



Universidad Autónoma de Guerrero

Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas

Unidad Académica de Medicina/UIEM

Maestría en Ciencias Biomédicas

**“EFECTO DE LA LEPTINA RECOMBINANTE SOBRE LA
PRODUCCIÓN DE CITOCINAS PROINFLAMATORIAS (IL-1 β , IL-6
y TNF- α) EN CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE
PERIFÉRICA CON VARIANTES POLIMÓRFICAS EN EL GEN
LEPR”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A:

FRANCISCO ISRAEL TORRES ROJAS

DIRECTOR DE TESIS: Dra. ISELA PARRA ROJAS

CODIRECTOR DE TESIS: Dr. JOSÉ FRANCISCO MUÑOZ VALLE

CHILPANCINGO, GRO. OCTUBRE DE 2012.



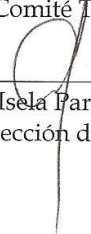



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

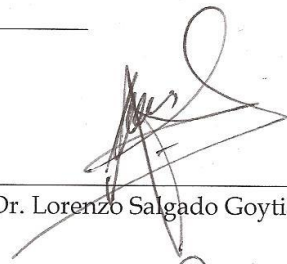
APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 22 días del mes de junio de dos mil doce, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "Efecto de la leptina recombinante sobre citocinas proinflamatorias (IL-1,IL-6 y TNF- α) en células mononucleares de sangre periférica con polimorfismos en el gen *LEPR*", presentada por el alumno Francisco Israel Torres Rojas, para obtener el Grado de Maestría 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 Tutorial


Dra. Isela Parra Rojas
Dirección de tesis



Dr. José Francisco Muñoz Valle
Codirección de tesis


Dr. Lorenzo Salgado Goytia



Dr. Eduardo Castañeda Saucedo


Dra. Ma. Elena Moreno Godínez


Vo. Bo


Dra. Isela Parra Rojas
Coordinadora del Posgrado en Ciencias Biomédicas


Vo. Bo


Dra. Berenice Illades Aguiar
Directora de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Investigación en Obesidad y Diabetes de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero y en el Laboratorio de Inmunología del Centro Universitario de Ciencias de la Salud de la Universidad de Guadalajara.

Directora de Tesis

Dra. Isela Parra Rojas

Codirector de Tesis

Dr. José Francisco Muñoz Valle

Comité tutorial

Dra. María Elena Moreno Godínez

Dr. Eduardo Castañeda Saucedo

Dr. Lorenzo Salgado Goytia

El alumno Francisco Israel Torres Rojas recibió beca CONACYT durante el periodo comprendido de septiembre de 2010 a agosto de 2012 con número de CVU 368312.

Se agradece al Banco Santander por haber otorgado beca al C. Francisco Israel Torres Rojas durante el periodo Agosto-Diciembre de 2011

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por permitirme lograr culminar una etapa más de formación profesional, por guiar mi andar en el camino del trabajo y el estudio, Gracias Señor.

A mis padres **Naty y Erasmo** por su apoyo y por haber inculcado en mi persona el deseo de intentar mejorar mi formación personal y académica.

A mi directora de tesis la doctora **Isela Parra** por la confianza y orientación en el desarrollo de este trabajo pero también por la enorme paciencia que mostró para mi persona.

Al doctor **José Francisco**, por la confianza, el apoyo, los consejos y la gran disponibilidad mostrada para charlar sobre el trabajo y la amistad brindada, además de la accesibilidad al aceptarme en su laboratorio en la ciudad de Guadalajara.

A mis sinodales, la doctora **María Elena** y el doctor **Eduardo** por las sabias sugerencias en cuanto al trabajo en cultivo celular, así como también por las muestras de apoyo; al doctor **Lorenzo** por sus observaciones y consejos en el escrito de este trabajo y por la apertura al dialogo que siempre mostró.

A mi esposa **Guadalupe** por el apoyo, la confianza y el impulso de realizar las cosas que ha fortalecido en mí día tras día.

A mi compañera de tesis de licenciatura y gran amiga **Irlanda** por el apoyo y las palabras de aliento en los momentos críticos de la parte experimental de este trabajo.

A la doctora **Ana Laura Pereira** por el apoyo y amabilidad al aceptarme en su laboratorio en la ciudad de Guadalajara.

A mis compañeros y amigos de laboratorio la química **Aralia Bernabé** por estar al pendiente de la necesidad de reactivos y material para mi trabajo, a **Kary, Samy, César, Barrera, Leslie, Jorge Ocampo** por los momentos agradables compartidos en el lab. Gracias.

A la doctora **Paola Guzmán** por los consejos, sugerencias y revisiones realizadas a mi trabajo que fueron útiles para el mejoramiento del mismo.

A la química **Natividad Sales** por sus sugerencias y ayuda en los momentos de duda. Al M. C. **Noelio Zamudio** por sus consejos y apoyo al estar al pendiente del desarrollo de mi trabajo.

A mis amigos en Guadalajara doctor **Luis Ángel**, M.C. **Salvador Muñoz, Mirna Vázquez, Edgar, Priscila** por que con su amistad, sugerencias y humor lograron hacer mi estancia más amena.

A la Biol. **Paola Ramírez** por su disponibilidad y amabilidad en cada uno de los trámites y solicitudes realizadas a su persona que hicieron menos tedioso el papeleo para llegar a estas instancias.

Í N D I C E

	Página
RESUMEN	5
ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN	7
MATERIAL Y MÉTODOS	11
RESULTADOS	14
DISCUSIÓN	19
CONCLUSIONES	25
ANEXOS	26
REFERENCIAS	32

RESUMEN

Antecedentes. La leptina es una hormona reguladora del balance energético. En células mononucleares promueve la producción de citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-6 y TNF- α . En el gen del receptor de leptina (*LEPR*), se han descrito variaciones; entre ellas están los polimorfismos A326G, A668G y G1968C, que pueden estar relacionados con la resistencia a la leptina, la desregulación del apetito y la inflamación. **Objetivo.** Evaluar el efecto de la leptina recombinante humana sobre cultivos de células mononucleares de sangre periférica de individuos portadores de distintas variantes polimórficas en el gen (*LEPR*). **Metodología.** Se genotipificaron 167 individuos originarios del estado de Guerrero para los polimorfismos A326G, A668G y G1968C, de los cuales a 8 se les realizó un cultivo primario de células mononucleares las cuales fueron estimuladas con 100 ng/mL de leptina recombinante humana (LEPr) y/o lipopolisacárido (LPS). El sobrenadante de los medios de cultivo fue colectado a las 24 horas después del estímulo para medir las concentraciones de citocinas proinflamatorias mediante la técnica de ELISA. **Resultados.** La producción de IL-1, IL-6 y TNF- α se incrementó al estimular las células mononucleares con leptina. Al comparar los niveles de estas citocinas por genotipo, se encontró que las células portadoras del alelo 668G (27.84 pg/mL de IL-1 β , 6.828 pg/mL de IL-6 y 15.13 pg/mL de TNF α) y 1968C (15.48 pg/mL de IL-1 β , 8.129 pg/mL de TNF α) tuvieron una mayor producción de citocinas en comparación con las células con genotipo silvestre 668AA (5.924 pg/mL de IL-1 β , 3.496 pg/mL de IL-6 y 5.840 pg/mL de TNF α) y 1968CC (5.527 pg/mL de IL-1 β , 3.10 pg/mL de TNF α). El análisis por haplogenotipo de las concentraciones de citocinas determinadas en los sobrenadantes mostró que el haplogenotipo AGGGGC es el que mejor responde al estímulo con leptina. **Conclusiones.** Las células mononucleares obtenidas de los individuos portadores de los genotipos 668AG, 668GG y 1968GC del gen *LEPR*, presentaron mayor secreción de citocinas proinflamatorias que las células con genotipo silvestre.

PALABRAS CLAVE: Receptor de leptina, polimorfismos, leptina recombinante, cultivo celular, citocinas.

ABSTRACT

Background. Leptin is a hormone that regulates energy balance. In mononuclear cells promotes proinflammatory cytokine production such as IL-1, IL-6 y TNF- α . In the leptin receptor gene (*LEPR*), have been described various alterations, among this are the polymorphisms A326G, A668G and G1968C, that may be associated with resistance to leptin, deregulation of appetite and inflammation. **Objective.** Evaluate the effect of recombinant human leptin in cultured peripheral blood mononuclear cells of subjects carriers of polymorphisms in the leptin receptor gene (*LEPR*). **Methodology.** 167 subjects from the state of Guerrero were genotyped for polymorphisms A326G, A668G and G1968C, of which 8 are conducted to a primary culture of mononuclear cells which were stimulated with 100 ng / mL human recombinant leptin (LEPr) and / or lipopolysaccharide (LPS). The supernatant of the culture media was collected at 24 hours after stimulation for measure the concentrations of proinflammatory cytokines by ELISA **Results.** The production of IL-1, IL-6 and TNF- α was increased when stimulating mononuclear cells with leptin. By comparing the nivels of these cytokines by genotype was found that cells carrying the 668G allele (27.84 pg/mL of IL-1 β , 6.828 pg/mL of IL-6 and 15.13 pg/mL of TNF α) and 1968C (15.48 pg/mL of IL-1 β , 8.129 pg/mL of TNF α) had increased cytokine production compared to cells with 668AA wild genotype (5.924 pg/mL of IL-1 β , 3.496 pg/mL of IL-6 y 5.840 pg/mL of TNF α) and 1968CC (5.527 pg/mL of IL-1 β , 3.10 pg/mL of TNF α). Analysis by haplogenotype concentrations of certain cytokines in supernatants showed that haplogenotype AGGGGC is most responsive to leptin stimulation. **Conclusions.** Mononuclear cells obtained from individuals 668AG, 668GG genotype and 1968GC *LEPR* gene, showed increased secretion of proinflammatory cytokines that cells with wild type.

KEYWORDS: leptin receptor, polymorphisms, recombinant leptin, cell culture, cytokines

I. INTRODUCCIÓN

La leptina es una hormona de 167 aminoácidos, producida principalmente por el tejido adiposo, y es codificada por el gen leptina (*LEP*) (Banerjee *et al.*, 2006; Popko *et al.*, 2007). El incremento de los niveles de leptina en plasma se asocia con el desarrollo de aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares (Hongo *et al.*, 2009), y con resistencia a la insulina, independientemente del índice de masa corporal (IMC) (Seth *et al.*, 2008).

El receptor de leptina es una proteína transmembranal, se expresa en la región hipotalámica y en varios tejidos periféricos. El gen que codifica para el receptor de leptina humano (*LEPR*) se localiza en el cromosoma 1p31-22 y origina 6 isoformas por medio de *splicing alternativo*, que se dividen en tres clases: corta, larga y soluble, las cuales difieren en longitud del dominio citoplasmático (Paracchini *et al.*, 2005; Banerjee *et al.*, 2006; Popko *et al.*, 2007).

Una vez que la leptina se une a su receptor en las células blanco, generalmente se activa la vía fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K). La unión leptina-receptor induce fosforilación de la tirosina cinasa janus-2 (JAK2), que fosforila a LEPR y a sustratos del receptor de insulina (IRS). La fosforilación de LEPR en los residuos de tirosina 1077 y 1138 recluta al activador de la transcripción y transductor de señal STAT3 que se dimeriza y transloca al interior del núcleo, donde controla la transcripción de genes blanco, como el supresor de señalización de citocinas SOCS-3 que regula la señalización de leptina (Donato *et al.*, 2010).

Se han realizado estudios de asociación de los polimorfismos en el gen *LEPR* con el desarrollo de obesidad y que pueden estar involucrados en alteraciones en la conducta alimentaria (Blüher and Mantzoros, 2004). De las variantes polimórficas en el gen *LEPR*, tres de ellas son las de mayor interés (A326G, A668G y G1968C). El polimorfismo A326G (Lys109Arg) localizado en el dominio extracelular del receptor de leptina, se ha asociado con incremento en los niveles de leptina como consecuencia de la ganancia de peso en población latinoamericana (Zurbano *et al.*, 2004); aunque en diferentes poblaciones del mundo la asociación entre este

polimorfismo y el desarrollo de obesidad no ha podido ser corroborada (Bender *et al.*, 2011). También se ha reportado que, la presencia del genotipo GG del polimorfismo A668G (Gln223Arg), localizado en el exón 6 de *LEPR*, en población polaca se asoció con incremento en el IMC y adiposidad (Popko *et al.*, 2007). De igual manera, en niños guerrerenses con obesidad se encontró que los portadores de los genotipos AG + GG del polimorfismo A668G, presentan un aumento en el consumo de alimento y un incremento en la temperatura corporal (Ramos 2009).

El polimorfismo G1968C (K656N) localizado en el exón 14 del gen *LEPR*, provoca un cambio de aminoácido modificando la carga de la proteína (de positiva a neutra) en la parte proximal a la membrana de su dominio extracelular, este polimorfismo no se ha asociado con niveles de adiposidad, pero se sugiere que puede alterar la funcionalidad del receptor al disminuir la afinidad hacia el ligando al cambiarse la carga de la proteína (Mars *et al.*, 2004); en población caucásica se ha detallado que el alelo C de este polimorfismo se encuentra en mayor frecuencia en personas obesas en comparación con personas delgadas y se ha asociado con niveles elevados de leptina sérica (Masuo *et al.*, 2008).

La hiperleptinemia es una característica común en las personas con un alto índice de masa corporal (Franek *et al.*, 2010). El aumento en los niveles séricos de leptina se asocia con la presencia de obesidad y puede estar relacionado con “resistencia a la leptina” (Paracchini *et al.*, 2005; Lang y Ratke 2009), que es una alteración en la cual existe pérdida del balance energético corporal, ya que se ingiere mayor cantidad de energía de la necesaria, debido a que no se inhibe el apetito, por lo que el almacenamiento de masa grasa se incrementa; lo que es consecuencia de diversos factores, como la baja cantidad de receptor soluble del receptor de leptina (Cohen *et al.*, 2007), o también pueden estar implicados polimorfismos en los genes de las proteínas que participan en la vía de señalización de leptina, como el supresor de señalización de citocinas (SOCS3) y el factor de transcripción y activador de transducción de señal STAT3 (Seth *et al.*, 2008). En población infantil guerrerense, se asoció la presencia del alelo 326G y 1968C con la disminución en los niveles del receptor soluble (Marino 2011), lo que sugiere un transporte ineficaz de la hormona

al hipotálamo en los portadores de estos alelos, disminuyendo la saciedad en estas personas, llegando a desarrollar la obesidad. Aunque todavía se desconocen los mecanismos que favorecen la resistencia a leptina, se han sugerido algunos, como alteraciones en el gen de leptina o del receptor de leptina, otro mecanismo puede ser la inhibición de la hormona mediante la unión de proteínas de unión a leptina libre como clusterina o proteína C reactiva, lo que genera que la leptina no pueda interactuar con su receptor específico de membrana (Seth *et al.*, 2008).

Las citocinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF- α se producen de forma inmediata tras el contacto de las células implicadas en la respuesta inmune innata con un agente extraño; los monocitos y macrófagos activados son la principal fuente de estas moléculas, aunque también pueden ser producidas por linfocitos (Gosain *et al.*, 2005). Asimismo se ha descrito que estas citocinas son producidas por el tejido adiposo blanco (Gómez *et al.*, 2009) y se sabe que la leptina estimula la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- α e IL-6 en monocitos humanos (Sánchez *et al.*, 2006).

Se ha evaluado el efecto de la leptina en diversos tipos celulares y se ha demostrado que esta es capaz de inducir la producción de IL-6 de manera dosis-dependiente, en líneas celulares de cáncer de colon, aunque en experimentos *in vivo* no fue confirmado (Fenton *et al.*, 2006). Al tratar con leptina humana recombinante muestras de tumores colorrectales, se encontró una expresión dosis dependiente de IL-1 β , IL-8 entre otros (Abolhassani *et al.*, 2008). También en cultivos de cartílago humano se observó un incremento dosis-dependiente en la producción de óxido nítrico, prostaglandina E2, IL-6 e IL-8, posterior al estímulo con leptina recombinante (Vuolteenaho *et al.*, 2009). La leptina promueve el tráfico de leucocitos e induce un fenotipo proinflamatorio en cultivos de hepatocitos de rata, incrementando la expresión de MCP-1 e IL-6 (Allman *et al.*, 2009). Además se ha observado que el tratamiento de células dendríticas (CD) con leptina, tanto maduras como inmaduras, se incrementa la producción de citocinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6 e IL-12). También se observó que sólo en CD inmaduras el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), es regulado (Mattioli *et al.*, 2008).

Otras funciones de la leptina es la regulación de la fagocitosis y la producción de citocinas proinflamatorias por macrófagos (Tang *et al.*, 2007), también promueve linfopoyesis (Riejos *et al.*, 2010), y en cultivos celulares de monocitos estimulados con leptina recombinante humana se observó un aumento dosis dependiente de la producción de IL-6 y TNF- α (Margalet *et al.*, 2003). Por otro lado, en cultivo de linfocitos T, se obtuvo un incremento dosis-dependiente en la producción de IL-1 β , IL-6 y TNF- α al ser estimulados con leptina recombinante humana (Dixit *et al.*, 2004).

En las alteraciones en la interacción leptina-receptor de leptina, pueden estar implicados los polimorfismos A326G, A668G y/o G1968C en el gen *LEPR*, que favorecen un cambio de aminoácido en la estructura de la proteína y con esto puede disminuir la afinidad con su ligando, llegando a inducir la resistencia a la leptina y consecuentemente una desregulación en la función de esta hormona, destacando la regulación del apetito y en la inflamación.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la leptina recombinante humana sobre la producción de citocinas proinflamatorias, en células mononucleares de sangre periférica, obtenidas de individuos portadores de los polimorfismos A326G, A668G y G1968C en el gen *LEPR*.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Sujetos

A partir del banco de ADN de individuos no relacionados genéticamente, de ambos sexos y originarios del estado de Guerrero, que se encuentra en el Laboratorio de Investigación en Obesidad y Diabetes, de la Unidad Académica de Ciencias Químico-Biológicas de la UAGro, se realizó la genotipificación de los polimorfismos A326G, A668G y G1968C en el gen del receptor de leptina, mediante la técnica de PCR-RFLP (Reacción en Cadena de la Polimerasa-Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción).

Genotipificación de los polimorfismos A326G, A668G y G1968C en el gen del receptor de leptina

La amplificación del fragmento de ADN del gen *LEPR* se realizó mediante la técnica de PCR, para el polimorfismo A326G se utilizaron los siguientes iniciadores sentido (5'- TTTCCACTGTTGCTTTTCGGA-3') y antisentido (5'-AAACTAAAGAATTTACTGTTGAAACAAATGGC-3'), se obtuvo un fragmento de 101 pb. La mezcla de reacción se realizó en un volumen final de 20 μ L, que contiene: buffer 1x, MgCl₂ 3.0 mM, dNTPs 0.2 mM, 0.1 μ M de cada primer, 1 U de *Taq* polimerasa (Invitrogen) y 0.1 μ g/ μ L de ADN.

Para el polimorfismo A668G se utilizaron los siguientes iniciadores: sentido (5'-AAACTCAACGACACTCTCCTT-3') y antisentido (5'-TGAAGTACATTAGAGGTGA-3') se obtuvo un producto de 80 pb. El volumen total de mezcla de reacción fue de 24 μ L, conteniendo: buffer 1x, MgCl₂ 1.25 mM, dNTPs 0.05 mM, iniciadores 0.2 mM, 1 U de *Taq* polimerasa y 0.1 μ g/ μ L de ADN.

Para el polimorfismo G1968C se utilizaron los siguientes iniciadores: sentido (5'-AATCCAGCCTACACAGTTGT-3') y antisentido (5'-CTTCCAAAGTAAAGTGACATTTTTCGC-3') para obtener un producto de 224 pb. El volumen total de la mezcla de reacción fue de 20 μ L, que contiene: buffer 1x, MgCl₂ 1.25 mM, dNTPs 0.05 mM, iniciadores 0.2 mM, 1 U de *Taq* polimerasa y 0.1 μ g/ μ L de

ADN. La amplificación se realizó en un termociclador (Techne TC-412), las condiciones de las reacciones se muestran en el anexo 1.

Para la restricción de los fragmentos A326G, A668G y G1968C del gen *LEPR*, amplificados previamente por PCR, se realizó una digestión con las endonucleasas de restricción *HaeIII*, *MspI* y *BstUI* respectivamente y fueron incubadas a 60°C por 3 horas para el fragmento G1968C y a 37°C por 2 y 2.5 horas para los fragmentos A326G y A668G, respectivamente. Posteriormente, los fragmentos obtenidos, se sometieron a una electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% y teñidos con una solución de nitrato de plata al 0.2% (Anexo 2).

Cultivo celular y tratamiento de células

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica de 8 individuos (Anexo 3), que se mantuvieron en medio RPMI-1640 suplementado con 10% SFB inactivado por calor y 2% de una solución de antibiótico antimicótico de 16-18 horas. Para posteriormente realizar por triplicado la estimulación con 100 ng/mL leptina recombinante humana y/o 50 ng/mL de lipopolisacárido durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se recolectaron los sobrenadantes, que fueron aclarados por centrifugación y almacenados a -70 °C hasta su uso.

Se realizó una curva dosis-respuesta con LEPr en la línea celular de monocitos humanos THP-1, que se ha descrito expresa al receptor funcional de leptina (Gruen et al., 2007). En una placa de 96 pozos (Nunc-GIBCO), se colocaron las células a una densidad de 80,000 cél/pozo, en el medio de cultivo RPMI-1640 (GIBCO). Posteriormente, se realizaron los estímulos bajo el siguiente esquema experimental: 0 ng/mL de leptina (control negativo), 100 ng/mL de leptina recombinante humana, 50 ng/mL de LPS (el LPS fue utilizado como control positivo al ser un fuerte inductor de respuesta inflamatoria) y 100 ng/mL de leptina más 50 ng/mL de LPS, durante 24 horas de acuerdo a reportes anteriores (Álvarez *et al* 1999; Muñoz *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2005; Agrawall *et al.*, 2011).

Cuantificación de citocinas

Los niveles de citocinas se determinaron mediante técnica de ELISA, utilizando 100 μ L de sobrenadante de medio de cultivo para IL-6 y TNF- α , y 50 μ L de sobrenadante de medio de cultivo para IL-1 β sin dilución, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Anexo 4).

Análisis estadístico

Los genotipos obtenidos se registraron en el programa STATA 9.2, las concentraciones de citocinas se registraron y analizaron en el programa GraphPad Prism 5 para Windows. Se realizó prueba de Shapiro Wilk para evaluar normalidad en las variables cuantitativas. Se realizó prueba de Kruskal Wallis para grupos con distribución no paramétrica, ANOVA para grupos con distribución paramétrica, para comparar diferencias de medias entre los cultivos sin estímulo vs. los cultivos con estímulo se utilizó la prueba t de Student para aquéllos en los que se observó distribución paramétrica y Mann Whitney para los grupos que no tuvieron distribución paramétrica. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$.

III. RESULTADOS

En la genotipificación de las 167 muestras para los polimorfismos A326G, A668G y G1968C en el gen *LEPR*; se obtuvo 48.8% de individuos con genotipo A/A, 41.3% A/G y 9.9% G/G para el polimorfismo A326G; 32.6% de individuos con genotipo A/A, 45.9% AG y 21.5% G/G para el A668G; mientras que para el polimorfismo G1968C fueron: 65.9% de sujetos con genotipo G/G, 32.9% G/C y 1.2% C/C (Anexo 5).

Los genotipos de los polimorfismos A326G, A668G y G1968C del gen *LEPR* de los individuos a los cuales se les realizó aislamiento de células mononucleares para su posterior cultivo se muestran en la tabla 1.

Muestra	A326G	A668G	G1968C
1	AA	AA	GG
2	AG	GG	GC
3	AG	AG	GC
4	AG	AG	GG
5	AA	AG	GC
6	GG	AG	GG
7	GG	GG	GC
8	AA	AA	GC
THP-1	AA	GG	GG

Las células mononucleares humanas y la línea celular THP1 fueron estimuladas con leptina, LPS y la combinación LPS + leptina durante 24 horas. En PBMC la producción de TNF- α , IL-1 β e IL-6 se incrementó tras el estímulo con 100 ng/mL de leptina recombinante humana y fue mayor al estimular a las células con 50 ng/mL de LPS, mientras que en células THP1 se observó un comportamiento similar, a excepción de la producción de IL-1 β (figura 1).

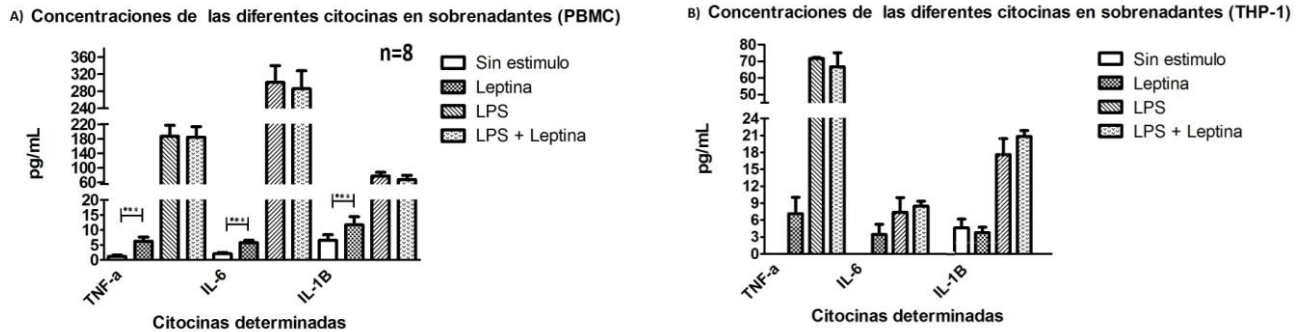


Figura 1. Niveles de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-6) en cultivos de células mononucleares (A) y de la línea celular THP-1 (B) en presencia de leptina, LPS y leptina más LPS. Se muestran valores de medias \pm DE. Los asteriscos indican la significancia estadística entre cultivos sin y con estímulo de leptina * p < 0.05, ** p < 0.01; *** p < 0.001.

Al comparar las medianas de los niveles de IL-1 β por genotipo, se encontró un incremento significativo después de que las células fueron estimuladas con 100 ng/mL de LEPr, a continuación solo se muestran las medianas de los niveles antes y después del estímulo con LEPr considerando el genotipo: 326AA (2.831 pg/mL vs. 6.464 pg/mL), 326AG (3.879 pg/mL vs. 9.916 pg/mL), 668GG (17.08 pg/mL vs. 27.84 pg/mL), y 1968GC (8.702 pg/mL vs. 15.48 pg/mL) como se muestra en la Figura 2.

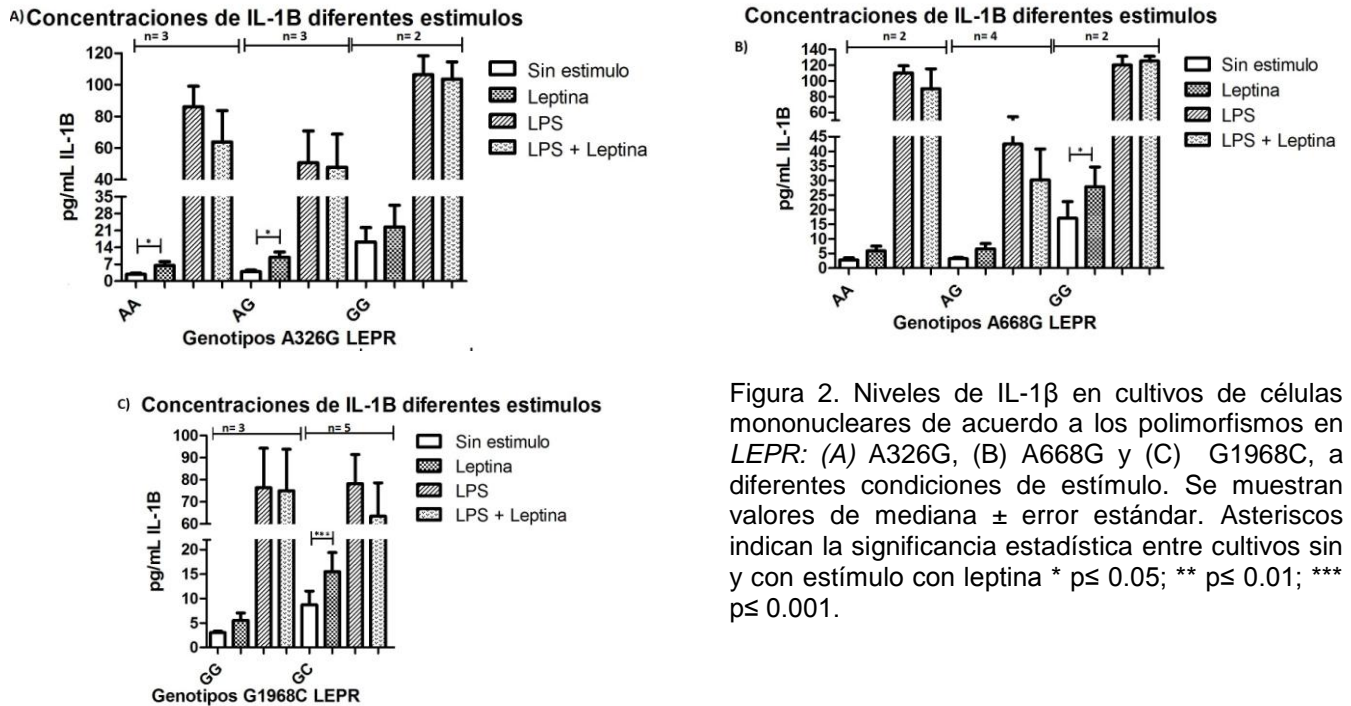
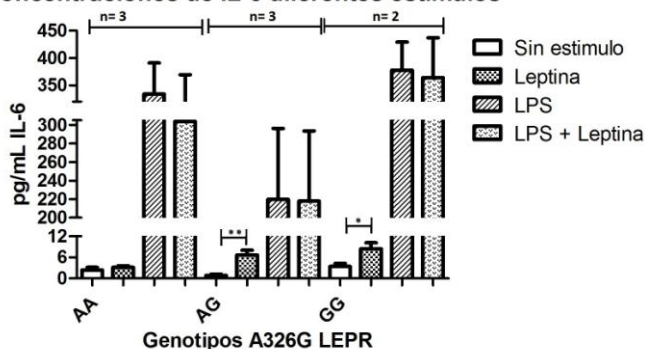


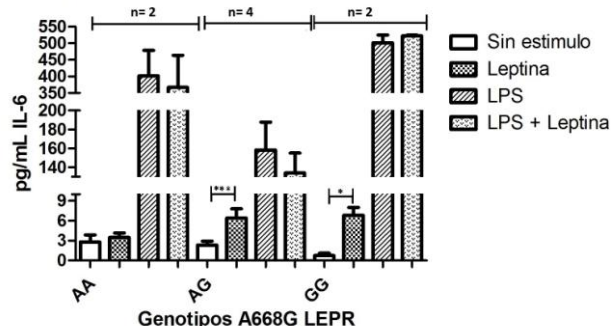
Figura 2. Niveles de IL-1 β en cultivos de células mononucleares de acuerdo a los polimorfismos en *LEPR*: (A) A326G, (B) A668G y (C) G1968C, a diferentes condiciones de estímulo. Se muestran valores de mediana \pm error estándar. Asteriscos indican la significancia estadística entre cultivos sin y con estímulo con leptina * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001.

En la Figura 3, se muestran las medianas de IL-6 por genotipo, se encontró un incremento significativo después de que las células fueron estimuladas con 100 ng/mL de LEPr, a continuación se muestran las medianas de los niveles obtenidos antes y después del estímulo con LEPr de acuerdo con el genotipo: 326AG (0.83 pg/mL vs. 6.65 pg/mL), 326GG (3.39 pg/mL vs. 8.44 pg/mL), 668AG (2.33 pg/mL vs. 6.42 pg/mL), 668GG (0.76 pg/mL vs. 6.82 pg/mL), 1968GG (2.56 pg/mL vs. 6.02 pg/mL) y 1968GC (1.76 pg/mL vs. 5.65 pg/mL), claramente observamos la tendencia al incremento en la producción con la presencia del alelo C de este último polimorfismo aunque no se pudo evaluar el efecto del genotipo CC.

A) Concentraciones de IL-6 diferentes estímulos



B) Concentraciones de IL-6 diferentes estímulos



C) Concentraciones de IL-6 diferentes estímulos

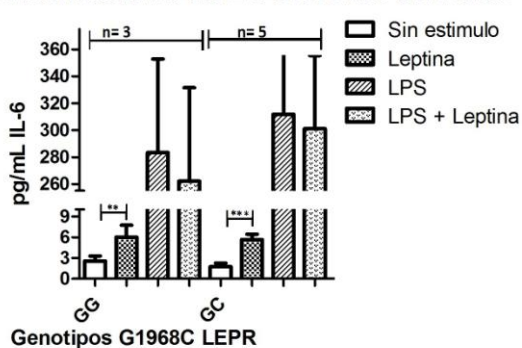


Figura 3. Niveles de IL-6 en cultivos de células mononucleares de acuerdo a los polimorfismos de *LEPR*: (A) A326G, (B) A668G y (C) G1968C a diferentes condiciones de estímulo. Se muestran valores de mediana \pm error estándar. Asteriscos indican la significancia estadística entre cultivos sin y con estímulo con leptina * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

Por último, se encontró un aumento significativo en la producción de TNF- α , después de que las células fueron estimuladas con 100 ng/mL de LEPr, a continuación solo se muestran los niveles obtenidos antes y después del estímulo con LEPr de acuerdo con el genotipo: 326AA (0.2834 pg/mL vs. 4.657 pg/mL), 668AG (0 pg/mL vs. 2 pg/mL), 668GG (4.312 pg/mL vs. 15.13 pg/mL), y 1968GC (1.895 pg/mL vs. 8.129 pg/mL), como se muestra en la Figura 4.

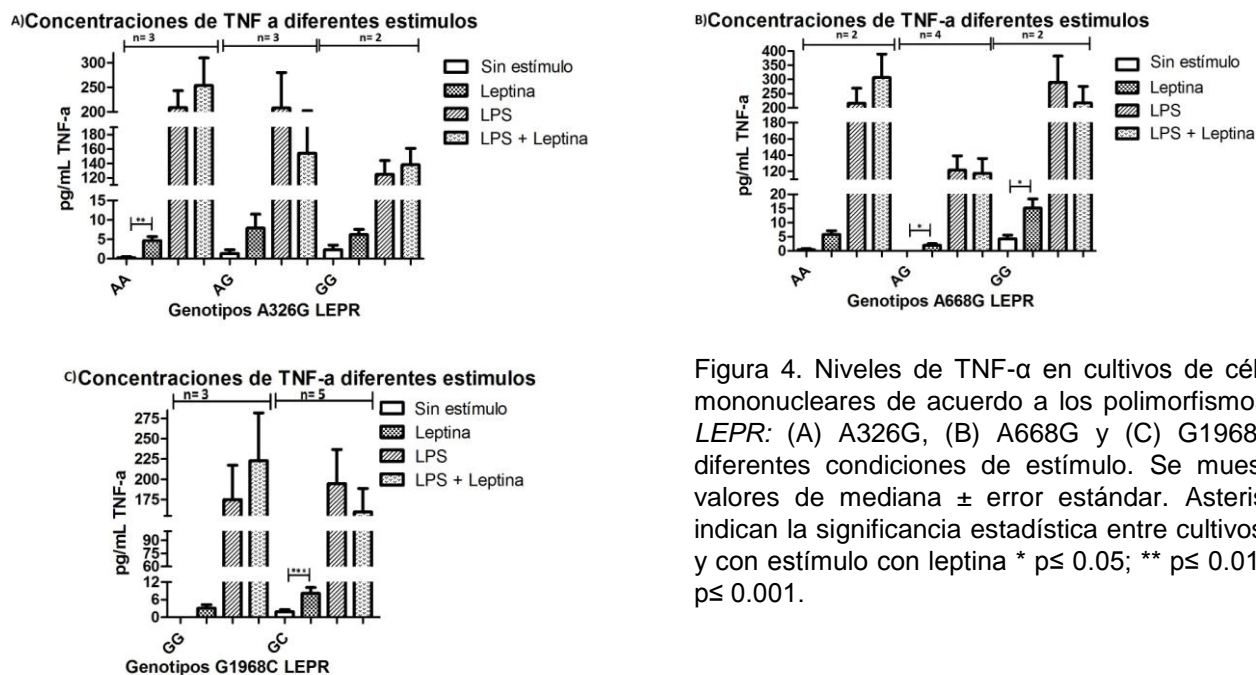
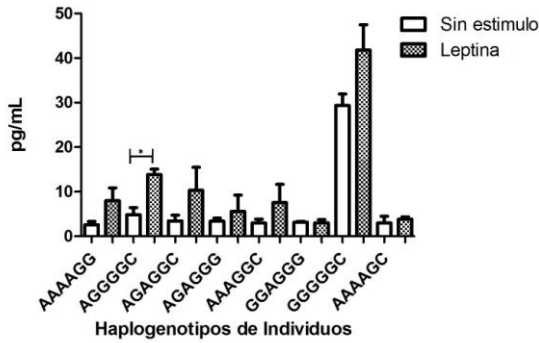


Figura 4. Niveles de TNF- α en cultivos de células mononucleares de acuerdo a los polimorfismos de *LEPR*: (A) A326G, (B) A668G y (C) G1968C a diferentes condiciones de estímulo. Se muestran valores de mediana \pm error estándar. Asteriscos indican la significancia estadística entre cultivos sin y con estímulo con leptina * p \leq 0.05; ** p \leq 0.01; *** p \leq 0.001.

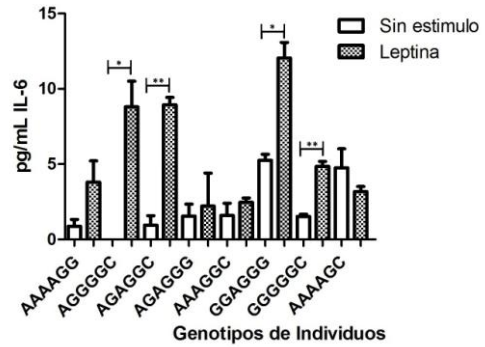
En los cultivos de la línea celular THP-1, se observó que la producción basal de TNF- α (0 pg/mL) se incrementó tras el estímulo con LEPr (7.14 pg/mL), lo mismo sucedió para IL-6 (0 pg/mL sin estímulo vs. 3.45 pg/mL con estímulo), estos niveles se encuentran en el rango de los obtenidos en el sobrenadante de los cultivos de PBMC estimulados con leptina (6.2 pg/mL para TNF- α y 5.7 pg/mL para IL-6). Se encontró que la producción de IL-1 β en células THP-1 disminuyó tras el estímulo con leptina (4.624 pg/mL sin estímulo vs. 3.780 pg/mL con estímulo).

Al comparar por haplogenotipo, la concentración de las citocinas, en los sobrenadantes de las PBMC, considerando el siguiente orden: A326G, A668G y G1968C, se encontró que las células portadoras del haplogenotipo AGGGGC incrementaron significativamente la producción de IL-1 β , después del estímulo con LEPr (Figura 5). En 4 de los 8 haplogenotipos evaluados, se observó que las células estimuladas con LEPr incrementaron significativamente la producción de IL-6. En cuanto a la producción de TNF- α , sólo en las células portadoras del haplogenotipo AGGGGC se observó incremento con significancia estadística (Figura 5), tras ser estimuladas con LEPr (medianas de 4.032 pg/mL a 21.85 pg/mL).

A) Concentración de IL-1 β en sobrenadantes



B) Concentraciones de IL-6 en sobrenadantes



C) Concentraciones de TNF en sobrenadantes

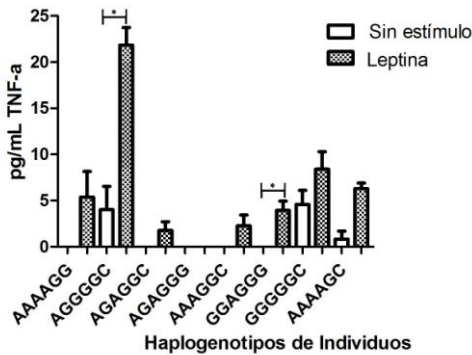


Figura 5. Niveles de IL-1 β (A), IL-6 (B) y TNF- α (C) en los sobrenadantes de los cultivos de PBMCs por haplogenotipo, con y sin estímulo con leptina. Se muestran valores de mediana \pm error estándar. Asteriscos indican la significancia estadística entre cultivos sin y con estímulo con leptina * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

Niveles de citocinas en sangre periférica

Los niveles plasmáticos de las citocinas evaluadas (IL-1 β , IL-6 y TNF- α) en los cultivos primarios de PBMC, también fueron determinados en sangre periférica de los sujetos a los que se les realizó cultivo primario. No se detectaron niveles séricos de TNF- α , y sólo en 2 de los 8 sujetos fueron detectables los niveles de IL-1 β . Los niveles de IL-6, si se detectaron en los 8 sujetos, aunque al compararse por genotipo no se observaron diferencias significativas (Figura 6).

Concentraciones de IL-6 en el plasma de los sujetos

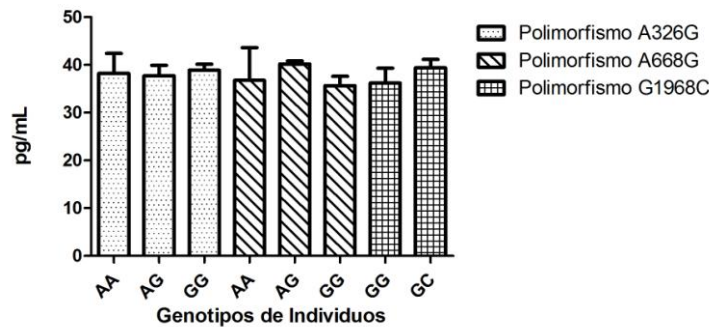


Figura 6. Comparación por genotipo de los niveles plasmáticos de IL-6.

IV. DISCUSIÓN

En este estudio se pretendió inicialmente trabajar con células portadoras de genotipos homocigotos de los tres polimorfismos por lo cual la genotipificación fue de 167 sujetos, sin embargo no se logró dicho objetivo por lo cual se procedió a utilizar células de sujetos con genotipos varios para el posterior análisis.

Se determinó la frecuencia alélica y genotípica de los polimorfismos A326G, A668G y G1968C en una muestra de población originaria del estado de Guerrero, dichas frecuencias son similares a las reportadas en estudios previos realizados en otros grupos de la misma población, para los polimorfismos A326G y G1968C (Marino 2011), pero difieren con lo determinado para el polimorfismo A668G (Ramos 2009), lo que puede ser resultado de diferencias en el tamaño de muestra en los estudios.

Se evaluó el efecto de los polimorfismos A326G, A668G y G1968C en cultivos de células mononucleares estimuladas con leptina recombinante humana. El cambio de aminoácido que estos polimorfismos implican se ha considerado como un factor que altera la afinidad del receptor hacia la hormona (Mars *et al.*, 2004), lo que generaría como principal consecuencia a nivel de sistema nervioso central que los péptidos encargados de inhibir la sensación de apetito como la propiomelanocortina no se liberen o lo hagan en menor cantidad a la normal, lo que en el individuo se reflejaría como un estado de hiperfagia, que es factor para que se desarrolle la obesidad (Blüher and Mantzoros, 2004). Además la presencia de estos polimorfismos en el gen del receptor leptina podría disminuir afinidad del receptor por su ligando por lo cual se disminuye la secreción de citocinas proinflamatorias que la leptina induce en células del sistema inmune.

En el presente estudio se encontró que los cultivos primarios de células mononucleares presentaron un incremento en la producción de citocinas proinflamatorias, tras el estímulo con leptina recombinante humana, este efecto coincide con lo reportado anteriormente en cultivos de linfocitos (Dixit *et al.*, 2004) y con reportes de proliferación y activación de células mononucleares al ser estimuladas con leptina, además, de un incremento en la producción de TNF- α e IL-6 (Álvarez *et al.*, 1999).

En este trabajo observamos que los niveles basales de IL-1 β se incrementan con la presencia del alelo polimórfico para los 3 polimorfismos lo que refuerza la propuesta de que estos polimorfismos pueden estar involucrados en el inicio y establecimiento de un estado proinflamatorio propio de la obesidad (Seth *et al.*, 2008). Aunque también debemos considerar que los niveles IL-1 β , así como los niveles del resto de citocinas están determinados por otras moléculas a nivel fisiológico como LPS e IL-16 y no solamente en respuesta a la señalización de leptina (Petrovsky 2001).

En este estudio se reporta por primera vez el efecto que tienen los polimorfismos A326G, A668G y G1968C en el gen del receptor de leptina en la producción de citocinas utilizando cultivo de PBMC, como antecedente tenemos el reporte del efecto de la leptina en adhesión y migración de monocitos considerando el fenotipo obeso y delgado (Sarigianni *et al.*, 2010), donde no se encontraron diferencias significativas entre grupos.

En un estudio previo en población guerrerense se asoció al alelo G del polimorfismo A326G con disminución en los niveles del receptor soluble de leptina (Marino 2011), en población europea se ha descrito que el genotipo GG de este polimorfismo está relacionado con un IMC elevado (Heo *et al.*, 2002). En el presente estudio se observó que cuando el alelo 326G está presente, se incrementa la producción de IL-1 β e IL-6 en células mononucleares tras el estímulo con leptina, lo cual sugiere que el efecto del alelo puede estar mediado por factores endocrinos como los niveles de glucocorticoides y prostaglandinas que regulan la producción de estas citocinas, otro factor es el estrés, que se ha demostrado que incrementa la producción de IL-1 β e IL-6 (Petrovsky 2001).

Se han realizado estudios de asociación entre variantes polimórficas del gen *LEPR* con el estado inflamatorio del individuo, y se ha asociado la presencia del alelo 326G con un incremento en los niveles plasmáticos de IL-6 (Abete *et al.*, 2009). De igual manera, en el presente estudio se observó un incremento en la producción de IL-6 en las células con genotipo 326AG y 326GG, lo que puede indicar que la presencia de una arginina en la posición 109 de la proteína podría estar induciendo un cambio conformacional de la proteína y puede ocasionar un incremento en la

afinidad hacia la leptina, aumentando la producción de IL-6 en estas células, en comparación a la producción que se induce por leptina cuando el aminoácido que está en posición 109 es una lisina, situación similar se observó en la producción de IL-1 β inducida por leptina, ésta se incrementó significativamente en las células con genotipos 326AA y 326AG; con estos resultados podemos mencionar que en 2 de las 3 citocinas evaluadas (IL-1 β , IL-6) el efecto de la estimulación con leptina se observó en las células con genotipo 326AG o 326GG.

Hasta el momento no existen reportes que relacionen los niveles de citocinas proinflamatorias con el polimorfismo A668G del gen *LEPR*. Aunque existen antecedentes de que la presencia del alelo G de este polimorfismo, disminuye la sensibilidad a la insulina, sugiriendo que el LEPR podría estar jugando un papel importante en la patogénesis de resistencia a insulina (Chiu *et al.*, 2004) y se ha asociado con aumento en el IMC (Popko *et al.*, 2007), aunque previamente se ha reportado que su presencia no influye en la señalización de la leptina (Stratigopoulos *et al.*, 2009). En este estudio se encontró que las células con genotipo 668AG y 668GG incrementaron significativamente la producción de TNF- α e IL-6 tras el estímulo con leptina. La producción de IL-1 β también se incrementó de manera significativa en las células con genotipo 668GG, sugiriendo que la presencia del alelo G que provoca el cambio de una glutamina por una arginina (Gotoda *et al.*, 1997), y por consecuente un cambio en la carga de la proteína, estaría incrementando la afinidad entre leptina y receptor de leptina lo que favorecería un aumento en la producción de las citocinas proinflamatorias, esto es diferente a lo reportado en un estudio previo realizado en población guerrerense, en el que se asoció la presencia del alelo 668G del gen *LEPR* con un incremento en la ingesta de alimento (Ramos 2009), y se sugirió un estado de resistencia a la leptina en individuos portadores de dicho alelo, cabe mencionar que el presente es un trabajo experimental y considera parámetros más directos en la participación de LEPR como lo es la cantidad de citocinas producidas.

En lo que respecta al polimorfismo G1968C, se observó que las células con genotipo GC incrementaron significativamente la producción de las 3 citocinas tras el estímulo con leptina, y sólo en la producción de IL-6 se observó un incremento

significativo en las células con genotipo GG, lo que indica que el cambio de base en esta posición del gen puede estar incrementado la afinidad de la proteína hacia la leptina como anteriormente ha sido sugerido (Mars *et al.*, 2004), favoreciendo un estado inflamatorio. En individuos con enfermedad de hígado graso no alcohólico, se asoció a la variante polimórfica en la posición 1968 del gen *LEPR* con inflamación lobular e inflamación portal (Aller *et al.*, 2012). Encontramos que la presencia de la variante con menor frecuencia alélica de estos polimorfismos (G para A326G y A668G, C para G1968C) permite una mayor producción de IL-1 β e IL-6, lo que puede indicar que el cambio de aminoácido generado por estos polimorfismos, modifica la estructura de la proteína propiciando un incremento de la afinidad ligando-receptor por lo que las proteínas inducidas por leptina tienden a incrementar cuando ésta última está presente.

En este estudio, se encontró que el efecto directo de los polimorfismos analizados en el gen *LEPR* se observa al aislar las células y estimularlas con leptina, en los individuos analizados, los niveles de estas citocinas en sujetos sanos están determinados generalmente por la cantidad de tejido adiposo, permaneciendo usualmente disminuidos y se elevan en un estado de obesidad (Denizmen *et al.*, 2005; Soon *et al.*, 2005), o debido a la presencia de agentes infecciosos donde se desencadena una respuesta inflamatoria (Hilebrand *et al.*, 2010).

En lo que respecta a los cultivos primarios estimulados con LPS, se observó una alta producción de las 3 citocinas bajo el estímulo con leptina; la combinación de LPS+leptina indujo una producción de citocinas similar a la inducida por LPS. Estos resultados coinciden con reportes previos (Frisullo *et al.*, 2004), lo que puede ser resultado de la regulación que ejerce la leptina sobre los receptores parecidos a toll (TLR) que tienen como función reconocer a LPS y de esta manera se modula la producción de TNF- α en presencia de leptina (Fortis *et al.*, 2012).

El estímulo con LPS a los cultivos primarios mostró una producción exacerbada de citocinas, la cual no se incrementó con el estímulo de LPS + Leptina, probablemente como resultado de que el estímulo en los cultivos se realizó paralelamente a diferencia de Lofreda y colaboradores quienes refieren un periodo

de preactivación de las células con LPS para su posterior estímulo con LEPr (Loffreda *et al.*, 1998) y si observan un efecto sinérgico de LPS + LEPr.

En el análisis por haplogenotipo se encontró que las células con el haplogenotipo AGGGGC presentaron un incremento significativo en la producción de las 3 citocinas, tras el estímulo con leptina recombinante humana, sugiriendo que este haplogenotipo es el que mejor responde al estímulo con leptina, puesto que células con haplogenotipo AGAGGC o con haplogenotipo GGGGGC, los cuales difieren en un genotipo en comparación con las primeras solo incrementan significativamente la producción de IL-6, este dato es muy interesante ya que pareciera que el cambio del genotipo en estos haplogenotipos repercute para que exista variación en las citocinas inducidas, aunque es importante señalar que solo se tuvo un individuo por haplogenotipo y que además de los 3 polimorfismos aquí evaluados, existe una gran cantidad de polimorfismos, no solo en el gen del receptor de leptina, si no en otros muchos genes involucrados en la vía de señalización de leptina y en la producción de citosinas, que pueden estar participando en la regulación de la secreción de éstas, por parte de las células mononucleares (Tang *et al.*, 2007; Agrawal *et al.*, 2011).

Nosotros observamos en las células THP-1 un efecto positivo en la producción de TNF- α e IL-6 tras el estímulo con leptina, esto es interesante debido a que no existen reportes anteriores de estímulo con leptina en la línea celular THP-1. El estímulo con LPS a la línea celular THP-1 mostró una gran producción de las 3 citocinas medidas, lo que coincide con reportes previos de curva de estímulo con LPS a esta línea celular (Singh *et al.*, 2005). La combinación LPS + leptina en esta línea celular mostró un incremento en la producción de IL-1 β e IL-6 en comparación con el estímulo de solo LPS, denotando un efecto sinérgico en esta línea celular.

En los sujetos a los cuales se les realizó aislamiento de células mononucleares no se detectaron niveles séricos de TNF- α ; de IL-1 β solo en 2 muestras fueron detectados, aunque con valores muy bajos, esto tal vez a consecuencia de que los kits utilizados no fueron de alta sensibilidad, aunque cabe señalar que nuestro reporte coincide con otros reportes que en individuos sanos los niveles plasmáticos de estas citocinas generalmente son menores a 10 pg/mL y en ocasiones

indetectables, ya que varían por diferentes factores, principalmente se incrementan en eventos traumáticos, durante la respuesta inflamatoria, también se ven influenciados por la edad, género, cantidad de tejido adiposo, estado hormonal en el caso de las mujeres y a la presencia también de polimorfismos en las regiones reguladoras de los genes de estas citocinas que modulan su producción (Maskin *et al.*, 2000; Mózes *et al.*, 2011).

En el modelo *in vitro* que se realizó se evaluó de manera directa el efecto de la leptina en células mononucleares para la producción de citocinas, encontrando que las variantes de menor frecuencia alélica para los polimorfismos A326G, A668G y G1968C de *LEPR*, están involucradas en el incremento de la producción de citocinas proinflamatorias en presencia de leptina, lo que pudiera ejemplificar lo que sucede en una persona obesa en la cual los niveles de leptina están elevados y al ser portadores de estas variantes, sus células producen una mayor cantidad de citocinas que sumada a la producción de citocinas por el tejido adiposo, se propicia el establecimiento de un estado proinflamatorio subclínico, característico de la obesidad crónica, por lo cual es importante analizar en estudios posteriores el papel de estos polimorfismos en otras células, como en las del hipotálamo en modelos viables y de fácil manejo como ratones o mediante constructos celulares donde se ponga de manifiesto la respuesta a leptina a nivel neuronal.

V. CONCLUSIONES

- La producción de IL-1 β , IL-6 y TNF- α se incrementó al estimular las células mononucleares con leptina.
- Las células portadoras de los alelos 668G y 1968C del gen *LEPR* produjeron una mayor cantidad de citocinas que las células con genotipos silvestres.
- El haplogenotipo con mejor respuesta al estímulo con leptina fue el AGGGGC
- La línea celular THP-1 responde al estímulo de leptina incrementando la producción de IL-6 y TNF- α .

VI. ANEXOS

Anexo 1. Condiciones de PCR para los polimorfismos A326G, A668G y G1968C del gen *LEPR*

Cuadro 1. Condiciones de reacción de la PCR para el polimorfismo 326A/G del gen del receptor de leptina.

Desnaturalización inicial	94 °C 5 min.	}	30 Ciclos
Desnaturalización del ADN	94 °C 30 seg.		
Alineamiento de primers	60 °C 30 seg.		
Extensión del ADN	72°C 30 seg.		
Extensión final	72°C 2 min.		

Cuadro 2. Condiciones de reacción de la PCR para el polimorfismos 668A/G en el gen del receptor de leptina.

Desnaturalización inicial	94°C 5 min.	}	25 Ciclos
Desnaturalización del DNA	94°C 30 seg.		
Alineamiento de primers	56°C 30 seg.		
Extensión del ADN	72°C 30 seg.		
Extensión final	72°C 3 min.		

Cuadro 3. Condiciones de reacción de la PCR para el polimorfismo 1968G/C en el gen del receptor de leptina.

Desnaturalización inicial	94°C 5 min.	}	30 CICLOS
Desnaturalización del DNA	94°C 30 seg.		
Alineamiento de primers	63°C 30 seg.		
Extensión del ADN	72°C 30 seg.		
Extensión final	72°C 3 min.		

Anexo 2. Corrimiento electroforético de PCR y RFLP de los polimorfismos A326G, A668G y G1968C del gen *LEPR*.

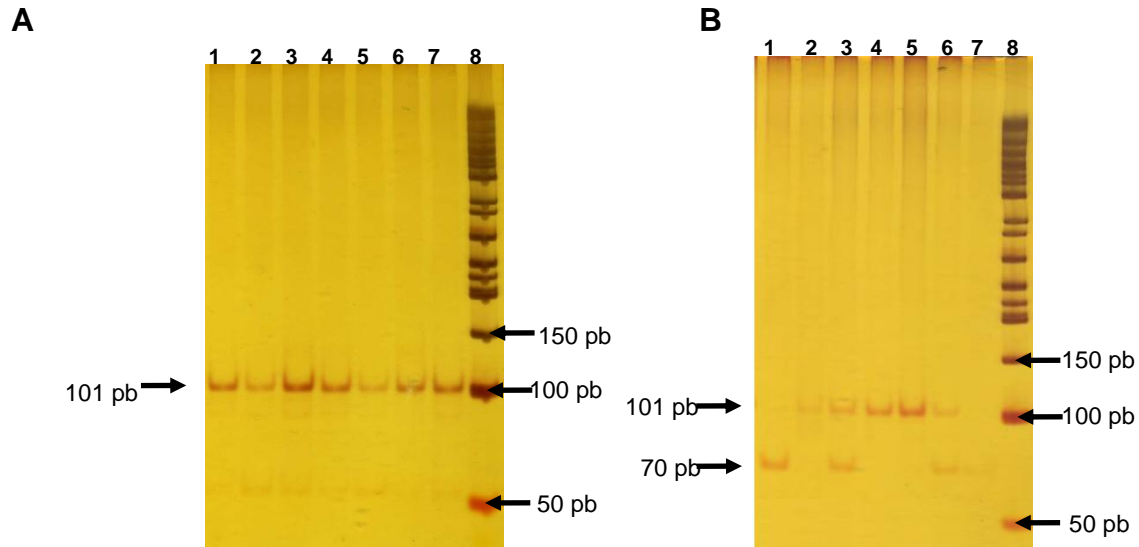


Figura. Polimorfismo 326A/G en el gen del receptor de leptina. **A)** Carriles 1-7 productos de PCR de 101 pb, carril 8 marcador de peso molecular de 50 pb en el gel de poliácridamida al 6%. **B)** Identificación de genotipos post-digestión con la enzima *HaeIII* y electroforesis en gel de poliácridamida al 6%. Carril 8: marcador de peso molecular de 50 pb, carril 2, 4 y 5: genotipo A/A, carril 3 y 6: genotipo A/G y carril 1: genotipo G/G.

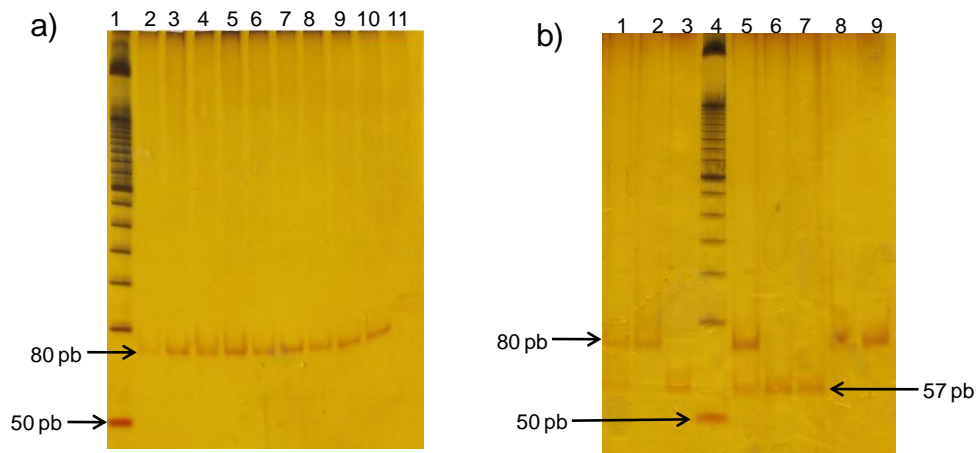


Figura. Identificación del polimorfismo A668G en el gen *LEPR* en geles de poliácridamida. a) Carril 1 Marcador de peso molecular 50 pb, Carriles 2-10 productos de PCR de 80pb. b) Productos de PCR post-digestión con la enzima *MspI*, Carril 4 Marcador de Peso Molecular de 50 pb, Carril 2, 8 y 9 genotipo A/A, Carril 1 y 5 genotipo A/G, Carril 3, 6 y 7 genotipo G/G

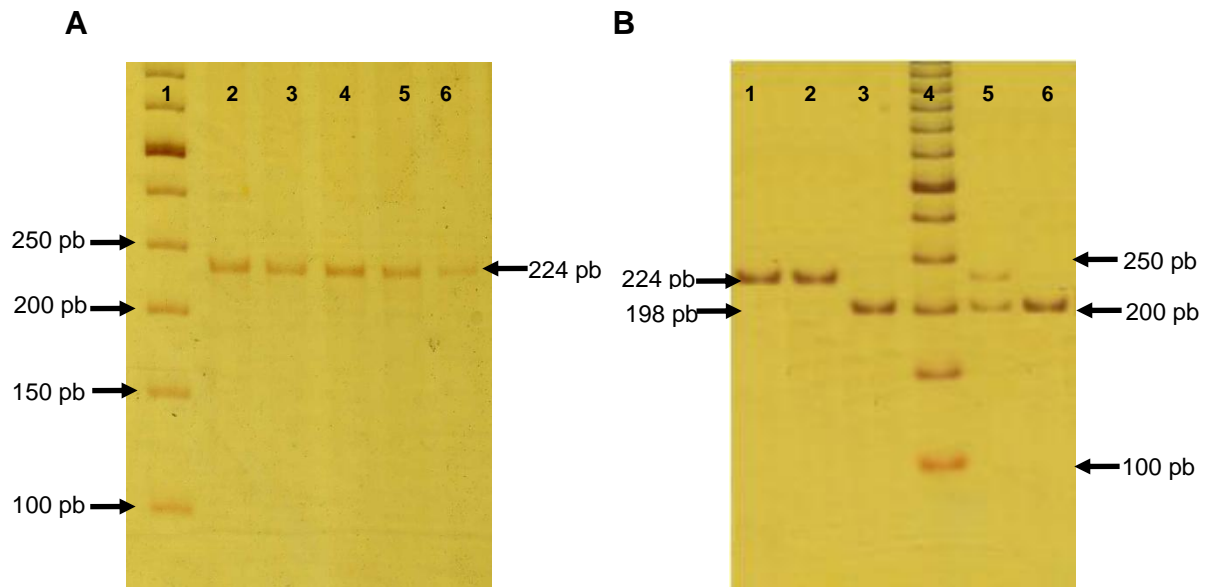


Figura. Identificación del polimorfismo G1968C en el gen *LEPR* a) Carril 2-6 Productos de PCR de 224 pb, carril 1 Marcador de Peso molecular 50 pb. b) Productos de PCR post-digestión con la enzima BstU1. Carril 4: marcador de peso molecular de 50 pb, carril 1 y 2: genotipo G/G, carril 3 y 6: genotipo C/C y carriles 5: genotipo G/C.

Anexo 3. Aislamiento de células mononucleares

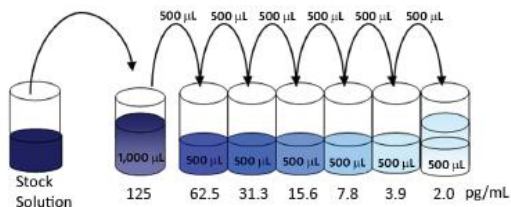
Inicialmente, se obtuvo una muestra de 5 mL de sangre venosa periférica con EDTA. En un tubo cónico de 15 mL se colocaron 4 mL de Lymphoprep y se adicionó la muestra de sangre, dejándola resbalar lentamente por las paredes teniendo cuidado de no perturbar el gradiente de densidad. Posteriormente, se centrifugó el tubo a 1500 rpm por 30 minutos. De esta forma se obtienen cuatro fases: 1) corresponde al plasma, 2) la segunda fase (anillo opalescente) corresponde a las células mononucleares, 3) la tercera será el lymphoprep y 4) la última corresponderá a los eritrocitos. Se separa la segunda fase con ayuda de una pipeta Pasteur y se coloca en un tubo estéril de 15 mL, al cual se le adicionaron 10 mL de PBS, se homogeniza la muestra con ayuda de una pipeta Pasteur y se centrifuga 10 minutos a 1500 rpm. Se decanta el PBS con cuidado y se realizan dos lavados bajo las mismas condiciones.

Finalmente, el botón celular se resuspende en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de SFB inactivado por calor y una solución de 2% de antibiótico antimicótico y son sembradas en botellas de cultivo.

Anexo 4: Técnica de ELISA

HUMAN IL-1 β (Biolegend)

Un día antes de correr la ELISA, diluye el anticuerpo de captura en 1X de buffer de captura. Añade 100 μ l de la solución de anticuerpo de captura en los pocillos. Colocar la placa a incubar durante 16-18 horas a 4°C. Coloca los reactivos a temperatura ambiente antes de su uso. Una curva de estándar es recomendada para cada ensayo. Lava la placa 4 veces con 300 μ l por pozo de buffer de lavado. Para bloquear las uniones no específicas añade 200 μ l de diluyente de ensayo 1X a cada pocillo. Tapa la placa e incuba en shaker a 200 rpm durante 1 hora. Prepara (si es necesario) las diluciones de muestras y estándar. Prepara 1 ml del estándar máximo de 125 pg/ml. Realiza una serie de diluciones con diluyente de ensayo en tubos separados. Después de la dilución, las concentraciones del estándar de IL-1 β humano son 125 pg/ml, 62.5 pg/ml, 31.3 pg/ml, 15.6 pg/ml, 7.8 pg/ml, 3.9 pg/ml, 2 pg/ml y 1 pg/ml respectivamente, el diluyente de ensayo A sirve como estándar cero (0 pg/ml).



Lava la placa 4 veces con buffer de lavado y añade 50 μ l de buffer de ensayo a los pocillos con muestras o estándar. Añade 50 μ l de estándar o muestra a los pocillos adecuados. Coloca la placa a incubar durante 2 horas sin shaker, posteriormente lava 4 veces con buffer de lavado. Coloca 100 μ l de anticuerpo de detección diluido a cada pozo e incuba la placa 1 hora, lava 4 veces con buffer de lavado, posteriormente añade 100 μ l por pozo de solución Avidin-HRP, incuba durante 30 minutos sin shaker. Lava 5 veces con buffer de lavado, coloca 100 μ l de solución substrato e incuba por 20 minutos (los pocillos positivos podrían tornarse de color azul, después de los 20 minutos añade la solución de paro (100 μ l por pocillo), lee la absorbancia para determinar concentraciones a 450nm durante los 30 minutos posteriores.

IL-6 (human), EIA kit (ENZOLIFESCIENCES)

Pipetear 100 μ L de diluyente estándar (Assay Buffer 13 or Culture Media) en el pocillo correspondiente a 0 pg/mL. Pipetear 100 μ L de estándar 1 a 7 en los pocillos correspondientes. Pipetear 100 μ L de las muestras en cada uno de los pocillos. Tapar la placa e incubar a temperatura ambiente durante 1 hora a ~500rpm. Vaciar el contenido de los pocillos y lavar 4 veces con 400 μ L de solución de lavado por pocillo, decantar el líquido y secar los pocillos. Pipetear 100 μ L de anticuerpo Amarillo dentro de cada pocillo, a excepción del blanco, tapar la placa e incubar a temperatura ambiente durante una hora ~500rpm. Lavar 4 veces con 400 μ L de solución de lavado como se realizó anteriormente, añadir 100 μ L del conjugado azul a los pocillos, excepto el blanco, colocar la placa a incubar durante 30 minutos a ~500rpm. Realizar una serie de lavados como anteriormente y pipetear 100 μ L de solución substrato en cada pocillo para posteriormente incubar por 15 minutos en shaker ~500rpm a temperatura ambiente. Pipetear 100 μ L de la solución de paro a cada uno de los pocillos. La reacción debe ser leída inmediatamente para la determinación de concentraciones.

ELISA TNF- α HUMANO (INVITROGEN)

Determine el número de columnas necesarias para el ensayo.

Añada 50 μ L de buffer de incubación a los pocillos que contendrán estándar o muestras de suero/plasma o 50 μ L de diluyente buffer estándar a los pocillos que contendrán muestras de cultivo celular, el pocillo para el blanco debe permanecer vacío. Añada 100 μ L del diluyente buffer estándar al pocillo cero. Añada 100 μ L de estándar, muestra o controles a los pocillos adecuados, tape la placa e incube durante 2 horas a temperatura ambiente. Decante la solución de los pocillos y lave 4 veces con buffer de lavado. Pipetear 100 μ L de la solución de anti-TNF- α Biotinilado a cada pocillo excepto al cromógeno blanco, tape la placa e incube 1 hora a temperatura ambiente. Decante la solución y lave 4 veces con buffer de lavado, posteriormente, añada 100 μ L Solución de trabajo Estreptavidin-HRP a cada pocillo, exceptuando el cromógeno blanco, tape la placa e incube en la oscuridad por 30 minutos a temperatura ambiente, decante el líquido y lave 4 veces. Añada 100 μ L de

cromógeno estabilizador a cada pocillo, el liquido tornará un cambio de color a azul, incube por 30 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente, añada 100 μ L de la solución de paro a cada pocillo, tape la placa, la solución en la placa podría cambiar de azul a amarillo. Lea la absorbancia de cada pocillo a 450 nm dentro de las siguientes 2 horas.

Anexo 5. Frecuencias de los polimorfismos A326G, A668G y G1968C del gen *LEPR* en población guerrerense

Tabla. Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos 326A/G, 668A/G y 1968G/C del gen del receptor de leptina

	¹ Alelo n (%)		² Genotipo n (%)		
	1	2	1/1	1/2	2/2
A326G	231 (69.16%)	103 (30.84%)	80 (47.9%)	71 (42.51%)	16 (9.58%)
A668G	183 (54.79%)	151 (45.21%)	52 (31.14%)	79 (47.31%)	36 (21.56%)
G1968C	275 (82.33%)	59 (17.67%)	110(65.9%)	55(32.9%)	2(1.2%)

¹Alelo 1, alelo silvestre; alelo 2, alelo variante

²Genotipo 1/1, homocigoto para el alelo silvestre; genotipo 1/2, heterocigoto; genotipo 2/2, homocigoto para el alelo variante

VII. REFERENCIAS

1. Abete I, Goyenechea E, Crujeiras AB, Martinez JA. Inflammatory state and stress condition in weight-lowering Lys109Arg LEPR gene polymorphism carriers. *Arch Med Res.* 2009; 40(4):306-10.
2. Abolhassani M, Aloulou N, Chaumette M, Aparicio T, Garcia N, Mansour H, *et al.* Leptin Receptor–Related Immune Response in Colorectal Tumors: The Role of Colonocytes and Interleukin-8. *Cancer Res* 2008; 68 (22): 9423-9432.
3. Agrawal S, Gollapudy S, Su H, Gupta S. Leptin Activates Human B Cells to Secrete TNF- α , IL-6, and IL-10 via JAK2/STAT3 and p38MAPK/ERK1/2 Signaling Pathway. *J Clin Immunol* (2011) 31:472–478.
4. Aller R, De Luis DA, Izaola O, González Sagrado M, *et al.* Lys656Asn polymorphism of leptin receptor, leptin levels and insulin resistance in patients with non alcoholic fatty liver disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2012; 16(3):335-41.
5. Allman M, Wallace M, Gaskin L, Rivera C. Leptin Induces an Inflammatory Phenotype in leanwistar Rats. *Hindawi Pub Corp Med of Inflamm* 2009; 1-8.
6. Álvarez S, Goberna R, Margalet V. Human Leptin Stimulates Proliferation and Activation of Human Circulating Monocytes. *Cell Immunol* 1999; (194): 6–11
7. Banerjee I, Trueman J, Hall C, Price D, Patel L, Whatmore A, *et al.* Phenotypic variation in constitutional delay of growth and puberty: relationship to specific leptin and leptin receptor gene polymorphisms. *Eur J of End* 2006; (155) 121–126.
8. Bender N, Allemann N, Marek D, *et al.* Association between Variants of the Leptin Receptor Gene (*LEPR*) and Overweight: A Systematic Review and an Analysis of the CoLaus Study. *PLoS ONE* 2011; 6 (10): e26157.
9. Blüher S & Mantzoros CS 2004. The role of leptin in regulating neuroendocrine function in humans. *J Nutr.* 2004; (134): 2469S-2474S.
10. Chiu k, Chu a, Chuang L, Saad M. Association of leptin receptor polymorphism with insulin resistance. *Eur J of End* 2004; (150) 725–729.
11. Cohen S, Kokkotou E, Biddinger E, *et al.* High Circulating Leptin Receptors with Normal Leptin Sensitivity in Liver-specific Insulin Receptor Knock-out (LIRKO) Mice. *J of Biol Chemistry* 2007; 282 (32): 23672–23678.
12. Denizmen A, Gungor S, Ustundag B *et al.* Proinflammatory Cytokines and Leptin Are Increased in Serum of Prepubertal Obese Children. *Med of Inflamm.* 2005;3 (2005) 180–183
13. Dixit V, Schaffer E, Pyle R, *et al.* Ghrelin inhibits leptin- and activation-induced proinflammatory cytokine expression by human monocytes and T cells. *J. Clin. Invest.* 2004; (114):57–66.
14. Donato J, Frazão R, Fuzeti C. The PI3K signaling pathway mediates the biological effects of leptin. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2010; 54 (7): 591-602.
15. Fenton J, Hursting S, Perkins S, Hord N. Interleukin-6 production induced by leptin treatment promotes cell proliferation in an Apc (Min/+) colon epithelial cell line. *Carcinogenesis* 2006; 27 (7) 1507–1515.
16. Fortis A, García R, Maldonado C, *et al.* The role of innate immunity in obesity. *Salud Publica Mex* 2012; 54: 171-177.
17. Franek E, Nowak J, Safranow K, *et al.* G(–2548)A leptin gene polymorphism in obese subjects is associated with serum leptin concentration and bone mass. *Pol Arch Med Wewn.* 2010; 120 (5): 175-179.

18. Frisullo G, Angelucci F, Mirabella M, *et al.* Leptin Enhances the Release of Cytokines by Peripheral Blood Mononuclear Cells from Relapsing Multiple Sclerosis Patients. *J of Clin Immun* 2004; 24 (3) 287-293.
19. Gómez R, Conde J, Gómez J *et al.* Adipocytokines: emerging mediators of the immune response and inflammation. *Reumatol Clin.*2009;5(S1):6–12
20. Gotoda T, Manning B, Goldstone A, Imrie H, Evans A, Strosberg A, *et al.* Leptin receptor gene variation and obesity: lack of association in a white British male population. *Hum Mol Genet*, 1997; 6 (6): 869–876.
21. Gosain A, Gamelli RL. A primer in cytokines. *J Burn Care Rehabil.* 2005; 6 (1): 7-12.
22. Gruen M, Hao M, Piston D y Hasty A. Leptin requires canonical migratory signaling pathways for induction of monocyte and macrophage chemotaxis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007; 293: C1481-C1488
23. Heo M, Leibel R, Fontaine K *et al.* A meta-analytic investigation of linkage and association of common leptin receptor (*LEPR*) polymorphisms with body mass index and waist circumference. *Int J of Obes.* 2002; 26: 640-646.
24. Hillenbrand A, Knippschild U, Weiss M *et al.* Sepsis induced changes of adipokines and cytokines - septic patients compared to morbidly obese patients. *BMC Surgery* 2010; 10 (26): 1-9
25. Hongo S, Watanabe T, Arita S, Kanome T, Kageyama H, Shioda S, Miyazaki A. Leptin modulates ACAT1 expression and cholesterol efflux from human macrophages. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 297: 474-482.
26. Lang K, Ratke J. Leptin and Adiponectin: new players in the field of tumor cell and leukocyte migration. *Cell Com and Sig* 2009; 7 (27): 1- 10.
27. Loffreda S, Yang S, Lin H, Karp C, Brengman M, Wang D, *et al.* Leptin regulates proinflammatory immune responses. *The FASEB J* 1998; 12: 57-65.
28. Margalet V, Romero C, Santos J, Goberna R, Najib S, González C. Role of leptin as an immunomodulator of blood mononuclear cells: mechanisms of action. *Clin Exp Immunol* 2003; 133:11–19.
29. Marino L. Polimorfismos 326A/G y 1968G/C en el receptor de leptina y su relación con obesidad en niños guerrerense. (Tesis de Maestría) México. Universidad Autónoma de Guerrero; 2011.
30. Mars M, Van Rossum C, de Graaf C, *et al.* Leptin Responsiveness to Energy Restriction: Genetic Variation in the Leptin Receptor Gene. *Obesity res* 2004; 12: 442-444.
31. Maskin B, Gammella D, Solar L, *et al.*, Liberación precoz de la citokina antiinflamatoria IL-10 en el trauma severo de cráneo. *MEDICINA* - Volumen 61 - Nº 5/1, 2001
32. Masuo K, Straznicky NE, Lambert GW, *et al.* Leptin-receptor polymorphisms relate to obesity through blunted leptin-mediated sympathetic nerve activation in a Caucasian male population. *Hypertens Res.* 2008 Jun;31(6):1093-100
33. Mattioli B, Straface E, Quaranta M, Giordani L, Viora M. Leptin promotes differentiation and survival of human dendritic cells and licenses them for Th1 priming. *J Immunol* 2005; 174: 6820-6828.
34. Mózes T, Baráth I, Gornicsar K, *et al.* Deviations in Circulating TNF α Levels and TNF α Production by Mononuclear Cells in Healthy Human Populations. *Med of Inflamm* Volume 2011.
35. Muñoz J, Vázquez M, García T, *et al.* TH1/TH2 cytokine profile, metalloprotease-9 activity and hormonal status in pregnant rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus patients. *Clin Exp Immunol* 2003; 131:377–384
36. Paracchini V, Pedotti P, Taioli E. Genetics of Leptin and Obesity: A huge Review. *Am J Epidemiol* 2005; 162 (2): 101-114.

37. Petrovsky N. Towards a unified model of neuroendocrine- immune interaction. *Immunol Cell Biol* 2001; 79: 350-357
38. Popko K, Gorska E, Wasik M, Stoklosa A, Plywaczewski R, Winiarska M, *et al.* Frequency of distribution of leptin receptor gene polymorphism in obstructive sleep apnea patients. *J of Physiol and Pharmacol* 2007; 58 (5): 551-561.
39. Ramos L. Polimorfismos A19G en el gen de la Leptina y A668G en su receptor y su relación con las concentraciones de leptina sérica y la hiperfagia en niños con obesidad. (Tesis de Maestría). México. Universidad Autónoma de Guerrero; 2009.
40. Riejos P, Najib S, Santos J, Romero C, Pérez A, González C, Sánchez V. Role of Leptin in the Activation of Immune Cells. *Hin Pub Corp Med of Inflamm* 2010; 1-8.
41. Sánchez V, Riejos P, González C, *et al.* Leptina y sistema inmune. *Rev Esp Obes* 2006; 4 (4): 221-230.
42. Sarigianni M, Bekiari E, Tsapas A, *et al.* Effect of Leptin and Insulin Resistance on Properties of Human Monocytes in Lean and Obese Healthy Participants. *ANGIOLOGY* 2010; 61(8): 768-774.
43. Seth M, Atif Q, Muredach R. Leptin Resistance: A Possible Interface of Inflammation and Metabolism in Obesity-Related Cardiovascular Disease. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52: 1201-1210.
44. Singh U, Tabibian J, Venugopal S, *et al.* Development of an In Vitro Screening Assay to Test the Antiinflammatory Properties of Dietary Supplements and Pharmacologic Agents. *Clinical Chemistry* 2005; 51 (12): 2252–2256
45. Soon H, Yul J, Yu R. Relationship of obesity and visceral adiposity with serum concentrations of CRP, TNF- α and IL-6. *Diab Res and Clin Pract* 2005; 69 (1): 29-35
46. Stratigopoulos G, Ieduc C, Matsuoka N, Gutman R, Rausch R, Robertson S, *et al.* Functional consequences of the human leptin receptor (LEPR) Q223R transversion. *Obesity* 2009; 17(1): 126–135.
47. Tang C, Lu D, Yang R, Tsai H, Kao M, Fu W, Chen Y. Leptin-Induced IL-6 Production Is Mediated by Leptin Receptor, Insulin Receptor Substrate-1, Phosphatidylinositol 3-Kinase, Akt, NF- κ B, and p300 Pathway in microglia. *J Immunol* 2007; 179: 1292-1302.
48. Vuolteenaho K, Koskinen A, Kukkonen M, Nieminen R, Pääväranta U, Moilanen T, Moilanen E. Leptin Enhances Synthesis of Proinflammatory Mediators in Human Osteoarthritic Cartilage—Mediator Role of NO in Leptin-Induced PGE₂, IL-6, and IL-8 Production. *Hind Pub Corp Med of Inflamm* 2009: 1-10.
49. Zurbano R, Ochoa M, Moreno M, Martí A. Estudios sobre obesidad de origen monogénico en humanos. *Rev Esp Obes* 2004; 2 (5): 269-278.