



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO**  
**UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**  
**UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**NIVELES DE EXPRESIÓN, METILACIÓN Y POLIMORFISMOS**  
**EN EL GEN DE LEPTINA EN MADRES-NEONATOS COMO**  
**DETERMINANTES DEL PESO AL NACER**

**T E S I S**

PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**P R E S E N T A**

**M. EN C. LINDA ANAHI MARINO ORTEGA**

DIRECTORA DE TESIS: **DRA. ISELA PARRA ROJAS**  
CODIRECTORA DE TESIS: **DRA. IRIS PAOLA GUZMÁN GUZMÁN**



CHILPANCINGO, GRO., OCTUBRE/2015.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO  
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS  
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 03 días del mes de julio del dos mil quince, se reunieron los miembros del Comité Tutoral designado por la Academia de Posgrado del Doctorado en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "Niveles de expresión, metilación y polimorfismos en el gen de leptina como determinantes del peso al nacer", presentada por la alumna Linda Anahi Marino Ortega, para obtener el Grado de Doctora en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

El Comité Tutoral

Dra. Isela Parra Rojas  
Dirección de tesis

Dr. Eduardo Castañeda Saucedo

Dra. Mónica Espinoza Rojo

Dra. Eugenia Flores Alfaro

Dr. José Francisco Muñoz Valle

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO



UAGro

Coordinación del M. o. B.  
Posgrado UACQB

Dra. Isela Parra Rojas

Coordinadora del Posgrado de la Unidad  
Académica de Ciencias Químico Biológicas

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO



UAGro  
Unidad Académica de  
Ciencias Químico Biológicas

DIRECCIÓN 2014

Dra. Amalia Vences Velázquez

Directora de la Unidad Académica de Ciencias  
Químico Biológicas

## **AGRADECIMIENTOS A LA INSTITUCIÓN**

Este trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Investigación en Obesidad y Diabetes (LIOD), de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero. Bajo asesoría de:

### **DIRECTORA DE TESIS**

DRA. ISELA PARRA ROJAS

### **CODIRECTORA DE TESIS**

DRA. IRIS PAOLA GUZMÁN GUZMÁN

### **COMITÉ TUTORAL**

Dr. José Francisco Muñoz Valle

Dr. Eduardo Castañeda Saucedo

Dra. Monica Espinoza Rojo

Dra. Eugenia Flores Alfaro

Este proyecto de Doctorado en Ciencias Biomédicas fue financiado con beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) para los posgrados de calidad en el PNPC.

## AGRADECIMIENTOS

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo, en especial a mi directora de tesis la **Dra. Isela Parra Rojas**, por la orientación, el seguimiento y la supervisión para la realización de este proyecto, por la motivación y el apoyo recibido a lo largo de estos años, por la confianza brindada, su enseñanza, pero sobre todo por la paciencia, tiempo dedicado y la amistad brindada. Le deseo lo mejor ahora y siempre, que Dios la bendiga.

A mis sinodales, en especial a mi asesor externo, **Dr. José Francisco Muñoz Valle**, por abrirme las puertas de su laboratorio para realizar una parte fundamental de este proyecto, por su apoyo y por las valiosas observaciones y aportaciones realizadas para la culminación del mismo. **Al Dr. Eduardo Castañeda Saucedo, y a las Dra. Monica Espinoza Rojo y Dra. Eugenia Flores Alfaro** por el tiempo dedicado, por sus valiosas aportaciones y sugerencias para la culminación de mi trabajo de tesis, gracias a todos y cada uno de ustedes.

**Al Dr. Lorenzo Salgado Goytia** por el gran apoyo ofrecido en la realización de este trabajo, por su tiempo compartido y la motivación para la culminación de esta tesis, pero sobre todo gracias por la amistad que me ha brindado a lo largo de estos años.

**A la Q.B.P. Aralia Berenice Salgado Bernabé** por su apoyo en el trabajo de laboratorio durante mi estancia en el mismo y por su amistad brindada.

**A la Bióloga Paola Macedo** por su apoyo en la realización de trámites administrativos, que sin ellos no se podría llevar a cabo la presentación de este trabajo. Gracias Pao.

A mis amigos, compañeros de laboratorio y escuela: **Samuel, Inés, Jorge, Agustín, Vicky, Carlos, Teresa, Adrián, Abigail, Ana Elvira, Pedro Pablo, Ramón José, Víctor** y todos los que han formado parte de mi vida, gracias por brindarme su amistad,

a los que formaron parte del LIOD gracias por haber hecho de mi paso en el laboratorio una estancia agradable, a todos gracias por compartir momentos agradables conmigo, ya que con cada uno de ustedes viví momentos inolvidables, amigos siempre tendrán mi amistad incondicional, les deseo éxito hoy y siempre.

A mis compañeros del Posgrado de quienes me llevo recuerdos con cada uno ya que compartimos juntos momentos inolvidables, como los seminarios.

## DEDICATORIAS

**A Dios** por ser mi guía darme la oportunidad de finalizar una meta más en mi vida, por darme la fuerza para levantarme de cada uno de mis fracasos.

**A mi Madre Berenice Ortega** por todo su apoyo y amor incondicional, por ser una de mis inspiraciones para seguir adelante cada día, por estar siempre a mi lado en los momentos más difíciles, pero sobre todo por sus sacrificios, consejos, valores, y por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien. Te amo mami. **A mi padre Jorge Luis Marino** por ser parte de mi vida, por desearme lo mejor en la vida, gracias por cada uno de tus consejos y por cada una de tus palabras de aliento para seguir adelante. Te quiero mucho.

**A mis hermanos Luis Arturo, Sergio Omar y José Manuel** por ser las personitas más importantes en mi existencia, por ser los mejores amigos con quienes he pasado momentos inolvidables, por alegrar mi vida a cada momento, porque a pesar de que a veces tenemos nuestras diferencias, estamos dispuestos a apoyarnos cuando más nos necesitamos. Hermanitos gracias por su apoyo y que Dios los bendiga por siempre. Los quiero mucho.

## ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>1</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>3</b>
<b>Capítulo I</b>	
Correlation of leptin and soluble leptin receptor levels with anthropometric parameters in mother-newborn pairs.....	15
<b>Capítulo II</b>	
Leptin mRNA differential expression in tissues of neonates and their mothers.....	24
<b>Capítulo III</b>	
Polimorfismos en el gen de leptina y niveles de ARN mensajero de <i>LEP</i> en placenta y cordón umbilical de neonatos y tejido adiposo de las madres.....	42
<b>Capítulo VI</b>	
Metilación global del ADN y su relación con la ingesta de ácido fólico y polimorfismos en el gen de leptina en binomios madre-neonato.....	55
<b>Discusión y conclusión</b> .....	<b>65</b>
<b>Perspectivas</b> .....	<b>72</b>
<b>Referencias</b> .....	<b>73</b>

## Niveles de expresión, metilación y polimorfismos en el gen de leptina en madres-neonatos como determinantes del peso al nacer

### RESUMEN

**Introducción.** La leptina es una hormona multifuncional que regula principalmente la ingesta calórica y el balance energético. Durante el embarazo regulando la angiogénesis, la hematopoyesis y funciones inmunes en la placenta, por lo tanto, se considera que la leptina juega un papel importante en el crecimiento y desarrollo del feto. **Objetivo.** Evaluar los polimorfismos -2548G/A, -188C/A, -160G/A, -146G/C y A19G, niveles de expresión y metilación en el gen de leptina (*LEP*) en binomios madres-neonatos como determinantes del peso al nacer. **Material y métodos.** Se incluyeron 50 binomios, mujeres embarazadas programadas para parto obstétrico por cesárea y sus neonatos. Se obtuvieron muestras de sangre periférica materna, de cordón umbilical y biopsias de tejido adiposo, placenta y cordón umbilical. Los niveles séricos de leptina se midieron utilizando un kit de ELISA y la expresión de su ARNm se determinó por PCR en tiempo real. La genotipificación de los polimorfismos se realizó por las técnicas PCR-RFLP. El porcentaje de metilación global del ADN se midió utilizando un kit colorimétrico basado en ELISA. **Resultados.** Se encontró un incremento en los niveles séricos de leptina y mayor expresión del ARNm de *LEP* en tejido adiposo y placenta en las madres con obesidad antes del embarazo y mayor ganancia de peso a término de la etapa gestacional. Los neonatos con mayor peso al nacer presentaron niveles séricos de leptina más altos, pero bajos niveles de ARNm en cordón umbilical. Los niveles séricos de leptina materna se correlacionan con el índice de masa corporal antes del embarazo, la ganancia de peso y los niveles de leptina en cordón, mientras que los niveles de leptina en cordón se correlacionan con el peso al nacer, la talla y las circunferencias corporales del neonato. Los genotipos GA + AA del polimorfismo -2548 G/A y GG + GA para el polimorfismo A19G en el gen *LEP* se asociaron con altos niveles del ARNm de leptina en tejido adiposo, mientras que en placenta se observó una baja expresión en los neonatos portadores de los mismos genotipos. También se observó un alto porcentaje de metilación global del ADN en placenta y tejido adiposo en comparación con el cordón umbilical, pero un



menor porcentaje de metilación global en la placenta de madres que refirieron una ingesta de ácido fólico antes del embarazo, mientras que en los neonatos con mayores medidas antropométricas se encontró un menor porcentaje de metilación. **Conclusión.** Los resultados obtenidos indican que tanto los niveles séricos de leptina materna y su antropometría prenatal, así como los polimorfismos en el gen *LEP* y el porcentaje de metilación global del ADN pueden influir sobre la expresión de la leptina en placenta y cordón umbilical, por lo que se sugiere que la leptina puede ser un determinante del peso al nacer.

**Palabras claves:** Leptina, cordón umbilical, neonato, placenta, tejido adiposo, polimorfismos, metilación.

## **Niveles de expresión, metilación y polimorfismos en el gen de leptina en madres-neonatos como determinantes del peso al nacer**

### **INTRODUCCIÓN**

La menor o mayor disponibilidad de sustratos energéticos, tanto en la vida prenatal como postnatal, predispone al desarrollo de procesos de adaptación metabólica y hormonal que persisten a lo largo de la vida y que se relacionan con el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas. Los cambios en la disponibilidad intrauterina de nutrientes, oxígeno y hormonas en tejidos programados, desarrollan y conducen a alteraciones en la función cardiovascular y metabólica en adultos (Garibay-Nieto and Miranda-Lora, 2008).

La programación fetal se refiere a un proceso mediante el cual un estímulo, ya sea dado por metabolitos, hormonas o el estrés, durante un periodo crítico o sensible del desarrollo, puede establecer patrones fisiológicos y estructurales a largo plazo, que programan la salud durante la etapa adulta (Ramirez-Velez, 2012, Reynolds *et al.*, 2010). Esta programación de los sistemas fisiológicos ocurre a nivel de genes, células, tejidos, órganos y sistemas, y causan cambios estructurales y funcionales permanentes, que pueden conducir a la enfermedad, en particular con el incremento de la edad (Fowden *et al.*, 2006).

En estudios recientes en humanos y animales, se ha demostrado que el medio ambiente en el útero, puede tener un impacto en los procesos de desarrollo del feto y puede alterar los mecanismos de regulación homeostática de los descendientes. Uno de los principios de la programación gestacional es que los efectos fisiológicos de una permutación en el útero pueden variar dependiendo del período de desarrollo del feto o neonato y de la especie. La programación puede definir el número de células, la estructura de los órganos, función de las hormonas y la expresión de genes, entre otros. Los efectos pueden ser permanentes o expresarse sólo en ciertas edades en la descendencia, por ejemplo, recién nacidos y adultos, lo que puede ser dependiente

del ambiente en el útero, por ejemplo, nutrición y glucocorticoides. Además, la presencia de alteraciones fisiológicas pueden manifestarse en condiciones basales o restringidas al estrés ambiental o etapas de la enfermedad en la descendencia (Chmurzynska, 2010).

Varios estudios epidemiológicos han mostrado una asociación entre bajo peso al nacer y un riesgo elevado de desarrollar varias enfermedades crónicas en la edad adulta. El bajo peso al nacer se asocia con incremento en la morbilidad y mortalidad en la etapa adulta por enfermedad cardiovascular, la diabetes tipo 2 y el síndrome metabólico (Kensara *et al.*, 2005). La hambruna holandesa, considerado el único "experimento natural", con un período bien definido de la falta de alimentos en una población bien nutrida, ha demostrado que la desnutrición materna durante la gestación compromete la salud en la vida adulta y que los efectos a largo plazo dependerán del tiempo de exposición a la falta de nutrientes durante la gestación. Además de un bajo peso al nacer, el alto peso al nacer debido a la obesidad o la diabetes materna, también se asocia con un mayor riesgo de desarrollar obesidad en etapas posteriores de la vida (Remmers and Delemarre-van de Waal, 2011).

Se ha descrito también, que la programación fetal por malnutrición materna resulta en un bajo peso al nacer y en una reducción del número de nefronas incrementando el riesgo para el desarrollo de enfermedad cardiovascular y renal en la etapa adulta. Vikse y colaboradores, mostraron que el bajo peso al nacer en los humanos incrementa un 70% el riesgo de falla renal en etapa terminal en adultos. Los experimentos han demostrado que la programación renal, con reducción del número de nefronas, puede ocurrir incluso cuando el peso al nacer es normal. Es importante mencionar que las consecuencias de la programación fetal no se limitan a la primera generación y sus efectos pueden prolongarse a las generaciones posteriores.

En 9 estudios de hombres y mujeres en Europa, Estados Unidos y Australia, se reportó una asociación entre el bajo peso al nacer y el metabolismo alterado de la glucosa. En la mayoría de las poblaciones, se encontró que la prevalencia de diabetes tipo 2 y la

tolerancia a la glucosa alterada decaen progresivamente entre aquellos que presentaron bajo peso al nacer ( $\leq 2.5$  kg) y aquellos que tuvieron alto peso al nacer ( $\geq 4.3$  kg) (Godfrey and Barker, 2000). Las tendencias son fuertes, como lo demuestra un estudio en 370 hombres de 65 años nacidos en Hertfordshire, en el que se muestra que la prevalencia de la diabetes tipo 2 y la intolerancia a la glucosa se reduce en un 40%, entre los que presentaron un peso  $\leq 5.5$  libras (2.54 kg) al nacer, a un 14% entre los que pesaron  $>9.5$  libras (4.31 kg) (Hales *et al.*, 1991, Godfrey and Barker, 2000). En poblaciones con una alta prevalencia de la diabetes en el embarazo, tales como los Indios Pima de Norteamérica, se ha encontrado una relación en forma de U, con altos índices de diabetes en aquellos individuos que pesaron  $\geq 4.5$  kg al nacer (McCance *et al.*, 1994).

Por otro lado, la placenta cumple múltiples funciones durante la gestación, como proteger de agentes patógenos al feto en crecimiento, realizar el intercambio de nutrientes y desechos entre la madre y el hijo, además de que es fuente de las hormonas que controlan el metabolismo y crecimiento fetal, entre ellas, estrógenos, progesterona, gonadotropina coriónica humana (hCG), hormona del crecimiento (GH), lactógeno placentario, factor de crecimiento insulínico (IGF), factor de crecimiento placentario (PGF) y factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF). (Higgins *et al.*, 2011, Rossant and Cross, 2001). El lactógeno placentario promueve el crecimiento embrionario y fetal a través de la estimulación de la producción de IGF-1 e insulina. Se ha demostrado una relación directa entre los niveles plasmáticos de insulina en sangre de cordón umbilical con el peso y talla de neonatos con restricción del crecimiento, y a su vez con el peso de la placenta. Por otra parte, como ya se ha mencionado, la macrosomía presente en niños cuyas madres cursaron un embarazo con diabetes gestacional, se atribuye a niveles elevados de insulina presentes en el feto durante la gestación. Durante la gestación, los niveles plasmáticos de IGF-1 e IGF-2, los cuales provienen principalmente de tejidos fetales, se elevan significativamente. Sin embargo, IGF-2 también se produce por la placenta, y regula su crecimiento. De hecho, se ha encontrado una relación directa entre los niveles de IGF-2 en la placenta y su peso en embarazos normales y con diabetes gestacional. Por otra parte, se ha comprobado

una mayor expresión de IGF-1 a nivel placentario, en fetos con restricción del crecimiento, probablemente como un mecanismo de respuesta al reducido crecimiento fetal (Krause *et al.*, 2009, Sibley *et al.*, 2010).

La insuficiencia placentaria condiciona al desarrollo de procesos de adaptación que suelen persistir a lo largo de la vida postnatal. Se ha descrito una disminución de las moléculas transportadoras de aminoácidos a nivel placentario, lo cual condiciona un insuficiente abastecimiento al feto (Farley *et al.*, 2010). Por otro lado, la disponibilidad de glucosa de la madre al feto, depende del transporte de glucosa a través de la placenta, proceso facilitado por miembros de la familia de transportadores pasivos de glucosa (GLUT), el transporte activo de glucosa desde la madre hacia la placenta es mediado por GLUT-3, y de la placenta al feto por GLUT-1, debido a que la capacidad de glucogénesis y gluconeogénesis en el feto es limitada (Stefan *et al.*, 2004). Así mismo, otros estudios han reportado que fetos con restricción del crecimiento intrauterino (RCIU), tienen una capacidad de respuesta a la secreción de insulina por células  $\beta$  pancreáticas limitada, sugiriendo así que esto puede deberse a una respuesta de adaptación ante niveles de glucosa disminuidos durante la gestación (Beltrand and Levy-Marchal, 2008)

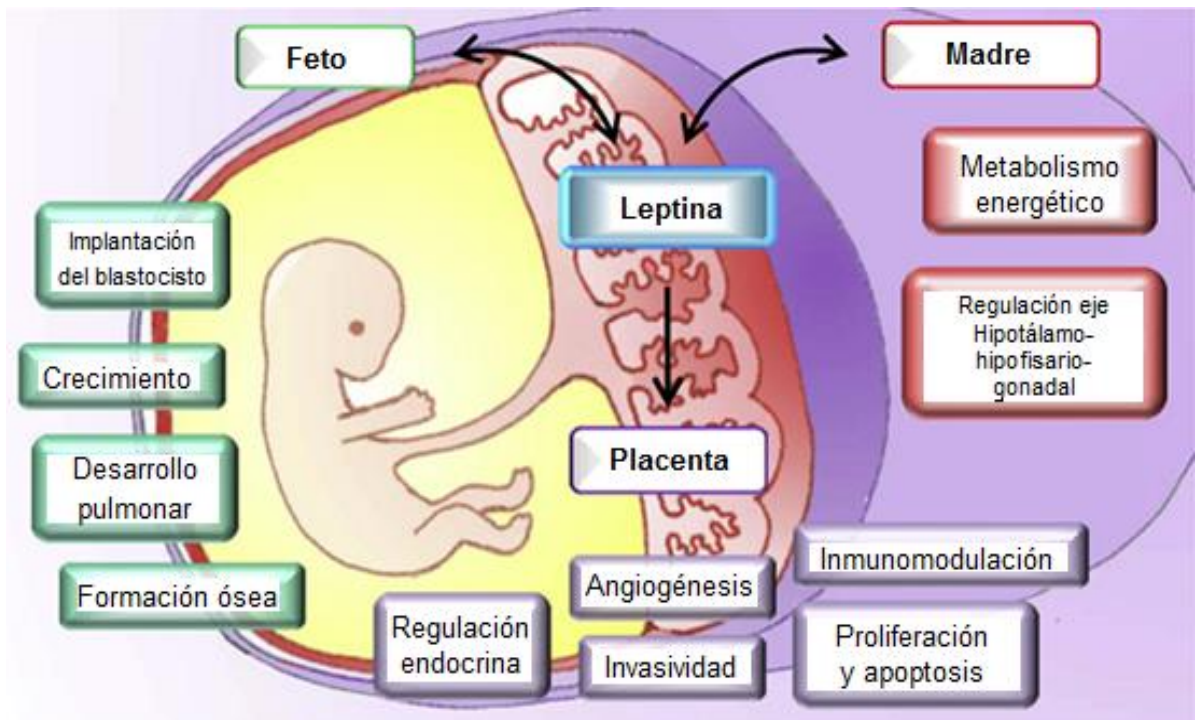
Una hormona importante producida durante el embarazo por el embrión en desarrollo después de la concepción, es la gonadotropina coriónica humana (hCG), la cual induce la expresión de la leptina en las células trofoblásticas. La hCG es secretada por las vellosidades del trofoblasto y es probable que actúe en otras células que llevan el receptor en el entorno feto-placentario. HCG media su acción a través del receptor de LH/hCG, y su principal función es la de mantener la producción de progesterona del cuerpo lúteo en la primera etapa del embarazo, es una de las señales embrionarias tempranas; que ya se expresa en embriones de ocho células y se secreta en altas concentraciones locales por el blastocisto en la cavidad uterina (Maymó *et al.*, 2009). La unión de hCG a su receptor genera la transducción de señales a través de la activación de proteínas G heterotriméricas, después de la unión de hCG a su receptor hay un aumento en AMPc tras la activación de la adenilato ciclasa y la consiguiente

activación de la proteína cinasa A (PKA), dando lugar a la fosforilación de CREB. Así como un aumento en el calcio intracelular a través de la vía fofoslipasa A<sub>2</sub>/inositol trifosfato. HCG induce la expresión de genes específicos tales como el factor de crecimiento endotelial vascular, factor inhibidor de leucemia, metaloproteinasa-9 y entre ellas leptina, todos importantes en la modulación del sistema inmune y la supervivencia celular en la interfase materno-fetal (Maymó *et al.*, 2011).

Otra de las principales hormonas producidas por la placenta es la leptina, se ha observado que las concentraciones de leptina circulante, se correlacionan con el desarrollo del tejido adiposo fetal y más tarde con el índice de masa corporal. El papel de la leptina entre la compleja red de factores que controlan el crecimiento del feto no se conoce bien, a pesar de que estudios recientes han demostrado una fuerte correlación entre la leptina en la sangre del cordón umbilical del feto y el peso al nacer (Bozzola *et al.*, 2010).

La leptina es un péptido biológicamente activo de 16 kDa, constituido de 167 aminoácidos e incluye una secuencia señal de 21 aminoácidos (Frühbeck, 2006). La leptina está codificada por el gen *LEP* en los humanos, el cual está localizado en el cromosoma 7 en el *locus* 31.3 (7q31.3), incluye 650 kb, está compuesto de tres exones separados por dos intrones (Paracchini *et al.*, 2005). Es una hormona anorexigénica, que circula en la sangre y actúa en el sistema nervioso central regulando parte de la conducta alimenticia y el balance de la energía, ya que se secreta en respuesta a la alimentación para suprimir el apetito a través de su acción hipotalámica (Almanza-Pérez *et al.*, 2008). Se produce principalmente por el tejido adiposo, pero también se ha demostrado que otros órganos y tejidos como la placenta, mucosa gástrica, intestino, médula del hueso, epitelio mamario, músculo esquelético, pituitaria e hipotálamo tienen la capacidad de producirla. Se ha descrito que la leptina es una hormona placentaria clave y varios estudios han demostrado que induce la proliferación de las células trofoblásticas, inhibe la apoptosis, estimula la síntesis de proteínas, y la producción de hormonas y citocinas en las mismas células, además regula el crecimiento y desarrollo del feto, por lo que se ve incrementada la

concentración plasmática de leptina durante el embarazo (Figura 1) (Gambino *et al.*, 2012, Nezar *et al.*, 2009).



**Figura 1.** Efectos de leptina en la interfase materno-fetal. La leptina regula la fertilidad y el metabolismo energético en la madre, la función placentaria, la implantación del embrión, el desarrollo y el crecimiento del feto (modificada de Gambino *et al.*, 2012).

Esta hormona se relaciona con los diferentes patrones de crecimiento y el desarrollo del feto, presentándose cambios en sus niveles, por ejemplo, recién nacidos pequeños para su edad gestacional tienen niveles bajos de leptina, en comparación con los niños con peso normal para su edad gestacional. En cambio, los recién nacidos macrosómicos tienen un aumento en los niveles de leptina. Por lo tanto, la leptina puede ser un factor importante para el crecimiento y el desarrollo del feto, mientras que sus efectos parecen independientes de la insulina y la hormona de crecimiento similar a la insulina. Estudios recientes, sugieren la implicación de la leptina en la regulación de algunas proteínas mitocondriales, tales como la proteína desacoplante de la fosforilación oxidativa-1, específica para el tejido adiposo marrón, ya que tiene un papel importante en la iniciación de la termogénesis del recién nacido y durante la

transición desde la vida fetal a neonatal (Pérez-Pérez *et al.*, 2009, Magarinos *et al.*, 2007).

A nivel de sistema nervioso central (SNC), la leptina ejerce acciones neurotróficas, que controlan la alimentación durante el período crítico de desarrollo del hipotálamo, a diferencia de lo que sucede en etapas posteriores de la vida, algunos hallazgos en estudios en animales indican que la leptina no inhibe el apetito en la etapa temprana postnatal. Por el contrario, parece que la leptina estimula el apetito y la deglución de los alimentos, contribuyendo así al rápido crecimiento y aumento de peso del recién nacido, pero esta evidencia aún no es concluyente (El-Haddad *et al.*, 2004, Alexe *et al.*, 2006).

Finalmente, también se ha sugerido que la resistencia a la leptina en la vida adulta, puede ser programada por la exposición a los períodos de desnutrición en la vida fetal, ya que se ha demostrado que ratas expuestas a la desnutrición materna durante las 2 primeras semanas de embarazo, pueden ser obesas en la edad adulta, y las crías de ratas preñadas que fueron severamente desnutridas durante todo el embarazo se convirtieron en hiperfágicas, obesas e hiperleptinémicas, cuando se alimentaron con una dieta hipercalórica después del destete (Edwards *et al.*, 2005).

Estudios evidencian que los niveles de leptina en sangre de cordón umbilical incrementan considerablemente a partir de las 34 semanas de gestación, y que además existe una correlación positiva entre los niveles de leptina umbilical y el peso al nacer del neonato, por otro lado, los neonatos de sexo femenino presentan un aumento en los niveles de leptina en comparación con los varones (Helland *et al.*, 1998, Jaquet *et al.*, 1998, Ong *et al.*, 1999, Pardo *et al.*, 2004). Zare y colaboradores, reportaron que los niveles séricos de leptina en sangre de cordón umbilical se correlacionan significativamente con el peso al nacer y con la razón peso al nacer/longitud al nacer ( $r=0.29$ ,  $p=0.01$  y  $r=0.24$ ,  $p=0.04$ , respectivamente). También observaron una correlación positiva entre los niveles de leptina del cordón umbilical,



tanto con la leptina materna como con el peso materno ( $r= 0.36$ ,  $p=0.004$  y  $r=0.59$ ,  $p<0,001$ , respectivamente) (Zare *et al.*, 2007).

Otro estudio realizado por Bozzola y colaboradores, reportaron la relación de los niveles séricos de leptina en infantes, con edad gestacional apropiada al nacimiento (AGA) e infantes pequeños para la edad gestacional (SGA), encontrando que las concentraciones circulantes de leptina fueron mayores en AGA ( $2.1\pm 4.1$  ng/mL) que en SGA ( $0.88\pm 1.03$  ng/mL,  $p<0.05$ ), correlacionándose con el estado nutricional de la madre (Bozzola *et al.*, 2010).

El desarrollo placentario y fetal está fuertemente influenciado por mecanismos epigenéticos, que alteran la expresión de genes a largo plazo, sin afectar la secuencia del ADN. La diferenciación celular y el desarrollo embrionario y fetal, son procesos regulados por múltiples mecanismos epigenéticos, tales como la modificación de la cromatina e histonas, la existencia de ARN no codificante y la metilación del ADN, este último mecanismo es importante ya que determina el *imprinting* genómico. Éstos pueden considerarse como genes cuya expresión depende de su origen parental, es decir, si provienen del padre o la madre. Este mecanismo actúa “silenciando” uno de los genes, materno o paterno, y consiste en la adición de un grupo metilo (CH<sub>3</sub>) al carbono 5 del anillo de citosina, adyacente a una guanina en dirección 5' (sitio CpG), formando así 5-metilcitosina, cuales tienden a agruparse en regiones de alta densidad, a menudo en los promotores de genes donde el incremento de la metilación se ha relacionado con disminución de la expresión. La metilación del ADN en diferentes regiones reguladoras participa en el silenciamiento de la expresión de genes, mientras que los genes que están hipometilados son accesibles y se transcriben. En la placenta, la expresión de genes que favorecen el crecimiento fetal dependen tanto de genes maternos y paternos, por ejemplo, el gen codificante para el factor de crecimiento similar a la insulina tipo 2 (IGF-2), o los transportadores de aminoácidos, son de origen paterno. Por el contrario, aquellos genes que restringen el crecimiento fetal, por ejemplo el gen que codifica para el receptor soluble de IGF-2 (IGF-2R), son de origen

materno (Heerwagen *et al.*, 2010, Krause *et al.*, 2009, Jones, 2012, Okada *et al.*, 2009, Cox and Nathanielsz, 2009).

En los años recientes la regulación epigenética de la expresión génica surgió como un importante contribuidor para los cambios en el tamaño y la morfología en los adipocitos durante la obesidad. En base a esto, se ha descrito que el gen *LEP* se encuentra transcripcionalmente activo mediante la modulación epigenética, cuando los pre-adipocitos son estimulados para iniciar el proceso de adipogénesis. Se ha descrito que la región proximal del promotor del gen *LEP* tiene un número de sitios (CpG) de metilación conservada, los cuales permanecen altamente metilados en los pre-adipocitos y por lo tanto impiden la expresión del gen *LEP* en esta etapa del desarrollo (Melzner *et al.*, 2002, Yokomori *et al.*, 2002). Además de los sitios CpG en el promotor de leptina, también posee una región de 217 pares de bases en la cual se ubica un elemento TATA-*box* y un sitio de unión al factor de transcripción funcional C/EBP- $\alpha$ , los cuales son suficientes para la expresión tejido-específica del gen. El núcleo de la secuencia de unión para el factor de transcripción C/EBP- $\alpha$  en el promotor del gen *LEP*, contiene un dinucleótido CG, un posible sitio de metilación (Hwang *et al.*, 1996).

Varios estudios han identificado un perfil de metilación en el promotor del gen de leptina. En un estudio *in vivo* donde se analizaron los patrones de metilación del promotor del gen *LEP*, tanto en línea celular de ratón y de humano, se reportó que en ambas líneas celulares, la densidad de metilación puede inducir la diferenciación de los adipocitos (Stoger, 2006). Marchi y colaboradores analizaron el perfil de metilación de una región de 305 pb en el promotor del gen de leptina en el cual ubicaron 31 sitios CpG y la correspondiente expresión de la leptina en la fracción de los adipocitos viscerales y de la fracción del estroma vascular del tejido adiposo blanco, encontrando una relación inversa entre la metilación y la expresión de la leptina en los adipocitos viscerales, evidenciando secuencias de reconocimiento entre las citocinas C15-C21 para los factores de transcripción Sp1 y C/EBP, sugiriendo que la metilación de estas citosinas alteraría la expresión de los niveles de ARNm y por lo tanto de la proteína (Marchi *et al.*, 2011).

Por otro lado, existen estudios que sugieren que variantes en el gen *LEP* pueden ser importantes en la fisiopatología de la obesidad, aunque aún no se han asociado con el peso al nacer, se ha descrito que el polimorfismo -2548G/A en el extremo 5' de la región promotora del gen *LEP*, se ha asociado con variaciones en la leptina plasmática y el IMC en individuos con obesidad, además se ha demostrado que este mismo polimorfismo influye en la expresión de la leptina, posiblemente a nivel transcripcional, y por lo tanto, también en los niveles de secreción de la hormona por el tejido adiposo (Hinuy *et al.*, 2008, Hoffstedt *et al.*, 2002). Un estudio de casos y controles realizado por Hinuy y colaboradores en 228 mujeres brasileñas, reportó asociación del polimorfismo -2548G/A con obesidad, encontrando que el alelo G se asocia con mayor IMC ( $p=0.027$ ) y con incremento de las concentraciones séricas de leptina en plasma ( $p=0.024$ ), además, las mujeres portadoras del alelo G tienen 4 veces más riesgo de presentar obesidad (OR: 4.11, IC95%: 1.06-15.90,  $p=0.041$ ) (Hinuy *et al.*, 2008).

En el 2009, Ramos Arellano reportó en población infantil guerrerense, la asociación de los polimorfismos A19G en el gen de leptina y A668G en su receptor con las concentraciones de leptina sérica e hiperfagia en niños con obesidad, encontrando una fuerte asociación entre la hiperleptinemia (leptina sérica  $>9$  ng/mL) y la obesidad. Los genotipos 668 AG+GG del gen del receptor de leptina, fueron asociados con el consumo abundante de alimento (OR=6.6, IC95% 1.60 a 26.70,  $p=0.009$ ) y la repetición de comida (OR=2.8, IC95% 1.42 a 5.34,  $p=0.003$ ). No se observó relación del polimorfismo A19G con la concentración de leptina sérica, obesidad y los hábitos alimenticios (Ramos Arellano LE, 2009).

En un estudio reciente de casos y controles realizado en población infantil guerrerense, se evaluó la asociación de los polimorfismos -2548G/A y -188C/A en el gen de leptina con la inflamación y la hematopoyesis en niños con obesidad, obteniendo las siguientes frecuencias genotípicas: para el polimorfismo -2548G/A, GG (30%), GA (51%) y AA (19%) y para el polimorfismo -188C/A, el genotipo más frecuente fue el CC (91.6%), seguido del CA (7.6%) y AA (0.8%). Se encontró un incremento en los niveles

de leptina en los niños con obesidad, aunque solo se observó asociación de los genotipos GG+GA del polimorfismo -2548 del gen de leptina con IMC, incremento en los niveles de leptina (4.61 vs 2.81 ng/mL,  $p=0.03$ ) y proteína C reactiva de alta sensibilidad (hsCRP) (0.98 vs 0.34 mg/L,  $p=0.02$ ) (García Carreón Adrián, 2010).

Hasta la fecha no se han reportado las frecuencias de los polimorfismos -146G/C y -160G/A. El Centro Nacional de Información Biotecnológica reporta una frecuencia del 95.7% G/G y 4.3% G/C para el polimorfismo -146G/C en población Hispana y del 100% G/G para población caucásica. Para el caso del polimorfismo -160G/A frecuencias globales del alelo menor (MAF) de A=0.006/13.

Estudios realizados en modelos animales, demuestran que la sobreexpresión de genes en el tejido adiposo, inducidos por la dieta durante el desarrollo de obesidad, no está mediada por cambios en la metilación del ADN, ya que por un lado, se ha observado que ratones C57BL/6J con una dieta rica en grasas presentan una marcada sobreexpresión en la expresión de la transcripción de la leptina, y otros genes como Mest (transcrito específico del mesodermo) y sFRP5 (proteína frizzled secretada) expresados en el tejido adiposo blanco. También se observó que la utilización de un agente desmetilante aumentó la cantidad del ARNm de Mest, pero no el ARNm de leptina o sFRP5 en los adipocitos de ratones 3T3-L1 (Okada *et al.*, 2009).

Debido a que se ha observado variabilidad en los niveles séricos de la leptina en personas con obesidad, sería importante conocer la relación entre los SNPs y la metilación en la región promotora de leptina, ya que no hay reportes en la literatura donde se evaluó la relación de los polimorfismos rs192763413, rs35048003 y -188C/A con el perfil de metilación en la región promotora de la leptina, pero se sugiere que al ubicarse estos SNPs en sitios CpG propicia que se genere un sitio sensible a metilación, el cual a su vez participaría en la represión de la expresión del gen y por lo tanto habría una menor expresión de la proteína. Además, cabe mencionar que el promotor del gen de leptina contiene un sitio de reconocimiento para el factor de transcripción C/EBP, en el cual se ubica un sitio CpG, que es un posible blanco de

metilación, lo cual podría favorecer de igual manera una represión de la expresión de la leptina.

# Capítulo I

**Correlation of leptin and soluble leptin receptor levels with anthropometric parameters  
in mother-newborn pairs**

## Original Article

# Correlation of leptin and soluble leptin receptor levels with anthropometric parameters in mother-newborn pairs

Linda A Marino-Ortega<sup>1</sup>, Adiel Molina-Bello<sup>2</sup>, Julio C Polanco-García<sup>2</sup>, José F Muñoz-Valle<sup>3</sup>, Aralia B Salgado-Bernabé<sup>1</sup>, Iris P Guzmán-Guzmán<sup>1</sup>, Isela Parra-Rojas<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Investigación en Obesidad y Diabetes, Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo, Guerrero, México; <sup>2</sup>Hospital de la Madre y el Niño Guerrerense (HMNG), Ciudad de los Servicios, Chilpancingo, Guerrero, México; <sup>3</sup>Instituto de Investigación en Ciencias Biomédicas, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, México

Received April 22, 2015; Accepted June 21, 2015; Epub July 15, 2015; Published July 30, 2015

**Abstract:** The aim of this study was to investigate if anthropometric parameters are associated with both leptin and soluble leptin receptor (sLEPR) levels in newborns and their mothers. This cross-sectional study was performed in 118 mother-newborn pairs. The venous blood sample of mothers was taken before delivery and immediately after delivery an umbilical cord blood sample was collected. Levels of leptin and sLEPR in maternal and umbilical cord sera were assessed by ELISA. Maternal serum concentration of leptin and sLEPR (6.2 and 25.7 ng/ml, respectively) were higher than in umbilical cord blood (2.4 and 14.2 ng/ml, respectively). However, the newborns and their mothers had higher sLEPR levels than leptin levels. In mothers was observed that leptin levels increase with weight gain in pregnancy and decreased sLEPR levels. Cord leptin levels correlated with neonatal birth weight and length, the body circumferences, placental weight and maternal leptin levels. Cord sLEPR levels correlated with maternal sLEPR and leptin levels. Maternal serum concentration of leptin correlated with pre-pregnancy BMI, weight gain, cord sLEPR and leptin levels. Maternal sLEPR concentration correlated with cord sLEPR levels. The leptin and sLEPR levels in mother-newborn pairs are related with anthropometric parameters and an inverse correlation between leptin levels and sLEPR was observed in pairs.

**Keywords:** Leptin, soluble receptor leptin, neonate, umbilical cord, placenta

## Introduction

It has been strongly suggested that the influence of maternal weight determines the relationship of birth weight in the newborn and the subsequent BMI, which it is in relation to the increased supply of energy substrates in the binomial. Maternal overnutrition negatively influences body composition of the fetus and predisposes to the development of obesity-related complications [1]. There is evidence suggesting that cytokines produced by the maternal endometrium and the developing embryo play an important role in this signaling process. Although numerous cytokine-receptor pairs are expressed by the maternal endometrium and the embryo during implantation, their temporal pattern of expression is still poorly understood [2]. Several cytokines and growth factors are known to influence the migration, proliferation and

invasion of the trophoblast [3, 4]. Leptin has been suggested to be involved in other functions during pregnancy, due to high concentrations produced by the placenta [5].

Leptin is the hormone product of the *LEP* gene and was originally considered as an adipocyte-derived signaling molecule to participate in modulating satiety and energy homeostasis [6, 7]. Actually, the pleiotropic effects of the hormone have been identified; leptin is involved on modulation of several processes such as thermogenesis, homeostasis, angiogenesis, hematopoiesis, osteogenesis, chondrogenesis, neuroendocrine, and immune functions, as well as arterial pressure control [8, 9]. Leptin exerts its function through a specific receptor that is expressed in isoforms by alternatively spliced and differ by the relative lengths of their cytoplasmic regions. Within its receptor are included a

## Leptin and sLEPR levels in mother-newborn pairs

**Table 1.** Clinical and anthropometric characteristics of the mothers

Variables	Values
Age (years)*	25 (22-34)
Height (cm)†	1.53 ± 0.06
Pre-pregnancy weight (kg)*	57 (52-79)
Pre-pregnancy BMI (kg/m <sup>2</sup> )*	24 (22.3-32.5)
Perinatal weight (kg)*	67 (61-90)
Perinatal BMI (kg/m <sup>2</sup> )*	28.0 (26.2-37.4)
Weight gain (kg)*	9 (6.2-16.5)
Weight gain category n (%)	
Underweight	60 (50.4)
Normal-weight	46 (38.7)
Overweight	13 (10.9)
Placental weight (g)*	625 (540-875)
Hip circumference (cm)†	104.5 ± 10.3
Belly circumference (cm)*	111 (106-129)
Arm circumference (cm)*	27 (25.2-33)
SBP (mmHg)†	108.53 ± 11.34
DBP (mmHg)†	70.57 ± 9.61

The data shown are median and percentiles (25-75) for nonparametric variables (\*), mean ± standard deviation for parametric variables (†) and frequency as n (%). BMI: Body mass index, SBP: systolic blood pressure, DBP: diastolic blood pressure.

long form (bLEPR) that predominates in the hypothalamus and a soluble isoform (sLEPR, circulating leptin receptor) generated by the proteolytic cleavage of membrane-bound receptors [10].

It has been proposed that leptin in pregnancy include the regulation of fetal growth and immunomodulation, as well as mobilization of the maternal fat. According to placental perfusion studies, 98.4% of placental leptin is released into the maternal circulation, as well, total and free leptin concentrations are higher in maternal blood during pregnancy and further elevated in pre-eclampsia. Therefore, leptin could be one of the fetal-placental signals altering maternal metabolism to benefit the fetus by mobilizing nutrients [11].

Several studies have demonstrated a strong positive correlation between the serum leptin concentration and amount of body fat [12, 13]. On the other hand, the physiological role of leptin in fetal growth has not been well clarified. Reports have demonstrated that leptin levels correlate highly with body mass index in obese children and rise just before the onset of puberty [14]. The aim of this study was to investigate if anthropometric parameters are associated

with both leptin and sLEPR levels in newborns and their mothers.

### Materials and methods

#### Participants

We recruited 118 mother-newborn pairs from the Hospital “La Madre y el Niño Guerrerense”, from Chilpancingo City in the state of Guerrero, Mexico. The present study was conducted between January 2013 and March 2014. The study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki. All included mothers provided signed informed consent before enrollment. The Ethics Committee of the Hospital “La Madre y el Niño Guerrerense” approved the study protocol. Mothers with pre-eclampsia, hypertension, or diabetes were excluded. Full term neonates were born after uncomplicated pregnancies and were otherwise healthy.

#### Clinic and anthropometric measurements

The clinical characteristics of the mothers were taken by a trained nurse using standard methods. The weight was measured with a mechanical column, bascule SECA 709 model. To determine height was used vertical stadiometer SECA model 206, and body circumferences were measured using an anthropometric tape. The blood pressure was determined with an automated sphygmomanometer OMRON 712C. We calculated the pre-pregnancy body mass index, according to World Health Organization (WHO). The weight gain was categorized according to the Institute of Medicine of the United States of America (IOM) [15]. The venous blood sample of mothers was taken before delivery. Clinical and anthropometric assessment in the newborn was performed by neonatologist at the same hospital, who determined the weight at birth with a mechanical bascule (SECA 745) and length with mechanical stadiometer for babies (SECA 207). With the anthropometric tape (SECA) were measured the head, abdominal and thoracic circumferences. According to the Mexican Association of Pediatrics we categorize birth weight in underweight (< 2.5 kg), normal-weight (2.5-3.5 kg) and overweight (> 3.5 kg). The newborns and their placentas were weighed immediately after birth.

#### Laboratory measurements

The venous blood sample of mothers was taken before delivery and immediately after delivery an umbilical cord blood sample was collected.

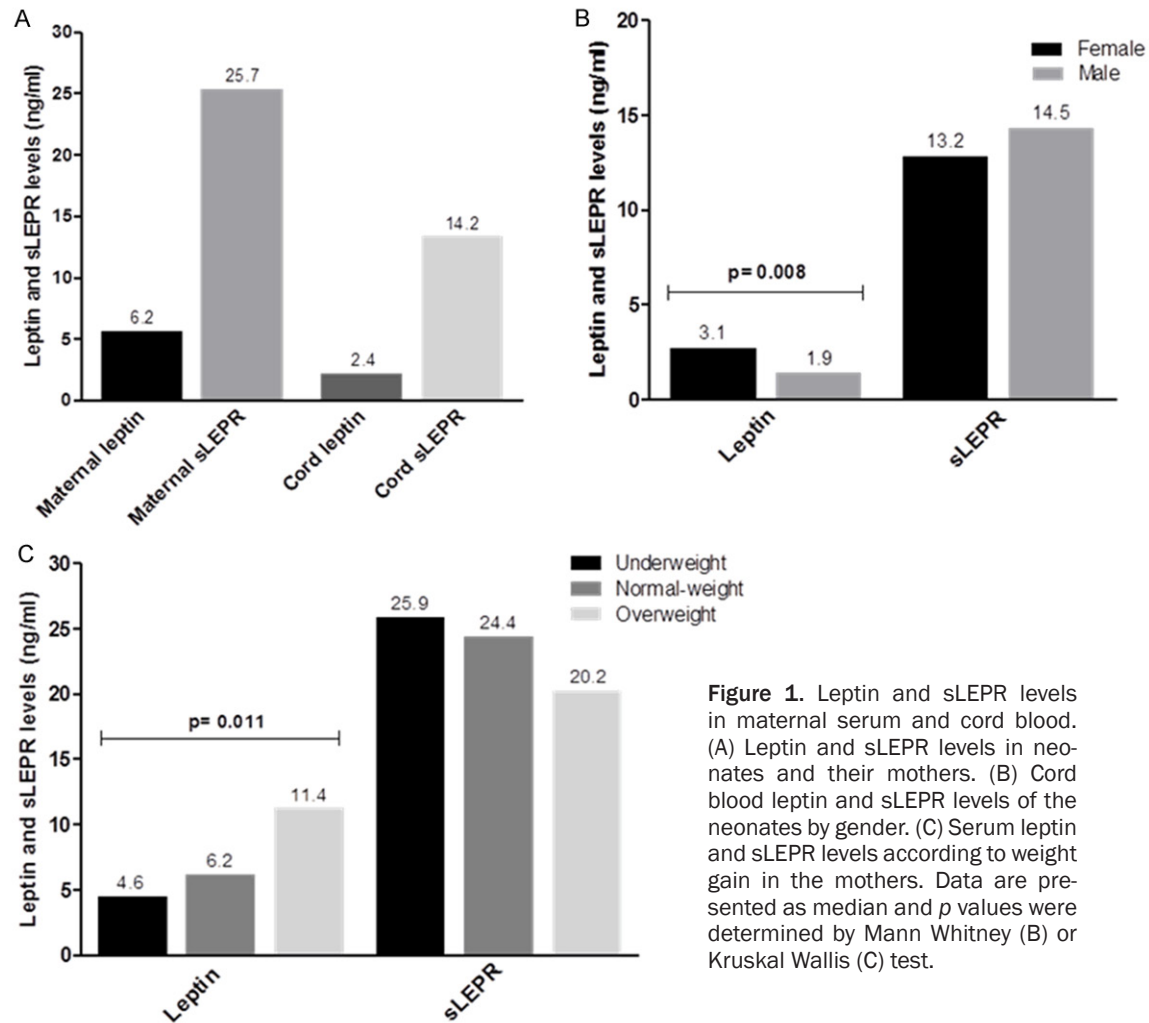


## Leptin and sLEPR levels in mother-newborn pairs

**Table 2.** Anthropometric and clinical characteristics of the newborns

Variable	Total (n = 118)	Gender		P
		Female (n = 61)	Male (n = 57)	
Gestational age (weeks) <sup>†</sup>	38.9 ± 1.3	38.9 ± 1.2	38.9 ± 1.3	0.83
Length (cm) <sup>*</sup>	51 (49-53)	51 (50-53)	50.5 (49-53)	0.19
Birthweight (kg) <sup>*</sup>	3.16 (2.9-3.3)	3.18 (2.9-3.3)	3.13 (2.9-3.3)	0.90
Birthweight category n (%)				0.58
Underweight < 2.5 kg	3 (2.5)	2 (3.3)	1 (1.8)	
Normal-weight 2.5-3.5 kg	98 (83.1)	52 (85.3)	46 (80.7)	
Overweight > 3.5 kg	17 (14.4)	7 (11.4)	10 (17.5)	
Head circumference (cm) <sup>*</sup>	34 (33-36.5)	34 (33-36.5)	34 (33-36.5)	0.50
Thoracic circumference (cm) <sup>*</sup>	33 (32-34)	33 (32-34)	33.5 (33-35)	0.04
Abdominal circumference (cm) <sup>*</sup>	30.5 (30-35)	30 (30-36)	31 (30-34.5)	0.57
Temperature (°C) <sup>*</sup>	36.5 (36.2-37.5)	36.5 (36.1-37.5)	36.7 (36.5-37.6)	0.11

The data shown are median and percentiles (25-75) for nonparametric variables (\*), mean ± standard deviation for parametric variables (†). p values were determined by Mann-Whitney and Student's t test, respectively.



**Figure 1.** Leptin and sLEPR levels in maternal serum and cord blood. (A) Leptin and sLEPR levels in neonates and their mothers. (B) Cord blood leptin and sLEPR levels of the neonates by gender. (C) Serum leptin and sLEPR levels according to weight gain in the mothers. Data are presented as median and p values were determined by Mann Whitney (B) or Kruskal Wallis (C) test.

The blood sample was centrifuged at 1200 rpm for 10 min and the serum was stored at -70°C

until analysis. Leptin and sLEPR serum concentrations were measured by a sandwich ELISA

## Leptin and sLEPR levels in mother-newborn pairs

**Table 3.** Correlation of leptin and sLEPR in maternal serum and cord blood with selected variables

Variable	Maternal leptin		Cord leptin		Maternal sLEPR		Cord sLEPR	
	<i>r</i> *	<i>P</i>	<i>r</i> *	<i>P</i>	<i>r</i> *	<i>P</i>	<i>r</i> *	<i>P</i>
<i>Mothers</i>								
Pre-pregnancy BMI	0.32	< 0.001	0.01	0.882	-0.18	0.048	0.001	0.986
Prenatal BMI	0.34	< 0.001	0.07	0.483	-0.26	0.004	0.01	0.846
Weight gain	0.29	< 0.001	0.12	0.197	-0.15	0.108	0.07	0.389
Gestational age	-0.14	0.119	0.11	0.231	-0.03	0.716	-0.13	0.165
Placental weight	0.17	0.059	0.20	0.034	-0.03	0.780	0.03	0.785
Belly circumference	0.28	0.002	-0.04	0.621	-0.11	0.218	0.09	0.314
Leptin levels	—	—	0.21	0.026	-0.09	0.311	0.42	< 0.001
sLEPR levels	-0.09	0.332	0.11	0.248	—	—	0.29	0.002
<i>Newborns</i>								
Birthweight	0.04	0.675	0.30	0.001	0.05	0.604	0.12	0.203
Length	-0.02	0.827	0.30	0.001	0.04	0.706	0.06	0.484
Head circ.	0.21	0.024	0.15	0.114	0.13	0.162	0.23	0.019
Thoracic circ.	0.11	0.235	0.34	< 0.001	0.07	0.434	0.13	0.160
Abdominal circ.	0.07	0.451	0.27	0.003	0.12	0.182	0.10	0.268
Leptin levels	0.21	0.026	—	—	0.11	0.236	0.14	0.121
sLEPR levels	0.42	< 0.001	0.14	0.130	0.29	0.002	—	—

BMI: body mass index, Head circ: head circumference, Thoracic circ: thoracic circumference, Abdominal circ: abdominal circumference, sLEPR: soluble leptin receptor. \*Spearman correlation coefficient.

kit (Human Leptin ELISA and Human Leptin Receptor ELISA, BioVendor Laboratory Medicine Inc, Czech Republic), for these assays the detection limit was 0.2 ng/mL and 0.04 ng/mL, respectively.

### Statistical analysis

Data analysis was performed using the statistical package STATA v.9.2. The normality of continuous variables was assessed using the Shapiro-Wilk's test. Means and standard deviations for symmetric quantitative variables were obtained and the comparison between groups using the t-Student test or one-factor ANOVA. For non-symmetric quantitative variables was obtained medians and percentiles 25 and 75 and comparison between groups was performed using the Mann Whitney or Kruskal Wallis test, were obtained absolute and relative frequencies for qualitative variables and compared between study groups using the chi-square test statistic ( $\chi^2$ ) were determined. To evaluate correlations between plasma leptin concentration and other parameters, Spearman test was used. A value of  $P < 0.05$  was considered significant statistically.

### Results

Clinical and anthropometric characteristics of the mothers are summarized in **Table 1**. Median

maternal age of 25 years old (22-34 yr), median pre-pregnancy BMI of 24 kg/m<sup>2</sup> which is representative of normal-weight before pregnancy and median prenatal BMI of 28 kg/m<sup>2</sup> characteristic of overweight. However, when we categorize the weight gain of women according to the criteria of the Institute of Medicine of the United States of America (IOM) found that most women (50.4%) had low weight gain during pregnancy and 10.9% were overweight. The women had the blood pressure within the normal range.

The anthropometric and clinical characteristics of the newborns are shown in **Table 2**. The results show that female and male neonates had similar somatometric characteristics. However, when we categorize the birthweight of neonates according to Mexican association of Pediatrics found that male neonates had high prevalence of overweight (17.5%) than female neonates (11.4%), although it was not significant.

Serum concentration of leptin and sLEPR in newborn-mother pairs are shown in **Figure 1A**. Maternal serum concentration of leptin and sLEPR (6.2 and 25.7 ng/ml, respectively) were higher than in umbilical cord blood (2.4 and 14.2 ng/ml, respectively). However, the newborns and their mothers had higher sLEPR than

## Leptin and sLEPR levels in mother-newborn pairs

leptin levels. **Figure 1B** shows cord blood leptin and sLEPR levels of the neonates by gender. Leptin was detected in all samples. Leptin levels were higher in females (3.1 ng/ml) than males (1.9 ng/ml) in the total sample, but there was no significant difference in sLEPR levels by gender. Serum leptin and sLEPR levels according to weight gain in the mothers are shown in **Figure 1C**. In mothers was observed that leptin levels increase with weight gain in pregnancy and decreased sLEPR levels.

There was no significant correlation between the anthropometric characteristics of the mothers and cord blood leptin and sLEPR levels of the newborns. Cord blood leptin levels correlated with neonatal birthweight and length ( $r = 0.30$ ,  $P = 0.001$ ), body circumferences, placental weight ( $r = 0.20$ ,  $P = 0.034$ ) and maternal leptin levels ( $r = 0.21$ ,  $P = 0.026$ ). There was no correlation between cord blood sLEPR levels and anthropometric parameters of the neonates, but if with maternal sLEPR and leptin levels ( $r = 0.29$ ,  $P = 0.002$  and  $r = 0.42$ ,  $P < 0.001$ , respectively). Maternal serum concentration of leptin correlated with pre-pregnancy BMI ( $r = 0.32$ ,  $P < 0.001$ ), weight gain in pregnancy ( $r = 0.29$ ,  $P < 0.001$ ) and cord sLEPR and leptin levels ( $r = 0.42$ ,  $P < 0.001$  and  $r = 0.21$ ,  $P = 0.026$ ). Maternal sLEPR correlated negatively with pre-pregnancy BMI ( $r = -0.18$ ,  $P = 0.048$ ) and prenatal BMI ( $r = -0.26$ ,  $P = 0.004$ ), but it was correlated positively with cord sLEPR ( $r = 0.29$ ,  $P = 0.002$ ) (**Table 3**).

### Discussion

Our study showed that the main determinants of maternal leptin levels are body adiposity and weight gain during pregnancy, but an inverse relation between maternal sLEPR and body adiposity was observed. In neonates, leptin levels correlated with birthweight and anthropometric measures and sLEPR levels with maternal leptin and sLEPR levels.

We found that maternal serum concentration of leptin and sLEPR were higher than in umbilical cord blood. Several studies have provided evidence that high leptin and sLEPR levels are present in maternal serum that in cord blood serum at birth [16-18].

Similarly, it has been reported that leptin levels reflect the amount of adipose tissue and during pregnancy, fetal leptin levels increase in paral-

lel with its development [14]. In adults, levels of circulating leptin are directly proportional to total fat mass [19] and are negatively associated with insulin sensitivity [20]. In another study, circulating leptin level was found to be proportional to adipose tissue mass, and body fat percentage was possibly the best adiposity-related predictor of serum leptin concentrations in human, which may be due to leptin resistance [21]. In the studies on the association between leptin and indirect measures of adiposity, the most frequently used measures were body mass index (BMI) and waist circumference [22].

Furthermore, the increase in the concentration of leptin can be attributed to the mobilization of nutrient sources required for fetal growth such as maternal adipose tissue [23]. We confirmed that BMI and weight gain in pregnancy are the main determinants of leptin levels in pregnant women, but not the placental weight. This correlation suggests body adiposity as the main determinant factor for leptin levels in the mothers.

In this study, the leptin levels in umbilical cord blood are lower than those seen in the mothers. This may be due to the increased prevalence in neonates of normal-weight (83.1%) and underweight (2.5%), therefore to less body fat decreases the leptin levels. Furthermore, cord leptin levels correlated with neonatal length and birthweight, as well placental weight, and these results are consistent with another study that found that the fetus and placenta contribute to the total amount of leptin [24]. While it is known that the placenta secretes leptin, the wide majority of this (at least 95%) is secreted into the maternal circulation, with very little going into the fetal circulation, meaning that cord blood leptin reflects fetal fat mass, with less than 1% estimated to be from the placenta/maternal circulation [25].

There is converging evidence that a strong correlation between leptin levels and neonatal birth weight exists [26, 27], therefore lower leptin levels in the cord blood of our neonates suggest that is mostly sourced from fetal adipose tissue. We found that leptin levels in cord blood were highest in female compared to the male neonates, but not cord sLEPR levels. Even though, there was no significant difference in anthropometric measures between female and

## Leptin and sLEPR levels in mother-newborn pairs

male newborns, therefore cannot attribute the difference in leptin levels to increase in weight or body circumferences in females. Underlying causes might be the differential amount of fat tissue by gender, the role of the variable sex steroid milieu of the newborn and the heavier placental weight associated with female gender [28].

In another study, it has been reported that serum leptin levels are higher in female neonates than males, but whether the cause of this difference is a suppression of leptin synthesis by androgens remains unclear [29]. Mellati and colleagues suggests that the estrogens may to increase leptin levels in female neonates [30]. Estrogens have been reported to regulate leptin expression by acting on a portion of the estrogen response element in the leptin promoter [31]. While the estrogen and corticosteroids are associated with the enhancement of leptin synthesis, androgens are linked to leptin inhibition [32]. In healthy men, testosterone concentrations were negatively correlated with leptin in serum [33].

We found that the sLEPR concentrations in cord blood and maternal serum, were significantly highest compared to the leptin levels. Similar to the previous reports of sLEPR levels behave in an opposite fashion to leptin levels at birth [18], as in later stages of extrauterine life [34]. The function of sLEPR is not entirely clear but believed to delay the clearance of leptin from the circulation and, thus, increase leptin's availability [35]. In addition, there is evidence suggesting that sLEPR not only alters the clearance of leptin but also potentiates leptin action [36]. Therefore, our results suggest that, as a consequence of the inverse relationship between maternal levels of leptin and sLEPR, the increase in sLEPR levels may play a role in the regulation of the leptin levels and its biological activity. Similarly, high sLEPR in cord blood may prevent the leptin from degradation and clearance. Moreover, we found that cord sLEPR levels correlated with maternal serum concentration of leptin and sLEPR, thus hormonal or genetic factors of their mothers can influence sLEPR levels in newborns.

Our study has some limitations. We relied on a single measure of leptin and sLEPR levels at delivery and we did not measure other hormones that are implicated in the regulation of

leptin levels and birthweight in the newborns. Taken together, our results indicate that the leptin and sLEPR levels in mother-newborn pairs are related with anthropometric parameters and an inverse correlation between leptin levels and sLEPR was observed in pairs. Biological mechanisms underlying these observations need to be further elucidated.

### Acknowledgements

This study was supported by Grants from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología INFR-2014-02/229958 and Programa de Fortalecimiento Académico del Posgrado de Alta Calidad 2013 and 2014. LAMO received a fellowship of CONACYT (No. 231241).

### Disclosure of conflict of interest

None.

**Address correspondence to:** Dr. Isela Parra-Rojas, Laboratorio de Investigación en Obesidad y Diabetes, Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Avenida Lázaro Cárdenas S/N, Ciudad Universitaria, Chilpancingo, Guerrero 39090, México. Tel: +52 (747) 4725503; Fax: +52 (747) 4725503; E-mail: iprojas@yahoo.com

### References

- [1] Thomas C, Hypponen E, Power C. Prenatal exposure and glucose metabolism in adulthood. *Diabetes Care* 2007; 30: 918-924.
- [2] Maymó JL, Pérez Pérez A, Sánchez-Margalet V, Dueñas JL, Calvo JC, Varone CL. Up-regulation of placental leptin by human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 2009; 50: 304-313.
- [3] Fitzgerald JS, Busch S, Wengenmayer T, Foerster K, de la Motte T, Poehlmann TG, Markert UR. Signal transduction in trophoblast invasion. *Chem Immunol Allergy* 2005; 88: 181-199.
- [4] Fitzgerald JS, Poehlmann TG, Schleussner E, Markert UR. Trophoblast invasion: the role of intracellular cytokine signalling via signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). *Hum Reprod Update* 2008; 14: 335-344.
- [5] Magariños MP, Sánchez-Margalet V, Kotler M, Calvo JC, Varone CL. Leptin promotes cell proliferation and survival of trophoblastic cells. *Biol Reprod* 2007; 76: 203-210.
- [6] Kyriakakou M, Malamitsi-Puchner A, Militsi H, Boutsikou T, Margeli A, Hassiakos D, Kanaka-

## Leptin and sLEPR levels in mother-newborn pairs

- Gantenbein C, Papassotiriou I, Mastorakos G. Leptin and adiponectin concentrations in intra-uterine growth restricted and appropriate for gestational age fetuses, neonates, and their mothers. *Eur J Endocrinol* 2008; 158: 343-348.
- [7] Zare F, Moradzirkohi A, Maghbooli Zh, Hossein-nezhad A, Rahmani M, Larijani B. Relationship between Serum Umbilical Cord and Maternal Leptin and Adiponectin Concentrations with Fetal Growth Parameters. *Iranian J Publ Health* 2007; 75-79.
- [8] Fantuzzi G, Faggioni R. See comment in PubMed Commons below Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *J Leukoc Biol* 2000; 68: 437-446.
- [9] Sagawa N, Yura S, Itoh H, Mise H, Kakui K, Korita D, Takemura M, Nuamah MA, Ogawa Y, Masuzaki H, Nakao K, Fujii S. Role of Leptin in Pregnancy-A review. *Placenta* 2002; 23: S80-86.
- [10] Zastrow O, Seidel B, Kiess W, Thiery J, Keller E, Böttner A, Kratzsch J. The soluble leptin receptor is crucial for leptin action: evidence from clinical and experimental data. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003; 27: 1472-1478.
- [11] Laivuori H, Gallaher MJ, Collura L, Crombleholme WR, Markovic N, Rajakumar A, Hubel CA, Roberts JM, Powers RW. Relationships between maternal plasma leptin, placental leptin mRNA and protein in normal pregnancy, pre-eclampsia and intrauterine growth restriction without pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod* 2006; 12: 551-556.
- [12] Castellano Filho DS, do Amaral Correa JO, Dos Santos Ramos P, de Oliveira Montessi M, Aarestrup BJ, Aarestrup FM. Body weight gain and serum leptin levels of non-overweight and overweight/obese pregnant women. *Med Sci Monit* 2013; 19: 1043-1049.
- [13] Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S, Kern PA, Friedman JM. Leptin levels in human and rodent: Measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* 1995; 1: 1155-1161.
- [14] Harigaya A, Nagashima K, Nako Y, Morikawa A. Relationship between concentration of serum leptin and fetal growth. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 3281-3284.
- [15] Institute of Medicine. Weight Gain During Pregnancy: Reexamining the Guidelines. The National Academies Press; May 28, 2009.
- [16] Rafeey M, Ouladsahebmadarek E, Rashtchizadeh N, Sheikh Monazah F, Gorbanihaghjo A, Hosseini MB, Nejati N. Correlation between maternal and cord blood leptin and fetal growth. *African Journal of Biotechnology* 2007; 6: 2023-2027.
- [17] Schubring C, Kiess W, Englaro P, Rascher W, Dötsch J, Hanitsch S, Attanasio A, Blum WF. Levels of leptin in maternal serum, amniotic fluid, and arterial and venous cord blood: relation to neonatal and placental weight. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 1480-1483.
- [18] Kratzsch J, Schubring C, Stitzel B, Böttner A, Berthold A, Thiery J, Kiess W. Inverse changes in the serum levels of the soluble leptin receptor and leptin in neonates: relations to anthropometric data. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 2212-2217.
- [19] Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriaucinas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannessian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL, Caro JF. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 1996; 334: 292-295.
- [20] Wauters M, Considine RV, Yudkin JS, Peiffer F, De Leeuw I, Van Gaal LF. Leptin levels in Type 2 diabetes: associations with measures of insulin resistance and insulin secretion. *Horm Metab Res* 2003; 35: 92-96.
- [21] Mahabir S, Baer D, Johnson LL, Roth M, Campbell W, Clevidence B, Taylor PR. Body Mass Index, percent body fat, and regional body fat distribution in relation to leptin concentrations in healthy, non-smoking postmenopausal women in a feeding study. *Nutr J* 2007; 6: 3.
- [22] Mente A, Razak F, Blankenberg S, Vuksan V, Davis AD, Miller R, Teo K, Gerstein H, Sharma AM, Yusuf S, Anand SS; Study of the Health Assessment And Risk Evaluation; Study of the Health Assessment And Risk Evaluation in Aboriginal Peoples Investigators. Ethnic Variation in adiponectin and leptin levels and their association with adiposity and insulin resistance. *Diabetes Care* 2010; 33: 1629-1634.
- [23] Hauguel-de Mouzon S, Lepercq J, Catalano P. The known and unknown of leptin in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 194: 1537-1545.
- [24] Lappas M, Yee K, Permezel M, Rice GE. Release and regulation of leptin, resistin and adiponectin from human placenta, fetal membranes, and maternal adipose tissue and skeletal muscle from normal and gestational diabetes mellitus-complicated pregnancies. *J Endocrinol* 2005; 186: 457-465.
- [25] Catalano PM, Presley L, Minium J, Hanguel-de Mouzon S. Fetuses of obese mothers develop insulin resistance in utero. *Diabetes Care* 2009; 32: 1076-1080.
- [26] Yang SW, Kim SY. The relationship of the levels of leptin, insulin-like growth factor-I and insulin in cord blood with birth size, ponderal index, and gender difference. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2000; 13: 289-296.

## Leptin and sLEPR levels in mother-newborn pairs

- [27] Petridou E, Mantzoros CS, Belechri M, Skalkidou A, Dessypris N, Papathoma E, Salvanos H, Lee JH, Kedikoglou S, Chrousos G, Trichopoulos D. Neonatal leptin levels are strongly associated with female gender, birth length, IGF-I levels and formula feeding. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005; 62: 366-371.
- [28] Watanobe H, Habu S. Manipulation of neonatal gonadal steroid milieu and leptin secretion in later life in male and female rats. *Regul Pept* 2003; 110: 219-224.
- [29] Schubring C, Siebler T, Kratzsch J, Englaro P, Blum WF, Triep K, Kiess W. Leptin serum concentrations in healthy neonates within the first week of life: relation to insulin and growth hormone levels, skinfold thickness, body mass index and weight. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1999; 51: 199-204.
- [30] Mellati AA, Mazloomzadeh S, Anjomshoaa A, Alipour M, Karimi F, Mazloomi S, Naghi Kazemi SA. Multiple correlations between cord blood leptin concentration and indices of neonatal growth. *Arch Med Res* 2010; 41: 26-32.
- [31] Machinal F, Dieudonne MN, Leneveu MC, Pecquery R, Giudicelli Y. In vivo and in vitro ob gene expression and leptin secretion in rat adipocytes: evidence for a regional specific regulation by sex steroid hormones. *Endocrinology* 1999; 140: 1567-1574.
- [32] Reidy SP, Weber JM. Leptin: an essential regulator of lipid metabolism. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2000; 125: 285-298.
- [33] Thomas T, Burguera B, Melton LJ III, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Riggs BL, Khosla S. Relationship of serum leptin levels with body composition and sex steroid and insulin levels in men and women. *Metabolism* 2000; 49: 1278-1284.
- [34] Kratzsch J, Lammert A, Bottner A, Seidel B, Mueller G, Thiery J, Hebebrand J, Kiess W. Circulating soluble leptin receptor and free leptin index during childhood, puberty, and adolescence. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 4587-4594.
- [35] Huang L, Wang Z, Li C. Modulation of circulating leptin levels by its soluble receptor. *J Biol Chem* 2001; 276: 6343-6349.
- [36] Cohen SE, Kokkotou E, Biddinger SB, Kondo T, Gebhardt R, Kratzsch J, Mantzoros CS, Kahn CR. High circulating leptin receptors with normal leptin sensitivity in liver-specific insulin receptor knock-out (LIRKO) mice. *J Biol Chem* 2007; 282: 23672-23678.

## **Capítulo II**

**Leptin mRNA differential expression in tissues of neonates and their mothers**

# Leptin mRNA differential expression in tissues of neonates and their mothers

## 1. Introduction

Leptin, the product of the *LEP* gene, is a 16 kDa nonglycosylated polypeptide of 146 amino acids [1]. The central source of leptin is the adipose tissue, although it can also be produced in other sites, including the placenta [2-4]. Leptin exerts multiple functions, being the best characterized the regulation of food intake, energy expenditure and body composition beginning in the early life, when the hormone also controls overall fetal growth and development [5-6]. Several important local actions of leptin have been identified, including thermogenesis, homeostasis, osteogenesis, chondrogenesis, neuroendocrine and immune functions, as well as arterial pressure control, anti-apoptosis effects of trophoblast, stimulation of the amino acid transporter system A activity and induction of angiogenesis, a biphasic effect on cytotrophoblast invasion and modulation of synthesis of placental steroid hormones, [7-9].

In animals and humans, the concentrations of leptin in adipose tissue and plasma closely parallel the mass of adipose tissue and adipocyte size and triglyceride content [10-11]. It has been described, that the placenta plays an important role in regulating fetal growth and development as it produces a number of growth factors and hormones. Several studies suggest that leptin in the fetus is produced by fetal tissues or by placenta, and that leptin concentration in cord blood correlates with newborn anthropometry [12-14]. Other findings from animal studies indicate that leptin does not inhibit the appetite during intrauterine and early postnatal life. On the contrary, it seems that leptin promotes hyperphagia, suggesting that it contributes to the rapid growth and weight gain of the newborn, however this evidence is still inconclusive [15-16].

On the other hand, there is widespread localization of leptin receptors on placenta which are involved in the developing fetus, especially in bone and cartilage. This has led to the proposal that leptin is involved in the control of fetal growth. In human infants at term, umbilical leptin concentration has been correlated with placental weight and



with a number of indices of fetal growth including body weight and length, head circumference, ponderal index, adiposity and bone mineral content and density [17]. Interestingly, a meta-analysis of 19 observational studies reported a positive correlation between insulin and leptin and many of the babies' anthropometric indices at birth [18]. The aim of our study was to analyze the relationship of leptin mRNA expression in different tissues, such as placenta and umbilical cord in neonates and adipose tissue of their mothers with anthropometric measures.

## **2. Materials and Methods**

*2.1. Patients.* Adipose tissue biopsies were obtained immediately after cesarean deliveries from 30 mothers, and umbilical cord tissue and placenta from their neonates. All samples were obtained from the Department of Obstetrics and Gynecology at the Hospital "La Madre y el Niño Guerrerense", from Chilpancingo City in the state of Guerrero, Mexico. Clinic and anthropometric measurements of mothers and their newborns were taken by Hospital nursing staff. The study was approved by the Research Ethics Committee of the University of Guerrero; informed written consent was obtained from all mothers. Mothers with pre-eclampsia, hypertension or gestational diabetes were excluded.

*2.2. Sampling of maternal peripheral blood and umbilical cord and tissue acquisition.* The venous blood sample of mothers was taken before delivery and immediately after delivery an umbilical cord blood sample was collected. The blood sample was centrifuged at 1200 rpm for 10 min and the serum was stored at -80°C until analysis. Fresh samples of adipose tissue, placenta and umbilical cord tissue were obtained within 30 min after placental delivery in collaboration with the Department of Obstetrics and Gynecology of Hospital. Using a sterile scalpel, we excised one quadrangular segment (approximately 1 x 1 cm). After the samples were rinsed with saline, then the samples were stored at -80°C until further processing.

*2.3. Determination of serum leptin levels.* The serum leptin concentrations were determined with commercially available ELISA kit (Human Leptin ELISA, BioVendor Laboratory Medicine Inc. Czech Republic). The procedures for the methods were according to the instructions provided by the manufacturer. Absorbance was measured at a wavelength of 405 nm using ELISA reader (Tecan-Minilyser System Modelo A-5082, Austria/Europa). The sensitivity of the leptin assay was 0.2 ng/mL.

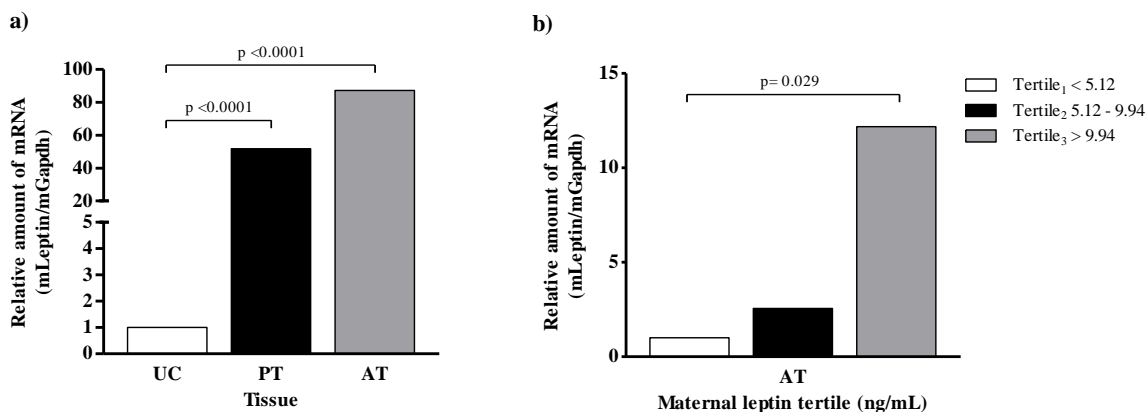
*2.4. RNA extraction and reverse transcription.* Total cellular RNA was extracted from adipose tissue, placenta and umbilical cord tissue by TRIzol® reagent (TRIzol®, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany). RNA concentrations were determined by spectrophotometry (NanoDrop 2000C, Thermo Scientific). About 1 µg of total RNA was reversely transcribed to synthesize cDNA, using oligo (dT) primer, M-MLV reverse transcriptase and reverse transcription reagents (Promega Corporation, USA). The cDNA samples were stored at -80°C until the real-time PCR assay.

*2.5. Leptin mRNA Expression Analysis.* TaqMan real-time PCR was used to quantify the expression of leptin gene in the different tissues. All samples were run in triplicate for analysis using the conditions indicated in the TaqMan Gene Expression Assay protocol in a Light Cycler Nano System (Roche Applied Science). The mRNA expression was normalized using glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). Relative gene expression levels were calculated using the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method [19] (expressed as relative expression units), after validating similar reaction efficiencies of the interest gene (leptin) and the reference gene GAPDH by running serial dilutions of both genes.

*2.6. Statistical analysis.* Data analysis was performed using STATA software (v.11.0) and GraphPad Prism® version 5.04 for Windows, GraphPad Software, Inc. After testing for Gaussian distribution, the data were analyzed using Mann-Whitney test for non-parametric data. A P-value of < 0.05 was considered significant.

### 3. Results

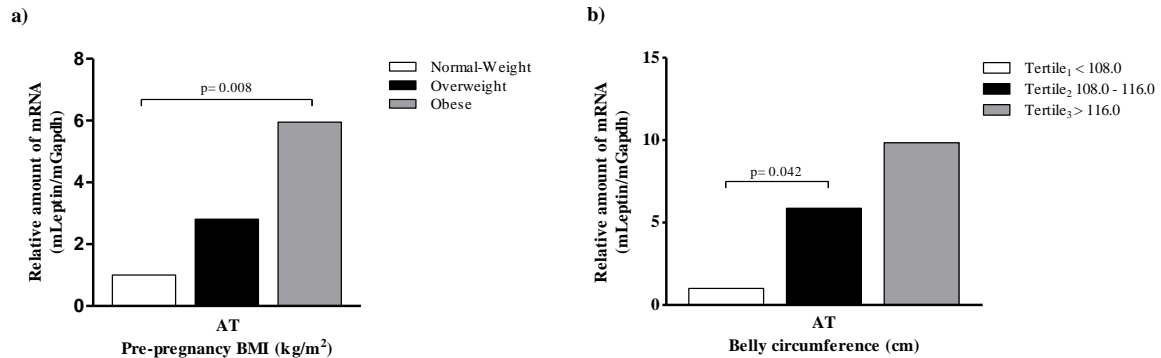
Leptin gene expression was compared between different tissues in newborns and their mothers. For this study, samples of tissue biopsy were taken from umbilical cord, the placenta and adipose tissue of mothers, immediately after delivery the samples were collected. The *LEP* gene expression was significantly different among tissues. Leptin mRNA expression was higher in placenta (51.82-fold;  $p < 0.0001$ ) and adipose tissue (87.23-fold;  $p < 0.0001$ ) than umbilical cord (Figure 1a). Leptin mRNA expression according to leptin levels in maternal serum and in umbilical cord blood were analyzed. We found that mothers with leptin levels  $> 9.94$  ng/mL had higher expression (12.18-fold;  $p = 0.029$ ) than mothers with leptin levels  $< 5.12$  ng/mL (Figure 1b). There was no significant difference in leptin gene expression between leptin levels in umbilical cord (data not shown).



**Figure 1.** Relative leptin mRNA expression in samples taken from umbilical cord (UC), placenta (PT) and adipose tissue (AT). **a)** Leptin mRNA expression was higher in adipose tissue and placenta than in umbilical cord. **b)** Leptin mRNA expression was higher in mothers with leptin levels above the third tertile compared to mothers with leptin levels lowest the first tertile, but there was no differences between leptin levels in umbilical cord. Relative expression analysis was performed using the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method and normalized to GAPDH. Comparison among groups was performed using the Mann-Whitney test;  $p < 0.05$ .

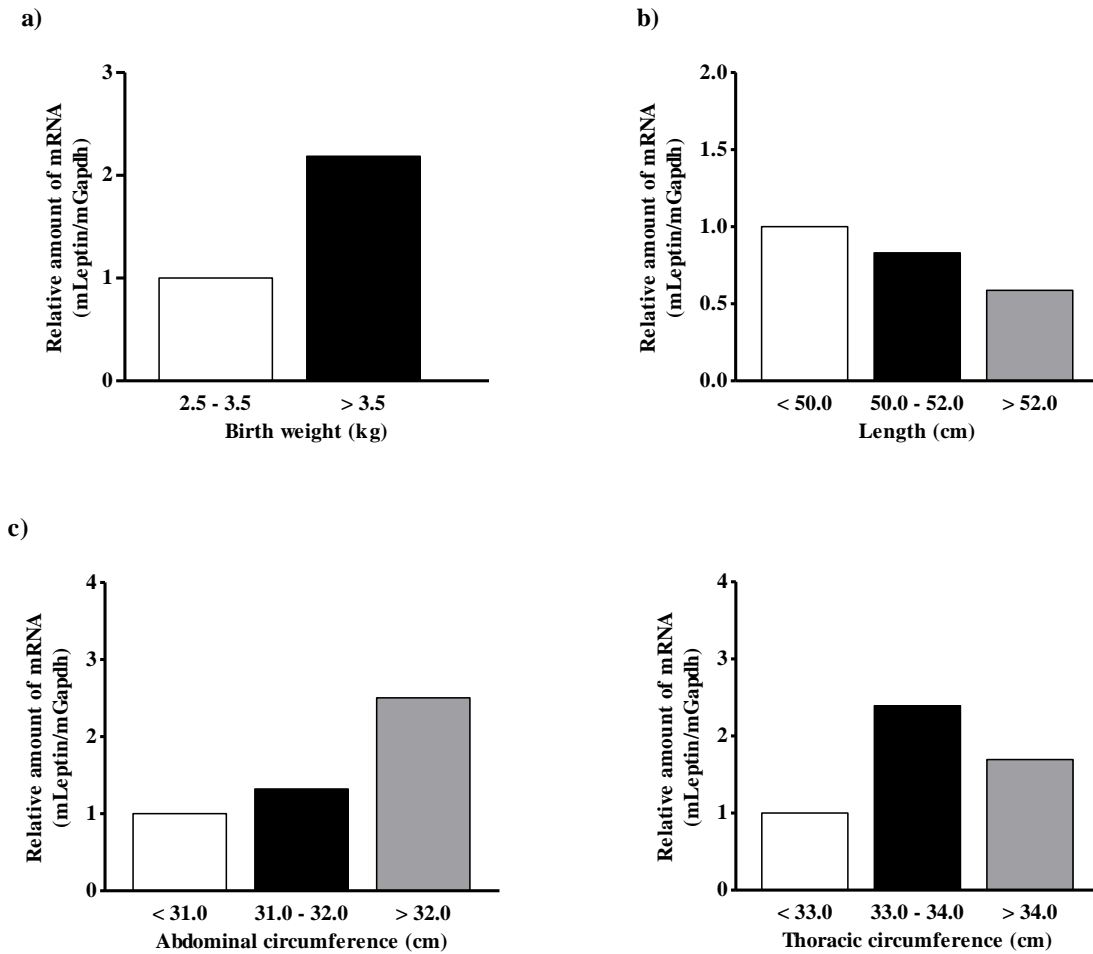
Relationship of leptin mRNA expression and anthropometric measurements in newborns and their mothers was evaluated. In adipose tissue of mothers was observed that leptin mRNA expression is higher in mothers pre-pregnancy obesity (5.95-fold;  $p = 0.008$ ) than mothers with normal-weight (Figure 2a). Similarly, the mothers with belly

circumference >108 cm had higher expression (5.86-fold;  $p= 0.042$ ) than mothers with circumference <108 cm (Figure 2b). We did not observed significant difference in leptin gene expression with circumference >116 cm because, only two mothers presented these circumference.



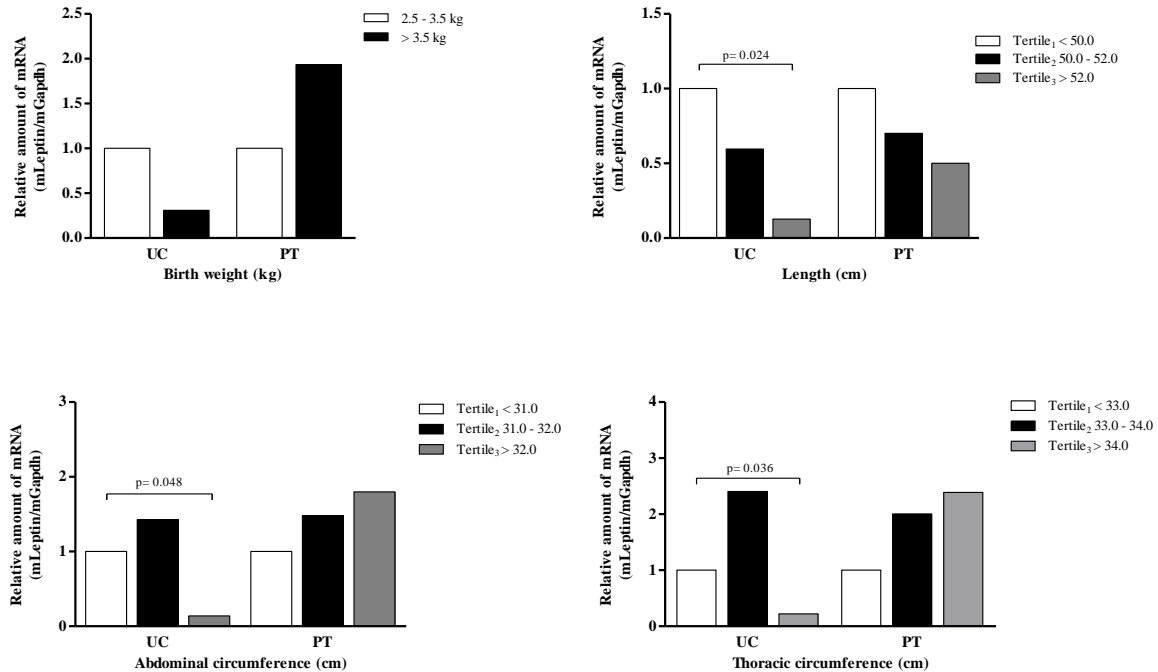
**Figure 2.** Relative leptin mRNA expression by maternal anthropometry. **a)** It was observed an increase leptin mRNA expression in adipose tissue (AT) of mothers with pre-pregnancy obesity, and **b)** greater belly circumference. Relative expression analysis was performed using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method and normalized to GAPDH. Comparison among groups was performed using the Mann-Whitney test;  $p < 0.05$ .

To analyze the relationship between leptin mRNA expression and anthropometric measurements of the newborns, these measures were categorized by tertiles. We found a high leptin gene expression in neonates with a birth weight > 3.5 kg compared with those with birth weight 2.5 – 3.5 kg (Figure 3a). Leptin gene expression was low in neonates with increased length compared with neonates with length <50 cm (Figure 3b). On the other hand, we observed that newborns with increased abdominal circumference had higher leptin expression than those with lower circumference (Figure 3c). Also, we found that neonates with thoracic circumference 33– 34 cm had high leptin expression compared to those with lower circumference (Figure 3d). There was no significant difference in leptin gene expression in umbilical cord and placenta according to the anthropometric measurements of the newborns.



**Figure 3.** Global analysis of the relative Leptin mRNA expression in newborns with anthropometry. A higher leptin RNAm expression was observed in newborns with an increment of a) birth weight, c) abdominal and d) thoracic circumference. b) It was observed that newborns with high length had decrease in leptin expression. Newborns were categorized for birth weight according to the Mexican Association of Pediatrics. Relative expression analysis was performed using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method and normalized to GAPDH. Comparison between groups was performed using the Mann-Whitney test;  $p < 0.05$ .

High leptin mRNA expression in placenta was observed in newborns with birth weight  $> 3.5$  kg but no in umbilical cord (Figure 4a). Similarly, high leptin mRNA in umbilical cord and placenta was observed in newborns with length  $< 50$  cm compared with neonates longer (Figure 4b). Low leptin mRNA in umbilical cord was observed in newborns with abdominal circumference  $> 32$  cm (Figure 4c) and thoracic circumference  $> 34.0$  (5.95-fold;  $p = 0.008$ ) but no in placenta (Figure 4d).



**Figure 4.** Relative expression analysis was performed using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method and normalized to GAPDH. Comparison between groups was performed using the Mann-Whitney test;  $p < 0.05$ .

## Discussion

In this study in tissue biopsies, we found high leptin mRNA expression in adipose tissue and placenta when compared with the umbilical cord. Mothers with higher levels of leptin had high leptin expression levels. Also, a high leptin mRNA expression in mothers with pre-pregnancy obesity and increased belly circumference was found. Interestingly, this is the first study that reports leptin mRNA expression of adipose tissue in pregnancy at term. However, it has been described that leptin is produced and secreted mainly by white adipose tissue and placenta during pregnancy and in small amounts in others tissues. On the other hand, it has been proposed a mechanism of leptin resistance during pregnancy, mainly due to the reduction in the transport of leptin across the blood brain barrier and alterations in leptin signaling in the hypothalamus [20]. Based on this, we suggest that the high leptin expression in adipose tissue and placenta is due to leptin resistance during pregnancy. Moreover, maternal serum leptin increases progressively during pregnancy, reaching a peak during the second trimester and at

the end of pregnancy; maternal leptin levels decline to normal values 24 hours after delivery [21].

Although there are no reports of leptin expression in adipose tissue during pregnancy, previous studies have reported a high leptin mRNA expression in adipose tissue both in human and rodent with obesity, and leptin expression levels are positively correlated with plasma leptin levels elevated. [5, 22-24]. Dusserre and coworkers showed that mRNA levels of leptin were higher in abdominal subcutaneous adipose tissue and leptin mRNA levels were positively correlated with the BMI [25]. Furthermore, plasma leptin levels in pregnant women are significantly higher than those in non-pregnant women [4, 26], and maternal leptin serum concentrations steadily increase during the first and second trimesters, reaching its peak in late second or early third trimester. These high levels are maintained throughout the remainder of gestation and decline drastically postpartum [21, 27]. Several studies in human and mice have provided evidence that leptin mRNA and leptin secretion is high in adipose tissue from obese women and these leptin mRNA expression levels in adipose tissue are correlated with plasma leptin [28-30]. Magariños and coworkers reported that pregnant rats exhibited a marked hyperleptinemia associated with an increase in leptin mRNA expression in both adipose tissue and placenta and suggest that the hyperphagia observed during pregnancy could be due to a decrease of the long form of the leptin receptor (LEPRb) at the hypothalamic level [31].

In our study, leptin mRNA expression with the neonatal anthropometry was also analyzed. A low leptin mRNA expression in umbilical cord of newborn with higher birth weight, greater length and increased abdominal and thoracic circumference was found. To our knowledge, this is the first study that reports the relationship between leptin mRNA expressions with neonatal anthropometry in umbilical cord tissue. However, very few studies have reported the leptin mRNA expression in umbilical cord [32-33]. Akerman and coworkers demonstrated that term pregnancy human umbilical cord and fetal membranes co-express leptin and its receptor, which supports the hypothesis that leptin is an autocrine and paracrine regulator in these tissues [33]. On the other hand,

several studies have also demonstrated a positive correlation between leptin concentrations in the umbilical cord blood and body birth weight, suggesting that leptin expression in placenta may also have a role in fetal development [34-35]. Others studies have reported that low leptin levels have been observed in small for gestational age (SGA) infants, compared to appropriately grown for gestational age (AGA) or large for gestational age (LGA) infants [36-37]. Harigaya and coworkers found that within the first 6 hours of life, the concentration of serum leptin in LGA infants and SGA infants was significantly higher and lower, respectively, than that in the AGA infants, and these concentrations was positively correlated with birth body weight [14].

Moreover, there was no significant difference in leptin gene expression in placenta according to the anthropometric measurements of the newborns. Nevertheless, we observed that newborns with increased anthropometric measure, leptin mRNA expression was low. It has been described that leptin is a key placental hormone; several studies have shown that leptin induces trophoblastic cell proliferation, inhibits apoptosis, stimulates protein synthesis, and hormone and cytokine production in trophoblastic cells, and regulates fetal growth and development [12, 38]. Leptin expression and its receptor have been localized in placenta trophoblasts cells [39-42].

Our results suggest that despite the fact that there is a lower leptin mRNA expression in umbilical cord, it's a source of leptin which is secreted toward fetal circulation. Nevertheless, we found a low leptin mRNA expression in umbilical cord in newborn with increased anthropometric measure, which leads us to suggest that these newborn have a less demand of leptin expression that smaller newborn. Besides, it has been described that the higher leptin levels in umbilical veins compared with umbilical arteries, and the marked fall during the neonatal period, indicate that the human placenta is a major source of leptin in the fetal circulation [43].

Furthermore, several mechanisms have been postulated to explain high leptin expression during pregnancy and relationship with fetal growth. Several studies have reported that leptin mRNA expression and plasma concentration can be modified by



hCG, estrogens and oxygen availability in utero. Maymó et al., shown that human chorionic gonadotropin hormone (hCG) enhances leptin promoter activity and regulates leptin gene expression at the transcriptional level [44]. Moreover, in similar studies it was also demonstrated that leptin has a stimulatory effect on hCG secretion added to primary cultures of human placental trophoblast cells in first-trimester and at term of pregnancy [45-46]. Furthermore, estrogens play a central role in reproduction, Gambino et al., shown that estrogens are a regulator of leptin expression in adipose tissue and placental in studies in vivo e in vitro [47]. Similarly, leptin expression in isolated rat adipocytes is inhibited by an estrogen receptor antagonist and diminution of leptin expression in white adipose tissue is reverted with estrogens administration in the same rats after ovariectomy [48-49]. In contrast to these studies, it has been shown that a decrease in placental leptin mRNA is associated with cases of intrauterine growth retardation suggesting that leptin influences fetal growth [38]. Furthermore, both pre-eclampsia and pregnancy-associated diabetes are another pathology characterized by increased placental leptin suggesting that this increase is associated with fetal hypoxia [50-51]. Other studies have described that human placental leptin is identical to that derived from adipose tissue in terms of size and immunoreactivity, but it has been also shown that the leptin gene has a specific upstream enhancer, known as the placental leptin enhancer region (PLE), implying that leptin gene expression is regulated differently in placenta than in adipose tissue [52-53].

Moreover, in vitro studies show that leptin induces cell proliferation in trophoblastic cells and human umbilical vein endothelial cells and through inhibition of apoptosis [32, 54-55]. Artwohl et al., reported that leptin increased expression of the apoptosis inhibitor bcl-2, modulates the hyperphosphorylation of retinoblastoma and cell cycle checkpoint genes/proteins as p53, p21 in umbilical vein endothelial cells [32].

It has been shown that leptin controls fetal bone remodeling by enhancing the differentiation of human bone marrow stromal cells to osteoblasts and decreasing bone resorption [56-58]. Javaid and coworkers described that umbilical venous leptin predicts both the size of the neonatal skeleton and its estimated volumetric mineral

density [59]. Previous studies have demonstrated a positive association between infant size and cord blood leptin concentration [60-61].

Taken together the results show a high leptin mRNA expression in adipose tissue and placenta of pregnancy at term and a low leptin expression in umbilical cord that seem participated in the regulated of fetal growth. Therefore leptin may be an important factor for growth and development of the fetus.

## References

1. 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(6505):425-432.
2. Ahima RS, Saper CB, Flier JS, Elmquist JK: Leptin regulation of neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol* 2000, 21(3):263-307.
3. Bado A, Levasseur S, Attoub S, Kermorgant S, Laigneau JP, Bortoluzzi MN, Moizo L, Lehy T, Guerre-Millo M, Le Marchand-Brustel Y et al: The stomach is a source of leptin. *Nature* 1998, 394(6695):790-793.
4. Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, Nishimura H, Yoshimasa Y, Tanaka I, Mori T et al: Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med* 1997, 3(9):1029-1033.
5. Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S et al: Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* 1995, 1(11):1155-1161.
6. Christou H, Serdy S, Mantzoros CS: Leptin in relation to growth and developmental processes in the fetus. *Semin Reprod Med* 2002, 20(2):123-130.
7. Sagawa N, Yura S, Itoh H, Kakui K, Takemura M, Nuamah MA, Ogawa Y, Masuzaki H, Nakao K, Fujii S: Possible role of placental leptin in pregnancy: a review. *Endocrine* 2002, 19(1):65-71.

8. Coya R, Martul P, Algorta J, Aniel-Quiroga MA, Busturia MA, Senaris R: Effect of leptin on the regulation of placental hormone secretion in cultured human placental cells. *Gynecol Endocrinol* 2006, 22(11):620-626.
9. Nelson SM, Coan PM, Burton GJ, Lindsay RS: Placental structure in type 1 diabetes: relation to fetal insulin, leptin, and IGF-I. *Diabetes* 2009, 58(11):2634-2641.
10. Frederich RC, Hamann A, Anderson S, Lollmann B, Lowell BB, Flier JS: Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat Med* 1995, 1(12):1311-1314.
11. Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM: Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 1995, 269(5223):543-546.
12. Hassink SG, de Lancey E, Sheslow DV, Smith-Kirwin SM, O'Connor DM, Considine RV, Opentanova I, Dostal K, Spear ML, Leef K et al: Placental leptin: an important new growth factor in intrauterine and neonatal development? *Pediatrics* 1997, 100(1):E1.
13. Perlitz Y, Gtezer-Soltzman S, Peleg A, Lang N, Almog B, Ben-Ami M: [Correlation of maternal serum and amniotic fluid leptin and insulin levels with neonatal birth weight]. *Harefuah* 2009, 148(7):420-423, 477.
14. Harigaya A, Nagashima K, Nako Y, Morikawa A: Relationship between concentration of serum leptin and fetal growth. *J Clin Endocrinol Metab* 1997, 82(10):3281-3284.
15. El-Haddad MA, Desai M, Gayle D, Ross MG: In utero development of fetal thirst and appetite: potential for programming. *J Soc Gynecol Investig* 2004, 11(3):123-130.
16. Roberts TJ, Nijland MJ, Caston-Balderrama A, Ross MG: Central leptin stimulates ingestive behavior and urine flow in the near term ovine fetus. *Horm Metab Res* 2001, 33(3):144-150.
17. Forhead AJ, Fowden AL: The hungry fetus? Role of leptin as a nutritional signal before birth. *J Physiol* 2009, 587(Pt 6):1145-1152.

18. Elhddad Agzail S. A., Lashen Hany: Birth Weight in Relation to Fetal and Maternal Leptin and Insulin: A Systematic Review and Meta-analysis. *Research in Obstetrics and Gynecology* 2012, 1(1):1-14.
19. Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods* 2001, 25:402-408.
20. Trujillo ML, Spuch C, Carro E, Senaris R: Hyperphagia and central mechanisms for leptin resistance during pregnancy. *Endocrinology* 2011, 152(4):1355-1365.
21. Hardie L, Trayhurn P, Abramovich D, Fowler P: Circulating leptin in women: a longitudinal study in the menstrual cycle and during pregnancy. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1997, 47(1):101-106.
22. Ranganathan S, Maffei M, Kern PA: Adipose tissue ob mRNA expression in humans: discordance with plasma leptin and relationship with adipose TNFalpha expression. *J Lipid Res* 1998, 39(4):724-730.
23. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL et al: Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 1996, 334(5):292-295.
24. Ogawa Y, Masuzaki H, Isse N, Okazaki T, Mori K, Shigemoto M, Satoh N, Tamura N, Hosoda K, Yoshimasa Y et al: Molecular cloning of rat obese cDNA and augmented gene expression in genetically obese Zucker fatty (fa/fa) rats. *J Clin Invest* 1995, 96(3):1647-1652.
25. Dusserre E, Moulin P, Vidal H: Differences in mRNA expression of the proteins secreted by the adipocytes in human subcutaneous and visceral adipose tissues. *Biochim Biophys Acta* 2000, 1500(1):88-96.
26. Sagawa N, Yura S, Itoh H, Mise H, Kakui K, Korita D, Takemura M, Nuamah MA, Ogawa Y, Masuzaki H et al: Role of leptin in pregnancy--a review. *Placenta* 2002, 23 Suppl A:S80-86.
27. Henson MC, Swan KF, O'Neil JS: Expression of placental leptin and leptin receptor transcripts in early pregnancy and at term. *Obstet Gynecol* 1998, 92(6):1020-1028.
28. Russell CD, Petersen RN, Rao SP, Ricci MR, Prasad A, Zhang Y, Brolin RE, Fried SK: Leptin expression in adipose tissue from obese humans: depot-specific

- regulation by insulin and dexamethasone. *Am J Physiol* 1998, 275(3 Pt 1):E507-515.
29. Krempler F, Breban D, Oberkofler H, Esterbauer H, Hell E, Paulweber B, Patsch W: Leptin, peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, and CCAAT/enhancer binding protein-alpha mRNA expression in adipose tissue of humans and their relation to cardiovascular risk factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000, 20(2):443-449.
  30. Guo KY, Halo P, Leibel RL, Zhang Y: Effects of obesity on the relationship of leptin mRNA expression and adipocyte size in anatomically distinct fat depots in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004, 287(1):R112-119.
  31. Garcia MD, Casanueva FF, Dieguez C, Senaris RM: Gestational profile of leptin messenger ribonucleic acid (mRNA) content in the placenta and adipose tissue in the rat, and regulation of the mRNA levels of the leptin receptor subtypes in the hypothalamus during pregnancy and lactation. *Biol Reprod* 2000, 62(3):698-703.
  32. Artwohl M, Roden M, Holzenbein T, Freudenthaler A, Waldhausl W, Baumgartner-Parzer SM: Modulation by leptin of proliferation and apoptosis in vascular endothelial cells. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002, 26(4):577-580.
  33. Akerman F, Lei ZM, Rao CV: Human umbilical cord and fetal membranes co-express leptin and its receptor genes. *Gynecol Endocrinol* 2002, 16(4):299-306.
  34. Schubring C, Kiess W, Englaro P, Rascher W, Dotsch J, Hanitsch S, Attanasio A, Blum WF: Levels of leptin in maternal serum, amniotic fluid, and arterial and venous cord blood: relation to neonatal and placental weight. *J Clin Endocrinol Metab* 1997, 82(5):1480-1483.
  35. Gross GA, Solenberger T, Philpott T, Holcomb WL, Jr., Landt M: Plasma leptin concentrations in newborns of diabetic and nondiabetic mothers. *Am J Perinatol* 1998, 15(4):243-247.
  36. Martos-Moreno GA, Barrios V, Saenz de Pipaon M, Pozo J, Dorronsoro I, Martinez-Biarge M, Quero J, Argente J: Influence of prematurity and growth restriction on the adipokine profile, IGF1, and ghrelin levels in cord blood: relationship with glucose metabolism. *Eur J Endocrinol* 2009, 161(3):381-389.

37. Mouzaki A, Panagoulas I, Raptis G, Farri-Kostopoulou E: Cord blood leptin levels of healthy neonates are associated with IFN-gamma production by cord blood T-cells. *PLoS One* 2012, 7(7):e40830.
38. Henson MC, Castracane VD: Leptin in pregnancy: an update. *Biol Reprod* 2006, 74(2):218-229.
39. Senaris R, Garcia-Caballero T, Casabiell X, Gallego R, Castro R, Considine RV, Dieguez C, Casanueva FF: Synthesis of leptin in human placenta. *Endocrinology* 1997, 138(10):4501-4504.
40. Challier J, Galtier M, Bintein T, Cortez A, Lepercq J, Hauguel-de Mouzon S: Placental leptin receptor isoforms in normal and pathological pregnancies. *Placenta* 2003, 24(1):92-99.
41. Laivuori H, Gallaher MJ, Collura L, Crombleholme WR, Markovic N, Rajakumar A, Hubel CA, Roberts JM, Powers RW: Relationships between maternal plasma leptin, placental leptin mRNA and protein in normal pregnancy, pre-eclampsia and intrauterine growth restriction without pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod* 2006, 12(9):551-556.
42. Schulz LC, Widmaier EP, Qiu J, Roberts RM: Effect of leptin on mouse trophoblast giant cells. *Biol Reprod* 2009, 80(3):415-424.
43. Yura S, Sagawa N, Mise H, Mori T, Masuzaki H, Ogawa Y, Nakao K: A positive umbilical venous-arterial difference of leptin level and its rapid decline after birth. *Am J Obstet Gynecol* 1998, 178(5):926-930.
44. Maymo JL, Perez Perez A, Sanchez-Margalet V, Duenas JL, Calvo JC, Varone CL: Up-regulation of placental leptin by human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 2009, 150(1):304-313.
45. Chardonens D, Cameo P, Aubert ML, Pralong FP, Islami D, Campana A, Gaillard RC, Bischof P: Modulation of human cytotrophoblastic leptin secretion by interleukin-1alpha and 17beta-oestradiol and its effect on HCG secretion. *Mol Hum Reprod* 1999, 5(11):1077-1082.
46. Cameo P, Bischof P, Calvo JC: Effect of leptin on progesterone, human chorionic gonadotropin, and interleukin-6 secretion by human term trophoblast cells in culture. *Biol Reprod* 2003, 68(2):472-477.

47. Gambino YP, Maymo JL, Perez-Perez A, Duenas JL, Sanchez-Margalet V, Calvo JC, Varone CL: 17Beta-estradiol enhances leptin expression in human placental cells through genomic and nongenomic actions. *Biol Reprod* 2010, 83(1):42-51.
48. Chu SC, Chou YC, Liu JY, Chen CH, Shyu JC, Chou FP: Fluctuation of serum leptin level in rats after ovariectomy and the influence of estrogen supplement. *Life Sci* 1999, 64(24):2299-2306.
49. Shimizu H, Shimomura Y, Nakanishi Y, Futawatari T, Ohtani K, Sato N, Mori M: Estrogen increases in vivo leptin production in rats and human subjects. *J Endocrinol* 1997, 154(2):285-292.
50. Hoegh AM, Borup R, Nielsen FC, Sorensen S, Hviid TV: Gene expression profiling of placentas affected by pre-eclampsia. *J Biomed Biotechnol* 2010, 2010:787545.
51. Qiu C, Williams MA, Vadachkoria S, Frederick IO, Luthy DA: Increased maternal plasma leptin in early pregnancy and risk of gestational diabetes mellitus. *Obstet Gynecol* 2004, 103(3):519-525.
52. Bi S, Gavrilova O, Gong DW, Mason MM, Reitman M: Identification of a placental enhancer for the human leptin gene. *J Biol Chem* 1997, 272(48):30583-30588.
53. Lappas M, Yee K, Permezel M, Rice GE: Release and regulation of leptin, resistin and adiponectin from human placenta, fetal membranes, and maternal adipose tissue and skeletal muscle from normal and gestational diabetes mellitus-complicated pregnancies. *J Endocrinol* 2005, 186(3):457-465.
54. Perez-Perez A, Maymo J, Duenas JL, Goberna R, Calvo JC, Varone C, Sanchez-Margalet V: Leptin prevents apoptosis of trophoblastic cells by activation of MAPK pathway. *Arch Biochem Biophys* 2008, 477(2):390-395.
55. Toro AR, Maymo JL, Ibarbalz FM, Perez-Perez A, Maskin B, Faletti AG, Sanchez-Margalet V, Varone CL: Leptin is an anti-apoptotic effector in placental cells involving p53 downregulation. *PLoS One* 2014, 9(6):e99187.
56. Harvey NC, Mahon PA, Robinson SM, Nisbet CE, Javaid MK, Crozier SR, Inskip HM, Godfrey KM, Arden NK, Dennison EM et al: Different indices of fetal growth predict bone size and volumetric density at 4 years of age. *J Bone Miner Res* 2010, 25(4):920-927.

57. Ogueh O, Sooranna S, Nicolaides KH, Johnson MR: The relationship between leptin concentration and bone metabolism in the human fetus. *J Clin Endocrinol Metab* 2000, 85(5):1997-1999.
58. Eleftheriou F, Ahn JD, Takeda S, Starbuck M, Yang X, Liu X, Kondo H, Richards WG, Bannon TW, Noda M et al: Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. *Nature* 2005, 434(7032):514-520.
59. Javaid MK, Godfrey KM, Taylor P, Robinson SM, Crozier SR, Dennison EM, Robinson JS, Breier BR, Arden NK, Cooper C: Umbilical cord leptin predicts neonatal bone mass. *Calcif Tissue Int* 2005, 76(5):341-347.
60. Varvarigou A, Mantzoros CS, Beratis NG: Cord blood leptin concentrations in relation to intrauterine growth. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1999, 50(2):177-183.
61. Ertl T, Funke S, Sarkany I, Szabo I, Rascher W, Blum WF, Sulyok E: Postnatal changes of leptin levels in full-term and preterm neonates: their relation to intrauterine growth, gender and testosterone. *Biol Neonate* 1999, 75(3):167-176.



## **Capítulo III**

**Polimorfismos en el gen de leptina y niveles de ARN mensajero de *LEP* en placenta y cordón umbilical de neonatos y tejido adiposo de las madres**

## **Polimorfismos en el gen de leptina y niveles de ARN mensajero de LEP en placenta y cordón umbilical de neonatos y tejido adiposo de las madres**

### **Introducción**

La leptina es un péptido biológicamente activo de 16 kDa, constituido de 167 aminoácidos que incluye una secuencia señal de 21 aminoácidos. La leptina está codificada por el gen *LEP* en los humanos, el cual está localizado en el cromosoma 7 en el locus 31.3 (7q31.3), incluye 650 kb y está compuesto de tres exones separados por dos intrones<sup>1-3</sup>. La leptina es secretada principalmente por los adipocitos blancos, y está implicada en la regulación de la ingesta de alimentos, gasto energético y el balance de energía<sup>4</sup>. Su expresión y secreción está altamente correlacionada con la grasa corporal y el tamaño del adipocito<sup>5</sup>. Se ha reportado que la leptina es una hormona placentaria clave, y varios estudios han demostrado que induce la proliferación de las células trofoblásticas, inhibe la apoptosis, estimula la producción de hormonas y citosinas en las mismas células, además regula el crecimiento y desarrollo del feto<sup>6-7</sup>. Los niveles séricos de leptina materna y de cordón incrementan a medida que avanza el embarazo. Estudios reportan una correlación positiva entre los niveles séricos de leptina en sangre de cordón umbilical con el peso al nacer<sup>8-10</sup>.

En humanos, se han identificado varios polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en el gen *LEP*<sup>11</sup>. Varios estudios de caso y controles han reportado que los polimorfismos -2548G/A y A19G en el gen *LEP* se asocian con la obesidad y los niveles séricos de leptina<sup>12-14</sup>. El polimorfismo -2548G/A consiste en la sustitución nucleotídica de una guanina por una adenina en la posición -2548 río arriba del sitio de inicio de la transcripción ATG en el promotor del gen *LEP*, y este polimorfismo se ha asociado con el incremento en la producción y secreción de leptina en los adipocitos<sup>15</sup>. El objetivo de este estudio fue investigar la asociación de los polimorfismos -2548G/A y A19G con los niveles de expresión del ARN mensajero (ARNm) de gen *LEP* en biopsias de placenta y cordón umbilical de neonatos y en tejido adiposo en las madres.

## Material y Métodos

*Participantes.* En este estudio se capturaron un total de 50 neonatos a término y sus madres; 22 niños y 22 niñas, con un rango de edad gestacional entre 37 y 40 semanas. Se seleccionaron mujeres embarazadas programadas para parto obstétrico por cesárea que aceptaron participar en el estudio, todas las mujeres firmaron un consentimiento informado antes del estudio. Se excluyeron aquellas madres con preclamsia, hipertensión y diabetes gestacional; neonatos con complicaciones clínicas al momento del nacimiento y con enfermedades congénitas también fueron excluidos. A todas las mujeres embarazadas que ingresaron a parto por cesárea, se les realizó una toma de muestra de sangre periférica por punción venosa, previo a la incisión quirúrgica, con un ayuno previo de 8 horas como mínimo, utilizando dos tubos, uno con anticoagulante (EDTA al 10%) y otro sin anticoagulante, obteniendo 3 ml de sangre en cada tubo. En el momento de la intervención quirúrgica se recolectó una biopsia de tejido adiposo y posteriormente, al nacimiento del neonato, al realizar el corte del cordón umbilical el médico pediatra, se procedió a coleccionar una muestra de sangre de cordón umbilical suficiente para la obtención de suero y leucocitos para la extracción de ADN. Posteriormente, las biopsias de placenta y cordón umbilical se recolectaron, para la extracción tanto de DNA como de RNA para realizar el análisis del perfil de metilación y expresión de la proteína, respectivamente. Los sueros obtenidos se guardaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

*Análisis de los niveles séricos de leptina.* De los sueros obtenidos y almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$ , de sangre periférica de la madre y sangre del cordón umbilical, se determinó la concentración de los niveles séricos de leptina, a través del ensayo inmunoenzimático ligado a enzima (Human Leptin ELISA, Bio Vendor, Enzo Life Sciences), basado en el principio de ELISA sandwich, utilizando un anticuerpo policlonal anti-leptina humana con un límite de sensibilidad de 0.2 ng/mL.

*Genotipificación de los polimorfismos en el gen de leptina.* El ADN genómico fue extraído de leucocitos totales de sangre periférica de la madre y de sangre de cordón umbilical del neonato y almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. Se determinaron dos polimorfismos en el gen de leptina. La genotipificación de los SNP seleccionados se realizó mediante las técnicas de

reacción en cadena de la polimerasa y polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP) en un termociclador (Techne TC-412). La información de los primers y las condiciones para el análisis de PCR-RFLP se muestra en la tabla 1. La mezcla de reacción se hizo en un volumen final de 20  $\mu$ l, adicionando: buffer 1x, MgCl<sub>2</sub> 2.0 mM, dNTPs 0.1 mM, 0.2 mM de cada primer, 1 U de Taq polimerasa (Invitrogen) y 0.1  $\mu$ g/ $\mu$ L de ADN genómico. Las condiciones de amplificación de PCR fueron las siguientes: una fase de desnaturalización inicial 94°C por 5 min, seguida por 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 seg, alineamiento entre 55 - 60°C por 30 seg, y una extensión a 72°C por 30 seg, seguida por una fase de extensión final de 72°C por 5 min. Se utilizó una alícuota de 10 $\mu$ l del producto de PCR y fue digerido con 1 U de enzima de restricción por 4 hrs. El análisis de productos de PCR, así como de los productos de la digestión con enzimas de restricción, fueron visualizados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% y teñidos con nitrato de plata al 0.2%.

*Extracción de ARN y transcripción reversa.* El ARN total fue extraído de los tejidos usando el TRIzol® (TRIzol® Reagent, Ambion|RNA by Life Technologies). Nosotros usamos 1 mL de TRIzol®/100 mg de tejido y adicionamos 400  $\mu$ L de Cloroformo. La concentración de ARN fue determinada espectrofotométricamente (NanoDrop 2000C, Thermo Scientific). Se retro-transcribió 1  $\mu$ g de ARN total para la síntesis de ADN complementario (ADNc) usando primer Oligo (dT), M-MLV transcriptasa inversa y reactivos de retro-transcripción (Promega Corporation, USA). El ADNc fue almacenado a -80°C hasta el análisis de PCR en tiempo real.

Análisis de la expresión del ARNm de LEP. La expresión de LEP y GAPDH fue cuantificada utilizando sondas TaqMan y todas las muestras se analizaron por triplicado utilizando las condiciones indicadas en el protocolo de ensayo en un Light Cycler Nano System (Roche Applied Science). Los niveles de expresión relativa del gen fueron calculadas utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (reportadas como unidades relativas de expresión)<sup>16</sup>. La validación de la eficiencia de la reacción del nuestro gen de interés (LEP) y el gen de referencia (GAPDH) se realizó mediante el corrimiento de diluciones seriadas para ambos genes.

Tabla 1. Primer y enzimas de restricción utilizados para la genotipificación.

Polimorfismo	SNP	Número rs de dbSNP	Posición	Secuencia del primer (5'-3')	Producto (pb)	Enzima de restricción	Alelo (pb)
-2548G/A	G/A	rs7799039	Promotor	F: TTTCTGTAAATTTCCCGTGAG R: AAAGCAAAGACAGGCATAAAAA	242	<i>HhaI</i>	G: 61/181 A: 242
A19G	G/A	rs2167270	Exon 1	F: CCCGCGAGGTGCACACTG R: AGGAGGAAGGAGCGCGCC	221	<i>MspAI</i>	G: 183/38 A: 221

SNP: polimorfismo de un solo nucleótido; F: sentido; R: antisentido.

*Análisis Estadístico.* Se realizó el análisis de los datos utilizando el software GraphPad Prism versión 5. La prueba para el equilibrio de Hardy-Weinberg para las frecuencias genotípicas y alélicas fue calculada mediante la prueba de ji cuadrada. Un valor de  $p < 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo.

## Resultados

*Distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos -2548G/A y A19G en el gen LEP.* Ambos polimorfismos cumplen con el equilibrio de Hardy Weinberg en el grupo de las madres ( $\chi^2 = 0.13$ ,  $p = 0.72$  polimorfismo -2548G/A;  $\chi^2 = 0.07$ ,  $p = 0.79$  polimorfismo A19G). La distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas de ambos polimorfismos se presentan en la tabla 2. El análisis comparativo de las frecuencias genotípicas y alélicas para los polimorfismos -2548G/A y A19G en el gen del leptina no mostró diferencias significativas entre madres e hijos.

Tabla 2: Distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos en el gen LEP en binomios (madre - hijo).

SNP	Genotipo	Madres $n = 50$	Hijos $n = 50$	Valor $p$	
-2548G/A	GG	18 (36.0)	12 (24.0)	0.39	
	GA	25 (50.0)	28 (56.0)		
	AA	7 (14.0)	10 (20.0)		
	Alelo	G	61 (61.0)	52 (52.0)	0.20
		A	39 (39.0)	48 (48.0)	
	$\chi^2 = 0.13$ ; $p = 0.72$				
A19G	GG	12 (24.0)	14 (28.0)	0.49	
	GA	24 (48.0)	27 (54.0)		
	AA	14 (28.0)	9 (18.0)		
	Alelo	G	48 (48.0)	55 (55.0)	0.32
		A	52 (52.0)	45 (45.0)	
	$\chi^2 = 0.07$ ; $p = 0.79$				

Se muestran n y % por conteo directo, valor de  $p$  calculado por prueba de  $\chi^2$ .

*Polimorfismos en el gen de leptina y su relación con los parámetros antropométricos y niveles séricos de la proteína en madres e hijos.* Cuando se realizó un análisis de comparación de las variables antropométricas y bioquímicas en las madres y los neonatos por genotipos de ambos polimorfismos de acuerdo con un modelo genético dominante o recesivo. Para el polimorfismo -2548 G/A los genotipos G/A y A/A fueron agrupados para el modelo genético dominante, el grupo -2548 G/A + A/A mostró un incremento en peso, índice de masa corporal (IMC) y circunferencias corporales en las madres (Tabla 3). Mientras que en el grupo de los neonatos se observó que los portadores del genotipo AA presentan menor peso al nacer en un modelo genético recesivo. No se observaron diferencias significativas cuando analizamos los niveles séricos de leptina en las madres, pero se observa una tendencia en la disminución de los niveles séricos en los neonatos portadores del genotipo A/A en el modelo recesivo.

Tabla 3 Características antropométricas y bioquímicas de acuerdo al polimorfismo -2548 G/A en el gen *LEP*.

Madres	Modelo dominante		Valor <i>p</i>	Modelo recesivo		Valor <i>p</i>
	GG <i>n</i> = 18	GA + AA <i>n</i> = 32		GG + GA <i>n</i> = 43	AA <i>n</i> = 7	
Peso previo al embarazo (kg)	55.61 ± 5.46	63.36 ± 9.85	<b>0.004<sup>a</sup></b>	60.03 ± 9.14	63.86 ± 10.06	0.316
IMC previo al embarazo (kg/m <sup>2</sup> )	23.37 ± 2.89	26.30 ± 4.54	<b>0.017<sup>a</sup></b>	25.07 ± 4.22	26.31 ± 4.50	0.479
Peso perinatal (kg)	65.00 (61.00 – 66.00)	70.90 (65.55 – 77.00)	<b>0.003<sup>b</sup></b>	67.00 (62.30 – 73.60)	72.00 (66.60 – 78.3)	0.158
IMC perinatal (kg/m <sup>2</sup> )	27.47 (26.43 – 29.09)	29.63 (26.94 – 32.09)	<b>0.043<sup>b</sup></b>	27.56 (26.43 – 30.25)	30.44 (27.02 – 32.17)	0.282
Ganancia de peso gestacional (kg)	9.0 (8.0 – 12.0)	8.4 (4.9 – 11.3)	0.395	8.5 (6.0 – 11.3)	8.5 (4.6 – 12.0)	0.967
Peso placenta (kg)	0.648 (0.625 – 0.740)	0.628 (0.578 – 0.740)	0.182	0.640 (0.600 – 0.740)	0.645 (0.605 – 0.655)	0.654
Circunferencia cadera (cm)	100.0 ± 6.9	107.6 ± 9.3	<b>0.004<sup>a</sup></b>	104.7 ± 9.4	105.6 ± 8.2	0.764
Circunferencia vientre (cm)	110.0 (107.0 – 116.0)	113.5 (106.5 – 118.5)	0.479	111.0 (107.0 – 118.0)	114.0 (106.0 – 119.0)	0.856
Circunferencia pecho (cm)	96.5 (93.0 – 99.0)	101 (98.0 – 105.0)	<b>0.031<sup>b</sup></b>	99.0 (95.0 – 103.0)	101.0 (98.0 – 105.0)	0.385
Circunferencia brazo (cm)	26.4 ± 2.4	29.0 ± 3.5	<b>0.006<sup>a</sup></b>	28.0 ± 3.5	28.6 ± 2.6	0.628
Leptina (ng/mL)	6.14 (2.39 – 10.52)	7.94 (2.40 – 11.02)	0.266	7.69 (2.40 – 10.73)	7.91 (6.10 – 10.16)	0.442
Neonatos	GG <i>n</i> = 12	GA + AA <i>n</i> = 38	Valor <i>p</i>	GG + GA <i>n</i> = 40	AA <i>n</i> = 10	Valor <i>p</i>
Peso al nacer (kg)	3.309 ± 0.331	3.158 ± 0.351	0.195	3.245 ± 0.326	2.994 ± 0.383	<b>0.041<sup>a</sup></b>
Longitud (cm)	51.0 ± 1.7	50.5 ± 1.9	0.442	50.8 ± 1.9	50.2 ± 1.5	0.403
Circunferencia cefálica (cm)	34.8 ± 1.6	34.7 ± 1.3	0.774	34.8 ± 1.4	34.5 ± 1.2	0.546
Circunferencia torácica (cm)	34.1 ± 2.0	33.7 ± 1.7	0.459	34.0 ± 1.7	33.2 ± 1.6	0.185
Circunferencia abdominal (cm)	31.5 ± 2.2	31.5 ± 2.1	0.943	31.7 ± 2.2	30.6 ± 1.3	0.113
Leptina (ng/mL)	2.37 (0.571 - 3.08)	2.16 (0.84 – 3.76)	0.823	2.48 (0.84 – 3.66)	1.67 (0.79 - 2.38)	0.083

Los valores presentados son media ± desviación estándar, mediana y percentiles 5 y 95. IMC (índice de masa corporal), valor de *p* fue calculado por la prueba de <sup>a</sup>Mann Whitney y <sup>b</sup>t de Student.

Con respecto al polimorfismo A19G los genotipos G/G +G/A se agruparon para el modelo genético recesivo. En la tabla 4 se muestra que el grupo 19 G/G + G/A mostró un incremento en la antropometría materna (mayor peso, IMC, circunferencia de cadera, circunferencia de pecho y la circunferencia del brazo). En el grupo de los neonatos, los portadores de los genotipos G/G y G/A muestran un incremento en el peso al nacer y mayor circunferencia torácica. No se observaron diferencias significativas cuando analizamos los niveles séricos de leptina en las madres.

Tabla 4: Características antropométricas y bioquímicas de acuerdo al polimorfismo A19G en el gen *LEP*.

Madres	Modelo dominante			Modelo recesivo		Valor <i>p</i>
	GG <i>n</i> = 12	GA + AA <i>n</i> = 38	Valor <i>p</i>	GG + GA <i>n</i> = 36	AA <i>n</i> = 14	
Peso previo al embarazo (kg)	61.67 ± 8.44	60.22 ± 9.59	0.643	63.01 ± 9.51	54.29 ± 4.60	<b>0.002</b>
IMC previo al embarazo (kg/m <sup>2</sup> )	24.55 ± 3.81	25.47 ± 4.39	0.521	26.28 ± 4.39	22.60 ± 2.32	<b>0.005</b>
Peso perinatal (kg)	69.15 (63.75 – 74.80)	67.00 (63.50 – 75.50)	0.759	70.15 (65.25 – 76.00)	64.25 (60.00 – 66.00)	<b>0.003</b>
IMC perinatal (kg/m <sup>2</sup> )	27.24 (25.05 – 30.71)	28.76 (26.64 – 30.90)	0.247	29.63 (27.13 – 31.82)	26.84 (25.54 – 27.62)	<b>0.009</b>
Ganancia de peso gestacional (kg)	7.3 (4.0 – 10.8)	9.0 (7.0 – 12.0)	0.159	8.15 (4.90 – 11.30)	9.25 (8.50 – 12.0)	0.217
Peso placenta (kg)	0.630 (0.563 – 0.712)	0.643 (0.615 – 0.740)	0.525	0.633 (0.598 – 0.740)	0.645 (0.625 – 0.740)	0.375
Circunferencia cadera (cm)	103.3 ± 7.1	105.4 ± 9.8	0.499	106.8 ± 9.1	99.9 ± 7.7	0.016
Circunferencia vientre (cm)	107.5 (106.0 – 115.0)	113.5 (108.0 – 119.0)	0.139	114.0 (107.3 – 119.0)	108.5 (106.0 – 115.0)	0.163
Circunferencia pecho (cm)	98.5 (96.5 – 102.5)	99.5 (95.0 – 105.0)	0.767	100.5 (97.5 – 105.0)	95.0 (93.0 – 99.0)	<b>0.028</b>
Circunferencia brazo (cm)	27.6 ± 3.2	28.2 ± 3.4	0.614	28.8 ± 3.4	26.2 ± 2.6	<b>0.013</b>
Leptina (ng/mL)	7.78 (2.37 – 10.05)	8.17 (2.49 – 10.73)	0.785	7.94 (2.40 – 10.39)	6.14 (2.39 – 10.73)	0.517

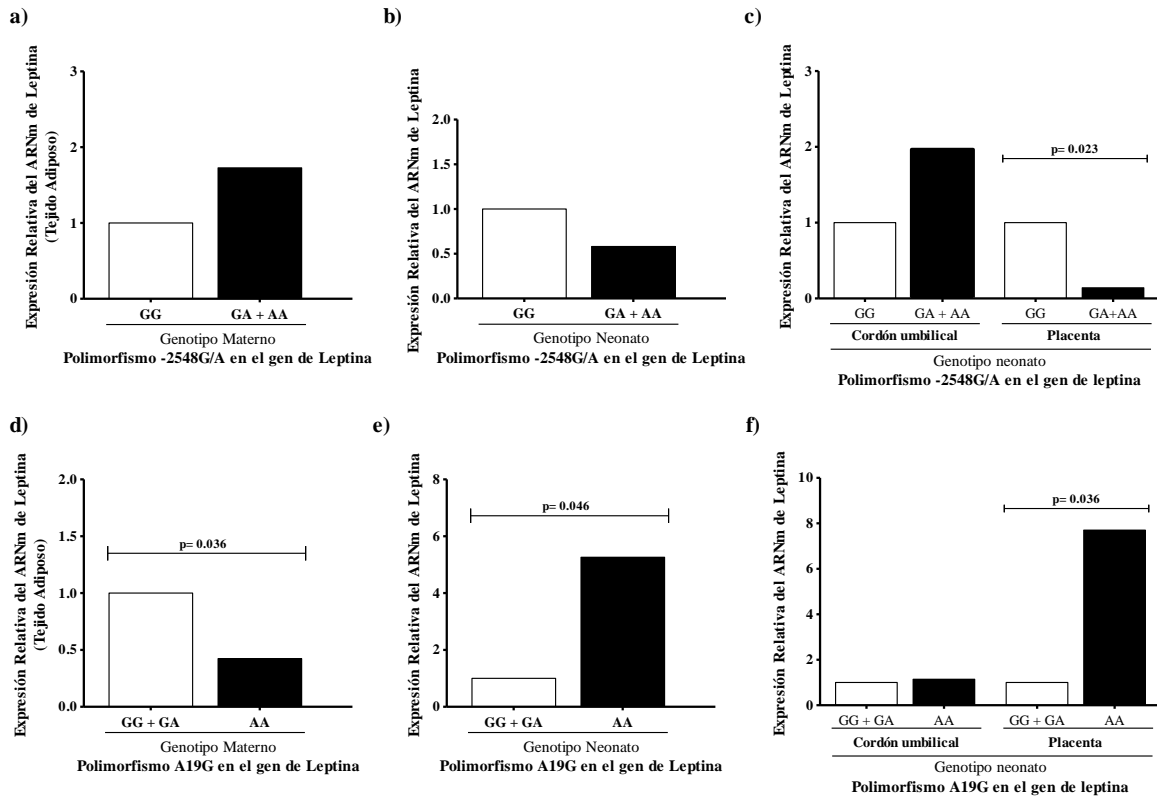
Neonato	Modelo dominante			Modelo recesivo		Valor <i>p</i>
	GG <i>n</i> = 14	GA + AA <i>n</i> = 36	Valor <i>p</i>	GG + GA <i>n</i> = 41	AA <i>n</i> = 9	
Peso al nacer (kg)	3.033 ± 0.317	3.257 ± 0.344	<b>0.040</b>	3.149 ± 0.353	3.402 ± 0.247	<b>0.048</b>
Longitud (cm)	50.5 ± 1.3	50.7 ± 2.0	0.741	50.6 ± 1.8	50.8 ± 1.9	0.807
Circunferencia cefálica (cm)	34.4 ± 1.3	34.8 ± 1.4	0.411	34.5 ± 1.4	35.4 ± 0.9	0.095
Circunferencia torácica (cm)	33.3 ± 1.3	34.0 ± 1.8	0.224	33.5 ± 1.6	34.9 ± 1.8	<b>0.026</b>
Circunferencia abdominal (cm)	31.8 ± 2.1	31.4 ± 2.1	0.609	31.3 ± 2.0	32.4 ± 2.5	0.167
Leptina (ng/mL)	2.38 (0.79 – 3.80)	2.17 (0.95 – 3.36)	0.712	2.15 (0.79 – 3.64)	2.76 (1.79 – 3.27)	0.185

Los valores presentados son media ± desviación estándar, mediana y percentiles 5 y 95. IMC (índice de masa corporal), valor de *p* fue calculado por la prueba de <sup>a</sup>Mann Whitney y <sup>b</sup>t de Student.

*Polimorfismos en el gen LEP y su relación con la expresión del ARNm en los tejidos de los binomios estudiados.* Para investigar el efecto funcional de los polimorfismos -2548G/A y A19G en el gen de leptina se analizó la expresión de ARNm del gen *LEP*. Cuando analizamos

la expresión del ARNm de leptina de acuerdo al polimorfismo -2548G/A, aunque no se observó diferencia significativa se muestra que madres portadoras de los genotipos G/A + A/A tuvieron mayor expresión de ARNm de leptina en comparación con portadoras del genotipo GG ( $1.7 > 1.0$ ) (Figura 1a). Al realizar el análisis en los neonatos se muestra que los portadores del genotipo -2548 G/A + AA tienen niveles significativamente bajos de expresión del ARNm en las biopsias de placenta en comparación de los portadores -2548 G/G ( $0.14 > 1.0$ ;  $p= 0.023$ ) (Figura 1c). Estos resultados se obtuvieron al realizar una normalización de los valores de expresión de LEP con el gen housekeeping GAPDH. Por otro lado, cuando nosotros analizamos la expresión de acuerdo al polimorfismo A19G, nosotros encontramos que madres portadoras del genotipo A/A tienen baja expresión de ARNm en tejido adiposo en comparación al genotipo G/G + G/A ( $0.42 > 1.0$ ;  $p=0.036$ ) (Figura 1d). Al realizar el análisis en los neonatos se muestra que los portadores del genotipo 19 AA tienen un incremento significativo en los niveles de expresión del ARNm en las biopsias de placenta y cordón umbilical, en comparación de los portadores de los genotipos G/G + G/A ( $5.26 > 1.0$ ;  $p= 0.046$ ) (Figura 1e). Del mismo modo, cuando comparamos la expresión por tejido específico en los neonatos se observó un incremento del ARNm en portadores del genotipo A/A con respecto al GG + G/A ( $7.5 > 1.0$ ;  $p=0.036$ ) (Figura 1f).





**Figura 1.** Expresión relativa del ARN mensajero (ARNm) de leptina en muestras de biopsias de tejido adiposo, cordón umbilical y placenta. Para el polimorfismo -2548 G/A **a)** las madres portadoras de los genotipos GA + AA tuvieron un ligero incremento en la expresión del ARNm de leptina. **b)** Una ligera disminución en la expresión de leptina fue observada en los neonatos portadores de los genotipos GA + AA. **c)** Neonatos portadores de los genotipos GA + AA tuvieron una baja expresión del ARNm de leptina en placenta. Para el polimorfismo A19G **d)** las madres portadoras del genotipo AA tuvieron una baja expresión de leptina en tejido adiposo; mientras que **e)** los neonatos portadores del genotipo AA tuvieron una alta expresión de leptina, **f)** este incremento es significativo en placenta. El análisis de expresión relativa se realizó utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  y normalizado con GAPDH. La comparación entre grupos se realizó mediante la prueba de Mann-Whitney; valor de  $p < 0.05$ .

## Discusión

Este estudio destaca el posible efecto funcional de polimorfismos en el gen de leptina sobre los niveles de expresión del ARNm de LEP en madres-neonatos de población Guerrerense. Este estudio muestra que madres portadoras de los genotipos -2548 GA + AA presentaron un incremento en las medidas antropométricas y un incremento no significativo en la expresión del ARNm de leptina en comparación con las portadoras del genotipo GG, mientras que las madres portadoras de los genotipos 19 AA presentaron menor antropometría materna y una disminución significativa en los niveles de expresión del ARNm de LEP en comparación con las portadoras de los genotipos 19 GG + AA. Por otro lado, en los neonatos portadores de los genotipos -2548 GA + AA en el gen de leptina se observó un menor peso al nacer y una disminución significativa

de los niveles de expresión del ARN mensajero de LEP en biopsias de placenta en comparación con los portadores del genotipo GG, mientras que, los neonatos portadores del genotipo 19 GA + AA presentan mayor peso al nacer, mayor circunferencia torácica y tuvieron un incremento significativo en la expresión del ARN mensajero de LEP con respecto a portadores del genotipo GG en biopsias de placenta, sugiriendo que los polimorfismos -2548G/A y A19G en el gen LEP juega un papel importante en la regulación de la expresión del gen.

La frecuencia del alelo G para ambos polimorfismos en el gen de leptina, fue similar a las reportadas en estudios previos en población caucásica<sup>17-19</sup>. Del mismo modo, un estudio realizado en binomios madres-neonatos en población checa reportó una frecuencia similar del alelo G para el polimorfismo -2548G/A en madres y en sus hijos<sup>20</sup>. Curiosamente, nuestros datos difieren de los reportados en población japonesa<sup>21</sup>, donde se reporta menor frecuencia del genotipo GG. Estas diferencias pueden ser atribuidas al tamaño de la muestra y los criterios de inclusión en cada estudio, así como a la influencia racial entre las poblaciones con diferente origen étnico, confirmando así a una mayor diversidad genética en la distribución de estos y otros polimorfismos.

Varios estudios han reportado la asociación de polimorfismos en el gen de leptina con la variabilidad en los niveles de la hormona, pero son muy pocos los estudios que han reportado la relación entre polimorfismos en el gen de leptina y la expresión relativa del ARN mensajero de LEP. Hoffstedt y colaboradores., investigaron si el polimorfismo -2548G/A influye en la transcripción del gen y la expresión de leptina en el tejido adiposo en mujeres no obesas, encontrando que mujeres portadoras del genotipo A/A tenían una mayor concentración de leptina sérica cuando ajustaron por IMC, y un incremento significativo en los niveles de expresión del ARN mensajero de LEP en tejido adiposo<sup>15</sup>. Por otro lado, Terrasi y colaboradores mostraron que en modelos celulares de cáncer de mama la presencia de los genotipos AA y GA para el polimorfismo -2548G/A coincidieron con la alta e intermedia expresión del ARN mensajero de LEP, respectivamente, mientras que las células con GG tenían niveles bajos de expresión. Además, la presencia del polimorfismo -2548G/A incrementa la expresión basal de leptina en células epiteliales de cáncer de mama mejorando el reclutamiento eficiente del factor

de transcripción SP1 hacia el ADN bajo el tratamiento con insulina, mientras que para el genotipo GG la unión de Sp1 al ADN no fue dependiente de insulina<sup>22</sup>.

Para nuestro conocimiento, este es el primer estudio que reporta la relación entre polimorfismos en el gen de leptina y la expresión del ARNm de LEP en biopsias de placenta y cordón umbilical en neonatos y tejido adiposo de sus madres en embarazos a término. Para el polimorfismo -2548, neonatos portadores del genotipo AA tenían baja expresión del ARN mensajero de LEP en placenta comparación con portadores del genotipo GG. Se ha reportado previamente que la expresión del ARN mensajero de leptina en placentas de embarazos a término, disminuye significativamente en comparación con placentas en etapas tempranas de la gestación<sup>23</sup>.

El incremento en los niveles circulantes de leptina y la sobre expresión ha sido reportada en sujetos portadores del alelo A para el polimorfismo -2548G/A, así como también, este alelo se ha asociado con un incremento 2 veces mayor en la secreción de leptina a partir de adipocitos cuando se compara esta misma secreción con la presencia del alelo G<sup>24</sup>.

## Referencias

1. Baratta M. Leptin--from a signal of adiposity to a hormonal mediator in peripheral tissues. *Med Sci Monit* 2002;8(12):RA282-92.
2. Fruhbeck G. Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem J* 2006;393(Pt 1):7-20.
3. Paracchini V, Pedotti P, Taioli E. Genetics of leptin and obesity: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2005;162(2):101-14.
4. Gnacinska M, Malgorzewicz S, Stojek M, Lysiak-Szydłowska W, Sworczak K. Role of adipokines in complications related to obesity: a review. *Adv Med Sci* 2009;54(2):150-7.
5. Houseknecht KL, Baile CA, Matteri RL, Spurlock ME. The biology of leptin: a review. *J Anim Sci* 1998;76(5):1405-20.
6. Gambino YP, Maymó JL, Pérez Pérez A, Calvo JC, Sánchez-Margalet V, Varone CL. Elsevier Trophoblast Research Award Lecture: Molecular mechanisms underlying

- estrogen functions in trophoblastic cells – Focus on leptin expression. *Placenta* 2012;33:S63-S70.
7. Nezar MA, el-Baky AM, Soliman OA, Abdel-Hady HA, Hammad AM, Al-Haggag MS. Endothelin-1 and leptin as markers of intrauterine growth restriction. *Indian J Pediatr* 2009;76(5):485-8.
  8. Bozzola E, Meazza C, Arvigo M, et al. Role of adiponectin and leptin on body development in infants during the first year of life. *Ital J Pediatr* 2010; 36(26):1-8.
  9. Rafeey M, Ouladsahebmadarek E, Rashtchizadeh N, et al. Correlation between maternal and cord blood leptin and fetal growth. *African Journal of Biotechnology* 2007;6(17).
  10. Zare F, Moradizirkohi A, Maghbooli Z, Hossein-nezhad A, Rahmani M, Larijani B. Relationship between Serum Umbilical Cord and Maternal Leptin and Adiponectin Concentrations with Fetal Growth Parameters. *Iranian J Publ Health* 2007:75-79.
  11. Karvonen MK, Pesonen U, Heinonen P, et al. Identification of new sequence variants in the leptin gene. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83(9):3239-42.
  12. Ben Ali S, Kallel A, Ftouhi B, et al. Association of G-2548A LEP polymorphism with plasma leptin levels in Tunisian obese patients. *Clin Biochem* 2009;42(7-8):584-8.
  13. 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(12):2196-200.
  14. Ren W, Zhang SH, Wu J, Ni YX. Polymorphism of the leptin gene promoter in pedigrees of type 2 diabetes mellitus in Chongqing, China. *Chin Med J (Engl)* 2004;117(4):558-61.
  15. Hoffstedt J, Eriksson P, Mottagui-Tabar S, Arner P. A polymorphism in the leptin promoter region (-2548 G/A) influences gene expression and adipose tissue secretion of leptin. *Horm Metab Res* 2002;34(7):355-9.
  16. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>( $\Delta\Delta C_T$ ) Method. *Methods* 2001;25(4):402-8.
  17. Li WD, Reed DR, Lee JH, et al. Sequence variants in the 5' flanking region of the leptin gene are associated with obesity in women. *Ann Hum Genet* 1999;63(Pt 3):227-34.
  18. 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(Pt 5):391-4.

19. 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 (Athens)* 2003;2(4):229-36.
20. Vasku JA, Vasku A, Dostalova Z, Bienert P. Association of leptin genetic polymorphism -2548 G/A with gestational diabetes mellitus. *Genes Nutr* 2006;1(2):117-23.
21. Mizuta E, Kokubo Y, Yamanaka I, et al. Leptin gene and leptin receptor gene polymorphisms are associated with sweet preference and obesity. *Hypertens Res* 2008;31(6):1069-77.
22. Terrasi M, Fiorio E, Mercanti A, et al. Functional analysis of the -2548G/A leptin gene polymorphism in breast cancer cells. *Int J Cancer* 2009;125(5):1038-44.
23. Henson MC, Swan KF, O'Neil JS. Expression of placental leptin and leptin receptor transcripts in early pregnancy and at term. *Obstet Gynecol* 1998;92(6):1020-8.
24. Hinuy HM, Hirata MH, Forti N, et al. Leptin G-2548A promoter polymorphism is associated with increased plasma leptin and BMI in Brazilian women. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia* 2008;52(4):611-616.

# **Capítulo IV**

**Metilación global del ADN y su relación con la ingesta de ácido fólico y polimorfismos en el gen de leptina en binomios madre-neonato**

## **Metilación global del ADN y su relación con la ingesta de ácido fólico y polimorfismos en el gen de leptina en binomios madre-neonato**

### **Introducción**

El ácido fólico es la forma sintética del folato, una vitamina del grupo del complejo B, su ingesta a través de la dieta juega un papel importante en la síntesis de ácidos nucleicos, además de que desempeña un papel crítico en la síntesis de S-adenosilmetionina (SAM) que sirve como donador de grupos metilo en varias reacciones de metilación, tales como la metilación del ADN, ARN y proteínas (Nazki et al., 2014).

La metilación del ADN es el principal mecanismo epigenético que regula la expresión génica mediante la modificación del ADN sin el cambio de la secuencia genómica. La metilación del ADN es un proceso en el que un grupo metilo está unido covalentemente a la posición 5 de una citosina en el contexto de un dinucleótido citosina-guanina (CpG) en el genoma de mamíferos (Geiman and Muegge, 2010). La metilación del ADN de promotores ricos en CpG de mamíferos juega un papel importante en el control de procesos celulares que incluyen, el desarrollo embrionario, la transcripción, la inactivación del cromosoma X y el "*imprinting*" genómico (Robertson, 2005, Hirst and Marra, 2009). Estudios recientes muestran que la metilación también afecta la estabilidad y estructura de los cromosomas. Y la hipometilación anormal puede causar muchas enfermedades humanas, incluyendo muchos tipos de cáncer (Takahashiet al., 2013, Pinto et al., 2013). Xiang H et al., estimó que más de 0.11% de las citosinas genómicas son metilcitosinas, las cuales probablemente se producen en dinucleótidos CG. La metilación en CGs es substancialmente enriquecida en los cuerpos de genes y se correlaciona positivamente con los niveles de expresión de genes, lo que sugiere que tiene un papel positivo en la transcripción de genes (Wang et al., 2014).

La leptina es una proteína de 167 aminoácidos (Frühbeck, 2006), esta hormona anorexigenica se produce principalmente en el tejido adiposo, y se ha demostrado que

otros tejidos como la placenta, mucosa gástrica, intestino, médula del hueso, epitelio mamario, músculo esquelético, pituitaria e hipotálamo tienen la capacidad de producirla en pequeñas cantidades. Estudios han demostrado que la leptina induce proliferación de células trofoblásticas, inhibe la apoptosis, estimula la síntesis de proteínas, hormonas y citocinas en las mismas células, además regula el crecimiento y desarrollo del feto, por lo que se ve incrementada la concentración plasmática de leptina durante el embarazo (Gambino et al., 2012, Nezar et al., 2009). Esta hormona se relaciona con los diferentes patrones de crecimiento y el desarrollo del feto, presentándose cambios en sus niveles, por ejemplo, recién nacidos pequeños para su edad gestacional tienen niveles bajos de leptina, en comparación con los niños con peso normal para su edad gestacional.

El desarrollo placentario y fetal está fuertemente influenciado por mecanismos epigenéticos que alteran la expresión de genes a largo plazo, sin afectar la secuencia del ADN. El promotor del gen *LEP* tiene varios sitios CpG, se ha observado que en una región de 217 pares de bases se ubica un elemento TATA-box y un sitio de unión al factor de transcripción funcional C/EBP- $\alpha$ , los cuales son suficientes para la expresión tejido-específica del gen. Además, el núcleo de la secuencia de unión para el factor de transcripción C/EBP- $\alpha$  en el promotor del gen *LEP*, contiene un dinucleótido CG, un posible sitio de metilación (Stoger, 2006). En un estudio in vivo donde se analizaron los patrones de metilación del promotor de gen *LEP*, tanto en línea celular de ratón y de humano, se reportó que, en ambas líneas celulares, la densidad de metilación puede inducir la diferenciación de los adipocitos (Stoger, 2006).

Por lo tanto, el objetivo de este estudio es evaluar la relación de los polimorfismos -2548G/A y A19G en el gen de leptina, y la metilación global del ADN con la ingesta de ácido fólico en binomios madre-neonato.



## Maerial y métodos

*Participantes.* En este estudio se incluyeron 28 neonatos a término y sus madres; con un rango de edad gestacional entre 37 y 40 semanas. Se seleccionaron mujeres embarazadas programadas para parto obstétrico por cesárea que aceptaron participar en el estudio con un consentimiento informado antes firmado. Se excluyeron aquellas madres con preclamsia, hipertensión y diabetes gestacional; neonatos con complicaciones clínicas al momento del nacimiento y con enfermedades congénitas también fueron excluidos. A todas las mujeres embarazadas que ingresaron a parto por cesárea, se les realizó una toma de muestra de sangre periférica por punción venosa, previo a la incisión quirúrgica, con un ayuno previo de 8 horas como mínimo, utilizando un tubo con anticoagulante (EDTA al 10%), obteniendo 3 ml de sangre en cada tubo para la extracción de ADN de leucocitos. En el momento de la intervención quirúrgica se recolectó una biopsia de tejido adiposo y posteriormente, al nacimiento del neonato, al realizar el corte del cordón umbilical el médico pediatra, se procedió a coleccionar una muestra de sangre de cordón umbilical suficiente para la obtención de leucos para la extracción de ADN. Posteriormente, las biopsias de placenta y cordón umbilical se recolectaron, para la extracción de DNA para realizar el análisis del porcentaje de metilación global del ADN.

*Genotipificación de los polimorfismos -2548G/A y A19G en el gen LEP.* Para la amplificación del fragmento de interés del polimorfismo -2548G/A se utilizaron los siguientes iniciadores: sentido (5'-CAATGTGCGCAGTACGGTC-3') y antisentido (5'-AGTGTCTGACATCTCGCAGAGGCTT-3'). El volumen total de la mezcla de reacción fue de 10 µl y el producto de PCR se digirieron con 10 U de la enzima de restricción Hha1 (New England BioLabs), a 37°C por 4 horas, obteniendo así fragmentos de 181 y 61 pb para el genotipo G/G; 242, 181 y 61 pb para el G/A; y un solo fragmento de 242 pb para el A/A. Para la amplificación A19G se utilizaron los siguientes iniciadores: sentido (5'-ATATAGAGGGCGTCAACCG-3') y antisentido (5'-CCTATTCACCTTGCGGTGCAGT-3'), para obtener un producto de 221 pb. El volumen total de la mezcla de reacción fue de 10 µl y el producto de PCR de 221 pb,

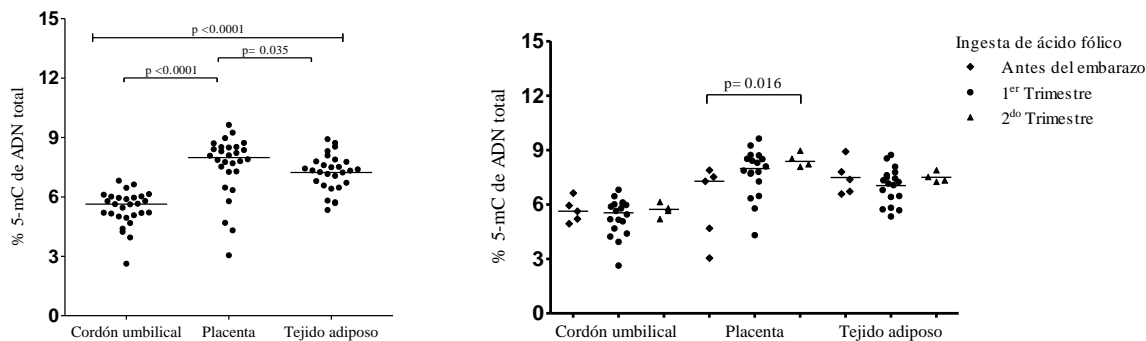
se digirió con 10 U de la enzima de restricción MspA1I (New England BioLabs), a 37°C por 4 horas, obteniendo así fragmentos de 183 y 38 pb para el genotipo G/G; 221, 183 y 38 pb para el G/A; y un solo fragmento de 221 pb para el A/A. El análisis de productos de PCR así como de los productos de la digestión con enzimas de restricción, se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% y para la visualización de los productos se utilizó una tinción con nitrato de plata al 0.2%.

*Análisis de metilación global del ADN.* Del ADN obtenido y almacenado a -20°C, a partir de la biopsias de tejido adiposo, cordón umbilical y placenta. El contenido de 5-mC o DNA metilado se midió con MethylFlash™ Methylated DNA Quantification Kit (Colorimetric), determinándose así el porcentaje de metilación global del ADN.

## **Resultados**

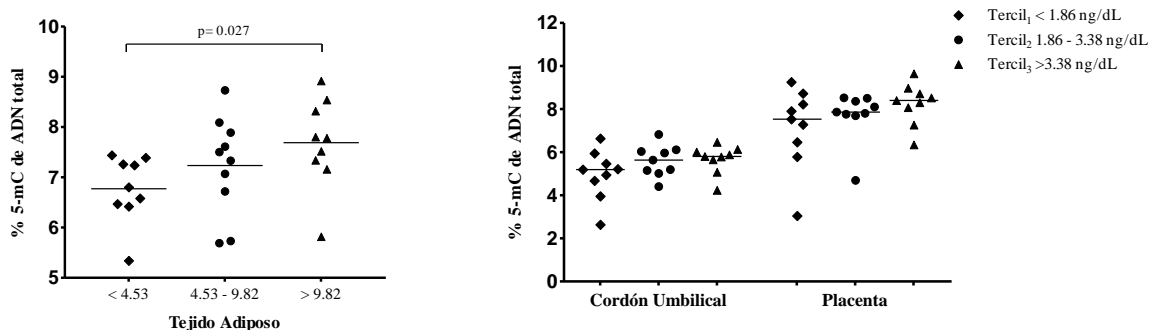
En el estudio se incluyeron 28 binomios madres-neonatos, a quienes se les evaluaron características clínicas y somatométricas. Las madres tuvieron una edad promedio entre 23 y 32 años con una media de IMC antes del embarazo de  $25.31 \pm 4.30$  kg/m<sup>2</sup> y un IMC prenatal de 27.9 (26.4 – 30.9) kg/m<sup>2</sup> con presión arterial normal. Los neonatos tenían una edad gestacional de  $38.7 \pm 1.2$  semanas, un peso al nacer de  $3.163 \pm 0.380$  kg, y una longitud entre 49 y 52 cm.

Al realizar el análisis de metilación global del ADN en placenta y cordón umbilical en los neonatos y en tejido adiposo de las madres, encontramos que la placenta y el tejido adiposo tienen mayor porcentaje de metilación en comparación con tejido de cordón umbilical (7.7 %, 7.3 % y 5.4 %, respectivamente) (figura 1a). Se realizó el análisis del porcentaje de metilación global del ADN con la ingesta de ácido fólico durante el embarazo y se observó que las madres que refirieron ingerir ácido fólico desde antes del embarazo tuvieron un menor porcentaje de metilación en placenta en comparación con las que tuvieron una ingesta de ácido fólico después del segundo trimestre del embarazo (Figura 1b).



**Figura 1.** Metilación global del ADN en muestras de biopsias de cordón umbilical, placenta y tejido adiposo. **a)** Diferencias significativas del porcentaje de 5-metilcitocina (5-mC) en las diferentes biopsias de tejido. **b)** Las madres que refirieron ingerir ácido fólico desde antes del embarazo tuvieron menor porcentaje de metilación en placenta. Los datos mostrados son medianas y la comparación entre grupos se realizó mediante la prueba de Kruskal Wallis; valor de  $p < 0.05$ .

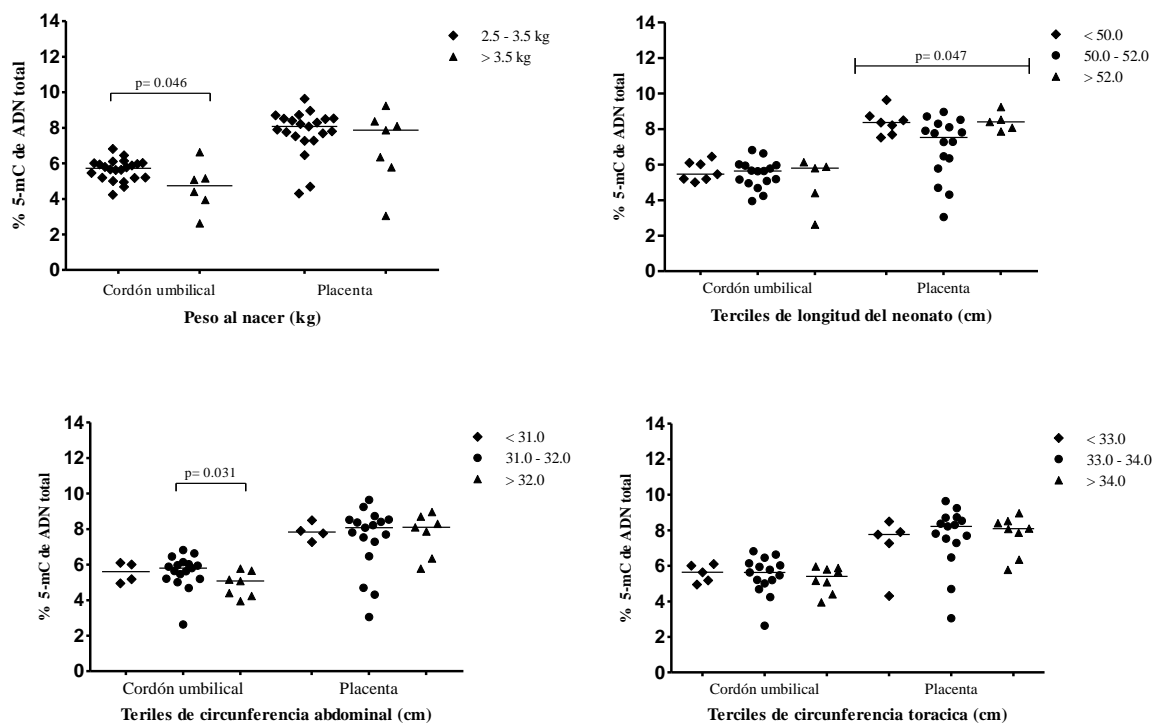
Al realizar el mismo análisis de metilación con los niveles séricos de leptina y los polimorfismos, se observó que las madres con niveles séricos de leptina mayores de 9.82 ng/dL presentan mayor porcentaje de metilación en comparación con las madres que tienen menores niveles de leptina (Figura 2a). Por otro lado, no se observaron diferencias significativas entre la metilación y los polimorfismos en el gen de leptina (datos no mostrados).



**Figura 2.** Contenido de 5-metilcitocina (% 5-mC) en las diferentes biopsias. **a)** El porcentaje de metilación en tejido adiposo fue mayor en las madres con niveles séricos de leptina  $> 9.82$  ng/mL. **b)** No se observó diferencias entre el porcentaje de metilación en cordón umbilical y placenta con los niveles de leptina de cordón. Los datos mostrados son medianas y la comparación entre grupos se realizó mediante la prueba de Kruskal Wallis; valor de  $p < 0.05$ .

Al realizar el análisis de metilación con la antropometría del neonato, se observó que los recién nacidos con mayor peso al nacer, mayor circunferencia torácica y abdominal,

presentan un menor porcentaje de metilación con respecto a los recién nacidos que tienen una menor medida antropométrica (figura 3).



**Figura 3.** Cuantificación de 5-mC en ADN de tejido de cordón umbilical y placenta. Los neonatos con **a)** mayor peso al nacer y mayor circunferencia **c)** abdominal y **d)** torácica presentaron un menor porcentaje de metilación en cordón umbilical. **d)** Se observan diferencias significativas entre el porcentaje de metilación en placenta y la longitud del neonato. Los datos mostrados son medianas y la comparación entre grupos se realizó mediante la prueba de Kruskal Wallis; valor de  $p < 0.05$ .

## Discusión

En este estudio se observó un mayor porcentaje de metilación en placenta y tejido adiposo en comparación con el tejido de cordón umbilical. Se ha descrito que en la placenta, numerosos cambios de metilación del ADN de una gran magnitud ocurren durante la gestación, incluso dentro del tercer trimestre (Novakovic et al., 2006, Yuen et al., 2010). Esto puede estar relacionado con los cambios en la composición de las células. Por ejemplo, la composición trofoblasto en la placenta varía en la gestación en el que las proporciones de células citotrofoblastos pasan de 85% en el primer trimestre a sólo el 15% en el embarazo a término (Bernischke et al., 2006), debido a la

diferenciación de estas células progenitoras en células sincitiotrofoblasto. La metilación del ADN también puede estar asociada con la edad gestacional debido a una programación normal de la expresión de genes y los cambios epigenéticos que se producen en todo el desarrollo dentro de cada tipo de célula (Hogg et al., 2014).

Por otro lado, las alteraciones epigenéticas proporcionan una hipótesis emergente para explicar los posibles fenómenos biológicos a través del cual un ambiente intrauterino adverso inicia una "impronta metabólica" en el recién nacido, y sigue contribuyendo a la patogénesis de las complicaciones tales como desordenes metabólicos, cardiovasculares y endocrinos en la etapa adulta. La importancia de la epigenética en la programación fetal y su relación con la hipótesis de fenotipo ahorrador está bien documentada en modelos animales (Armitage, et al., 2004, Issa, 2002). Por el contrario, algunos estudios humanos examinaron la interacción entre la restricción del crecimiento intrauterino y las modificaciones epigenéticas como un posible mecanismo para explicar el desarrollo posterior de fenotipos relacionados al síndrome metabólico (Gemma et al., 2009).

En los mamíferos, la metilación del ADN se produce en las bases de citosina, adyacentes a una guanina (dinucleótidos CpG) 5'-CG-3' para producir 5-metilcitosina (5mC). La metilación no-CpG también se ha detectado en algunos loci específicos (Ichiyanagi et al, 2013; Imamura et al, 2005; Nishino et al., 2011) su importancia biológica en los mamíferos no se conoce, pero, la metilación no-CpG parece ser más enriquecida en el genoma de las células germinales y las células ES (Ramsahoye et al., 2000; Shirane et al, 2013.). Aunque la metilación en sitios CpGs se asocia sobre todo con la represión de la expresión génica (Weber et al, 2007; Yagi et al, 2008, 2012), la presencia de promotores metilados con bajo contenido de CpG en genes transcripcionalmente activos también ha sido observado por de todo el genoma (Weber et al., 2007). Esto sugiere que la escasa metilación CpG no interfiere con la maquinaria de transcripción y/o que la metilación CpG en un contexto de secuencia particular, activa la transcripción. El último no es totalmente improbable ya que se ha demostrado que la metilación de CpG dentro de las secuencias CRE (TGACGTCA) crea un sitio

de unión para el factor de transcripción C / EBPA y resulta en la activación de genes específicos de tejido de secuencia asociada CRE (Rishi et al., 2010).

En conclusión, los neonatos con mayor peso al nacer presentan menor porcentaje de metilación global del ADN en placenta y esto depende de la ingesta de ácido fólico antes del embarazo.

## Referencias

- ALMANZA-PÉREZ, J., BLANCAS-FLORES, G., GARCÍA-MACEDO, R., ALARCÓN-AGUILAR, F. & CRUZA, M. 2008. Leptina y su relación con la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2. *Gac Méd Méx*, 144.
- FRÜHBECK, G. 2006. Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochemical Journal*, 393, 7.
- HEERWAGEN, M. J., MILLER, M. R., BARBOUR, L. A. & FRIEDMAN, J. E. 2010. Maternal obesity and fetal metabolic programming: a fertile epigenetic soil. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 299, R711-22.
- HWANG, C. S., MANDRUP, S., MACDOUGALD, O. A., GEIMAN, D. E. & LANE, M. D. 1996. Transcriptional activation of the mouse obese (ob) gene by CCAAT/enhancer binding protein alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 873-7.
- JONES, P. A. 2012. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet*, 13, 484-92.
- MARCHI, M., LISI, S., CURCIO, M., BARBUTI, S., PIAGGI, P., CECCARINI, G., NANNIPIERI, M., ANSELMINO, M., DI SALVO, C., VITTI, P., PINCHERA, A., SANTINI, F. & MAFFEI, M. 2011. Human leptin tissue distribution, but not weight loss-dependent change in expression, is associated with methylation of its promoter. *Epigenetics*, 6.
- MELZNER, I., SCOTT, V., DORSCH, K., FISCHER, P., WABITSCH, M., BRUDERLEIN, S., HASEL, C. & MOLLER, P. 2002. Leptin gene expression in human preadipocytes is switched on by maturation-induced demethylation of distinct CpGs in its proximal promoter. *J Biol Chem*, 277, 45420-7.

- OKADA, Y., SAKAUE, H., NAGARE, T. & KASUGA, M. 2009. Diet-induced up-regulation of gene expression in adipocytes without changes in DNA methylation. *Kobe J Med Sci*, 54, E241-9.
- STOGER, R. 2006. In vivo methylation patterns of the leptin promoter in human and mouse. *Epigenetics*, 1, 155-62.
- YOKOMORI, N., TAWATA, M. & ONAYA, T. 2002. DNA demethylation modulates mouse leptin promoter activity during the differentiation of 3T3-L1 cells. *Diabetologia*, 45, 140-8.

## Discusión

En este trabajo de investigación al igual que en otros estudios, se observó que los niveles séricos de leptina fueron mayores en las madres que en los neonatos (Schubring et al., 1997). Las madres con mayor ganancia de peso a término del embarazo, presentan un incremento significativo en los niveles séricos de leptina similar a lo que se ha reportado en otros estudios (Misra et al., 2013, Castellano Filho et al., 2013). Se sugiere que este incremento en los niveles séricos de leptina se relaciona con el papel de la leptina durante el embarazo, se puede explicar por la reducción en el transporte de leptina a través de la barrera hematoencefálica y alteraciones en señalización de leptina en el hipotálamo (Trujillo et al., 2011). Similar a otros estudios en neonatos, se ha reportado que los niveles séricos de leptina en cordón umbilical son mayores en niñas que en niños (Schubring et al., 1999). Mellati y colaboradores, sugieren que el incremento en los niveles de leptina en niñas recién nacidas es debido a los estrógenos (Mellati et al., 2010). Además se ha descrito que la región promotora del gen de leptina posee un elemento de respuesta a estrógenos, regulando así la expresión de leptina (Machinal et al., 1999, Gambino et al., 2010).

Cuando se realizó el análisis comparativo de la expresión del ARN mensajero (ARNm) del gen *LEP* en biopsias de deferentes tejidos en neonatos y sus madres, se encontró mayor expresión de leptina en tejido adiposo y placenta que en cordón umbilical, en este mismo análisis, se observó una correlación entre la expresión del ARNm de leptina en tejido adiposo y los niveles séricos de la proteína en las madres, así como con la antropometría materna, sin embargo, no se observó esta misma asociación entre los niveles séricos de leptina en suero de cordón umbilical y la expresión del ARNm en placenta y tejido de cordón. Algunos estudios evidencian la expresión deferencial del ARNm de un gen en particular en diferentes tejidos y que estos niveles de expresión se correlacionan con la expresión de su proteína, sin embargo, otros estudios describen que la expresión del ARNm de un gen no siempre predice la expresión de la proteína (Guo et al., 2008, Koussounadis et al., 2015). Estas diferencias entre la expresión del ARNm y la proteína son explicados por varios



mecanismos, entre los cuales se incluyen factores que puedan afectar la estabilidad y la transcripción del ARNm, la traducción y degradación de la proteína (de Sousa Abreu et al., 2009).

Por otro lado, no se encontraron estudios de asociación entre la expresión de ARNm de leptina en tejido adiposo y los niveles circulantes de la proteína en madres con embarazo a término. Sin embargo, se ha descrito que la leptina es producida y secretada principalmente por el tejido adiposo, y en la placenta durante el embarazo. Estudios previos en personas con obesidad han reportado una mayor expresión de leptina en tejido adiposo (Schoof et al., 2004, Considine et al., 1996). Un estudio realizado por Hardie y colaboradores, reporta que las concentraciones séricas de leptina materna aumentan progresivamente durante el embarazo, alcanzando un pico durante el segundo trimestre y al final del embarazo, y disminuyen a valores normales 24 horas después del parto (Hardie et al., 1997). Se ha propuesto que este incremento en las concentraciones séricas de leptina, es debido a un mecanismo de resistencia a la leptina en el hipotálamo materno en la etapa gestacional, que da lugar a la reducción en el transporte de leptina a través de la barrera hematoencefálica y alteraciones en la señalización de la hormona en el hipotálamo (Trujillo et al., 2011).

También se encontró una baja expresión del ARNm de leptina en tejido de cordón umbilical de neonatos con incremento en la antropometría neonatal, tales como, peso al nacer, longitud y circunferencias abdominal y torácica. Además, no se observó diferencia significativa de la expresión gen de la leptina en placenta cuando se compara con las medidas antropométricas de los neonatos. Sin embargo, se observó una baja expresión del ARNm en neonatos con mayores medidas antropométricas. Este es uno de los primeros estudios que reporta la relación entre la expresión de ARNm de leptina en tejido de cordón umbilical con la antropometría neonatal. Muy pocos estudios han demostrado la expresión de leptina en el cordón umbilical (Akerman et al., 2002, Artwohl et al., 2002). Akerman y colaboradores, demostraron que en embarazos a término, el cordón umbilical y membranas fetales co-expresan leptina y su receptor (Akerman et al., 2002). Por otra parte, varios estudios han

demostrado una correlación positiva entre las concentraciones de leptina en la sangre del cordón umbilical y el peso al nacer, sugiriendo así que la expresión de la leptina en la placenta tiene un papel fundamental en el desarrollo fetal (Gross et al., 1998, Schubring et al., 1997). Una posible explicación para la baja expresión del ARNm de leptina en neonatos con un incremento en su antropometría tienen una menor demanda de expresión de leptina por parte del cordón umbilical, y esto podría ser debido a que neonatos a término expresan y secretan su propia leptina principalmente por el tejido adiposo fetal. Además como se ha descrito la placenta es una fuente importante de la leptina en la circulación fetal en etapas tempranas de la gestación (Yura et al., 1998).

En este trabajo se analizaron los polimorfismos -2548G/A, -188C/A, rs192763413, rs35048003 y A19G en el gen de leptina, de los cuales los polimorfismos -188C/A, rs192763413 y rs35048003 tuvieron una distribución monogénica en nuestra población. Los polimorfismos -2548G/A y A19G cumplen con el equilibrio de Hardy-Weinberg en el grupo de las madres, lo que nos permitió hacer el análisis de estos polimorfismos con la expresión del ARNm del gen *LEP* en biopsias de placenta y cordón umbilical de neonatos, y tejido adiposo de sus madres, encontrando que los neonatos portadores de los genotipos GA y AA del polimorfismo-2548G/A tienen significativamente muy bajos niveles de expresión del ARNm de *LEP* en las biopsias de placenta, mientras que las madres portadoras de los genotipos GA y AA tuvieron un incremento significativo en la expresión del ARNm de leptina. Se ha descrito, que el promotor del gen de la leptina en el humano contiene varios sitios consenso de unión a una gran variedad de factores de transcripción y que el polimorfismo -2548G/A no se encuentra en ningún sitio regulador conocido. Por lo cual, se propone que la sustitución de G por A para este polimorfismo no modifica ni crea un sitio para algún factor de transcripción, pero se ha reportado que los factores nucleares extraídos de células U937 y de adipocitos subcutáneos se unen con mayor afinidad al alelo A del polimorfismo -2548G/A, lo que sugiere que este polimorfismo puede modificar la tasa transcripcional del gen de leptina. Sin embargo, esto no excluye la posibilidad de que el polimorfismo este en desequilibrio de ligamiento con otras secuencias reguladoras

que influyen en la transcripción del gen de la leptina (Yiannakouris et al., 2003). Un estudio en mujeres con peso normal, reporta que mujeres portadoras del genotipo AA para el polimorfismo -2548G/A tenían una mayor concentración de leptina sérica cuando se ajustaron por IMC, y un incremento significativo en los niveles de expresión del ARN mensajero de LEP en tejido adiposo (Hoffstedt et al., 2002).

Para el polimorfismo A19G, las madres portadoras del genotipo AA presentaron una baja expresión del mensajero de leptina en tejido adiposo con respecto a los genotipos GG y GA, mientras que los neonatos portadores del genotipo AA tienen mayor expresión de ARNm en placenta en comparación al genotipo GG y GA. El polimorfismo A19G se localiza en la región 5'-UTR del primer exón del gen *LEP*. La modificación del alelo G por A resulta en la aparición de un sitio para el factor de transcripción c-Myb (Weston et al., 1998). Recientemente, Chen y colaboradores reportaron que la sobreexpresión de c-Myb podría mejorar la diferenciación adipogénica en las células madre mesenquimales. Las células madre mesenquimales son pluripotentes y además de los adipocitos, pueden dar lugar a varios linajes de células distintas, tales como osteoblastos, condrocitos, miocitos, e incluso las neuronas en condiciones apropiadas (Fourati et al., 2013, Yilan Chen et al., 2011).

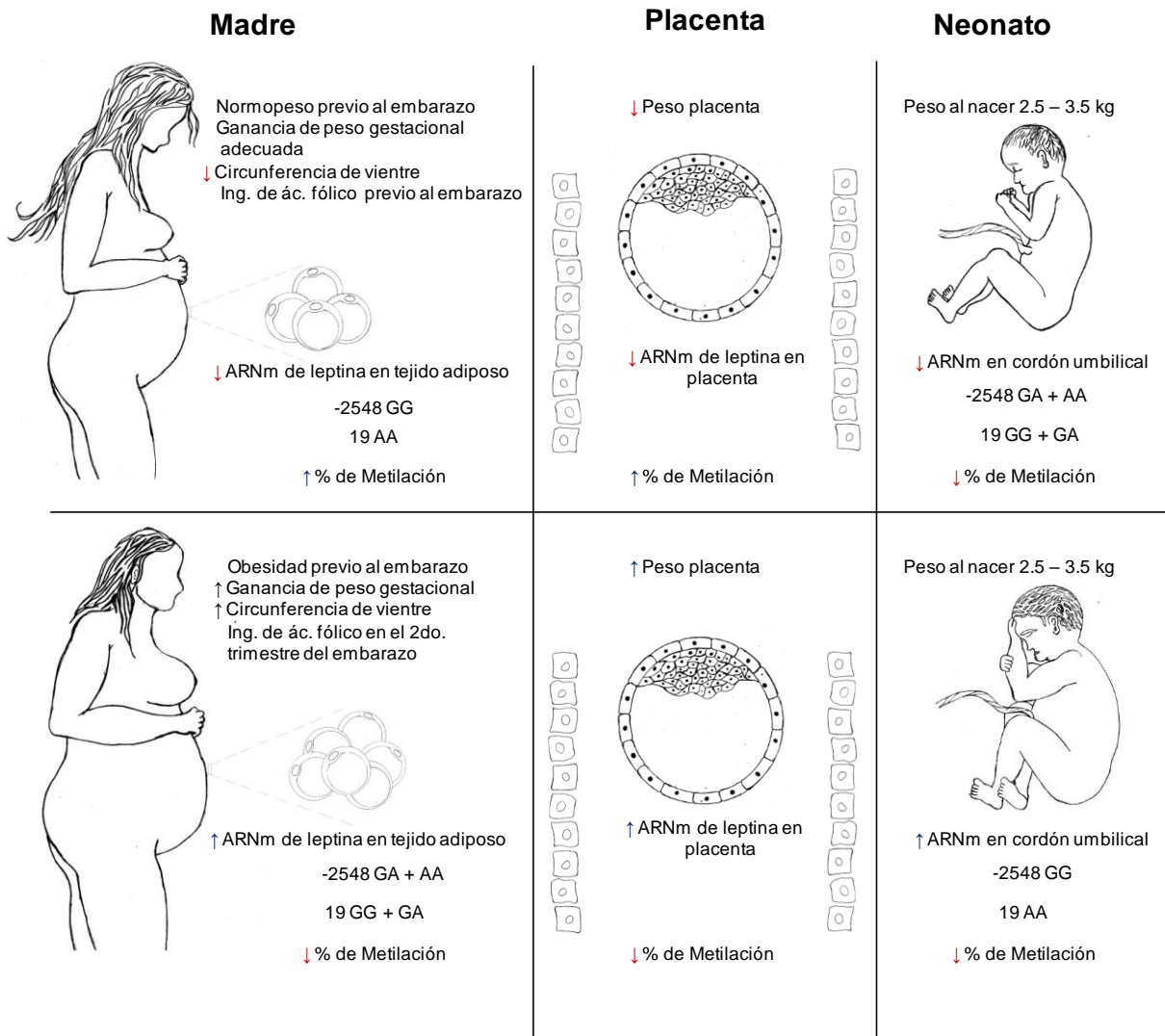
En este estudio, se describe la distribución de 5-metilcitocina (5-mC) en los tejidos. La placenta y el tejido adiposo contienen un alto nivel de 5-mC que el cordón umbilical. Se ha descrito que la metilación del ADN es esencial en la regulación de expresión de genes y casi todos los procesos biológicos incluyendo el desarrollo, crecimiento y diferenciación (Laird and Jaenisch, 1996, Robertson, 2005) y que las alteraciones en la metilación del ADN producen cambios en la expresión génica. La hipermetilación conduce a silenciamiento génico o disminución de la expresión génica, mientras que la hipometilación activa los genes o incrementa la expresión génica. Además, también observamos que las madres que refirieron ingerir ácido fólico antes del embarazo presentaron un menor porcentaje de metilación global del ADN en placenta y cordón umbilical, respectivamente, en comparación con las que refirieron ingerir ácido fólico después del segundo trimestre del embarazo. Algunos estudios han descrito que

durante la gestación la placenta presenta numerosos cambios en la metilación del ADN, incluso hasta el tercer trimestre (Novakovic et al., 2006, Yuen et al., 2010). Estos cambios pueden estar relacionados con la composición de las células, es decir, la composición del trofoblasto en la placenta varía en la gestación. Las proporciones de citotrofoblastos pasan de 85% en el primer trimestre a sólo el 15% en el embarazo a término (Bernischke et al., 2006), debido a la diferenciación de estas células progenitoras en células sincitiotrofoblasticas. Por otro lado, la metilación del ADN también puede estar asociada con la edad gestacional debido a una programación normal de la expresión de genes y los cambios epigenéticos que se producen en todo el desarrollo dentro de cada tipo de célula (Hogg et al., 2014).

En conclusión, las madres con obesidad antes del embarazo y mayor ganancia de peso durante la etapa gestacional presentan una alta expresión del ARNm del gen *LEP* en tejido adiposo y un incremento en los niveles séricos de leptina y son portadoras de los genotipos -2548 GA + AA para el polimorfismo -2548 G/A y 19 GG + GA del polimorfismo A19G, mientras que los neonatos con mayor peso al nacer presentan una baja expresión del ARNm del leptina en cordón umbilical, pero una mayor expresión en placenta y son portadores del genotipo -2548 GG para el polimorfismo -2548 G/A y 19 AA para el polimorfismo A19G en el gen de *LEP* y presentan menor porcentaje de metilación global del ADN.

A continuación, se propone un modelo de integración de los factores maternos y perinatales como determinantes del peso al nacer. Como resultado de este trabajo de investigación en binomios madres-neonatos, se encontró que las madres con obesidad antes del embarazo y mayor ganancia de peso durante la etapa gestacional presentan un incremento en los niveles de expresión de leptina y son portadoras de los genotipos -2548 GA + AA y 19 GG + GA de los polimorfismos -2548 G/A y A19G en el gen *LEP*, los cuales a su vez se relacionan con un incremento en la antropometría materna en comparación con las madres con peso normal; mientras que los neonatos con mayor peso al nacer y un incremento en las circunferencias corporales presentan mayor expresión de leptina y son portadores de los genotipos -2548 GG y 19 AA. Además,

las madres que refirieron una ingesta de ácido fólico después del segundo trimestre de embarazo presentan menor porcentaje de metilación global de ADN en placenta y cordón umbilical (Figura 2).



**Figura 2.** Modelo comparativo de los factores maternos y perinatales como determinantes del peso al nacer en madres-neonatos.

En resumen, podemos observar que las madres con una mayor ganancia de peso, y una ingesta de ácido fólico después del segundo trimestre de embarazo presentan un menor porcentaje de metilación global del ADN en placenta y cordón umbilical, y tienen mayores niveles de leptina con respecto a las madres con peso normal. Este

incremento en los niveles de expresión de leptina en tejido adiposo y placenta de madres con mayor IMC perinatal y sus neonatos con peso >3.5 kg al nacer podría estar atribuido no solo a la adiposidad materna, sino también a la presencia de polimorfismos en el gen *LEP* y a cambios en la regulación epigenética como la metilación del ADN.

## PERSPECTIVAS

- ▶ Realizar un análisis por secuenciación de la región promotora del gen de leptina para identificar islas CpG que puedan estar metiladas en las biopsias de tejido adiposo y placenta y compararlas con los niveles de expresión del gen y los polimorfismos.
- ▶ Analizar la expresión del ARNm del receptor de leptina en placenta y compararla con la expresión de leptina y el peso al nacer.
- ▶ Realizar la medición de otras hormonas (ej. gonadotropina coriónica humana, estrógenos, insulina, entre otras) que estén implicadas en la regulación de los niveles de expresión de leptina y el peso al nacer en los recién nacidos.

## REFERENCIAS

- AKERMAN, F., LEI, Z. M. & RAO, C. V. 2002. Human umbilical cord and fetal membranes co-express leptin and its receptor genes. *Gynecol Endocrinol*, 16, 299-306.
- ALEXE, D.-M., SYRIDOU, G. & PETRIDOU, E. T. 2006. Determinants of early life leptin levels and later life degenerative outcomes. *Clinical medicine & research*, 4, 326-335.
- ALMANZA-PÉREZ, J., BLANCAS-FLORES, G., GARCÍA-MACEDO, R., ALARCÓN-AGUILAR, F. & CRUZA, M. 2008. Leptina y su relación con la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2. *Gac Méd Méx*, 144.
- ARTWOHL, M., RODEN, M., HOLZENBEIN, T., FREUDENTHALER, A., WALDHAUSL, W. & BAUMGARTNER-PARZER, S. M. 2002. Modulation by leptin of proliferation and apoptosis in vascular endothelial cells. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 26, 577-80.
- BELTRAND, J. & LEVY-MARCHAL, C. 2008. Pathophysiology of insulin resistance in subjects born small for gestational age. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 22, 503-15.
- BOZZOLA, E., MEAZZA, C., ARVIGO, M., TRAVAGLINO, P., PAGANI, S., STRONATI, M., GASPARONI, A., BIANCO, C. & BOZZOLA, M. 2010. Role of adiponectin and leptin on body development in infants during the first year of life. *Ital J Pediatr*, 36, 1-8.
- CASTELLANO FILHO, D. S., DO AMARAL CORREA, J. O., DOS SANTOS RAMOS, P., DE OLIVEIRA MONTESSI, M., AARESTRUP, B. J. & AARESTRUP, F. M. 2013. Body weight gain and serum leptin levels of non-overweight and overweight/obese pregnant women. *Med Sci Monit*, 19, 1043-9.
- CONSIDINE, R. V., SINHA, M. K., HEIMAN, M. L., KRIAUCIUNAS, A., STEPHENS, T. W., NYCE, M. R., OHANNESIAN, J. P., MARCO, C. C., MCKEE, L. J., BAUER, T. L. & ET AL. 1996. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med*, 334, 292-5.



- COX, L. A. & NATHANIELSZ, P. W. 2009. The importance of altered gene promoter methylation and transcription factor binding in developmental programming of central appetitive drive. *J Physiol*, 587, 4763-4.
- CHMURZYNSKA, A. 2010. Fetal programming: link between early nutrition, DNA methylation, and complex diseases. *Nutrition reviews*, 68, 87-98.
- DE SOUSA ABREU, R., PENALVA, L. O., MARCOTTE, E. M. & VOGEL, C. 2009. Global signatures of protein and mRNA expression levels. *Mol Biosyst*, 5, 1512-26.
- EDWARDS, L. J., MCFARLANE, J. R., KAUTER, K. G. & MCMILLEN, I. C. 2005. Impact of periconceptional nutrition on maternal and fetal leptin and fetal adiposity in singleton and twin pregnancies. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 288, R39-45.
- EL-HADDAD, M. A., DESAI, M., GAYLE, D. & ROSS, M. G. 2004. In utero development of fetal thirst and appetite: potential for programming. *J Soc Gynecol Investig*, 11, 123-30.
- FARLEY, D. M., CHOI, J., DUDLEY, D. J., LI, C., JENKINS, S. L., MYATT, L. & NATHANIELSZ, P. W. 2010. Placental Amino Acid Transport and Placental Leptin Resistance in Pregnancies Complicated by Maternal Obesity. *Placenta*, 31, 718-724.
- FOWDEN, A. L., GIUSSANI, D. A. & FORHEAD, A. J. 2006. Intrauterine programming of physiological systems: causes and consequences. *Physiology (Bethesda)*, 21, 29-37.
- FRÜHBECK, G. 2006. Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochemical Journal*, 393, 7.
- GAMBINO, Y. P., MAYMO, J. L., PEREZ-PEREZ, A., DUENAS, J. L., SANCHEZ-MARGALET, V., CALVO, J. C. & VARONE, C. L. 2010. 17Beta-estradiol enhances leptin expression in human placental cells through genomic and nongenomic actions. *Biol Reprod*, 83, 42-51.
- GAMBINO, Y. P., MAYMÓ, J. L., PÉREZ PÉREZ, A., CALVO, J. C., SÁNCHEZ-MARGALET, V. & VARONE, C. L. 2012. Elsevier Trophoblast Research Award

Lecture: Molecular mechanisms underlying estrogen functions in trophoblastic cells – Focus on leptin expression. *Placenta*, 33, S63-S70.

GARCÍA CARREÓN ADRIÁN. 2010. *Polimorfismos -2548G/A y -188C/A en el gen de la leptina y su relación con inflamación y hematopoyesis en niños con obesidad*. Universidad Autónoma de Guerrero.

GARIBAY-NIETO, N. & MIRANDA-LORA, A. L. 2008. Impacto de la programación fetal y la nutrición durante el primer año de vida en el desarrollo de obesidad y sus complicaciones. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 65, 451-467.

GODFREY, K. M. & BARKER, D. J. 2000. Fetal nutrition and adult disease. *The American journal of clinical nutrition*, 71, 1344s-1352s.

GROSS, G. A., SOLENBERGER, T., PHILPOTT, T., HOLCOMB, W. L., JR. & LANDT, M. 1998. Plasma leptin concentrations in newborns of diabetic and nondiabetic mothers. *Am J Perinatol*, 15, 243-7.

GUO, Y., XIAO, P., LEI, S., DENG, F., XIAO, G. G., LIU, Y., CHEN, X., LI, L., WU, S., CHEN, Y., JIANG, H., TAN, L., XIE, J., ZHU, X., LIANG, S. & DENG, H. 2008. How is mRNA expression predictive for protein expression? A correlation study on human circulating monocytes. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 40, 426-36.

HALES, C. N., BARKER, D. J., CLARK, P. M., COX, L. J., FALL, C., OSMOND, C. & WINTER, P. D. 1991. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ*, 303, 1019-22.

HARDIE, L., TRAYHURN, P., ABRAMOVICH, D. & FOWLER, P. 1997. Circulating leptin in women: a longitudinal study in the menstrual cycle and during pregnancy. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 47, 101-6.

HEERWAGEN, M. J., MILLER, M. R., BARBOUR, L. A. & FRIEDMAN, J. E. 2010. Maternal obesity and fetal metabolic programming: a fertile epigenetic soil. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 299, R711-22.

HELLAND, I. B., RESELAND, J. E., SAUGSTAD, O. D. & DREVON, C. A. 1998. Leptin levels in pregnant women and newborn infants: gender differences and reduction during the neonatal period. *Pediatrics*, 101, e12-e12.

- HIGGINS, L., GREENWOOD, S. L., WAREING, M., SIBLEY, C. P. & MILLS, T. A. 2011. Obesity and the placenta: A consideration of nutrient exchange mechanisms in relation to aberrant fetal growth. *Placenta*, 32, 1-7.
- HINUUY, H. M., HIRATA, M. H., FORTI, N., DIAMENT, J., SAMPAIO, M. F., ARMAGANIJAN, D., SALAZAR, L. A. & HIRATA, R. D. C. 2008. Leptin G-2548A promoter polymorphism is associated with increased plasma leptin and BMI in Brazilian women. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 52, 611-616.
- HOFFSTEDT, J., ERIKSSON, P., MOTTAGUI-TABAR, S. & ARNER, P. 2002. A polymorphism in the leptin promoter region (-2548 G/A) influences gene expression and adipose tissue secretion of leptin. *Horm Metab Res*, 34, 355-9.
- HWANG, C. S., MANDRUP, S., MACDOUGALD, O. A., GEIMAN, D. E. & LANE, M. D. 1996. Transcriptional activation of the mouse obese (ob) gene by CCAAT/enhancer binding protein alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 873-7.
- JAUQUET, D., LEGER, J., LEVY-MARCHAL, C., OURY, J. F. & CZERNICHOW, P. 1998. Ontogeny of leptin in human fetuses and newborns: effect of intrauterine growth retardation on serum leptin concentrations. *J Clin Endocrinol Metab*, 83, 1243-6.
- JONES, P. A. 2012. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet*, 13, 484-92.
- KENSARA, O. A., WOOTTON, S. A., PHILLIPS, D. I., PATEL, M., JACKSON, A. A. & ELIA, M. 2005. Fetal programming of body composition: relation between birth weight and body composition measured with dual-energy X-ray absorptiometry and anthropometric methods in older Englishmen. *Am J Clin Nutr*, 82, 980-7.
- KOUSSOUNADIS, A., LANGDON, S. P., UM, I. H., HARRISON, D. J. & SMITH, V. A. 2015. Relationship between differentially expressed mRNA and mRNA-protein correlations in a xenograft model system. *Sci Rep*, 5, 10775.
- KRAUSE, B., SOBREVIA, L. & CASANELLO, P. 2009. Papel de la placenta en la programación fetal de las enfermedades crónicas del adulto. *Uauy, Ricardo; Carmuega, Esteban; Barker, David JP Impacto del crecimiento y desarrollo*

*temprano sobre la salud y bienestar de la población: perspectivas y reflexiones desde el Cono Sur. Buenos Aires, Instituto Danone, 2009, p. 117-133 ilus.*

- MACHINAL, F., DIEUDONNE, M. N., LENEVEU, M. C., PECQUERY, R. & GIUDICELLI, Y. 1999. In vivo and in vitro ob gene expression and leptin secretion in rat adipocytes: evidence for a regional specific regulation by sex steroid hormones. *Endocrinology*, 140, 1567-74.
- MAGARINOS, M. P., SANCHEZ-MARGALET, V., KOTLER, M., CALVO, J. C. & VARONE, C. L. 2007. Leptin promotes cell proliferation and survival of trophoblastic cells. *Biol Reprod*, 76, 203-10.
- MARCHI, M., LISI, S., CURCIO, M., BARBUTI, S., PIAGGI, P., CECCARINI, G., NANNIPIERI, M., ANSELMINO, M., DI SALVO, C., VITTI, P., PINCHERA, A., SANTINI, F. & MAFFEI, M. 2011. Human leptin tissue distribution, but not weight loss-dependent change in expression, is associated with methylation of its promoter. *Epigenetics*, 6.
- MAYMÓ, J. L., PÉREZ, A. P., SÁNCHEZ-MARGALET, V., DUEÑAS, J. L., CALVO, J. C. & VARONE, C. L. 2009. Up-regulation of placental leptin by human chorionic gonadotropin. *Endocrinology*, 150, 304-313.
- MAYMÓ, J. L., PÉREZ PÉREZ, A., GAMBINO, Y., CALVO, J. C., SÁNCHEZ-MARGALET, V. & VARONE, C. L. 2011. Review: Leptin gene expression in the placenta – Regulation of a key hormone in trophoblast proliferation and survival. *Placenta*, 32, S146-S153.
- MCCANCE, D. R., PETTITT, D. J., HANSON, R. L., JACOBSSON, L. T., KNOWLER, W. C. & BENNETT, P. H. 1994. Birth weight and non-insulin dependent diabetes: thrifty genotype, thrifty phenotype, or surviving small baby genotype? *BMJ*, 308, 942-5.
- MELZNER, I., SCOTT, V., DORSCH, K., FISCHER, P., WABITSCH, M., BRUDERLEIN, S., HASEL, C. & MOLLER, P. 2002. Leptin gene expression in human preadipocytes is switched on by maturation-induced demethylation of distinct CpGs in its proximal promoter. *J Biol Chem*, 277, 45420-7.
- MELLATI, A. A., MAZLOOMZADEH, S., ANJOMSHOAA, A., ALIPOUR, M., KARIMI, F., MAZLOOMI, S. & NAGHI KAZEMI, S. A. 2010. Multiple correlations between

- cord blood leptin concentration and indices of neonatal growth. *Arch Med Res*, 41, 26-32.
- MISRA, V. K., STRAUGHEN, J. K. & TRUDEAU, S. 2013. Maternal serum leptin during pregnancy and infant birth weight: the influence of maternal overweight and obesity. *Obesity (Silver Spring)*, 21, 1064-9.
- NEZAR, M. A., EL-BAKY, A. M., SOLIMAN, O. A., ABDEL-HADY, H. A., HAMMAD, A. M. & AL-HAGGAR, M. S. 2009. Endothelin-1 and leptin as markers of intrauterine growth restriction. *Indian J Pediatr*, 76, 485-8.
- OKADA, Y., SAKAUE, H., NAGARE, T. & KASUGA, M. 2009. Diet-induced up-regulation of gene expression in adipocytes without changes in DNA methylation. *Kobe J Med Sci*, 54, E241-9.
- ONG, K. K., AHMED, M. L., SHERRIFF, A., WOODS, K. A., WATTS, A., GOLDING, J. & DUNGER, D. B. 1999. Cord blood leptin is associated with size at birth and predicts infancy weight gain in humans. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 84, 1145-1148.
- PARACCHINI, V., PEDOTTI, P. & TAIOLI, E. 2005. Genetics of leptin and obesity: a HuGE review. *Am J Epidemiol*, 162, 101-14.
- PARDO, I. M., GELONEZE, B., TAMBASCIA, M. A., PEREIRA, J. L. & BARROS FILHO, A. A. 2004. Leptin as a marker of sexual dimorphism in newborn infants. *Jornal de Pediatria*, 80, 305-308.
- PÉREZ-PÉREZ, A., MAYMÓ, J., GAMBINO, Y., DUEÑAS, J. L., GOBERNA, R., VARONE, C. & SÁNCHEZ-MARGALET, V. 2009. Leptin stimulates protein synthesis-activating translation machinery in human trophoblastic cells. *Biology of reproduction*, 81, 826-832.
- RAMIREZ-VELEZ, R. 2012. [In utero fetal programming and its impact on health in adulthood]. *Endocrinol Nutr*, 59, 383-93.
- RAMOS ARELLANO LE. 2009. *Polimorfismos A19G en el gen de leptina y A668G en su receptor y su relación con las concentraciones de leptina sérica y la hiperfagia en niños con obesidad.*, Universidad Autónoma de Guerrero.

- REMMERS, F. & DELEMARRE-VAN DE WAAL, H. A. 2011. Developmental programming of energy balance and its hypothalamic regulation. *Endocr Rev*, 32, 272-311.
- REYNOLDS, L. P., BOROWICZ, P. P., CATON, J. S., VONNAHME, K. A., LUTHER, J. S., HAMMER, C. J., MADDOCK CARLIN, K. R., GRAZUL-BILSKA, A. T. & REDMER, D. A. 2010. Developmental programming: the concept, large animal models, and the key role of uteroplacental vascular development. *J Anim Sci*, 88, E61-72.
- ROSSANT, J. & CROSS, J. C. 2001. Placental development: lessons from mouse mutants. *Nat Rev Genet*, 2, 538-48.
- SCHOOF, E., STUPPY, A., HARIG, F., CARBON, R., HORBACH, T., STOHR, W., RASCHER, W. & DOTSCHE, J. 2004. Comparison of leptin gene expression in different adipose tissues in children and adults. *Eur J Endocrinol*, 150, 579-84.
- SCHUBRING, C., KIESS, W., ENGLARO, P., RASCHER, W., DOTSCHE, J., HANITSCH, S., ATTANASIO, A. & BLUM, W. F. 1997. Levels of leptin in maternal serum, amniotic fluid, and arterial and venous cord blood: relation to neonatal and placental weight. *J Clin Endocrinol Metab*, 82, 1480-3.
- SCHUBRING, C., SIEBLER, T., KRATZSCH, J., ENGLARO, P., BLUM, W. F., TRIEP, K. & KIESS, W. 1999. Leptin serum concentrations in healthy neonates within the first week of life: relation to insulin and growth hormone levels, skinfold thickness, body mass index and weight. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 51, 199-204.
- SIBLEY, C. P., BROWNBILL, P., DILWORTH, M. & GLAZIER, J. D. 2010. Review: Adaptation in placental nutrient supply to meet fetal growth demand: Implications for programming. *Placenta*, 31, S70-S74.
- STEFAN, N., WEYER, C., LEVY-MARCHAL, C., STUMVOLL, M., KNOWLER, W. C., TATARANNI, P. A., BOGARDUS, C. & PRATLEY, R. E. 2004. Endogenous glucose production, insulin sensitivity, and insulin secretion in normal glucose-tolerant Pima Indians with low birth weight. *Metabolism*, 53, 904-11.
- STOGER, R. 2006. In vivo methylation patterns of the leptin promoter in human and mouse. *Epigenetics*, 1, 155-62.

- TRUJILLO, M. L., SPUCH, C., CARRO, E. & SENARIS, R. 2011. Hyperphagia and central mechanisms for leptin resistance during pregnancy. *Endocrinology*, 152, 1355-65.
- YOKOMORI, N., TAWATA, M. & ONAYA, T. 2002. DNA demethylation modulates mouse leptin promoter activity during the differentiation of 3T3-L1 cells. *Diabetologia*, 45, 140-8.
- YURA, S., SAGAWA, N., MISE, H., MORI, T., MASUZAKI, H., OGAWA, Y. & NAKAO, K. 1998. A positive umbilical venous-arterial difference of leptin level and its rapid decline after birth. *Am J Obstet Gynecol*, 178, 926-30.
- ZARE, F., MORADIZIRKOHI, A., MAGHBOOLI, Z., HOSSEIN-NEZHAD, A., RAHMANI, M. & LARIJANI, B. 2007. Relationship between Serum Umbilical Cord and Maternal Leptin and Adiponectin Concentrations with Fetal Growth Parameters. *Iranian J Publ Health*, 75-79.