis estadístico se usaron tablas de contingencia simple, evaluando la asociación entre las variables del estudio y el polimorfismo Gly972Arg por Chi2 y odds ratio (OR). Para determinar las relaciones entre alelos del gen estudiado y la enfermedad también se realizaron pruebas de ANOVA, evaluando la asociación entre las variables del estudio y el alelo del gen mencionado. Se consideró como significativo un p-valor $< 0,05$.

Tabla 1. Criterios de Clasificación de Parámetros Bioquímicos

Parámetro	Referencia	Criterio Diagnóstico
Glucosa en ayunas	Asociación Americana de Diabetes (ADA)(25)	Normoglucemia: glucemia menor a 100 mg/dL.
		Alteración de la glucemia en ayunas (AGA): glucemia entre 100 mg/dL y 126 mg/dL.
		Alteración de la tolerancia a la glucosa (ATG): glucemia 2 horas después de sobrecarga oral de glucosa entre 140 mg/dL y 199 mg/dL.
Colesterol Triglicéridos	Fundacredesa, Proyecto Venezuela (26)	En rango normal: igual o mayor al Percentil 10 y menor a p.75.
		En zona de riesgo: igual o mayor a p.7575 y menor a p.90.
		En rango elevado: igual o mayor a p.90
LDL-c	Panel de expertos del Programa Nacional de enseñanzas sobre Colesterol para niños y adolescentes (27)	Aceptable: menos de 110 mg/dL
		Límite: Entre 110 mg/dL y 129 mg/dL
		Alto: Igual o mayor a 130 mg/dL
HDL-c	Panel de Expertos del Programa Nacional de Enseñanzas sobre Colesterol para Niños y Adolescentes (27).	Adecuado: igual o mayor a 35 mg/dL

RESULTADOS

En la Tabla 2 se presentan las características fenotípicas de los niños participantes en el estudio en cuanto a niveles de: glucemia, colesterol total y fraccionado, triglicéridos e insulina, representándose los valores como media \pm desviación estándar.

De acuerdo al análisis de los parámetros mencionados y al índice HOMA, los niños fueron clasificados en 3 grupos: niños controles, niños con sobrepeso/obesidad sin resistencia a la insulina y niños con sobrepeso/obesidad y resistencia a la insulina. Como se aprecia en la Tabla 1 la concentración de glucosa basal de los niños con sobrepeso/obesidad y resistencia a la insulina fue significativamente mayor con respecto al grupo de niños control con un $p < 0,05$. De la misma manera, la concentración de insulina basal de los niños con sobrepeso/obesidad sin resistencia y con resistencia a la insulina fue $9,18 \pm 3,24 \mu\text{UI/mL}$ y $20,74 \pm 8,64 \mu\text{UI/mL}$, respectivamente, dichos valores son significativamente mayores ($p < 0,001$) respecto al grupo de niños control que posee $7,29 \pm 2,48 \mu\text{UI/mL}$. El valor de HOMA de los niños con sobrepeso/obesidad sin/con resistencia a la insulina fue también significativamente superior respecto a los niños control ($p < 0,001$).

Las concentraciones de colesterol total, LDLc, VLDLc y triglicéridos se encontraron significativamente incrementados en los niños con obesidad sin/con resistencia a la insulina respecto a las concentraciones de niños control con un $p < 0,001$. La concentración de HDLc de los niños con sobrepeso/obesidad sin/con resistencia a la insulina fue significativamente menor con $p < 0,05$ respecto al grupo de niños control.

Del total de niños con algún grado de obesidad se encontró que 50% presenta obesidad grave, seguido de 24% que presenta obesidad moderada, 14% obesidad leve y 12% sobrepeso.

Tipificación de la variante G2548A del gen de Leptina (LEP)

En la figura 1 se visualizan los productos amplificados correspondientes a la región del gen LEP que posee la variante G2548A.

Posteriormente, los productos amplificados fueron digeridos con la enzima de restricción HhaI (PROMEGA), visualizándose en geles de poliacrilamida al 10%, coloreado con nitrato de plata. Se observaron tres bandas: 61 pb, 181 pb, 242 pb. La visualización de las tres bandas (61 pb, 181 pb, 242 pb) corresponde al genotipo heterocigoto G/A, cuando solo se observan dos bandas (61 pb y 181 pb) se corresponde con el genotipo Homocigoto G/G y cuando solo se observó una banda (242 pb) se corresponde con el genotipo Homocigoto A/A (Figura 2).

Frecuencia del Polimorfismo G2548A del gen LEP

En el grupo estudiado la distribución genotípica del polimorfismo G2548A del gen LEP, se encontró en equilibrio de Hardy Weinberg ($X^2 = 0,968$ $p = 0,325$).

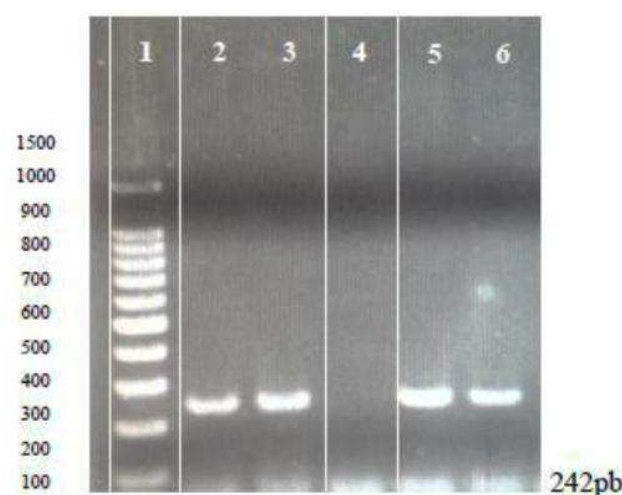


Figura 1. Visualización de los productos amplificados correspondientes al gen LEP, mediante electroforesis en gel de agarosa al (2%) en buffer TBE 1X, coloreado con SYBR@SAFE. El pozo número 1 corresponde al marcador molecular (MP) de 100 pb (PROMEGA). Los carriles 2, 3, 5 y 6 corresponden a los productos amplificados (242 pb) y el pozo 4 corresponde al control negativo.

Tabla 2. Características bioquímicas de los niños en estudio por grupo

Parámetros	Niños control (n=72)	Niños con sobrepeso/obesidad sin RI (n=152)	Niños con sobrepeso/obesidad y RI (n=90)
Glucosa Basal (mg/dL)	85,79 \pm 7,28	84,31 \pm 9,20	92,18 \pm 23,13**
Glucosa Post Prandial (mg/dL)	----	91,45 \pm 14,51	92,79 \pm 17,19
Insulina Basal ($\mu\text{UI/mL}$)	7,29 \pm 2,48	9,18 \pm 3,24*	20,74 \pm 8,64*
Insulina Post Prandial ($\mu\text{UI/mL}$)	----	32,85 \pm 21,96	50,41 \pm 26,11
HOMA	1,55 \pm 0,55	1,89 \pm 0,69	4,67 \pm 2,08*
Colesterol (mg/dL)	139,19 \pm 25,65	163,41 \pm 39,87*	171,64 \pm 39,85***
HDL-c(mg/dL)	44,54 \pm 10,76	39,63 \pm 10,85**	41,05 \pm 14,00**
VLDL-c (mg/dL)	12,19 \pm 4,57	17,25 \pm 10,21*	22,58 \pm 12,23*
LDL-c (mg/dL)	82,47 \pm 20,79	106,78 \pm 3,63*	108,47 \pm 37,71*
TG (mg/dL)	60,93 \pm 22,87	86,27 \pm 51,06*	114,16 \pm 60,30*

* $p < 0,001$ con respecto al grupo control ** $p < 0,05$ con respecto al grupo control

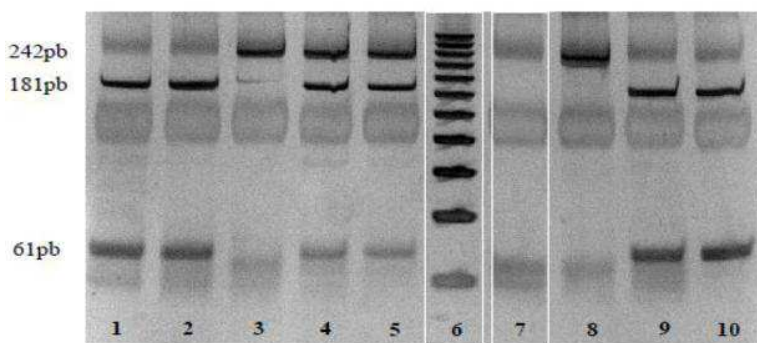


Figura 2. Visualización de los productos obtenidos de la digestión del producto amplificado de 242 pb del gen LEP con la enzima HhaI, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (10%) en buffer TBE 1X. El carril número 6 corresponde al marcador molecular (MP) de 25 pb (PROMEGA). El carril 7 corresponde al control negativo. Los carriles indicados como 3 y 8 corresponde al genotipo Homocigoto A/A, los carriles 1,2,9,10 corresponde al genotipo Homocigoto G/G y los carriles 4 y 5 se corresponden con el genotipo Heterocigoto G/A.

Tabla 3. Frecuencias genotípicas y alélicas del gen LEP en los grupos de niños en estudio.

Grupos en estudio	Niños control (n=72)	Niños con Sobrepeso/obesidad sin RI (n=134)	Niños con Sobrepeso/obesidad y RI (n=84)	Total (n=290)
GENOTIPO				
G/G	28% (20)	34% (45)	36% (30)	33% (95)
G/A	54% (39)	48% (65)	53% (45)	51% (149)
A/A	18% (13)	18% (24)	11% (9)	16% (46)
ALELO				
G	55% (79)	58% (155)	62% (105)	58% (339)
A	45% (65)	42% (113)	38% (63)	42% (241)

NOTA: Los valores mostrados entre paréntesis representan el número de veces que se repite el alelo o el número de individuos portadores del genotipo para el sitio polimórfico estudiado. La frecuencia está expresada en porcentaje.

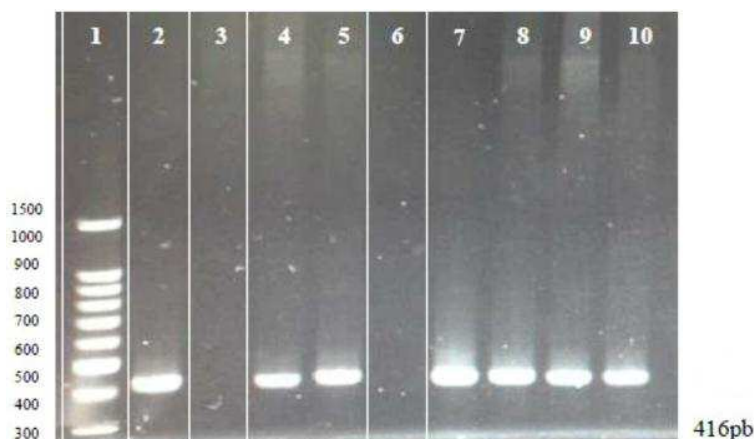


Figura 3. Visualización de los productos amplificados correspondientes al gen LEPR, mediante electroforesis en gel de agarosa al (2%) en buffer TBE 1X, coloreado con SYBR®SAFE. El carril número 1 corresponde al marcador de peso molecular (MP) de 100 pb (PROMEGA). Los carriles 3 y 6 corresponden a los controles negativos. Los carriles 2,4,5,7,8, 9 y 10 corresponden a los productos amplificados del gen LEPR (416 pb).

Como se observa en la Tabla 3, en los tres grupos de niños tipificados genotípicamente, se encontró la presencia de los tres genotipos posibles (G/G, G/A, A/A), presentando el genotipo G/A la mayor frecuencia (51%), seguido por el genotipo G/G (33%), el genotipo con la menor frecuencia fue el A/A (16%).

Se observó que no existe una diferencia significativa en la distribución de los alelos G y A entre los niños con sobrepeso/obesidad sin/con RI y el grupo de niños control. La frecuencia del alelo G para los niños control, niños con sobrepeso/obesidad sin RI y niños con sobrepeso/obesidad y RI fue de 55%, 58% y 62%, respectivamente. En contraste a la frecuencia del alelo A que fue menor en cada uno de los grupos de niños en estudio, fue de 45%, 42% y 38%, en niños control, niños con sobrepeso/obesidad sin RI y niños con sobrepeso/obesidad y RI, respectivamente. El alelo de riesgo A no parece conferir riesgo para el desarrollo de obesidad (OR= 0,886; IC 95% = 0,58-1,36 ; p>0,05), ni resistencia a la insulina (OR= 0,729; IC 95% = 0,45-1,18 ; p>0,05) en el grupo de niños estudiados.

Tipificación de la variante Gln223Arg del gen del Receptor de Leptina (LEPR)

En la figura 3 se visualizan los productos correspondientes a la región del gen LEPR que posee la variante Gln223Arg.

Posteriormente, los productos amplificados fueron digeridos con la enzima de restricción MspI (PROMEGA), visualizándose en geles de poliacrilamida al 10%, coloreado con nitrato de plata. Se observaron tres bandas: 124 pb, 292 pb y 416 pb. La visualización de las tres bandas (124 pb, 292 pb, 416 pb) corresponde al genotipo Heterocigoto Gln/Arg, cuando solo se observaron dos bandas (124 pb y 292 pb) se corresponde con el genotipo Homocigoto Arg/Arg y cuando solo se observó una banda (416 pb) se corresponde con el genotipo Homocigoto Gln/Gln (Figura 4).

Frecuencia del Polimorfismo G2548A del gen LEP

En el grupo estudiado la distribución genotípica del polimorfismo G2548A del gen LEP, se encontró en equilibrio de Hardy Weinberg ($X^2= 0,076$ p = 0,783).

En la Tabla 4, se muestra que en los tres grupos de niños tipificados genotípicamente, se observó la presencia de los tres genotipos posibles Gln/Gln, Gln/Arg y Arg/Arg, presentando el genotipo Gln/Arg la mayor frecuencia (49%), seguido por el genotipo Gln/Gln (31%), el genotipo con la menor frecuencia fue el Arg/Arg (20%). Se muestra en

Tabla 4. Frecuencias genotípicas y alélicas de LEPR en los grupos de niños en estudio.

Grupos en estudio	Niños control (n=70)	Niños con sobrepeso/obesidad sin RI (n=133)	Niños con Sobrepeso/obesidad y RI (n=75)	Total (n=278)
GENOTIPO				
Gln/Gln	21% (15)	31% (41)	41% (31)	31% (87)
Gln/Arg	60% (42)	48% (64)	39% (29)	49% (135)
Arg/Arg	19% (13)	21% (28)	20% (15)	20% (56)
ALELO				
Gln	51% (72)	55% (146)	61% (91)	56% (309)
Arg	49% (68)	45% (120)	39% (59)	44% (247)

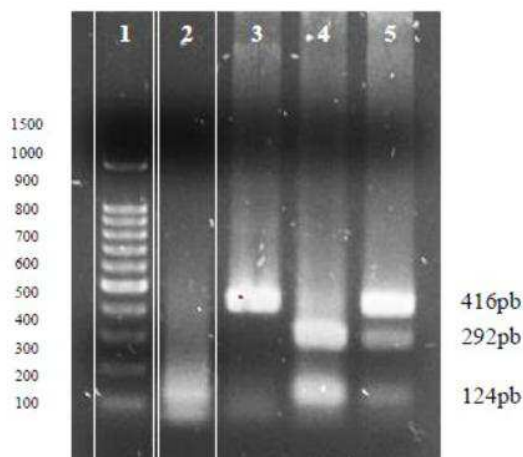


Figura 4. Visualización de los productos obtenidos de la digestión del producto amplificado de 416 pb del gen LEPR con la enzima MspI, mediante electroforesis en gel de agarosa (2%) en buffer TAE 1X. El carril número 1 corresponde al marcador de peso molecular (MP) de 100 pb (PROMEGA). El carril 2 corresponde al control negativo. El carril 3 corresponde al genotipo Homocigoto Gln/Gln, el carril 4 corresponde al genotipo Homocigoto Arg/Arg, el carril 5 corresponde al genotipo Heterocigoto Gln/Arg.

paréntesis el número de veces que se repite el alelo o el número de individuos portadores del genotipo para el sitio polimórfico estudiado.

El alelo normal Gln presentó una mayor frecuencia en los 3 grupos de niños estudiados con 51%, 55% y 61%, en los niños control, niños con obesidad sin resistencia a la insulina y niños con obesidad y resistencia a la insulina, respectivamente. De acuerdo al total de niños que se le determinó el genotipo de LEPR, el alelo normal Gln presentó una mayor frecuencia (56%) en comparación con el alelo mutado Arg (44%).

El grupo de niños con sobrepeso/obesidad y resistencia a la insulina presentaron una mayor frecuencia del genotipo Gln/Gln que el grupo de niños control (OR= 2,583 ; IC 95%= 1,17-5,75 ; p < 0,05), sugiriendo que la presencia de este genotipo podría aumentar el riesgo al desarrollo de resistencia a la insulina (RI). Por otra parte, los niños control presentaron una mayor frecuencia de genotipo Arg/Arg, Gln/Arg en comparación con los niños con sobrepeso/obesidad y resistencia a

la insulina (OR=0,387 ; IC 95%= 0,17-0,86 ; p < 0,05).

No se observó diferencia significativa en la distribución de los diferentes genotipos y alelos del gen LEPR en el grupo de niños sobrepeso/obesos sin resistencia a la insulina con respecto al grupo de niños control.

DISCUSION

Este es el primer estudio en Venezuela en el que se investiga la asociación entre los genes LEP y LEPR con factores de riesgo

cardiometabólicos en niños. En el presente estudio se obtuvo que los niños con sobrepeso/obesidad y resistencia a la insulina tienen 2.6 veces más riesgo de desarrollar RI que los niños control. Este riesgo podría estar asociado a que la variante Gln/Gln del receptor de leptina podría tener una menor afinidad por la leptina, llevando esto a un aumento de los niveles de leptina y creando un estado de resistencia a la misma. La resistencia a la leptina ha sido asociada con resistencia a la insulina en estudios en roedores. No se encontraron estudios donde se evaluara la relación de este polimorfismo de LEPR con la resistencia a la insulina en niños, ni en adultos, para comparar los resultados obtenidos en este estudio.

El polimorfismo Gln223Arg A→G se localiza en el sitio de enlace con la leptina lo que podría sugerir que el cambio de un aminoácido cargado positivamente como la Arginina por otro aminoácido no cargado como la Glutamina podría mediar un aumento o disminución en la afinidad por su ligando (Leptina), lo que se traduce en una mayor respuesta a la cascada de activación de la cinasa Jak-2 ocasionando la fosforilación de las proteínas blanco en el citoplasma entre las que se encuentra el factor de transcripción STAT (transductor de señales y activador de la transcripción). Por otro lado, el Sustrato del Receptor de Insulina (IRS1) es también un sustrato de Jak, por lo tanto la leptina y la insulina comparten rutas para propagar señalización (31,32). Al alterarse la cascada de señalización se produce un estado conocido como resistencia a la leptina, que es un modelo estudiado en roedores obesos en los que se observa también resistencia a la insulina, por lo que una disfunción en el receptor de leptina ha sido asociado con diabetes tipo 2 y resistencia a la insulina (31,33). Deben realizarse estudios moleculares para poder entender el mecanismo de la resistencia a la insulina y como ésta puede llevar también a las alteraciones en la homeostasis de la glucosa provocando resistencia a la insulina y diabetes.

En este estudio se encontró asociación entre la variante Gln/Gln del gen LEPR y la resistencia a la insulina, similar a otros estudios en los que se asoció esta variante con hiperleptinemia, perfil lipídico aterogénico, obesidad, porcentaje de masa grasa, así como la tendencia a agrandar el tamaño del adipocito en los individuos portadores del genotipo Gln/Gln

(34-36). Los resultados de este estudio son comparables a los reportados en una investigación en niños mexicanos; las frecuencias genotípicas encontradas en este estudio fueron para el genotipo homocigoto normal Gln/Gln 31%, heterocigoto Gln/Arg 49% y homocigoto mutado Arg/Arg 20% similares a las encontradas por Jiménez y col en el 2004, en la que reportan una frecuencia para el homocigoto normal Gln/Gln 36,8%, heterocigoto Gln/Arg 43,4% y homocigoto mutado Arg/Arg 19,7% reportados por estos investigadores en niños mexicanos. Lo mismo se observa con las frecuencias alélicas, que para los niños mexicanos es de 58,5% para el alelo Gln y 41,5% para el alelo Arg, similar a lo encontrado en este estudio donde el alelo Gln arrojó una frecuencia de 56% y el alelo Arg de 44% (37).

Sin embargo algunos investigadores no encontraron asociación entre el polimorfismo de LEPR con factores de riesgo cardiometabólico (38,39).

Con respecto al polimorfismo G2548A del gen LEP, no se encontraron diferencias significativas en las frecuencias genotípicas y alélicas entre el grupo de niños control y los niños con sobrepeso/obesidad sin/con resistencia a la insulina ($p>0.05$). Se observó que el alelo de riesgo A no parece conferir riesgo para el desarrollo de obesidad ni resistencia a la insulina en el grupo de niños estudiados.

Los resultados de este estudio son comparables a los reportados por Pedraza y colaboradores (40) en niños mexicanos. La frecuencia del alelo mutado A fue de 42% tanto en los niños mexicanos como en los niños venezolanos estudiados. De igual forma, las frecuencias genotípicas obtenidas para el polimorfismo G2548A de LEP en esta investigación fueron 33% para el homocigoto normal G/G, 51% para el heterocigoto G/A y 16% para el homocigoto mutado A/A, estos resultados son muy similares a los citados en el estudio en México donde obtuvieron una frecuencia de 34,6%, 49,7% y 15,6% para el homocigoto normal G/G, heterocigoto G/A y homocigoto mutado A/A, respectivamente. En ambos trabajos no se encontraron diferencias significativas en las frecuencias alélicas y genotípicas entre los niños obesos y los niños control para $p>0.05$.

Otros investigadores han asociado el polimorfismo G2548A de LEP con obesidad, hiperleptinemia y síndrome metabólico en diversas poblaciones como la brasileña, española, turca, francesa y japonesa (13-15, 37,41). Esto indica que las distribuciones alélicas son muy variables en cada región. Asociándose a enfermedad en algunos estudios, mientras que en otros no se encuentra dicha asociación a pesar de que el tamaño en la muestra estudiada sea similar (42).

Con los resultados obtenidos en este estudio, se puede asociar el polimorfismo Gln223Arg del gen LEPR con la resistencia a la insulina que es un factor de riesgo cardiometabólico que se presenta en el SM, el cual es considerado como marcador de riesgo en el desarrollo de la DT2 y las enfermedades cardiovasculares. Conocer la genética y los genes involucrados al desarrollo de enfermedades cardiometabólicas es

importante, porque se pueden tomar medidas preventivas en estos niños para evitar el desarrollo de estas patologías y sus consecuencias, entre las que se pueden citar los cambios en el estilo de vida (dieta baja en carbohidratos y grasas, realizar ejercicio, entre otras).

CONCLUSIONES

Este es el primer estudio en niños en el que se encuentra una asociación entre la presencia del genotipo Gln223Arg del gen LEPR con la obesidad en niños pre-púberes y donde se encuentra que el genotipo Gln/Gln del gen LEPR confiere a los niños que lo portan 2,6 veces más riesgo a desarrollar resistencia a la insulina que los niños con el genotipo Arg/Arg y Gln/Arg.

AGRADECIMIENTOS

El proyecto fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH) Proyecto de Grupo N° 09-00-8202-2011/1 y por la Coordinación de Investigación de la Facultad de Medicina. Agradecimiento especial a: Grupo EvoLab C.A, a los padres o representantes de los niños incluidos en el estudio y al Hospital de Niños "J.M. de los Ríos".

REFERENCIAS

1. Bray GA. Obesity: The disease. *J Med Chem* 2006;49:4001-4007.
2. Castillo C, Le Roy C, Osorio J. Obesidad y síndrome metabólico en niños y adolescentes. *Rev Med Clín Conde* 2012;23(2):160-164.
3. Villalobos J, Hernández W, Maulino N, Gáffaro de Valera L, García de Blanco M, Merino G, et al. Diabetes tipo 2 en niños y adolescentes. experiencia de la unidad de Diabetes del Hospital de Niños J.M. de los Ríos. *Rev Venez Endocrinol Metab* 2004;2:18-23.
4. Paoli de Valery M, Pereira A. Síndrome metabólico en el niño y adolescente. *Rev Venez Endocrinol Metab* 2006;4 (1):1-3.
5. Quijada Z, Paoli M, Zerpa Y, Camacho N, Cichetti R, Villarroel V, et al. The triglyceride/HDL-cholesterol ratio as a marker of cardiovascular risk in obese children: Association with traditional and emergent risk factors. *Pediatr Diabetes* 2008;9(5):464-471.
6. Macías-Tomei C, Maulino N. Obesidad y Síndrome Metabólico. En: L. Machado, I. Espinoza, R. Santiago (eds.). *Nutrición Pediátrica*. Sociedad Venezolana de Puericultura y Pediatría. Editorial Panamericana. Caracas 2009, pp. 241-272.
7. Machado L, Macías-Tomei C, Mejías A, Sparano A, Arias Gómez A. Consulta de detección temprana de factores de riesgo cardiometabólico en pediatría. *Arch Venez Puer Ped* 2013;76 (2):79-84.
8. Considine RV. Human leptin: an adipocyte hormone with weight-regulatory and endocrine functions. *Semin Vasc Med* 2005;5:15-24.
9. Mantzoros CS, Magkos F, Brinkoetter M, Sienkiewicz E, Dardeno TA, Kim SY, et al. Leptin in human physiology and pathophysiology. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011;301:E567-584.
10. Wauman J, Tavernier J. Leptin receptor signaling: pathways to leptin resistance. *Front Biosci* 2011;17:2771-2793.
11. Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Argyropoulos G, Walts B, et al. The human obesity gene map:

- the 2005 update. *Obesity* 2006;14:529-644.
12. Herrera BM, Lindgren CM. The genetics of obesity. *Curr Diab Rep* 2010;10:498-505.
 13. Yiannakouris N, Melistas L, Yannakoulia M, Mungal K, Mantzoros CS. The-2548G/A polymorphism in the human leptin gene promoter region is associated with plasma free leptin levels; interaction with adiposity and gender in healthy subjects. *Hormones* 2003;2:229-236.
 14. Jiang Y, Wilk JB, Borecki I, Williamson S, De Stefano AL, Xu G, 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.
 15. Deniz S, Cemil T, Cemil D, Murat C, Mustafa C, Edip U, et al. Association with Leptin Gene c.-2548 G>A Polymorphism, Serum Leptin Levels, and Body Mass Index in Turkish Obese Patients. *Cell Biochem Biophys* 2013;65:243-247.
 16. Suriyaprom K, Tungtrongchitr R, Thawnasom K. Measurement of the levels of leptin, BDNF associated with polymorphism LEP G2548A, LEPR Gln223Arg and BDNF Val66Met in Thai with metabolic syndrome. *Diabetol Metab Syndr* 2014;6:6. Disponible en: <http://www.dmsjournal.com/content/6/1/6> [consultado en: febrero 2016].
 17. Furusawa T, Naka I, Yamauchi T, Natsuhara K, Kimura R, Nakazawa M, et al. The Q223R polymorphism in LEPR is associated with obesity in Pacific Islanders. *Hum Genet* 2010;127:287-294.
 18. Izaguirre de Espinoza I, López de Blanco M. Evaluación del crecimiento y la maduración física. En: L. Machado, I. Espinoza, R. Santiago (eds.). *Nutrición Pediátrica*. Sociedad Venezolana de Puericultura y Pediatría. 1ª.ed. Editorial Médica Panamericana. Caracas 2009, pp. 3-40.
 19. Tresaco B, Bueno G, Pineda I, Moreno L, Garagorri J, Bueno M. Homeostatic model assessment (HOMA) index cut-off values to identify the metabolic syndrome in children. *J Physiol Biochem* 2005; 61(Suppl. 1):381-388.
 20. Cusiminsky M, Lejarraga H, Mercer R, Martell M., Fescina R. Evaluación del Crecimiento del Niño. En: *Manual de Crecimiento y Desarrollo del niño*. Organización Panamericana de Salud-Organización Mundial de la Salud. Washington, DC 1993:23-52.
 21. Méndez Castellano H, López de Blanco M, Landaeta Jiménez M, González de Tineo A, Pereira I. Estudio Transversal de Caracas. *Arch Venez Pueric Pediatr* 1986; 49 (3-4):11-55.
 22. Espinoza I. Guía práctica para la evaluación antropométrica del crecimiento, maduración y estado nutricional del niño y el adolescente. *Evaluación del Crecimiento*. *Arch Venez Puer Ped* 2004; 67(Supl. 1):S3-S52.
 23. Soto I, Figueroa O, López A, Nuñez L, Vera L, Correa C. Crecimiento, Desarrollo y Nutrición. *Manual de pautas de diagnóstico y tratamiento*. Hospital de Niños "J. M. de los Ríos". *Bol Hosp Niños* 2006; 42 (1):5-30.
 24. Méndez H, de Méndez M. Estratificación Social y Biología Humana. Método Graffar modificado para Venezuela. *Arch Ven Puer Ped* 1986;49(4):93-104.
 25. American Diabetes Association. *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. *Diabetes Care* 2005;28:S37-S42.
 26. Bosch V, Méndez Castellano H. Bioquímica: Colesterol y triglicéridos. Percentiles según intervalos de edad y sexo. En: H. Méndez Castellano (editor). *Estudio Nacional de Crecimiento y Desarrollo Humanos de la República de Venezuela: Proyecto Venezuela*. Tomo III. Escuela Técnica Popular Don Bosco. Caracas 1996, pp.1270-1273
 27. National Cholesterol Education Program. Report of the Expert Panel on Blood Cholesterol Levels in Children and Adolescents. Publication N° 91-2732. National Institutes of Health. Bethesda, MD 1991, pp. 7-22
 28. Welsh KL, Bunce M. Molecular Typing for the MHC with PCR-SSP. *Rev Immunogenet* 1999;1:157-176.
 29. Boumaiza I, Omezzine A, Rejeb J, Rebhi L, Ouedrani A, Rejeb N, et al. Relationship between Leptin G2548A and Leptin Receptor Q223R Gene Polymorphisms and Obesity and Metabolic Syndrome Risk in Tunisian Volunteers. *Genet Test Mol Biomarkers* 2012;16(7):726-733.
 30. Duarte S, Francischetti E, Genelhu-Abreu V, Barroso S, Braga J, Cabello P, et al. p.Q223R leptin receptor polymorphism associated with obesity in Brazilian multiethnic subjects. *Am J Human Biol* 2006;18(4):448-453.
 31. Münzberg H, Flier JS, Bjorbaek C. Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice. *Endocrinology* 2004;145: 4880-4889.
 32. Denroche H, Huynh F, Kieffer T. The role of leptin in glucose homeostasis. *J Diabetes Investig* 2012;3(2):115-129.
 33. Münzberg H, Myers MG. Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. *Nat Neurosci* 2005;8:566-570.
 34. Portoles, O, Sorlí JV, Francés F, Coltell O, González JI, Sáiz C, et al. 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):605-612.
 35. Chagnon Y, Wilmore J, Borecki I, Gagnon J, Pérusse L, Chagnon M et al. Associations between the leptin receptor gene and adiposity in middle-aged Caucasian males from the HERITAGE family study. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85(1):29-34.
 36. De Oliveira R, Cerda A, Vecchia F, Ferraz M, Armaganjian D, Martins M, et al. Leptin receptor gene polymorphisms are associated with adiposity and metabolic alterations in Brazilian individuals. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2013;57(9):677-684.
 37. Jiménez Z, Solís E, Carrera L, Mora M, Aguilar-M, Campos E. Frecuencia del polimorfismo Q223R del gen del receptor de leptina en una muestra de niños con obesidad en Monterrey. 2do Congreso Internacional de Nutriología y Obesidad. Monterrey, México 2004;7:64.
 38. Gotoda T, Manning B, Goldstone, Imrie H, Evans A, Strosberg A, et al. Leptin receptor gene variation and obesity: lack of association in a white British male population. *Human Molec Genet* 1997;6:869-976.
 39. Stefan N, Vozarova B, Parigi A, Ossowski V, Thompson D, Hanson R, et al. The Gln223Arg polymorphism of the leptin receptor in Pima Indians: influence on energy expenditure, physical activity and lipid metabolism. *Inter J Obes* 2002;26:1629-1632.
 40. Pedraza F, Pérez M, Medina D, Moreno D, Luque F, Magaña J, et al. Análisis del polimorfismo G-2548A del gen LEP y su asociación con obesidad en niños escolares de la ciudad de Culiacán, Sinaloa, México. *Genética Comunitaria*.2014. [en línea] Disponible en: <http://geneticacomunitaria2014.sld.cu/index.php/geneticacomunitaria/2014/paper/view/611>[Consultado en: febrero 2016].
 41. Hinuy H, Hirata M, Forti N, Diamant J, Sampaio M, Armaganjian D, et al. Leptin G-2548A Promoter Polymorphism in Associated with Increased Plasma Leptin and BMI in Brazilian Women. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2008; 52:611-616.
 42. Server S, Rüstemoğlu A, Tekcan A, Taşliyurt T, Güven H, Yiğitl S. Investigation of Associations between Obesity and LEP G2548A and LEPR 668A/G Polymorphisms in a Turkish Population. *Disease Markers* 2013;35:673-677.