

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
IZTAPALAPA

---



**Casa abierta al tiempo**

**GENOTIPIFICACIÓN ALÉLICA DE GENES INVOLUCRADOS  
CON LA OBESIDAD EN MUJERES MEXICANAS CON  
CÁNCER DE MAMA.**

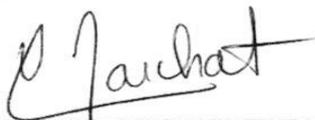
TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA:  
B.E.: CARMEN ISABEL SANTOS CABRERA.

Agradezco de manera muy especial al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo a mis estudios por medio de la beca con número de registro 375884.

JURADO.



---

DRA. LAURENCE MARCHAT  
PRESIDENTE



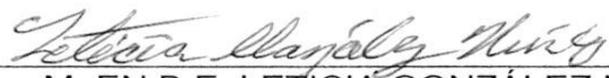
---

DR. PABLO GUSTAVO DAMIAN MATZUMURA  
SECRETARIO



---

DRA. MARIA CONCEPCIÓN GUTIERREZ RUIZ  
VOCAL



---

M. EN B.E. LETICIA GONZÁLEZ NUÑEZ  
VOCAL

## AGRADECIMIENTOS.

A los laboratorios de: Biología Molecular del Servicio de Genética del Hospital General de México, Fisiología y Bioquímica Celular de la UAM Iztapalapa, así como al de Biología y Bioquímica Molecular de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del Instituto Politécnico Nacional, por permitirme desarrollar este proyecto de investigación en sus instalaciones.

Al Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz, quien representa la calidad de investigador que quiero llegar a ser. Gracias por sus críticas y comentarios que han hecho de mí una mejor estudiante, pero sobre todo gracias por ser mi guía y mentor.

A las Dras. Luz María González Huerta y Laurence Marchat, por sus comentarios, observaciones y fungir como guías en el desarrollo de este proyecto.

Al M. en C. Héctor Urueta Huerta por enseñarme todas las técnicas del laboratorio, gracias por todo tu apoyo pero sobre todo por brindarme tu amistad.

Al químico Luis Alberto Suárez Reyes por su apoyo en el desarrollo de la parte estadística de este proyecto, muchas gracias por compartirme tus conocimientos y por tu paciencia al explicármelos.

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES.

A Dios por bendecirme cada día con una familia, con amigos y por facilitarme el logro de todas mis metas.

A mi mamá Martha Beatriz Cabrera Mendoza, por su incondicional amor y apoyo, por siempre alentarme a realizar todos mis objetivos y siempre dar lo mejor de mí. Pero sobre todo gracias por siempre sentirte orgullosa de mí.

A mis hermanos, Marco Alberto Santos Cabrera, Edna Salamanca Quevedo y José Alberto Armendariz San Agustín por todo su apoyo y sus consejos, por su cariño incondicional y por siempre estar ahí cuando los necesito.

A la alineación ganadora: Teresa Elizabeth Durán Moreno y Guillermo Quevedo Olivares, gracias por su apoyo, por siempre tener las palabras correctas, por hacer de mí una persona con más determinación y agallas, pero sobre todo gracias por brindarme su amistad y su cariño incondicional.

A mis compañeros del Laboratorio de Genética Forense de la Procuraduría General de Justicia del Distrito Federal: Diego Ernesto Villanueva, Yolanda Santiago, Oscar Antonio Barrera Villalobos y Marco Antonio Abaunza.

Igualmente quiero expresar un profundo agradecimiento a todos los amigos que he logrado a través del tiempo, gracias por formar parte de mi vida.

## ABREVIATURAS.

°C: grados Centígrados

A: Adenina

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ANOVA: Análisis de Varianza

Arg: Arginina

ARNm: Ácido Ribonucleico mensajero

Asn: Asparagina

C: Citocina

CaM: Cáncer de Mama

Cdk: Cinasa dependiente de ciclina.

CME: Cuadrado Medio del Error

CRH: Dominios Homólogos del Receptor de Citocina.

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

ELISA: Ensayo Inmunoenzimático

ER: Receptor a Estrógenos

F3: Fibronectina tipo III

G: Guanina

Gln: Glutamina

HRM: High Resolution Melting

HT: Heterocigoto

IL-6: Interleucina 6.

IMC: Índice de Masa Corporal.

Kg: Kilogramo

LEP: gen de leptina

LEPR: gen del receptor de leptina

LSD: Diferencia Mínima Significativa

Lys: Lisina

m<sup>2</sup>: metro cuadrado

MAE: Error Medio Absoluto

MAPE: Porcentaje de Error Medio Absoluto

ME: Error Medio

mL: mililitro

mM: milimolar

MUT: Mutante

NaCl: Cloruro de Sodio

ng: nanogramos

nm: nanómetros

Ob-R: Receptor de Leptina

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PAI1: Inhibidor del Activador del Plasminógeno Tipo 1

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

SDS: Dodecilsulfato sódico

SNP: Polimorfismo de Nucleótido Único

TNF- $\alpha$ : Factor de Necrosis Tumoral alfa.

TTS: Tris-Tritón-Sacarosa

V: Volts

VEGF: Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular.

VIF: Factor de Inflación de Varianza

WT: silvestre

$\mu$ L: microlitro

## ÍNDICE.

|  |    |
|--|----|
| <b>RESUMEN</b> .....   | 1  |
| <b>Abstract</b> .....  | 3  |
| <b>INTRODUCCIÓN</b> .....  | 5  |
| <b>OBESIDAD</b> .....  | 5  |
| Definición y Epidemiología.....  | 5  |
| Factores Fenotípicos. ....   | 7  |
| <b>TEJIDO ADIPOSO COMO ÓRGANO DISFUNCIONAL EN LA OBESIDAD</b> .....  | 8  |
| <b>CONTRIBUCIÓN GENÉTICA EN EL DESARROLLO DE LA OBESIDAD</b> .....   | 9  |
| <i>Leptina</i> .....   | 10 |
| <b>INTERACCIÓN OBESIDAD-CÁNCER DE MAMA</b> .....   | 11 |
| <i>El papel de la leptina</i> .....  | 14 |
| <b>IMPLICACIONES DE LOS POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO ÚNICO (SNP) EN LOS GENES DE LEPTINA Y DEL RECEPTOR DE LEPTINA Y SU REPERCUSIÓN EN EL RIESGO A DESARROLLAR CÁNCER DE MAMA</b> ..... | 16 |
| <b>ANTECEDENTES</b> .....  | 18 |
| <b>JUSTIFICACIÓN</b> .....   | 20 |
| <b>HIPOTESIS</b> .....   | 21 |
| <b>OBJETIVOS</b> .....   | 22 |
| GENERAL.....   | 22 |
| PARTICULARES.....  | 22 |
| <b>CRITERIOS DE INCLUSIÓN</b> .....  | 22 |
| <b>MÉTODOS</b> .....   | 23 |
| 1. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA.....  | 23 |
| 2. EXTRACCIÓN DEL ADN.....   | 23 |
| 2.1. Método Salino.....  | 24 |
| 3. CUANTIFICACIÓN DE ADN.....  | 25 |
| 4. DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS.....   | 25 |
| 4.1. LEPTINA.....  | 25 |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.2. RECEPTOR DE LEPTINA Lys109Arg.....   | 25        |
| 4.3. RECEPTOR DE LEPTINA Gln223Arg.....   | 26        |
| 4.4. RECEPTOR DE LEPTINA Lys663Asn.....   | 26        |
| 5. HIGH RESOLUTION MELTING (HRM).....   | 27        |
| 6. DETERMINACIÓN EN SUERO DE LA LEPTINA (ELISA).....  | 30        |
| 7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....  | 30        |
| <b>RESULTADOS.....</b>  | <b>31</b> |
| FUSIÓN DE ALTA RESOLUCIÓN DEL ADN (HIGH RESOLUTION MELTING, HRM). ....  | 31        |
| <i>Leptina</i> .....  | 32        |
| <i>LEPG-2548A (rs7799039)</i> .....   | 32        |
| <i>Receptor de Leptina</i> .....  | 33        |
| <i>Lys109Arg (rs1137100)</i> .....  | 33        |
| <i>Gln223Arg (rs 1137101)</i> .....   | 34        |
| <i>Lys663Asn (rs8179183)</i> .....  | 36        |
| MODELOS LINEALES GENERALIZADOS.....   | 37        |
| CONCENTRACIÓN DE LEPTINA (ELISA).....   | 52        |
| <b>1) Evaluación de la relación entre la concentración de la leptina y la presencia del SNP LEPG-2548A</b> .....  | <b>52</b> |
| <b>2) Evaluación de la relación entre la concentración de la leptina y el índice de masa corporal (IMC)</b> ..... | <b>54</b> |
| <b>3) Evaluación de la relación entre la concentración de leptina y la presencia de cáncer de mama</b> .....      | <b>55</b> |
| ANÁLISIS MULTIVARIADOS.....   | 57        |
| <b>DISCUSIÓN</b> .....  | <b>59</b> |
| <b>CONCLUSIONES</b> .....   | <b>67</b> |
| <b>REFERENCIAS</b> .....  | <b>68</b> |

## **RESUMEN.**

Debido a que la obesidad es un factor de riesgo establecido en diferentes tipos de cáncer y dado que la leptina juega un papel importante en la fisiopatología de la obesidad, aunado a lo anterior varios estudios han demostrado la presencia tanto de la leptina como de su receptor en células epiteliales mamarias normales y cancerosas, existiendo una presencia del 92% y del 83%, de la leptina y de su receptor, respectivamente, en las células cancerosas, por lo que el explorar la relación de ésta última con el riesgo a padecer cáncer, es de vital importancia.

## **OBJETIVO.**

Identificar los polimorfismos de nucleótido (SNP) en los genes de la leptina y de su receptor para determinar su probable relación con el riesgo a desarrollar cáncer de mama en mujeres obesas mexicanas.

## **MÉTODOS.**

La muestra sanguínea recabada a las pacientes se sometió a una extracción salina de ADN, para determinar la presencia de los SNP para los genes de la leptina (LEPG-2548A) y del receptor de la leptina (LEPR: Lys109Arg, Gln223Arg y Lys663Asn) se sometieron 50ng/mL de ADN de cada muestra al análisis de Fusión

de Alta resolución del ADN (HRM). Finalmente se determinó la concentración sérica de leptina a través del ensayo inmunoenzimático (ELISA).

## **RESULTADOS.**

Para el SNP LEPG-2548A se obtuvo que el genotipo homocigoto mutante A/A es significativamente diferente con respecto a los otros dos genotipos, interpretándose dicha diferencia como un factor que incrementa el riesgo a padecer cáncer de mama mientras que para los genotipos G/A y G/G no se encontró que incrementaran el riesgo a padecer dicha patología. Para el SNP Lys109Arg, se obtuvo que el genotipo silvestre A/A es significativamente diferente con respecto a los otros dos genotipos, que se puede interpretar como una relación inversa a lo reportado hasta el momento en la literatura, lo que se puede interpretar como un factor de riesgo para desarrollar dicha patología. Por otro lado para los SNP's Gln223Arg y Lys663Asn no se determinó riesgo alguno para ninguno de los genotipos. Se determinó una correlación entre la concentración y el índice de masa corporal, la cual es directamente proporcional; sin embargo, no se encontró una correlación entre la concentración de leptina con el SNP LEPG-2548A, ni con la patología del cáncer de mama.

**Abstract.**

Obesity represents a risk factor highly recognize in many diseases like different types of cancer and because leptin has a key rol in the fisiopathology of obesity, plus several studies have demostrated the presence of leptin and the receptor of leptin in cancerous breast cells, being of 92% and 83%, respectively, with respect to normal epithelium breast cells. That is why is important to investigate the relationship between the single nucleotide polymorphism (SNP) in the genes of leptin and the receptor of leptin and the increase of the risk of developmet breast cancer.

**Objective.**

Identify the presence of single nucleotide polimorphism (SNP) in the genes of leptin and the receptor of leptin and their relationship with the risk of developmet breast cancer in obese mexican women.

**Methods.**

The blood sample taken to each patient was submitted to a saline DNA extraction. To be available of determinate the presence of SNP's in the genes of leptin (LEPG-2548A) and the leptin receptor (Lys109Arg, Gln223Arg, Lys663Asn), 50ng/mL of DNA of each sample were taken and submitted to a high resolution melting (HRM) analysis. Finally the concentration of leptin was measure with the enzymatic immunoassay (ELISA).

## Results.

For the SNP LEPG-2548A, we found that the genotype A/A was significantly different from the wild type (G/G) and heterozygous (G/A), what can be understood as a condition that increases the risk of development breast cancer, this condition wasn't determined for the other two genotypes, wich means that not represent a risk for the pathology of breast cáncer. For the SNP Lys109Arg, we obtained that the wild type genotype (A/A) was significantly different from the other two genotypes, mutant homozygous (G/G) and heterozygous (A/G), what is a inverse relationship from what is has been reported in the literature so far, wich can be interpreted as a risk genotype. On the other hand, the SNP's Gln223Arg and Lys663Asn, were determined as a not risk factor for any of the genotypes. It was dertermined a correlation between the concentration of leptin and the body mass index (IMC), wich is directly proportional; however no correlation were determined between the concetration of leptin and the SNP LEPG-2548A or with the pathology of breast cancer.

## **INTRODUCCIÓN.**

### **OBESIDAD.**

#### **Definición y Epidemiología.**

La obesidad es definida como un exceso en la grasa corporal que ocasiona un daño a la salud, resulta de un desequilibrio entre las calorías consumidas y el gasto de energía, lo que conlleva a que se almacene el exceso de energía en forma de grasa en el organismo; tanto la ingesta de comida como el gasto de energía están regulados por rutas endocrino-neuronales conservando la homeostasis energética del organismo. Sin embargo, no se puede atribuir la creciente epidemia de la obesidad solamente al desequilibrio energético, más bien dicha epidemia es el resultado de una compleja interacción entre factores multigenéticos, conductuales y ambientales, lo anterior basado en los resultados arrojados por los diversos estudios familiares realizados tomando en cuenta adoptados, gemelos y gemelos adoptados, en los cuales concluyen que existe una contribución genética significativa para desarrollar la obesidad. (Flier & Maratos-Flier, 2010; Farooqi, 2011; Van Vliet-Ostapchouk, et al., 2009)

Dicho incremento se debe en gran parte a los cambios en el estilo de vida en los últimos 30 años, que se han caracterizado por una alza y prevalencia en el consumo de productos altamente energéticos, así como de comida “placentera”, esta calidad de sobre-nutrición aunado al sedentarismo presente en la población, acorde con los datos reportados por la Encuesta Nacional de Salud y Revisión Nutricional

(NHANES, por sus siglas en inglés), muestran que el porcentaje de la población adulta norteamericana obesa ( $IMC > 30 \text{ Kg/m}^2$ ), se ha incrementado del 14.5% (1976-1980) a 30.5% (1999-2000), de igual manera se presentó un incremento en la población con obesidad extrema ( $IMC \geq 40 \text{ Kg/m}^2$ ), representando para el periodo de tiempo comprendido entre 1999-2000 un 4.7% de la población norteamericana adulta, mientras que el sobrepeso ( $IMC > 25 \text{ Kg/m}^2$ ) afectaba al 64% de los individuos mayores de 25 años en el mismo periodo de tiempo, lo que ha llevado a que se calcule que para el 2015 el 10% de la población mundial será clínicamente obeso. (Flier & Maratos-Flier, 2010; Gautron & Elmquist, 2011; Farooqi, 2011)

En México la epidemia del sobrepeso y la obesidad es un problema de salud de gran magnitud el cual no distingue edad, género ni condición social, que está creciendo a gran velocidad ya que de 1980 a la fecha, la prevalencia de obesidad y sobrepeso en nuestro país se ha triplicado, en particular en la población adulta: 39.5% de los hombres y mujeres tienen sobrepeso y 31.7% obesidad. Es decir, aproximadamente 70% de la población adulta tiene una masa corporal inadecuada. Adicionalmente, esta epidemia registra una elevada tasa de crecimiento entre la población infantil, lo que se ha traducido también en una alta prevalencia de sobrepeso y obesidad entre la población escolar de preescolar y primaria de todo el país (entre 5 y 11 años) y entre adolescentes. (Córdoba Villalobos, 2010)

Actualmente la OMS tiene las siguientes estadísticas de los IMC de obesidad para México (Tabla 1):

Tabla 1. Estadísticas de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de la población obesa en México según su Índice de Masa Corporal (IMC).

| <b>Sobrepeso</b>                                 |         | <b>Pre-Obeso</b>                   |         | <b>Obeso</b>                        |         |
|--|---------|------------------------------------|---------|-------------------------------------|---------|
| <b>IMC <math>\leq</math> 25 Kg/m<sup>2</sup></b> |         | <b>IMC =25-29 Kg/m<sup>2</sup></b> |         | <b>IMC &gt; 30 Kg/m<sup>2</sup></b> |         |
| Hombres  | Mujeres | Hombres                            | Mujeres | Hombres                             | Mujeres |
| 66.7%  | 71.9%   | 42.5%                              | 37%     | 24.2%                               | 34.5 %  |

\*Datos tomados de las estadísticas más recientes publicadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (WHO, 2010)

### **Factores Fenotípicos.**

Aunque no hay una manera directa de medir la obesidad, el método más utilizado para determinar dicha condición es el índice de masa corporal (IMC), el cual resulta de dividir el peso en kilogramos de un individuo entre su estatura en metros elevada al cuadrado. Bajo dicho parámetro, la Organización Mundial de la Salud ha establecido valores específicos que determinan la condición de sobrepeso y obesidad, de acuerdo a dicha institución un  $IMC \geq 25 \text{ Kg/m}^2$  corresponde a una condición de sobrepeso, mientras que un  $IMC > 30 \text{ Kg/m}^2$  corresponde a una condición de obesidad. Se han reportado otros métodos para cuantificar la obesidad, entre los que están: circunferencia de la cintura y la proporción de la cintura y cadera, para determina la grasa abdominal, la antropometría (pliegues de la piel) para

determinar la grasa subcutánea, tomografía, imagen de resonancia magnética y ultrasonografía. (Flier & Maratos-Flier, 2010; Van Vliet-Ostaptchouk, et al., 2009)

## **TEJIDO ADIPOSO COMO ÓRGANO DISFUNCIONAL EN LA OBESIDAD.**

En un principio solamente se consideraba al tejido adiposo como un depósito del exceso de grasa (en forma de triglicéridos), que en situaciones de requerimiento energético o ayuno prolongado, se liberaba en forma de ácidos grasos libres para generar energía. (Flier & Maratos-Flier, 2010). Sin embargo, dicho concepto se ha modificado, ya que actualmente se le considera como un importante órgano del sistema endocrino, provisto de diferentes tipos de receptores que le permiten funcionar de manera: (i) endocrina al interactuar con las hormonas que circulan en el torrente sanguíneo, (ii) paracrina mediante la síntesis de moléculas biológicamente activas, péptidos, proteínas y citocinas, que en su conjunto se le denominan adipocinas las cuales estimulan a adipocitos vecinos y así como interactúan con el sistema nervioso central, para activar receptores adrenérgicos. (Ibrahim, 2010) Dentro de las adipocinas sintetizadas por el tejido adiposo destaca la leptina, la cual se encarga de mantener la homeostasis energética del organismo, al interactuar a nivel del núcleo arqueado del hipotálamo, con las neuronas orexigénicas y anorexigénicas, ejerciendo un mecanismo inhibitorio en las neuronas orexigénicas mientras que estimula o activa la acción de las neuronas anorexigénicas, provocando la sensación de saciedad. (Schwartz, et al., 2000; Coll, et al., 2007; Ronti, et al., 2006)

En el caso de la obesidad existe una mayor proporción de adipocitos diferenciados, los cuales se caracterizan por presentar una resistencia a la insulina, razón por la cual no absorben glucosa ni tampoco ácidos grasos libres, además de tener una actividad lipolítica, debido a su correcta respuesta a las catecolaminas, lo que los hace estar liberando constantemente ácidos grasos aún después de una ingesta de comida y finalmente sintetizan gran cantidad de citocinas pro-inflamatorias. Esta condición disfuncional del adipocito es lo que caracteriza a la obesidad como la principal causa de que se desarrollen patologías relacionadas con desórdenes metabólicos, como consecuencia de una liberación inapropiada de factores mitogénicos y pro-inflamatorios. (Figura 1) (Park, et al., 2011; Ibrahim, 2010)

### **CONTRIBUCIÓN GENÉTICA EN EL DESARROLLO DE LA OBESIDAD.**

La obesidad es poligenética, ya que, a pesar de que cada gen contribuye en menor parte a la variación fenotípica, una combinación de varios genes predispone al desarrollo de la obesidad. (Yiannakouris, et al., 2001) La contribución genética hace referencia a aquellos genes que participan en rutas neuro-hormonales, teniendo su efecto primario en la regulación del apetito y la saciedad, por lo tanto un defecto en dichos genes se ve reflejado en un desequilibrio en el control de la saciedad, dichos factores heredables afectan la correcta función de los centros de control del apetito presentes en el cerebro, alterando la homeostasis energética así como la distribución de los nutrientes entre el tejido graso y el tejido muscular. (Farooqi & O'Rahilly, 2007; Farooqi & O'Rahilly, 2005). Lo anterior se ha evidenciado a través de

diversos estudios en donde se han reportado que el índice de masa corporal está determinado genéticamente, con una heredabilidad entre el 40 y 70% entre los individuos de una misma población. (Farooqi, 2011)

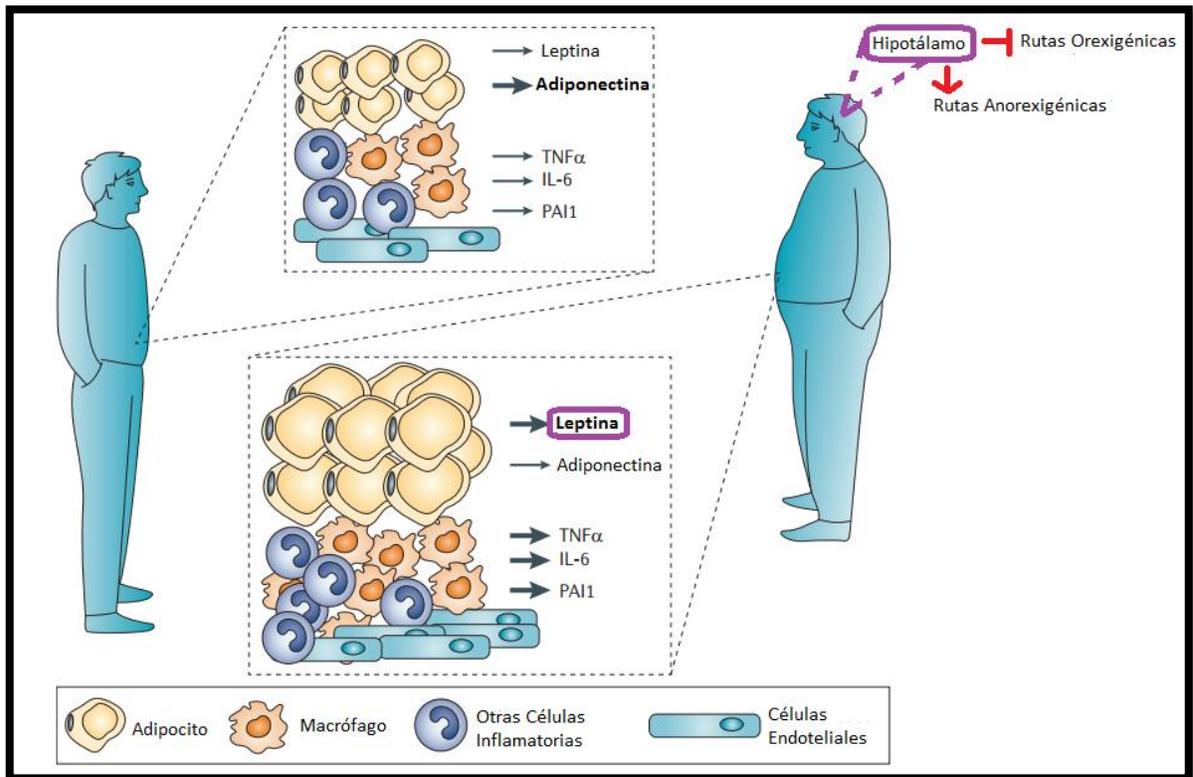


Figura 1. Disfuncionalidad del tejido adiposo en la Obesidad. El incremento de los depósitos de grasa y por ende de adipocitos, conlleva a una alteración en la producción de citocinas y adipocinas, contribuyendo a un desorden en el funcionamiento del tejido y por ende a que la condición de obesidad se una factor de riesgo para desarrollar otras patologías. TNF- $\alpha$ : Factor de Necrosis Tumoral Alfa, IL-6: Interleucina 6 y PAI1: Inhibidor del Activador del Plasminógeno Tipo 1. Imagen tomada y modificada de la publicación Khandekar, 2011. (Khandekar, et al., 2011)

## Leptina.

La leptina es una hormona peptídica de 16 kDa con 167 aminoácidos codificada por el gen LEP que se encuentra localizado en el cromosoma 7q21.3, ejerce su función a través de su interacción con su receptor específico el cual es codificado por el gen LEPR que se localiza en el cromosoma 1p31. (Liew, et al., 2009) El receptor de la

leptina es una proteína que pertenece a la familia de receptores de citocinas clase I, y debido a un splicing alternativo de su ARNm existen al menos cinco isoformas de dicho receptor, todas comparten el mismo dominio extracelular que consiste en dos dominios homólogos de receptor de citocina (CRH), CRH 1 y CRH2, separados por un dominio parecido a inmunoglobulina seguido de tres dominios de fibronectina tipo III (F3). La isoforma larga del receptor de leptina Ob-R es la responsable de la señalización intracelular de la leptina, siendo suficiente su enlace al dominio CRH2 para activar a dicho receptor. Las isoformas poseen dominios intra y extracelulares idénticos, pero difieren en la longitud del dominio citoplásmico. Varios polimorfismos comunes tanto de LEP como de LEPR han sido reportados y la asociación potencial con la obesidad ha sido evaluada en diferentes poblaciones. (Stratigopoulos, et al., 2009).

### **INTERACCIÓN OBESIDAD-CÁNCER DE MAMA.**

El desarrollo y progresión del cáncer se caracterizan por un incremento en la proliferación celular consecuencia de un desequilibrio en la expresión tanto de los factores de crecimiento como en sus receptores, lo anterior aunado a la alteración en el proceso de apoptosis celular. (Koda, et al., 2007)

Si bien la carcinogénesis mamaria presenta una cierta contribución genética, la contribución de factores modificables como el sobrepeso (IMC 25-30 kg/m<sup>2</sup>) o la obesidad (IMC > 30 Kg/m<sup>2</sup>), representan un rol importante en el desarrollo de dicha

patología, lo anterior se sustenta en estudios epidemiológicos, los cuales han descrito que un tejido adiposo abundante incrementa el riesgo a padecer cáncer de mama (Andò & Catalano , 2012), debido a que se presenta una alteración en tanto en la producción como en el funcionamiento (autocrino o paracrino) de las adipocinas promoviendo: 1) la proliferación, migración e invasión celular, 2) la regulación en la producción de proteínas derivadas del epitelio, proteínas angiogénicas y factores de crecimiento, y 3) la estimulación de otras células en el microambiente del tumor para proliferar e invadir, como el caso de la infiltración de células inmunes (Figura 2), induciendo un efecto mitogénico observado en el desarrollo y progreso del cáncer, que se traduce en una tendencia a desarrollar un tumor más agresivo y un mal pronóstico de supervivencia. (Park, et al., 2011; Jardé, et al., 2011)

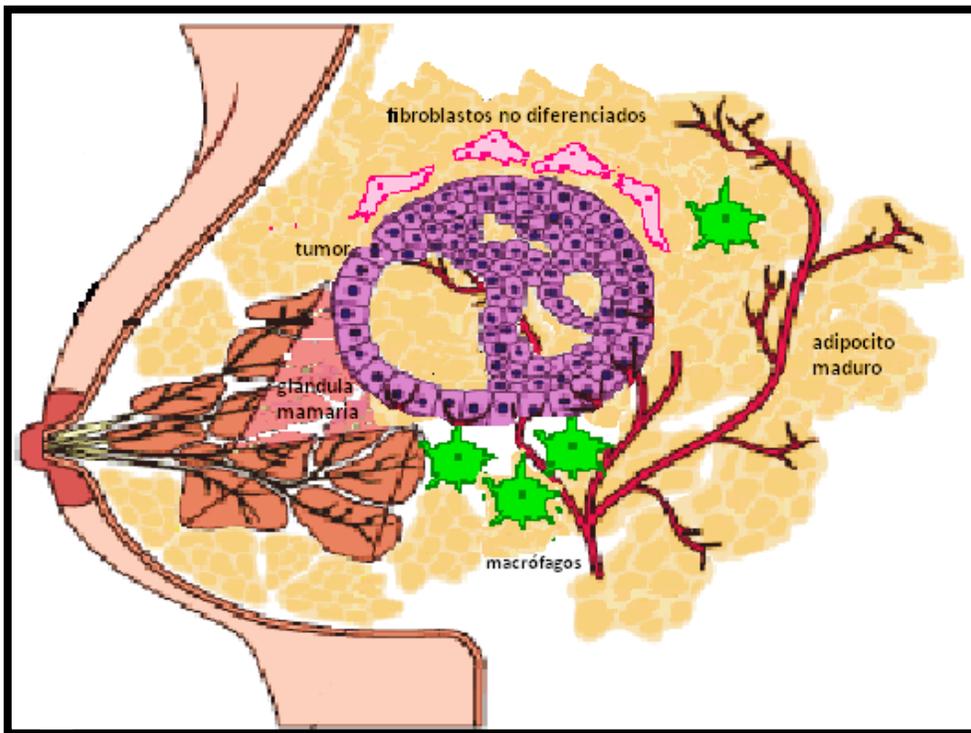


Figura 2 Alteración estructural de la glándula mamaria debido a un incremento en los depósitos de grasa. Imagen tomada y modificada de la publicación de Macciò, 2011 (Macciò, 2011).

Se ha estimado que cerca de un 15-20% de las muertes causadas por el cáncer en los Estados Unidos se atribuye a la condición de sobrepeso u obesidad (Nock & Berger, 2010); en el caso particular del cáncer de mama, las mujeres con un índice de masa corporal  $\geq 40 \text{ Kg/m}^2$  tienen un riesgo de 3 veces más de mortalidad que las mujeres con un índice de masa corporal de 18 (Calle & Thun, 2004). Las tasas de mortalidad por cáncer de mama en México muestran un aumento notorio en las últimas cinco décadas. Entre 1955 y 1960, a partir de la disposición de los primeros datos confiables, la tasa era alrededor de dos a cuatro muertes por 100000 mujeres. Luego se elevó de manera sostenida en las mujeres adultas de todas las edades hasta alcanzar una cifra cercana a 9 por 100000 para la mitad de la década de 1990, para el año 2006, el cáncer de mama se había convertido en la segunda causa de

muerte más común en México entre las mujeres de 30 a 54 años y la tercera más frecuente entre el grupo de 30 a 59 años. En el año 2009 era la segunda causa de muerte entre las mujeres mexicanas adultas de 30 a 54 años de edad. (Knaul, et al., 2009)

### ***El papel de la leptina.***

Debido a que la obesidad es un factor de riesgo establecido en diferentes tipos de cáncer y dado que la leptina juega un papel importante en la fisiopatología de la obesidad, el explorar la relación de ésta última con el riesgo a padecer cáncer, es de vital importancia. Lo anterior aunado a que la leptina es considerada un mitógeno para varios tipos celulares incluyendo las células progenitoras hematopoyéticas primitivas y mielocíticas, células epiteliales de la mama, normales y transformadas, así como las células endoteliales vasculares, debido al efecto pleiotrópico desregulado en obesidad, que puede contribuir a la proliferación, proceso antiapoptótico, angiogénesis, cambios en la membrana extracelular y metástasis. (Ishikawa, et al., 2004; Lorincz & Sukumar, 2006; González, et al., 2009)

Además de lo descrito anteriormente, varios estudios han demostrado la presencia tanto de la leptina como de su receptor en células epiteliales mamarias normales y cancerosas, existiendo una presencia del 92% y del 83%, de la leptina y de su receptor, respectivamente, en las células cancerosas, mientras que en tejido sano

hay poca expresión de ambas moléculas. (Hu, et al., 2002; Vona-Davis & Rose, 2007; Taliaferro-Smith, et al., 2013)

Otros más se han realizado con el objetivo de determinar el impacto de la presencia de la leptina y de su receptor en las células del cáncer de mama, ya que han observado que aquellas condiciones que se caracterizan por tener altos niveles de leptina, tal es el caso de la obesidad y de la menopausia, se correlaciona positivamente con un incremento en la incidencia del cáncer de mama (González, et al., 2009).

Teniendo en cuenta que los niveles de leptina son proporcionales a la cantidad de grasa almacenada, por lo tanto una sobreproducción de leptina puede acelerar el crecimiento del tumor en la glándula mamaria, ya que es capaz de transformar el microambiente de dicha glándula al inducir una serie de eventos como el facilitar la proliferación celular, potencializar la migración de células endoteliales, inducir la angiogénesis así como el reclutamiento de macrófagos y monocitos que secretan factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y citocinas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa ( $TNF-\alpha$ ) y la interleucina 1 (IL-1), ambas citocinas secretadas por células del sistema inmune, inducen la expresión de la leptina en dicho tejido (Figura 3). Además de que la leptina induce la señalización mediada por el receptor a estrógenos (ER), promoviendo el crecimiento de las células tumorales, igualmente facilita la expresión de los cdk-2 y ciclina D1, reguladores del ciclo celular liberan a la célula del arresto en la fase G1 para que pasen a la fase S, así como la

regulación en la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl2. (González, et al., 2009; Sulkowska, et al., 2006; Andò & Catalano , 2012)

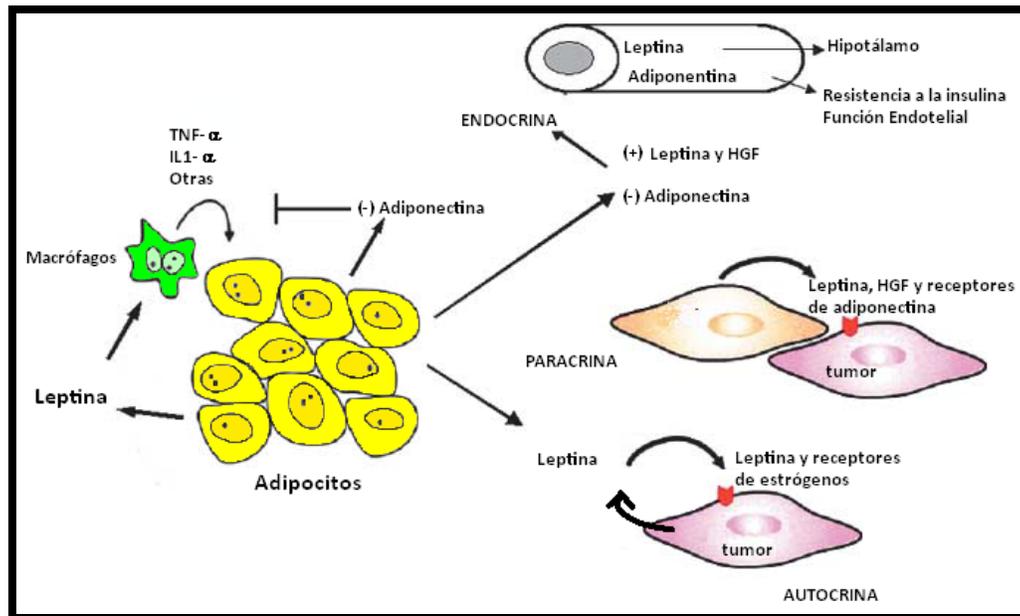


Figura 3. Interacción del tejido adiposo con otras estirpes celulares, mediante la síntesis de diferentes adipocinas. Imagen tomada y modificada de la publicación de Vona-Davis, 2007.

### IMPLICACIONES DE LOS POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIPO ÚNICO (SNP) EN LOS GENES DE LEPTINA Y DEL RECEPTOR DE LEPTINA Y SU REPERCUSIÓN EN EL RIESGO A DESARROLLAR CÁNCER DE MAMA.

Debido al papel pleiotrópico que desempeña la leptina, diversos estudios se han llevado a cabo para determinar la presencia de una alteración en el gen de esta hormona así como de su receptor, que pueda explicar el que se desarrolle un cáncer de mama más agresivo en las mujeres obesas con respecto a las mujeres delgadas. Se han identificado varios polimorfismos de nucleótido único (SNP) en el gen de la leptina, destaca aquel que se localiza en la zona promotora del gen donde se

presenta una transición de una guanina por una adenina en la posición -2548 río arriba del codón de inicio. Dicha transición se correlaciona con variaciones en los niveles de leptina, el grado de obesidad así como con el cáncer. Una condición de Lep-2548A/A se correlaciona con un incremento en los niveles de leptina independientemente del índice de masa corporal (IMC) así como con un incremento a desarrollar cáncer. (Terrasi, et al., 2009)

En cuanto al receptor de leptina (LEPR), tres son los SNPs más estudiados en la patología del cáncer de mama, los cuales están asociados con sustituciones de aminoácidos en la región extracelular del LEPR, y que tienen consecuencias potencialmente funcionales. Uno se manifiesta en un cambio conservativo de una lisina por una arginina en el codón 109 (K109R), mientras que los otros dos resultan en un cambio de carga debido a la sustitución del aminoácido, el cambio de glutamina por arginina en el codón 223 (Q223R) y un cambio de lisina a asparagina en el codón 656 (K656N), éstos último debido al cambio en la carga son los que probablemente tengan una consecuencia en la funcionalidad del receptor de la leptina. La sustitución Q223R presente en el exón 6 del gen, se localiza en el dominio de citocina, que es donde se enlaza la leptina, se ha sugerido que el cambio de carga de neutral a positiva puede afectar la capacidad de señalización de dicho receptor (Figura 4) (Yiannakouris, et al., 2001)

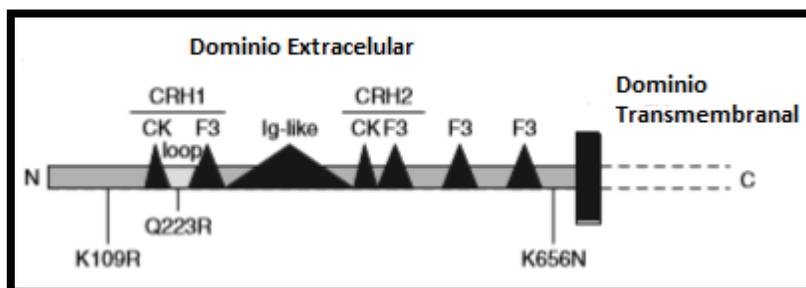


Figura 4. Localización de los polimorfismos de nucleótido único en el receptor de la leptina. Imagen tomada y modificada de la publicación de Stratigopoulos, 2009.

## ANTECEDENTES.

Teniendo en cuenta lo anterior se han realizado varios estudios para evaluar el impacto de la concentración de la leptina en el desarrollo y pronóstico del cáncer de mama, igualmente se realizaron análisis para evaluar el riesgo que representa la presencia de SNP's en los genes de la leptina y de su receptor sobre el desarrollo del cáncer de mama obteniéndose resultados no contundentes.

En dos estudios realizados de manera independiente por Tessitore (1998) y Vizio (2000), se reportó que tanto los niveles de leptina como la expresión de ARNm en el tejido adiposo se veían incrementados en los pacientes con cáncer de mama, con respecto a controles sanos, lo que los llevo a pensar que los niveles de leptina plasmática pudiera ser utilizada como un indicador de diagnóstico temprano del cáncer de mama.

Por otro lado, en 1999 Mantzoros y colaboradores, estudiaron el efecto de la leptina en el riesgo de desarrollar cáncer de mama en mujeres pre-menopáusicas, y encontraron que la leptina no incrementó el riesgo sustancialmente, datos que se

contrastan con los obtenidos por Petridou y sus colaboradores en el 2000, en mujeres griegas pre-menopáusicas donde encontraron una relación inversa entre la leptina y el cáncer de mama, la cual fue significativa. Sin embargo, ninguna relación fue encontrada, en dicho estudio, entre la leptina y el cáncer de mama en mujeres post-menopáusicas lo que coincide con los resultados obtenidos por Stattin y colaboradores, evaluaron el papel de la leptina sérica entre mujeres postmenopáusicas, sin encontrar una asociación significativa entre la leptina y el riesgo a presentar cáncer de mama, y por lo tanto no pudieron utilizarlo factor pre-diagnóstico. Lo anterior se complementa con los resultados obtenidos por Coskun y sus colaboradores en el 2003 al evaluar los efectos de la leptina sérica en los procesos de angiogénesis y metástasis sin encontrar efecto alguno.

En caso contrario, dos estudios realizados en el 2005, uno realizado por Chen y colaboradores, y otro por Han y colaboradores, los cuales reportaron un incremento en la leptina en los pacientes con cáncer de mama con respecto a los controles, además el estudio realizado por Chen reportó un incremento significativo en la proporción de leptina-adiponectina. Además de que dicha proporción se encuentra altamente relacionada con el tamaño del tumor.

En cuanto a los SNP's de los genes de la leptina y del receptor de leptina, y su contribución a incrementar el riesgo a desarrollar cáncer mama, se ha reportado lo siguiente:

En el 2006 Snoussi y colaboradores evaluaron a los SNP's LEP G-2548A y para LEPR Q223R en mujeres tusinianas, reportando para los genotipos mutantes A/A y G/G, respectivamente, un incremento en el riesgo a desarrollar cáncer de mama. Lo reportado por Snoussi para el SNP Q223R coincide con lo que posteriormente reportara Okobia y colaboradores en un estudio desarrollado con mujeres nigerianas pre-menopáusicas realizado en el 2008, quienes reportaron un ligero incremento en el riesgo de padecer cáncer de mama.

Finalmente, Cleveland y colaboradores, realizaron un estudio en el cual evaluaron si la variación genética en los genes de leptina (LEP) y de su receptor (LEPR) están asociadas con el riesgo de presentar cáncer de mama, o si ya existía el diagnóstico que relación tenían con la sobrevivencia. Se analizaron los polimorfismos, para LEP G-2548A y para LEPR Q223R. Encontraron un modesto incremento de desarrollar cáncer de mama asociado con el genotipo LEP-2548AA comparado con el genotipo LEP-2548GG, dicha asociación fue mayor entre mujeres postmenopáusicas que eran obesas. Lo anterior refuerza la hipótesis de que la leptina está relacionada con la carcinogénesis.

## **JUSTIFICACIÓN.**

Tomando en cuenta todo lo descrito anteriormente la justificación de este trabajo de investigación radica en analizar la proporción de los polimorfismos descritos para la leptina y su receptor en las mujeres que acuden al Servicio de Tumores Mamaros

del Servicio de Oncología del Hospital General y determinar si existe un incremento en el riesgo a que presenten cáncer de mama en aquellas portadoras del polimorfismo con respecto a las que no lo presentan, y si así fuera, poder brindar herramientas de diagnóstico molecular temprano que puedan auxiliar a la prevención o manejo de la patología del cáncer la cual se complica con otras patologías, tal es el caso de la condición de obesidad y al igual que cuando se presenta una alteración en los genes que codifican para la leptina y su receptor que se traduce en un mal pronóstico de supervivencia en las mujeres que lo padecen, para auxiliar en el tratamiento de ambas patologías ya que en nuestro país van en aumento y representan un serio problema de salud pública.

A partir de lo anterior se genera la siguiente:

### **HIPOTESIS.**

Si en las células cancerosas de la mama se ha identificado la presencia tanto de la leptina como de su receptor, entonces la presencia de polimorfismos de nucleótido único en sus respectivos genes representará un factor de riesgo para desarrollar cáncer de mama en mujeres obesas mexicanas.

## **OBJETIVOS.**

### **GENERAL.**

Identificar los polimorfismos de nucleótido (SNP) en los genes de la leptina y de su receptor para determinar su probable relación con el riesgo a desarrollar cáncer de mama en mujeres obesas mexicanas.

### **PARTICULARES.**

- Identificar la variación en los polimorfismos de los genes LEP y LEPR.
- Calcular la concentración de leptina en suero y relacionarlo con la presencia del polimorfismo en el gen de la leptina, la obesidad y el cáncer de mama.
- Correlacionar los polimorfismos LEP y LEPR con el cáncer de mama.

### **CRITERIOS DE INCLUSIÓN.**

- Mujeres mexicanas de 20-65 años de edad que tengan un índice de masa corporal (IMC) mayor o igual a  $30\text{Kg/m}^2$  con diagnóstico de cáncer mama.
- Mujeres mexicanas de 20-65 años de edad que tengan un índice de masa corporal (IMC) mayor o igual a  $30\text{Kg/m}^2$  sin diagnóstico de cáncer mama.
- Mujeres mexicanas de 20-65 años de edad que tengan un índice de masa corporal (IMC) menor de  $25\text{Kg/m}^2$  con diagnóstico de cáncer mama.
- Mujeres mexicanas de 20-65 años de edad que tengan un índice de masa corporal (IMC) menor de  $25\text{Kg/m}^2$  sin diagnóstico de cáncer mama.

## **MÉTODOS.**

### **1. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA.**

Se canalizaron pacientes mujeres del Servicio de Oncología, Tumores Mamarios, del Hospital General de México, a quienes después de firmar la carta de consentimiento, se les tomó una muestra de sangre periférica, captándose 5mL en un tubo con EDTA (BD Vacutainer® K3 EDTA 2mg, REF 366450) para evitar la coagulación de la sangre y 5mL más que se capturaron en un tubo serológico (BD Vacutainer® Serum, REF 368175) para obtener el suero. Igualmente se les aplicó una breve encuesta sobre sus hábitos alimenticios, se les determinó su peso en kilogramos así como su estatura en metros, para poder determinar su índice de masa corporal que se obtiene de la razón del peso en kilogramos entre la estatura en metros elevada al cuadrado.

### **2. EXTRACCIÓN DEL ADN.**

Las muestras de sangre contenidas en los tubos con EDTA se sometieron a centrifugación por seis minutos a 3,000 r.p.m., para separar los leucocitos y poder a partir de su lisis, obtener el ADN. Se recuperaron los leucocitos con un bulbo para leucocitos y se colocaron en un tubo Falcon® de 15 mL para extraer el ADN mediante el método salino.

## 2.1. Método Salino.

A los leucocitos se les agregó 9mL de una solución de TTS (Tris-Tritón-Sacarosa; Tris 0.01M, Tritón 1%, Sacarosa 0.3M), se agitaron durante 1 minuto, para posteriormente someterlos a centrifugación durante seis minutos a 3,000 r.p.m.; se desechó el sobrenadante y se repitió el procedimiento. Al botón celular se le agregó 1mL de TTS y se disgregó con una micropipeta de un mililitro, el homogenizado se colocó en un tubo eppendorf de 1.5mL, el cual se sometió a centrifugación durante tres minutos a 11,000 rpm. Se desechó el sobrenadante y al botón celular se le agregaron 570 $\mu$ L de una solución de NaCl 5mM, se sometió a agitación durante dos minutos, posteriormente se le añadieron 30 $\mu$ L de una solución de SDS al 10% y se procedió a agitar durante cinco minutos, finalmente se agregaron 200 $\mu$ L de una solución concentrada de NaCl y se sometió a agitación durante diez minutos.

Posteriormente se sometieron a centrifugación durante veinte minutos a 11,000 rpm a 4 grados Centígrados, el sobrenadante se colocó en etanol absoluto frío y se dejó precipitando toda la noche a 4° C. El ADN se recuperó con una pipeta Pasteur, y se hicieron dos lavados con Etanol al 70%, posteriormente se eluyó en 200 $\mu$ L de agua inyectable y se colocó en el termoblot a 60°C durante una hora. Las muestras se almacenaron a 4°C.

### 3. CUANTIFICACIÓN DE ADN.

La cuantificación de ADN se realizó mediante espectrofotometría, utilizándose una celda de cuarzo de 1mL y el espectrofotómetro JENWAY 6305. Cada una de las muestras se agitó durante 30 segundos, se tomaron 5 $\mu$ L de volumen y se diluyeron en 995  $\mu$ L de agua inyectable, posteriormente cada una de las diluciones se agitó durante 30 segundos y se procedió a la lectura en el espectrofotómetro, a 260nm con un factor de dilución igual a 200.

### 4. DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS.

Los oligonucleótidos específicos para cada uno de los SNP's se diseñaron utilizando el software LightScanner® Primer Desing.

#### 4.1. LEPTINA.

Se determinó la presencia del SNP del gen de Leptina G-2548A, rs7799039, (Snoussi, 2006; Cleveland, 2010), mediante el uso de los siguientes oligonucleótidos:

Sentido: 5'-TTC CTG TAA TTT TCC CAT GAG AAC- 3' (IDT 80426187, Tm = 53.2 °C).

Antisentido: 5'- TCT CAG CAC TTA GGG AGA CT- 3' (IDT 80426188, Tm = 54.6 °C).

#### 4.2. RECEPTOR DE LEPTINA Lys109Arg.

Se determinó la presencia del SNP del gen del receptor de la Leptina A326G, rs1137100 (Liu, 2007), mediante el uso de los siguientes oligonucleótidos:

Sentido: 5'- GAA ACT GCT CCT TAT GTG CAG A- 3' (IDT 80426191, Tm= 55.1°C).

Antisentido: 5'- TGC TTA CCT ATT TGT TGA AAA ACT AAA- 3' (IDT 80426192, Tm= 52.2°C).

#### 4.3. RECEPTOR DE LEPTINA Gln223Arg.

Se determinó la presencia del SNP del gen del receptor de la Leptina A668G, rs1137101 (Terrasi, 2009; Cleveland, 2010), mediante el uso de los siguientes oligonucleótidos:

Sentido: 5'- CGA CAC TCT CCT TAT GTG TTT GA- 3' (IDT 80426193, Tm= 54.6°C).

Antisentido: 5'- ATA TTT ATG GGG TGA ACT GAC ATT AG- 3' (IDT 80426194, Tm= 53.1°C).

#### 4.4. RECEPTOR DE LEPTINA Lys663Asn.

Se determinó la presencia del SNP del gen del receptor de la Leptina G1968C, rs8179183 (Anuradha, 2012), mediante el uso de los siguientes oligonucleótidos:

Sentido: 5'- GAG GAC CTG AAT TTT GGA GAA TAA- 3' (IDT 80426195, Tm= 52.8°C).

Antisentido: 5'- GAA TAC CTT CCA AAG TAA AGT GAC A- 3' (IDT 80426196, Tm= 53.1°C).

## 5. HIGH RESOLUTION MELTING (HRM).

La fusión de alta resolución del ADN (HRM, por sus siglas en inglés), es una técnica recientemente empleada para poder genotipificar polimorfismos de nucleótido único (SNP, por sus siglas en inglés) dentro de pequeños amplicones. Este método de tubo cerrado que incluye un ciclaje rápido de PCR se completa en menos de quince minutos y no requiere de instrumentos para realizar la PCR en tiempo real o PCR alelo específica así como se prescinde de oligonucleótidos marcados con fluorescencia. (Wittwer, et al., 2003)

El proceso de fusión es posible mediante el uso de ciertos colorantes que tiñen el ADN de doble cadena los cuales se utilizan a concentraciones saturadas sin inhibir la reacción de la cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), permitiendo de esta manera la detección de heteroduplicados. Después de la amplificación de un heterocigoto se forman 4 dobles cadenas: 2 homoduplicados y 2 heteroduplicados, cada par tiene una temperatura de fusión específica, siendo la de los heteroduplicados menor que la de los homoduplicados, la diferencia entre dichos pares se puede ver mediante el análisis de la curva de fusión, ya que se presenta una alteración en el comportamiento de la curva ante la presencia de un heteroduplicado. (Wittwer, et al., 2003; Graham, et al., 2005)

Las mezclas de reacción utilizadas consistieron en lo siguiente (Tabla 2):

Tabla 2. Relación de los componente y volúmenes que integran la mezcla de reacción para el procedimiento de HRM (volumen reportado para una muestra 1X).

| Componente  | Volumen para una reacción (μL) |
|---|--------------------------------|
| H <sub>2</sub> O (LightScanner Reagent Grade Water Idaho Technology Inc.)   | 3,44                           |
| LC Green <sup>TM</sup> Plus + Gene Scanning Reagent 10X Solution (Bio Chem) | 1                              |
| Buffer Mix (BioTecMol)  | 1                              |
| dNTPs (PROMEGA)   | 1                              |
| Oligonucleótido Sentido   | 0,5                            |
| Oligonucleótido Antisentido   | 0,5                            |
| Taq (Amplificasa BioTecMol)   | 0,06                           |
| ADN   | 2 (0.1ng de ADN)               |
| MgCl <sub>2</sub> [30mM] (BioTecMol)  | 0,5                            |

Una vez que se prepararon las mezclas de reacción, éstas se colocaron en los capilares LightCycler® Capillaries (Roche) de 20μL de capacidad, diseñados específicamente para el equipo LightScanner® 32 System.

Se sometieron las muestras al procedimiento de HRM con las siguientes condiciones:

LEPTINA: G-2548A (Tabla 3).

Tabla 3. Condiciones para realizar el análisis de High Resolution Melting (HRM) para el SNP de LEP G-2548A.

| PROGRAMA          | PASO              | TEMPERATURA (°C) | TIEMPO                   | ADQUISICIÓN      | CICLOS |
|-------------------|-------------------|------------------|--------------------------|------------------|--------|
| DESNATURALIZACIÓN | INICIAL           | 95               | 1 min.                   | -                | 1      |
| AMPLIFICACIÓN     | DESNATURALIZACIÓN | 95               | 5 seg                    | CUANTIFICACIÓN   | 50     |
|                   | ALINEAMIENTO      | 61               | 17 seg                   |                  |        |
|                   | ELONGACIÓN        | 72               | 30 seg                   | SENCILLO         |        |
| PRE-HRM           | 1                 | 95               | 5 seg                    | -                | 1      |
|                   | 2                 | 40               | 30 seg                   |                  |        |
| HRM               | TEMPERATURA 1     | 50               | PREDE-<br>TERMI-<br>NADO | HIGH-RES<br>MELT | 1      |
|                   | TEMPERATURA 2     | 65               |                          |                  |        |
|                   | TEMPERATURA 3     | 95               |                          |                  |        |

RECEPTOR DE LEPTINA (A326G (Lys109Arg); A668G (Gln223Arg) y G1968C (Lys663Asn)).

Tabla 4. Condiciones para realizar el análisis de High Resolution Melting (HRM) para los SNPs en el receptor de la leptina A326G; A668G y G1968C.

| PROGRAMA          | PASO              | TEMPERATURA (°C) | TIEMPO                   | ADQUISICIÓN    | CICLOS |
|-------------------|-------------------|------------------|--------------------------|----------------|--------|
| DESNATURALIZACIÓN | INICIAL           | 95               | 1 min                    | -              | 1      |
| AMPLIFICACIÓN     | DESNATURALIZACIÓN | 95               | 5 seg                    | CUANTIFICACIÓN | 45     |
|                   | ALINEAMIENTO      | 60               | 20 seg                   |                |        |
|                   | ELONGACIÓN        | 72               | 20 seg                   | SENCILLO       |        |
| PRE-HRM           | 1                 | 95               | 5 seg                    | -              | 1      |
|                   | 2                 | 40               | 30 seg                   |                |        |
| HRM               | TEMPERATURA 1     | 50               | PREDE-<br>TERMI-<br>NADO | HIGH-RES MELT  | 1      |
|                   | TEMPERATURA 2     | 65               |                          |                |        |
|                   | TEMPERATURA 3     | 95               |                          |                |        |

## 6. DETERMINACIÓN EN SUERO DE LA LEPTINA (ELISA).

Para evaluar o determinar las concentraciones séricas de la leptina se empleó la técnica del Ensayo Inmunoenzimático (ELISA, por sus siglas en inglés), utilizando el kit comercial de ELISA de la compañía Millipore ® para determinar la presencia de leptina humana siguiendo el protocolo del fabricante.

## 7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Se realizó el procedimiento de Modelos Lineales Generalizados, el cual está diseñado para construir un modelo estadístico que describa el impacto de uno o más factores  $X$  en una o más variables dependientes  $Y$ , los factores pueden ser: 1) cuantitativos o categóricos, 2) cruzados o anidados y 3) Fijos o aleatorios.

Por otro lado también se realizaron las pruebas de Kruskal-Wallis, para determinar las diferencias entre las concentraciones de la leptina con respecto a diferentes factores así como un **Análisis Multivariado**, que está diseñado para resumir dos o más columnas de datos numéricos. Calcula resúmenes estadísticos para cada variable, así como correlaciones y covarianzas entre las variables. Todos los diseños estadísticos se realizaron utilizando el programa **STATGRAPHICS centurión Version XVI**.

## RESULTADOS.

Se reclutaron un total de 133 muestras según los criterios de inclusión para realizar el estudio, las cuales fueron separadas acorde a su índice de masa corporal (IMC) y la presencia o ausencia de la patología del cáncer de mama, tal como lo muestra la siguiente tabla:

*Tabla 5. Muestras recabadas a pacientes que acuden al Hospital General de México. Un total de 133 muestras se sometieron al estudio, separadas acorde a su índice de masa corporal (IMC) y a la presencia o ausencia de la patología de Cáncer de Mama.*

|                           | Cáncer de Mama | SIN Cáncer de Mama |
|---------------------------|----------------|--------------------|
| IMC <25 Kg/m <sup>2</sup> | 35             | 26                 |
| IMC >30 Kg/m <sup>2</sup> | 34             | 38                 |

## FUSIÓN DE ALTA RESOLUCIÓN DEL ADN (HIGH RESOLUTION MELTING, HRM).

Se realizó el análisis de fusión de alta definición (HRM) para detectar los SNP reportados para el gen de leptina (LEP, rs7799039) y para el gen del receptor de leptina (LEPR: rs1137100, rs1137101 y rs8179183), a partir de un amplicón de 96pb y mediante el análisis tanto de la temperatura de fusión como de las curvas de fusión para cada par de homodúplex y heterodúplex, obteniéndose los siguientes resultados:

## **Leptina**

### **LEPG-2548A (rs7799039).**

Para el SNP localizado en la región promotora del gen de la leptina, en donde ocurre una transición de una A por una G en la posición -2548 río arriba a partir del codón de inicio, se obtuvieron tres diferentes temperaturas y curvas de fusión correspondientes a los tres genotipos posibles. Denotándose una mayor temperatura de fusión para la condición silvestre (G/G) que para la condición homocigota mutante (A/A), así como una curva con dos picos para la condición heterocigota (G/A), lo que se encuentra representado en la Figura 5. A partir de dicho análisis se obtuvo la siguiente distribución de los genotipos descritos anteriormente (Tabla 6) en los grupos de estudios generados a partir de las muestras sometidas al estudio (Tabla 5).

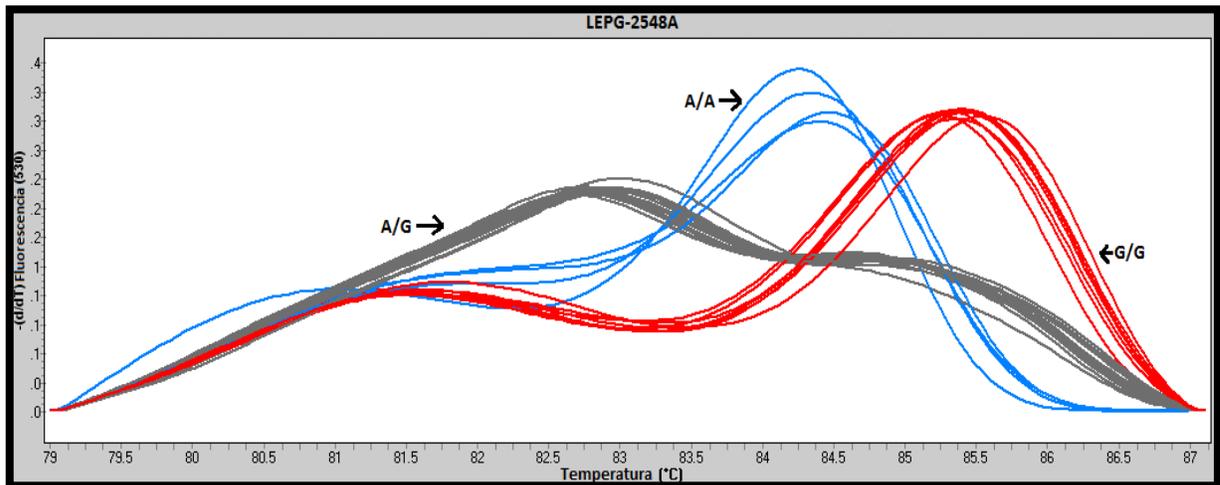


Figura 5. Curvas de fusión del ADN derivadas del estudio de HRM para el SNP LEPG-2548A obtenidos del LightScanner32®. Se distinguen los tres genotipos posibles, silvestre (G/G) en rojo, heterocigoto (A/G) en gris y mutante homocigoto (A/A) en azul.

Tabla 6. Distribución de los genotipos en los diferentes grupos de estudio para el SNP LEPG-2548A. CaM= Cáncer de Mama. IMC = Índice de Masa Corporal. WT =Silvestre, HT= Heterocigoto, MUT= Mutante.

| Grupo de Estudio                  | LEPG-2548A |          |           |
|-----------------------------------|------------|----------|-----------|
|                                   | G/G (WT)   | G/A (HT) | A/A (MUT) |
| CaM IMC >30 Kg/m <sup>2</sup>     | 11 (32%)   | 11 (32%) | 12 (36%)  |
| CaM IMC <25 Kg/m <sup>2</sup>     | 8 (23%)    | 21 (60%) | 6 (17%)   |
| SIN CaM IMC >30 Kg/m <sup>2</sup> | 8 (21%)    | 23 (61%) | 7 (18%)   |
| SIN CaM IMC <25 Kg/m <sup>2</sup> | 12 (46%)   | 12 (46%) | 2 (8%)    |

### **Receptor de Leptina.**

#### **Lys109Arg (rs1137100).**

Para el SNP localizado en el gen del receptor de la leptina en donde se presenta una transición de una G por una A en la posición 326 que se traduce en un cambio de una lisina por una arginina en el codón 109 a partir del codón de inicio, se obtuvieron tres diferentes temperaturas y curvas de fusión correspondientes a los tres genotipos posibles. Denotándose una mayor temperatura de fusión para la condición homocigota mutante (G/G) que para la condición silvestre (A/A), así como una curva con dos picos para la condición heterocigota (A/G), lo que se encuentra representado en la Figura 6. A partir de dicho análisis se obtuvo la siguiente distribución de los genotipos descritos anteriormente (Tabla 7) en los grupos de estudios generados a partir de las muestras sometidas al estudio (Tabla 5).

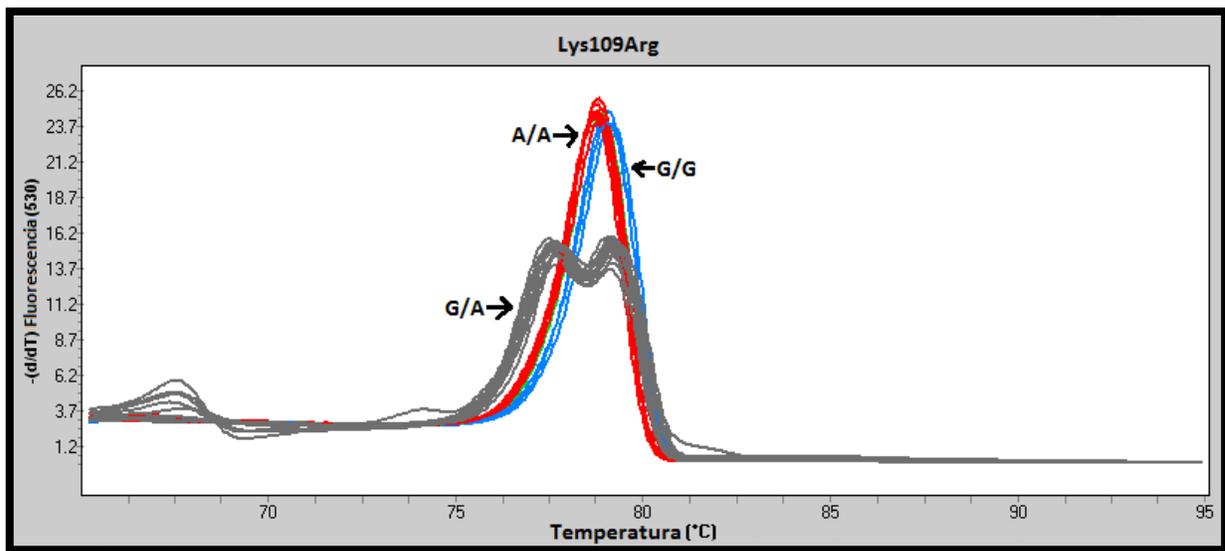


Figura 6. Curvas de fusión del ADN derivadas del estudio de HRM para el SNP Lys109Arg obtenidas del LightScanner32®. Se distinguen los tres genotipos posibles, silvestre (A/A) en rojo, heterocigoto (G/A) en gris y mutante homocigoto (G/G) en azul.

Tabla 7. Distribución de los genotipos en los diferentes grupos de estudio para el SNP Lys109Arg. CaM= Cáncer de Mama. IMC = Índice de Masa Corporal. WT =Silvestre, HT= Heterocigoto, MUT= Mutante.

| Grupo de Estudio                  | Lys109Arg |          |           |
|-----------------------------------|-----------|----------|-----------|
|                                   | A/A (WT)  | A/G (HT) | G/G (MUT) |
| CaM IMC >30 Kg/m <sup>2</sup>     | 24 (70%)  | 8 (23%)  | 2 (7%)    |
| CaM IMC <25 Kg/m <sup>2</sup>     | 22 (63%)  | 13 (37%) | 0 (0%)    |
| SIN CaM IMC >30 Kg/m <sup>2</sup> | 13 (34%)  | 11 (29%) | 14 (37%)  |
| SIN CaM IMC <25 Kg/m <sup>2</sup> | 3 (12%)   | 16 (62%) | 7 (26%)   |

### **Gln223Arg (rs 1137101).**

Para el SNP localizado en el gen del receptor de la leptina en donde se presenta una transición de una G por una A en la posición 668 que se traduce en un cambio de una glutamina por una arginina en el codón 223 a partir del codón de inicio, se obtuvieron tres diferentes temperaturas y curvas de fusión correspondientes a los tres genotipos posibles. Denotándose una mayor temperatura de fusión para la condición homocigota mutante (G/G) que para la condición silvestre (A/A), así como

una curva con dos picos para la condición heterocigota (A/G), lo que se encuentra representado en la Figura 7. A partir de dicho análisis se obtuvo la siguiente distribución de los genotipos descritos anteriormente (Tabla 8) en los grupos de estudios generados a partir de muestras las sometidas al estudio (Tabla 5).

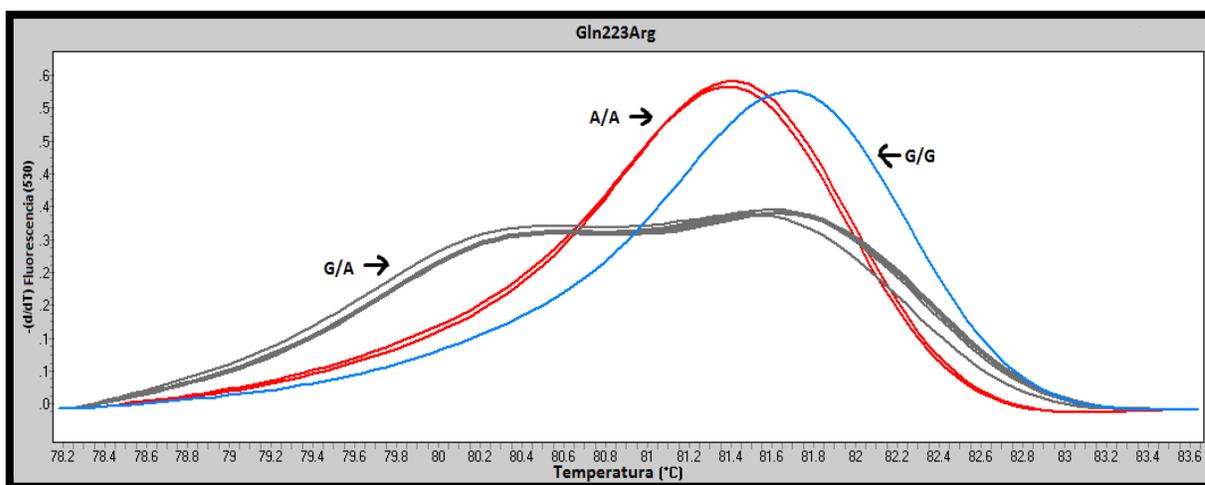


Figura 7. Curvas de fusión del ADN derivadas del estudio de HRM para el SNP Gln223Arg obtenidas del LightScanner32®. Se distinguen los tres genotipos posibles, silvestre (A/A) en rojo, heterocigoto (G/A) en gris y mutante homocigoto (G/G) en azul.

Tabla 8. Distribución de los genotipos en los diferentes grupos de estudio para el SNP Gln223Arg. CaM= Cáncer de Mama. IMC = Índice de Masa Corporal. WT=Silvestre, HT= Heterocigoto, MUT= Mutante.

| Grupo de Estudio                  | Gln223Arg |          |           |
|-----------------------------------|-----------|----------|-----------|
|                                   | A/A (WT)  | A/G (HT) | G/G (MUT) |
| CaM IMC >30 Kg/m <sup>2</sup>     | 12 (35%)  | 16 (47%) | 6 (18%)   |
| CaM IMC <25 Kg/m <sup>2</sup>     | 18 (51%)  | 10 (29%) | 7 (20%)   |
| SIN CaM IMC >30 Kg/m <sup>2</sup> | 7 (18%)   | 20 (53%) | 11 (29%)  |
| SIN CaM IMC <25 Kg/m <sup>2</sup> | 3 (12%)   | 16 (62%) | 7 (26%)   |

### ***Lys663Asn (rs8179183).***

Para el SNP localizado en el gen del receptor de la leptina en donde se presenta una transversión de una C por una G en la posición 1968 que se traduce en un cambio de una lisina por una asparagina en el codón 663 a partir del codón de inicio, se obtuvieron tres diferentes temperaturas y curvas de fusión correspondientes a los tres genotipos posibles. Denotándose una mayor temperatura de fusión para la condición silvestre (G/G) que para la condición homocigota mutante (C/C), así como una curva con dos picos para la condición heterocigota (G/C), lo que se encuentra representado en la Figura 8. A partir de dicho análisis se obtuvo la siguiente distribución de los genotipos descritos anteriormente (Tabla 9) en los grupos de estudios generados a partir de las muestras sometidas al estudio (Tabla 5).

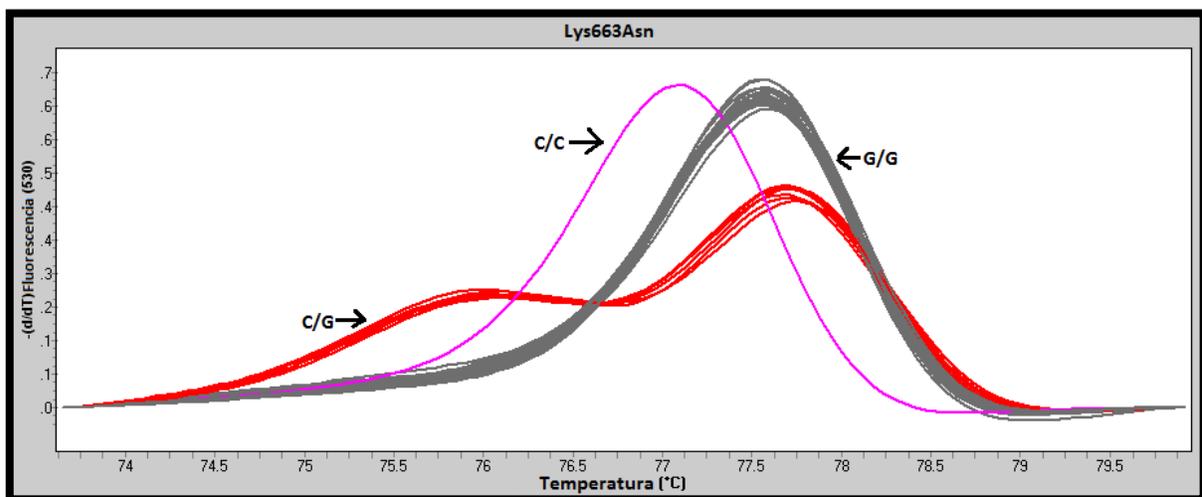


Figura 8. Curvas de fusión del ADN derivadas del estudio de HRM para el SNP Lys663Asn obtenidas del LightScanner32®. Se distinguen los tres genotipos posibles, silvestre (G/G) en gris, heterocigoto (C/G) en rojo y mutante homocigoto (C/C) en rosa.

Tabla 9. Distribución de los genotipos en los diferentes grupos de estudio para el SNP Lys663Asn. CAM= Cáncer de Mama. IMC = Índice de Masa Corporal. WT =Silvestre, HT= Heterocigoto, MUT= Mutante.

| Grupo de Estudio                  | Lys663Asn |          |           |
|-----------------------------------|-----------|----------|-----------|
|                                   | G/G (WT)  | G/C (HT) | C/C (MUT) |
| CaM IMC >30 Kg/m <sup>2</sup>     | 24 (71%)  | 9 (26%)  | 1 (3%)    |
| CaM IMC <25 Kg/m <sup>2</sup>     | 26 (74%)  | 7 (20%)  | 2 (6%)    |
| SIN CaM IMC >30 Kg/m <sup>2</sup> | 23 (61%)  | 15 (39%) | 0 (0%)    |
| SIN CaM IMC <25 Kg/m <sup>2</sup> | 21 (80%)  | 5 (20%)  | 0 (0%)    |

## MODELOS LINEALES GENERALIZADOS.

Con este análisis estadístico lo que se busca es generar un modelo lineal, en el cual se pueda predecir una consecuencia X a partir de la contribución de varias variables independientes a través de la construcción de una ecuación lineal. En este caso se tomaron en cuenta los genotipos para cada uno de los SNP's presentes en el gen de la Leptina y en el gen del Receptor de la Leptina (LEPR), así como la edad y el índice de masa corporal (IMC), como factores asociados a incrementar el riesgo a desarrollar Cáncer de Mama.

Número de variables dependientes: Cáncer de Mama.

Número de factores categóricos: 4

A= LEPG-2548A

B= Lys663Asn

C= Lys109Arg

D= Gln223Arg

Número de factores cuantitativos: 2

E=EDAD

F=IMC

Para determinar la asociación y ajustar un modelo estadístico lineal entre los factores predictivos, tanto los categóricos como los cuantitativos descritos anteriormente, con el Cáncer de Mama, se realizó un análisis de varianza (ANOVA), el cual indica una relación estadísticamente significativa entre dichos factores predictivos y la variable dependiente (Tabla 10), con un nivel de confianza del 95% y una probabilidad (Valor-P) de 0,00001, la cual al ser menor que 0.05, indica que tanto los SNP's presentes en el gen de la leptina como en el gen del receptor de la leptina así como el índice de masa corporal y la edad, son variables relacionadas con la variable dependiente de cáncer de mama, por lo tanto pueden ser referidas como factores predictores.

Tabla 10. Análisis de Varianza para la Variable dependiente Cáncer de Mama.

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|---------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| Modelo        | 18,558                   | 10        | 1,8558                | 15,46          | <b>0,00001</b> |
| Residuo       | 14,645                   | 122       | 0,120041              |                |                |
| Total (Corr.) | 33,203                   | 132       |                       |                |                |

El siguiente punto en el ajuste del modelo es determinar el grado de significancia estadística de cada uno de los factores tanto categóricos como cuantitativos, conforme fueron introducidos al modelo, lo anterior mediante un análisis de varianza

(ANOVA) para la variable Cáncer de Mama, los resultados se muestran en la tabla 11, acorde con dicha tabla tenemos que los factores correspondientes a Edad, Índice de Masa Corporal (IMC) y el SNP de Lys109Arg, son los de mayor grado de significancia dentro del modelo con una probabilidad de 0.00001 (Valor-P), en cuanto al SNP LEPG-2548A, su grado de significancia es menor con respecto a los anteriores con un valor de probabilidad de 0.0522, finalmente los valores de probabilidad de los SNP's Lys663Asn y Gln223Arg, es de 0.3211 y 0.6438, respectivamente, debido a que el valor de probabilidad más alto (mayor o igual que 0-05) lo presenta el SNP Gln223Arg, es un término que no es estadísticamente significativo con un nivel de confianza del 95,0%.

Tabla 11. Análisis de Varianza (ANOVA) de los factores categóricos y cuantitativos que forman el modelo.

| Fuente            | Suma de Cuadrados | Gl  | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P        |
|-------------------|-------------------|-----|----------------|---------|----------------|
| LEPG-2548A        | 0,72637           | 2   | 0,363185       | 3,03    | <b>0,0522</b>  |
| Lys663Asn         | 0,275252          | 2   | 0,137626       | 1,15    | 0,3211         |
| Lys109Arg         | 5,27656           | 2   | 2,63828        | 21,98   | <b>0,00001</b> |
| Gln223Arg         | 0,106124          | 2   | 0,053062       | 0,44    | 0,6438         |
| EDAD              | 8,05689           | 1   | 8,05689        | 67,12   | <b>0,00001</b> |
| IMC               | 2,53214           | 1   | 2,53214        | 21,09   | <b>0,00001</b> |
| Residuo           | 14,645            | 122 | 0,120041       |         |                |
| Total (corregido) | 33,203            | 132 |                |         |                |

Tabla 12. Cuadrados Medios Esperados (CME).

| Fuente      | CME    |
|-------------|--------|
| LEP G-2548A | (7)+Q1 |
| Lys663Asn   | (7)+Q2 |
| Lys109Arg   | (7)+Q3 |
| Gln223Arg   | (7)+Q4 |
| EDAD        | (7)+Q5 |
| IMC         | (7)+Q6 |
| Residuo     | (7)    |

En la tabla 12 se muestran los cuadrados medios esperados para cada uno de los factores mediante el método de síntesis de Hartley (1967). El número 7 representa la suma de todos los factores empleados más el residuo, mientras que los términos representados por “Q1,.....Q6”, indican una cantidad única correspondiente al factor en el que aparece, por lo tanto Q1 corresponde a un valor único designado a LEP G-2548A. Los cuadrados medios representados en la tabla anterior son necesarios para la construcción de la prueba F.

Tabla 13. Denominadores de la Prueba-F.

| <i>Fuente</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Denominador</i> |
|---------------|-----------|-----------------------|--------------------|
| LEP G-2548A   | 122,00    | 0,120041              | (7)                |
| Lys663Asn     | 122,00    | 0,120041              | (7)                |
| Lys109Arg     | 122,00    | 0,120041              | (7)                |
| Gln223Arg     | 122,00    | 0,120041              | (7)                |
| EDAD          | 122,00    | 0,120041              | (7)                |
| IMC           | 122,00    | 0,120041              | (7)                |

La prueba F (Tabla 13) se determinó utilizando los cuadrados medios como denominador para cada factor, junto con sus grados de libertad, es decir, se obtiene el valor de la prueba F usando el cuadrado medio (7) en su denominador que es lo mismo que emplear a cada factor como término de error. En nuestro caso es importante realizar el cálculo de dicha prueba ya que se tienen presentes factores aleatorios como lo son la presencia de los SNP's.

Tabla 14. Componentes de Varianza.

| <i>Fuente</i> | <i>Estimado</i> |
|---------------|-----------------|
| Residuo       | 0,120041        |

Para los modelos con factores aleatorios, estima el componente de varianza (Tabla 14) de cada efecto aleatorio. Los componentes de varianza miden la variabilidad en la respuesta inducida por la variación en los efectos aleatorios. Los componentes son derivados igualando los cuadrados medios con sus valores esperados, lo cual es conocido como el método de momentos. Para este caso, el valor del residuo se igualó al valor esperado, siendo éste cerca de 0.12 lo que indica la condición aleatoria de los factores empleados en la prueba.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo, así ajustado, arroja un porcentaje que es el valor de la variabilidad en la variable dependiente, en este caso el valor de R-cuadrada explica el 55,8925% de la variabilidad en Cáncer de Mama. El estadístico R-Cuadrada ajustada, el cual es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es de **52,2771%**. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 0,346469, mientras que el error medio absoluto es de 0.26551. El estadístico de Durbin-Watson (DW) analiza los residuos para determinar si hay alguna correlación significativa con base en el orden en el que se presentaron en el archivo de datos, acorde a su valor de probabilidad de 0.00001 (menor que 0.05) indica una posible correlación serial.

R-Cuadrada = 55,8925%

R-Cuadrada (ajustada por grados de libertad) = **52,2771%**

Error estándar del estadístico = 0,346469

Error medio absoluto = 0,26551

Estadístico Durbin-Watson = 0,921066 (**P=0,00001**)

La tabla 15 resume el desempeño del modelo para ajustar los datos, y para predecir cualquier valor retenido fuera del proceso de ajuste. Muestra el cuadrado medio del error (CME), el error medio absoluto (MAE), el porcentaje de error medio absoluto (MAPE), el error medio (ME) y el porcentaje de error medio (MPE), cada uno de los estadísticos está basado en los residuos. Los primeros tres estadísticos miden la magnitud de los errores. El mejor modelo dará el valor más pequeño. Los últimos dos estadísticos miden el bias (sesgo). El mejor modelo dará un valor cercano a 0. NOTA: el MAPE y el MPE no fueron calculados debido a que el valor más pequeño en el conjunto de datos es menor o igual a 0.

Tabla 15. Análisis de Residuos

|      | <i>Estimación</i> | <i>Validación</i> |
|------|-------------------|-------------------|
| n    | 133               |                   |
| CME  | 0,120041          |                   |
| MAE  | 0,26551           |                   |
| MAPE |                   |                   |
| ME   | -2,83399E-16      |                   |
| MPE  |                   |                   |

Continuando con la construcción de un modelo se debe establecer la ausencia de multicolinealidad. Dos requisitos son necesarios para la linealidad de un modelo, que las variables explicativas sean independientes, que no haya multicolinealidad y que sean lineales. El factor de inflación de varianza (V.I.F.), es la manera más sencilla y directa para determinar la multicolinealidad y medir el daño producido por la falta de independencia; si las variables explicativas no son redundantes entonces el V.I.F. es igual a la unidad, valores de V.I.F. mayores a 4 sugieren la existencia de

multicolinealidad y valores mayores de 10 sugieren una multicolinealidad grave.  
(Mandeville, 2008)

La existencia de multicolinealidad se determinó para cada uno de los factores tomados en cuenta para la construcción del modelo, los resultados obtenidos se expresan en la tabla 16, ahí se denota que solamente para la variable correspondiente al SNP Lys663Asn, el valor del V.I.F. es mayor a 4. Igualmente en dicha tabla se reportan los intervalos de confianza del 95% para cada uno de los factores.

Debido a que existen dos variables con un V.I.F. mayor a cuatro, una alternativa a aplicarse para que dicha multicolinealidad no tenga una mayor repercusión es ajustar los factores por cuadrados mínimos (Tabla 17) a una ecuación polinomial de grado apropiado. Los métodos de regresión polinomial son aplicables cuando las variables explicativas son continuas y están medidas en escala ordinal, intervalo o razón.  
(Mandeville, 2008)

Tabla 16. Límites de Confianza del 95% para el coeficiente estimado, Cáncer de Mama.

| Parámetro   | Estimado   | Error      |                 | Límite Superior | V.I.F.         |
|-------------|------------|------------|-----------------|-----------------|----------------|
|             |            | Estándar   | Límite Inferior |                 |                |
| CONSTANTE   | 0,217402   | 0,179293   | -0,137527       | 0,57233         |                |
| LEP G-2548A | 0,124624   | 0,0515671  | 0,0225413       | 0,226706        | 1,43806        |
| LEP G-2548A | -0,0700978 | 0,0419342  | -0,153111       | 0,0129153       | 1,46643        |
| Lys663Asn   | 0,199426   | 0,137356   | -0,0724841      | 0,471336        | <b>5,45953</b> |
| Lys663Asn   | -0,120052  | 0,0806352  | -0,279677       | 0,0395742       | <b>5,67145</b> |
| Lys109Arg   | 0,317389   | 0,0482709  | 0,221832        | 0,412946        | 1,45858        |
| Lys109Arg   | -0,0967516 | 0,0531886  | -0,202044       | 0,00854083      | 1,57953        |
| Gln223Arg   | 0,0324662  | 0,0528954  | -0,0722457      | 0,137178        | 1,64067        |
| Gln223Arg   | -0,0418207 | 0,0459898  | -0,132862       | 0,0492209       | 1,5113         |
| EDAD        | 0,0226953  | 0,00277024 | 0,0172114       | 0,0281793       | 1,10806        |
| IMC         | -0,0209786 | 0,00456771 | -0,0300209      | -0,0119364      | 1,26923        |

Finalmente, la ecuación del modelo ajustado es la siguiente:

$$\text{Cáncer de Mama} = 0,217402 + 0,124624 \cdot I1(1) - 0,0700978 \cdot I1(2) + 0,199426 \cdot I2(1) - 0,120052 \cdot I2(2) + 0,317389 \cdot I3(1) - 0,0967516 \cdot I3(2) + 0,0324662 \cdot I4(1) - 0,0418207 \cdot I4(2) + 0,0226953 \cdot \text{EDAD} - 0,0209786 \cdot \text{IMC}$$

En donde:

$I1(1) = 1$  si LEP G-2548A =A/A,  $-1$  si LEP G-2548A =G/G,  $0$  de lo contrario

$I1(2) = 1$  si LEP G-2548A =G/A,  $-1$  si LEP G-2548A =G/G,  $0$  de lo contrario

$I2(1) = 1$  si Lys663Asn =C/C,  $-1$  si Lys663Asn =G/G,  $0$  de lo contrario

$I2(2) = 1$  si Lys663Asn =G/C,  $-1$  si Lys663Asn =G/G,  $0$  de lo contrario

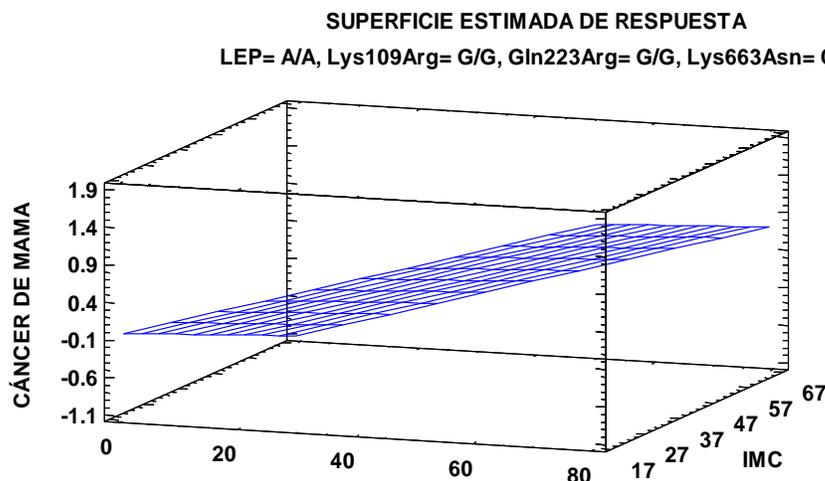
$I3(1) = 1$  si Lys109Arg =A/A,  $-1$  si Lys109Arg =G/G,  $0$  de lo contrario

$I3(2) = 1$  si Lys109Arg =A/G,  $-1$  si Lys109Arg =G/G,  $0$  de lo contrario

$I4(1) = 1$  si Gln223Arg =A/A,  $-1$  si Gln223Arg =G/G,  $0$  de lo contrario

$I4(2) = 1$  si Gln223Arg =G/A,  $-1$  si Gln223Arg =G/G,  $0$  de lo contrario

La ecuación anterior queda ejemplificada en la siguiente gráfica, la cual muestra la superficie de respuesta, es decir, la presencia de cáncer de mama en función de la edad y del índice de masa corporal, teniendo en cuenta el genotipo mutante para cada uno de los SNP's tanto del gen de leptina como el gen del receptor de leptina.



Gráfica 1. Superficie Estimada de Respuesta de la variable dependiente, Cáncer de Mama, la cual refleja la contribución de cada uno de los factores predictivos empleados para construir la ecuación del modelo.

Tabla 17. Medias de Mínimos Cuadrados de Cáncer de Mama con intervalos de confianza de 95%.

| Nivel         | Recuento | Media    | Error Estándar | Límite Inferior | Límite Superior |
|---------------|----------|----------|----------------|-----------------|-----------------|
| MEDIA GENERAL | 133      | 0,562495 | 0,0738226      | 0,416355        | 0,708634        |
| LEP G-2548A   |          |          |                |                 |                 |
| A/A           | 27       | 0,687118 | 0,0942245      | 0,500591        | 0,873645        |
| G/A           | 67       | 0,492397 | 0,0792719      | 0,33547         | 0,649324        |
| G/G           | 39       | 0,507968 | 0,087901       | 0,333959        | 0,681978        |
| Lys663Asn     |          |          |                |                 |                 |
| C/C           | 3        | 0,761921 | 0,203082       | 0,359898        | 1,16394         |
| G/C           | 36       | 0,442443 | 0,0672027      | 0,309408        | 0,575478        |
| G/G           | 94       | 0,48312  | 0,0399256      | 0,404083        | 0,562157        |
| Lys109Arg     |          |          |                |                 |                 |
| A/A           | 62       | 0,879883 | 0,0844867      | 0,712633        | 1,04713         |
| A/G           | 47       | 0,465743 | 0,0845487      | 0,29837         | 0,633116        |
| G/G           | 24       | 0,341857 | 0,101736       | 0,140459        | 0,543255        |

| Gln223Arg |    |          |           |          |          |
|-----------|----|----------|-----------|----------|----------|
| A/A       | 40 | 0,594961 | 0,0912287 | 0,414364 | 0,775557 |
| G/A       | 62 | 0,520674 | 0,0840087 | 0,35437  | 0,686978 |
| G/G       | 31 | 0,571849 | 0,0930626 | 0,387622 | 0,756076 |

*Tabla 18. Medias de Factores Cuantitativos*

|      |         |
|------|---------|
| EDAD | 42,1429 |
| IMC  | 29,1417 |

Las tablas 17 y 18 muestran la variación media de Cáncer de Mama para cada nivel de los factores. Sin embargo, solamente la tabla 17 muestra los errores estándar de cada media, que son una medida de su variabilidad de muestreo. Las dos columnas de la extrema derecha muestran intervalos de confianza del 95,0% para cada una de las medias. La variabilidad expuesta en la tabla anteriormente descrita, debe evaluarse de manera independiente para cada uno de los factores con la finalidad de descifrar si existen diferencias significativas entre los grupos para poder determinar la existencia de un genotipo que pueda asociarse con un incremento en el riesgo a desarrollar cáncer de mama.

Se realizó una prueba de comparaciones múltiples (Tabla 19) entre los genotipos del SNP de gen del leptina LEPG-2548A para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de cuales otras, estableciendo grupos homogéneos denotados por una X en el mismo nivel, para este polimorfismo en específico, el genotipo A/A es diferente de los genotipos G/A y G/G.

Tabla 19. Comparaciones múltiples para Cáncer de Mama por LEP G-2548A

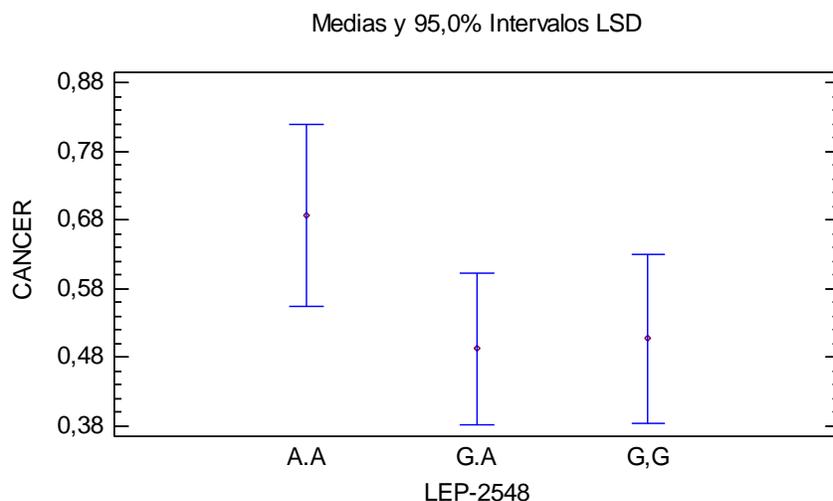
| LEP G-2548A | Recuento | Media MC | Sigma MC  | Grupos Homogéneos |
|-------------|----------|----------|-----------|-------------------|
| G/A         | 67       | 0,492397 | 0,0792719 | X                 |
| G/G         | 39       | 0,507968 | 0,087901  | X                 |
| A/A         | 27       | 0,687118 | 0,0942245 | X                 |

Tabla 20. Diferencias estimadas mediante una el método de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel de confianza del 95%.

| Contraste | Sig. | Diferencia      | Límites +/- |
|-----------|------|-----------------|-------------|
| A/A - G/A | *    | <b>0,194722</b> | 0,162199    |
| A/A - G/G | *    | <b>0,17915</b>  | 0,174875    |
| G/A - G/G |      | -0,0155717      | 0,141394    |

\* denota una diferencia estadísticamente significativa.

Con el fin de evaluar una diferencia significativa entre los grupo aparentemente heterogéneos determinados por las comparaciones múltiples se aplicó la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher (Tabla 20), con este método hay un 5,0% de riesgo de decir que cada par de medias es estadísticamente diferente cuando la diferencia real es igual a 0. La prueba fortalece lo obtenido por las comparaciones múltiples, indicando que el genotipo A/A de riesgo, es significativamente diferente con un nivel de confianza del 95,0% (Gráfica 2) con respecto a los genotipos A/G (HT) y G/G (WT), lo cual se puede interpretar como que la presencia de dicho genotipo se asocia con un incremento en el riesgo a padecer cáncer de mama.



Gráfica 2. Comparación de las diferencias entre las medias, resultado de la diferencia mínima significativa de Fisher con un intervalo de confianza del 95% para cada uno de los genotipos para el polimorfismo de nucleótido único en el gen de leptina (LEP G-2548A).

La prueba de comparaciones múltiples, utilizada para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de cuales otras, aplicada a los genotipos del SNP de gen del receptor de leptina (LEPR) Lys663Asn se reporta en la tabla 21, estableciendo a todos los grupos como homogéneos lo cual se denota por la X en el mismo nivel.

Tabla 21. Comparaciones Múltiples para CANCER por Lys663Asn.

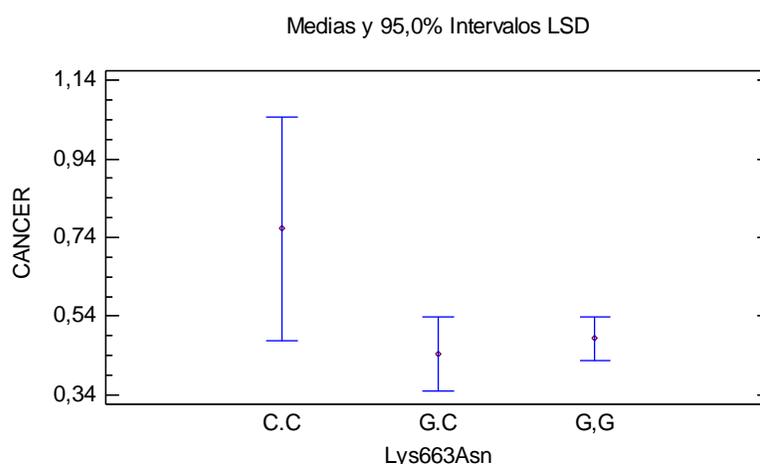
| Lys663Asn | Recuento | Media MC | Sigma MC  | Grupos Homogéneos |
|-----------|----------|----------|-----------|-------------------|
| G/C       | 36       | 0,442443 | 0,0672027 | X                 |
| G/G       | 94       | 0,48312  | 0,0399256 | X                 |
| C/C       | 3        | 0,761921 | 0,203082  | X                 |

Tabla 22. Diferencias de medias entre los genotipos de Lys663Asn estimadas mediante una el método de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel de confianza del 95%

| Contraste | Sig. | Diferencia | Límites +/- |
|-----------|------|------------|-------------|
| C/C - G/C |      | 0,319478   | 0,420416    |
| C/C - G/G |      | 0,278801   | 0,408109    |
| G/C - G/G |      | -0,040677  | 0,145564    |

\* denota una diferencia estadísticamente significativa.

Por otro lado, el resultado del procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher (Tabla 22), indica que no hay diferencias estadísticamente significativas entre ningún par de medias con un nivel de confianza del 95,0%. (Gráfica 3). Lo que indica que para la población mexicana estudiada todos los genotipos tienen el mismo nivel de riesgo a desarrollar cáncer mama.



Gráfica 3. Comparación de las diferencias entre las medias, resultado de la diferencia mínima significativa de Fisher con un intervalo de confianza del 95% para cada uno de los genotipos para el polimorfismo de nucleótido único en el gen del receptor de leptina Lys663Asn.

El resultado de comparación múltiple aplicado a los genotipos del SNP Lys109Arg del receptor de leptina (LEPR), que se muestra en la Tabla 23, denotando que el genotipo A/A es heterogéneo con respecto a los grupos A/G y G/G, lo que indica que sus medias son significativamente diferentes.

Tabla 23. Comparaciones Múltiples para Cáncer de Mama por Lys109Arg.

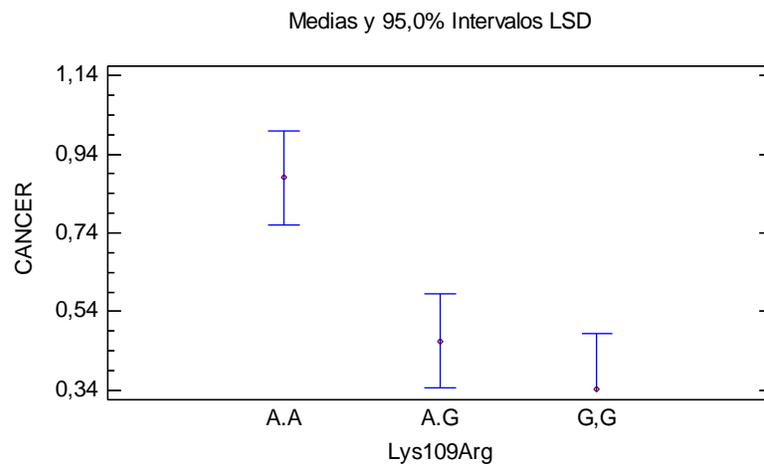
| Lys109Arg | Recuento | Media MC | Sigma MC  | Grupos Homogéneos |
|-----------|----------|----------|-----------|-------------------|
| G/G       | 24       | 0,341857 | 0,101736  | X                 |
| A/G       | 47       | 0,465743 | 0,0845487 | X                 |
| A/A       | 62       | 0,879883 | 0,0844867 | X                 |

Tabla 24. Diferencias de medias entre los genotipos de Lys109Arg estimadas mediante una el método de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel de confianza del 95%

| Contraste | Sig. | Diferencia | Límites +/- |
|-----------|------|------------|-------------|
| A/A - A/G | *    | 0,41414    | 0,167857    |
| A/A - G/G | *    | 0,538026   | 0,17803     |
| A/G - G/G |      | 0,123886   | 0,193806    |

\* denota una diferencia estadísticamente significativa.

El resultado obtenido de la prueba de comparaciones múltiples se corrobora con el resultado del resultado del procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher (Tabla 24), donde se indica que el genotipo A/A presenta exhibe una diferencia significativa con un nivel de confianza del 95,0% (Gráfica 4) con respecto a los genotipos A/G y G/G. Lo que se ve en dicho análisis puede ser interpretado como una mayor frecuencia del genotipo silvestre (A/A) en la población estudiada lo que lo determina como diferente a los otros genotipos, es aventurado interpretar dicha diferencia como un factor de riesgo ya que podría tratarse de un sesgo por el tamaño de la muestra, se necesita realizar el escaneo en una población mayor para observar si el patrón se repita y entonces tomarlo como factor de riesgo.



Gráfica 4. Comparación de las diferencias entre las medias, resultado de la diferencia mínima significativa de Fisher con un intervalo de confianza del 95% para cada uno de los genotipos para el polimorfismo de nucleótido único en el gen del receptor de leptina Lys109Arg.

La prueba de comparaciones múltiples, utilizada para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de cuales otras, aplicada a los genotipos del SNP de gen del receptor de leptina (LEPR) Gln223Arg se reporta en la tabla 25, estableciendo a todos los grupos como homogéneos lo cual se denota por la X en el mismo nivel.

Tabla 25. Comparaciones Múltiples para Cáncer de Mama por Gln223Arg.

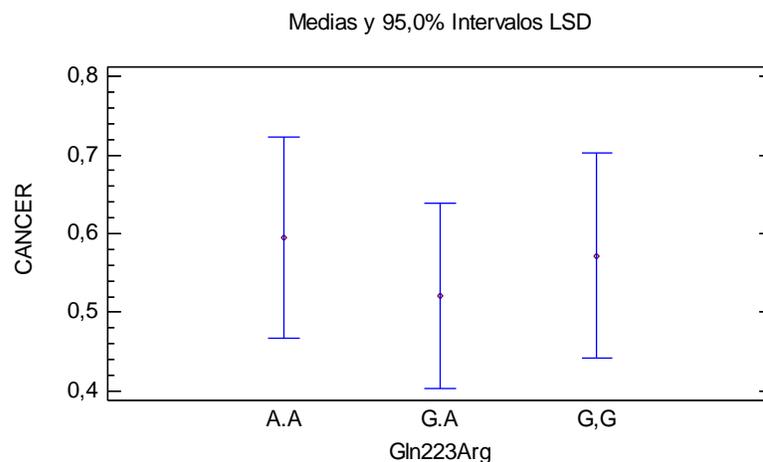
| Gln223Arg | Recuento | Media MC | Sigma MC  | Grupos Homogéneos |
|-----------|----------|----------|-----------|-------------------|
| G/A       | 62       | 0,520674 | 0,0840087 | X                 |
| G/G       | 31       | 0,571849 | 0,0930626 | X                 |
| A/A       | 40       | 0,594961 | 0,0912287 | X                 |

Tabla 26. Diferencias de medias entre los genotipos de Gln223Arg estimadas mediante la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel de confianza del 95%.

| Contraste | Sig. | Diferencia | Límites +/- |
|-----------|------|------------|-------------|
| A/A - G/A |      | 0,0742869  | 0,166187    |
| A/A - G/G |      | 0,0231116  | 0,188194    |
| G/A - G/G |      | -0,0511753 | 0,165497    |

\* denota una diferencia estadísticamente significativa.

Por otro lado, el resultado del procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher (Tabla 26), indica que no hay diferencias estadísticamente significativas entre ningún par de medias con un nivel de confianza del 95,0%. (Gráfica 5). Lo que indica que para la población mexicana estudiada todos los genotipos tienen el mismo nivel de riesgo a desarrollar cáncer mama.



Gráfica 5. Comparación de las diferencias entre las medias, resultado de la diferencia mínima significativa de Fisher con un intervalo de confianza del 95% para cada uno de los genotipos para el polimorfismo de nucleótido único en el gen del receptor de leptina Gln223Arg.

## CONCENTRACIÓN DE LEPTINA (ELISA).

Se determinaron las concentraciones en suero de leptina en 45 muestras de pacientes para poder realizar la:

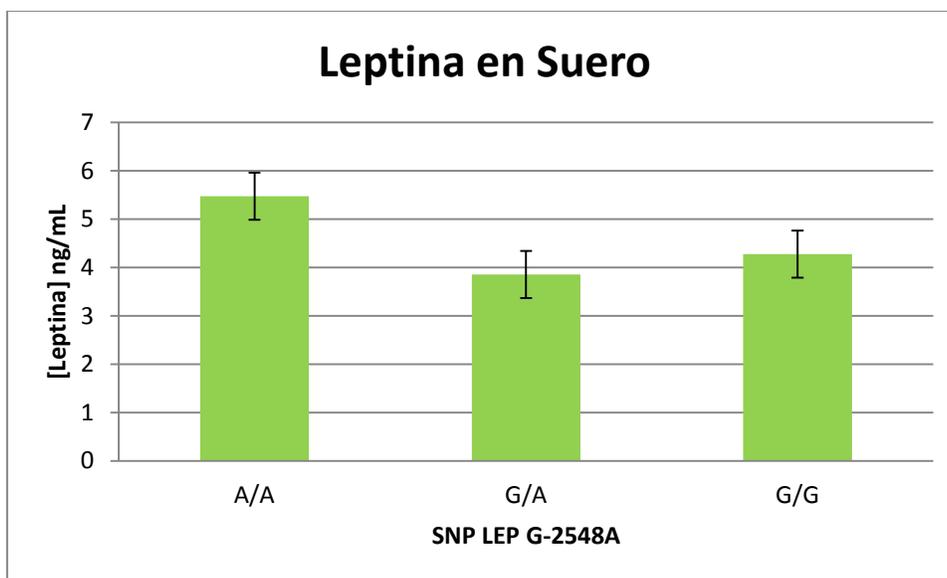
### **1) Evaluación de la relación entre la concentración de la leptina y la presencia del SNP LEPG-2548A.**

Para poder determinar una relación entre la concentración en suero de la leptina y el SNP LEPG-2548A, se calculó la mediana de las concentraciones de leptina correspondientes a cada uno de los genotipos posibles para el SNP descrito (Tabla 27), se aplicó el estadístico de Kruskal-Wallis para evaluar la diferencia entre los grupos, lo cual se ve reflejado en la Gráfica 6.

Tabla 27. Concentración de leptina correspondiente a cada genotipo posible para el SNP LEPG-2548A. Estadístico de Kruskal-Wallis para evaluar la diferencia en la concentración de leptina entre los diferentes genotipos.  $P > 0.05$  indica que no existe diferencia significativa. G/G= silvestre, G/A= heterocigoto y A/A= homocigoto mutante.

| Genotipo LEPG-2548A | [Leptina] ng/mL (mediana) | Kruskal-Wallis | P-Value  |
|---------------------|---------------------------|----------------|----------|
| G/G                 | 4.27258445                | 3.14675        | 0.207344 |
| G/A                 | 3.8503535                 |                |          |
| A/A                 | 5.47329144                |                |          |

Debido a que el valor de probabilidad (*P-value*), arrojado por el estadístico de Kruskal-Wallis es mayor que 0.05 indica que no existe una diferencia entre los grupos (Gráfica 6), es decir, no es posible justificar un incremento en la concentración de la leptina sérica debido a la presencia del genotipo mutante A/A para el de la leptina.



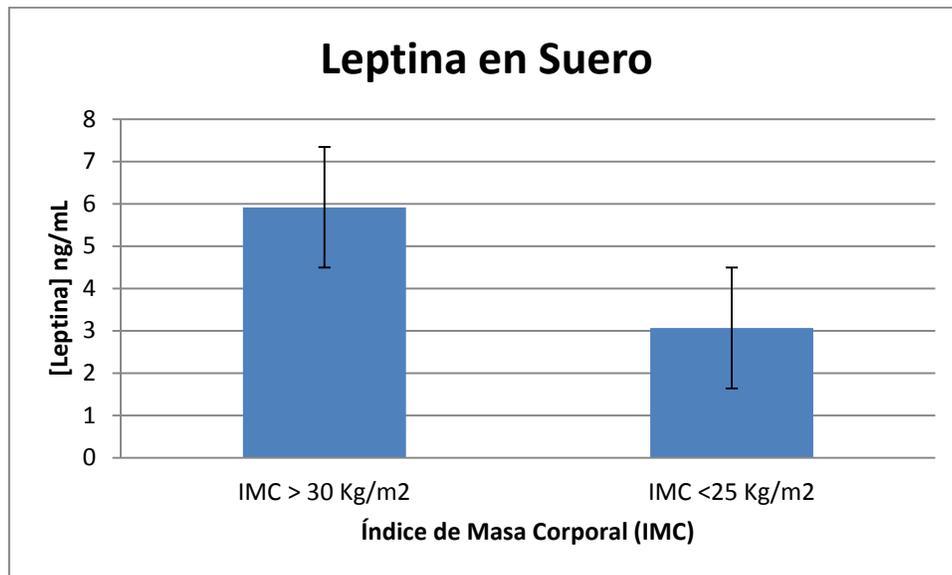
Gráfica 6. Concentración en suero de leptina correspondiente para cada uno de los genotipos posibles para el SNP de LEPG-2548A. G/G= silvestre, G/A= heterocigoto y A/A= homocigoto mutante.

**2) Evaluación de la relación entre la concentración de la leptina y el índice de masa corporal (IMC).**

En el mismo sentido, para poder determinar una relación entre la concentración sérica de la leptina y el índice de masa corporal (IMC), se calculó la mediana de las concentraciones de leptina correspondientes tanto a el índice de masa corporal que denota obesidad (IMC >30 Kg/m<sup>2</sup>) como a el índice de masa corporal que denota no obesidad (IMC <25 Kg/m<sup>2</sup>), lo cual se describe en la Tabla 28, se aplicó el estadístico de Kruskal-Wallis para evaluar la diferencia entre los grupos, lo cual se ve reflejado en la Gráfica 7.

*Tabla 28. Concentración de leptina correspondiente a la condición de obesidad (IMC >30 Kg/m<sup>2</sup>) y no obesidad (IMC <25 Kg/m<sup>2</sup>). Estadístico de Kruskal-Wallis para evaluar la diferencia en la concentración de leptina entre las diferentes condiciones. P<0.05 indica la existencia de una diferencia significativa.*

| Índice de Masa Corporal (IMC) | [Leptina] ng/mL (mediana) | Kruskal-Wallis | P-Value    |
|-------------------------------|---------------------------|----------------|------------|
| IMC >30 Kg/m <sup>2</sup>     | 5.91555381                | 27.4593        | 1.60433E-7 |
| IMC <25 Kg/m <sup>2</sup>     | 3.063629222               |                |            |



Gráfica 7. Concentración en suero de leptina correspondiente para la condición de obesidad (IMC >30 Kg/m<sup>2</sup>) y no obesidad (IMC <25 Kg/m<sup>2</sup>).

Para el caso del índice de masa corporal (IMC), el cual representa una forma de medir la obesidad, si existe una diferencia significativa entre la concentración de leptina entre los que presentan la condición de obesidad con respecto a los que no la presentan, lo cual indica que la cantidad de leptina disponible se incrementa conforme se incrementan los depósitos de grasa en el organismo.

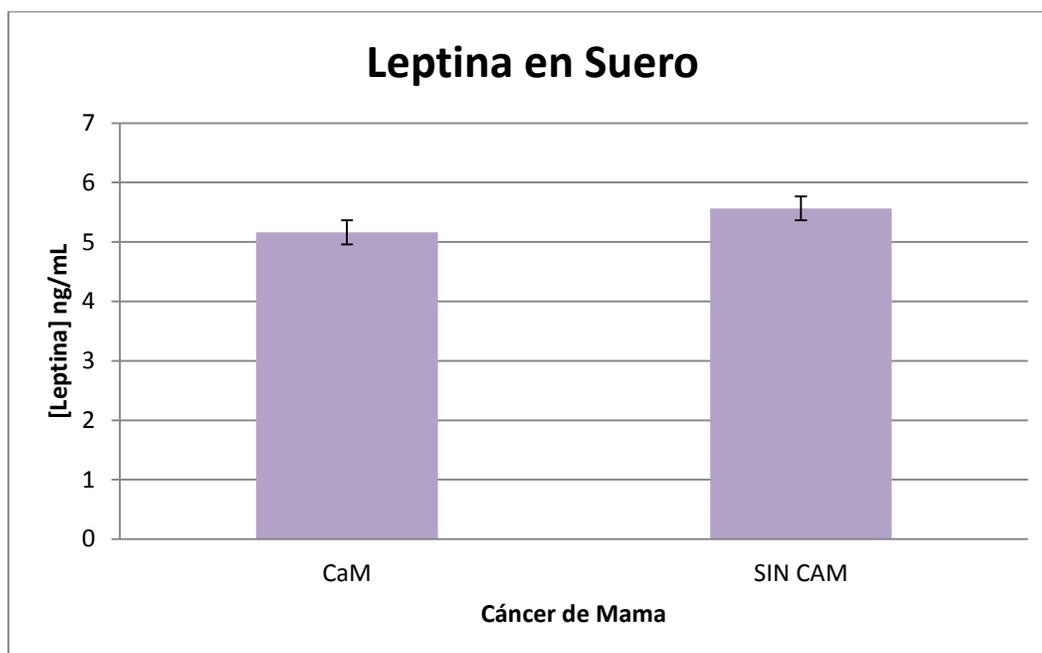
### **3) Evaluación de la relación entre la concentración de leptina y la presencia de cáncer de mama.**

Por otro lado se determinó la relación entre la concentración sérica de la leptina y la presencia de la patología del Cáncer de Mama, lo anterior a partir de calcular la mediana de las concentraciones de leptina correspondientes tanto a la presencia de

la patología del Cáncer de Mama como a la ausencia de la misma (Tabla 29), se aplicó el estadístico de Kruskal-Wallis para evaluar la diferencia entre los grupos, lo cual se ve reflejado en la Gráfica 8.

Tabla 29. Concentración de leptina correspondiente a la presencia de Cáncer de Mama (CaM) o a la ausencia de Cáncer de Mama (No CaM)). Estadístico de Kruskal-Wallis para evaluar la diferencia en la concentración de leptina entre las diferentes condiciones.  $P > 0.05$  no indica la existencia de una diferencia significativa.

| Cáncer de Mama (CaM) | [Leptina] ng/mL (mediana) | Kruskal-Wallis | P-Value  |
|----------------------|---------------------------|----------------|----------|
| CaM                  | 5.160193774               | 0.107417       | 0.743104 |
| SIN CaM              | 5.565593087               |                |          |



Gráfica 8. Concentración sérica de leptina correspondiente para la presencia de Cáncer de Mama (CaM) y la ausencia de Cáncer de Mama (SIN CaM)

Debido a que el valor de probabilidad (*P-value*) arrojado por la prueba de Kruskal-Wallis que al ser mayor que 0.05, no se puede atribuir una asociación entre la concentración de leptina y la tendencia a desarrollar cáncer de mama, ya que las concentraciones de dicha proteína no son mayores en las muestra de las pacientes con cáncer de mama con respecto a las pacientes sanas.

Con el fin de evaluar si existe una correlación entre la presencia del genotipo de riesgo A/A para el SNP LEPG-2548A presente en el gen de la leptina, con la concentración de leptina en suero, la presencia de cáncer de mama y el índice de masa corporal (IMC), se recurrió al análisis multivariado.

### **ANÁLISIS MULTIVARIADOS.**

El objetivo de dicho análisis es encontrar combinaciones de las columnas que están fuertemente asociadas entre sí. Lo anterior mediante la realización de correlaciones resultado del producto de Pearson, entre cada par de variables. El rango de estos coeficientes de correlación va de -1 a +1, y miden la fuerza de la relación lineal entre las variables. También se muestra, entre paréntesis, el número de pares de datos utilizados para calcular cada coeficiente. El tercer número en cada bloque de la tabla es un valor-P que prueba la significancia estadística de las correlaciones estimadas. Valores-P abajo de 0,05 indican correlaciones significativamente diferentes de cero, con un nivel de confianza del 95,0%.

Datos/Variables utilizadas:

CANCER

IMC

CONCENTRACION DE LEPTINA

LEP G-2548A

Existen 45 casos completos a utilizarse en los cálculos

Tabla 30. Correlaciones entre las variables analizadas. La primer fila da el valor de la correlación, la segunda el tamaño de la muestra y la tercera indica el valor de P.

|                          | CANCER  | IMC            | CONCENTRACION DE LEPTINA | LEP G-2548A |
|--------------------------|---------|----------------|--------------------------|-------------|
| CANCER                   |         | 0,0115         | -0,0377                  | 0,1031      |
|                          |         | (45)           | (45)                     | (45)        |
|                          |         | 0,9400         | 0,8060                   | 0,5002      |
| IMC                      | 0,0115  |                | 0,8025                   | 0,2758      |
|                          | (45)    |                | (45)                     | (45)        |
|                          | 0,9400  |                | <b>0,00001</b>           | 0,0667      |
| CONCENTRACION DE LEPTINA | -0,0377 | 0,8025         |                          | 0,2697      |
|                          | (45)    | (45)           |                          | (45)        |
|                          | 0,8060  | <b>0,00001</b> |                          | 0,0732      |
| LEP G-2548A              | 0,1031  | 0,2758         | 0,2697                   |             |
|                          | (45)    | (45)           | (45)                     |             |
|                          | 0,5002  | 0,0667         | 0,0732                   |             |

La tabla 30 muestra los coeficientes de correlación de Pearson para cada una de las diferentes variables, en dicha tabla se puede apreciar que no existe una correlación entre la concentración de la leptina y el cáncer, lo cual se refleja en el coeficiente obtenido de -0.0377 con un valor de  $P= 0.8060$ . Por otro lado, la concentración de leptina se correlaciona con el índice de masa corporal (IMC), obteniéndose un coeficiente de 0.8025 con un probabilidad de  $P= 0.00001$ , lo que indica que el coeficiente de correlación es significativamente diferente de cero.

Finalmente se determinó la existencia de una correlación entre la concentración de leptina y la presencia del SNP LEPG-2548A en el gen de la leptina, que pudiera explicar una asociación entre la presencia del genotipo de riesgo A/A y un incremento en la concentración de dicha proteína, sin embargo, a partir de los datos arrojados, el valor del coeficiente de correlación es de 0.2697, el cual a partir de su valor de probabilidad,  $P= 0.0732$ , se puede considerar como una no correlación entre ambos parámetros.

## **DISCUSIÓN.**

La obesidad es un factor de riesgo en desarrollar la patología del cáncer de mama en mujeres post-menopáusicas ya que mujeres pre-menopáusicas el efecto de la obesidad es aparentemente protector (Calle & Thun, 2004); sin embargo, en un estudio realizado por Harris *et al* en el 2011 con el fin de evaluar la relación de los niveles en suero de la leptina y el cáncer de mama en mujeres pre-menopáusicas, observaron una asociación inversa no significativa la cual estaba mediada por el índice de masa corporal (IMC) (Harris, et al., 2011); aunado a lo anterior en un estudio realizado por Harvie en el 2003 determinó que un incremento en la grasa superior central incrementaba el riesgo de cáncer de mama en mujeres pre-menopáusicas (Garofalo & Surmacz, 2006). Los resultados obtenidos arrojan una mayor incidencia de cáncer de mama con un elevado índice de masa corporal (IMC) y con una mayor edad de las pacientes, tal como se observa en la Gráfica 1, lo que coincide hasta el momento con lo reportado en la literatura.

Debido a que la cantidad de leptina está en proporción a la cantidad de grasa corporal y que se encuentra involucrada en la homeostasis energética, aunado a que se ha reportado en diversos estudios la presencia tanto de leptina como de su receptor en las células mamarias cancerígenas, nos llevó a evaluar si la presencia de los polimorfismos de nucleótido único (SNP) en los genes de la leptina (LEPG-2548A) y en el de su receptor (LEPR): Lys109Arg, Gln223Arg y Lys663Asn, facilitan o permiten el desarrollo del cáncer de mama.

Para determinar lo expuesto anteriormente lo primero que se evaluó fue la relación entre los polimorfismos de nucleótido único (SNP) presentes tanto en el gen de la leptina (LEPG-2548A) como en el gen del receptor de leptina (LEPR): Lys109Arg, Gln223Arg y Lys663Asn, la edad y el índice de masa corporal (IMC) con el cáncer de mama (Tabla 10), el valor obtenido de probabilidad es de 0.00001 lo que indica que los SNP's, la edad y el IMC guardan una relación con el cáncer de mama, dicha relación puede ser entendida como que dichas variables pueden ser utilizadas como predictores en el desarrollo de dicha patología a partir de la construcción de una ecuación lineal como la que se ha reportado anteriormente.

Posteriormente se analizó la repercusión de cada uno de los polimorfismos de nucleótido único en el desarrollo el cáncer de mama, lo anterior mediante una comparación de medias seguida de una prueba de diferencia mínima significativa de Fisher.

Para el SNP LEPG-2548A (rs7799039), se obtuvo que el genotipo correspondiente a A/A, fue significativamente diferente con respecto a los genotipos heterocigoto y homocigoto silvestre, se esperaba que el alelo de riesgo "A", representara un incremento en el riesgo tanto en su forma heterocigota como en su forma homocigota. Sin embargo, para la condición de heterocigocidad, G/A, aunque tuvo una mayor frecuencia en la muestra analizada (Tabla 17), ésta no representó una diferencia significativa al compararla con el genotipo silvestre G/G y el genotipo mutante A/A (Tablas 19 y 20), resultado que concuerda con el reportado en el estudio realizado por Cleveland *et al* en el 2010 con mujeres europeo-americanas.

Por otro lado para su condición de homocigocidad, el genotipo A/A, es significativamente diferente con respecto a los genotipos G/A y G/G (Tablas 19 y 20), pudiéndose interpretar dicha diferencia como un factor de riesgo de desarrollar cáncer de mama en mujeres obesas y post-menopáusicas (Gráfica 1), datos que coinciden con los resultados obtenidos en los estudios realizados en poblaciones de mujeres de Tunisia (Snoussi, 2006) y europeo-americanas (Cleveland, 2010).

Por otra parte, también se evaluó la correlación entre el SNP LEPG-2548A con el cáncer de mama (Tabla 30), para determinar si la presencia del SNP asegura la condición de cáncer de mama, se obtuvo un valor de correlación de 0.1031 con un valor de probabilidad  $P= 0.5002$ , que indica que la presencia del SNP en el gen de la leptina no va a condicionar el desarrollo del cáncer de mama.

En cuanto a los SNP's presentes en el gen del receptor de la leptina (LEPR), se han determinado como responsables de una alteración en el buen funcionamiento del receptor (Yiannakouris, et al., 2001), y el que más se ha estudiado y relacionado tanto con el cáncer de mama (Okobia, et al., 2008; Cleveland, et al., 2010) como con la obesidad (Liew, et al., 2009), es el Gln223Arg (rs1137101), dicho polimorfismo se localiza en el sitio de enlace con la leptina (Stratigopoulos, et al., 2009) y se caracteriza por una transición de Adenina (A) a Guanina (G) en el nucleótido 668 a partir del codón de inicio que convierte una glutamina a arginina en el codón 223. (Han, et al., 2008)

En el estudio que nosotros llevamos a cabo el resultado que se obtuvo para el alelo de riesgo "G" de dicho SNP, ya sea para su condición homocigota G/G o heterocigota G/A, no fue significativamente diferente con respecto al genotipo silvestre A/A (Tablas 25 y 26), lo que indica que la presencia de dicho SNP no incrementa el riesgo a padecer cáncer de mama, dicha información concuerda con los resultados reportados por Woo, 2006 (mujeres coreanas); Cleveland, 2010 y Gu, 2012 (mujeres caucásicas pre-menopáusicas).

Otro SNP presente en el gen del receptor de la leptina es el Lys109Arg (rs1137100), el cual en un estudio realizado por Liu *et al* en el 2007, dicho polimorfismo se asociaba con el tamaño del tumor. Los resultados que se obtuvieron para dicho polimorfismo son los siguientes, el genotipo silvestre A/A fue significativamente diferente (Tablas 23 y 24) con respecto a los genotipos A/G y G/G (riesgo), lo cual no coincide con lo reportado por el investigador antes citado, la relación que guarda

dicho polimorfismo es inversa, pudiéndose entender que el riesgo está dado por el genotipo silvestre A/A y no por el genotipo G/G.

El último SNP sometido a análisis fue el SNP Lys663Asn (rs8179183), el análisis de comparación de medias y la prueba de Fisher (Tablas 21 y 22) no muestran diferencias significativas entre los genotipos G/G (silvestre), G/C (heterocigoto) y C/C (riesgo), lo cual puede ser interpretado como que la presencia de dicho SNP no incrementa el riesgo de desarrollar cáncer de mama, datos que coinciden con lo reportado por Gu, 2012

La estructura de la glándula mamaria favorece una interacción muy cercana entre el tejido adiposo y el tejido mamario por lo tanto al presentarse un incremento en el tejido graso conlleva a alteraciones en los niveles séricos de leptina, adiponectina, estrógenos y factores inflamatorios, lo que en conjunto puede contribuir al desarrollo y progresión del cáncer de mama. (Koda, et al., 2007; Jardé, et al., 2011; Taliaferro-Smith, et al., 2013)

Con base en el argumento anterior se han realizado diversos estudios que han tenido como objetivo el determinar la existencia de una relación entre un incremento en las concentraciones de leptina y el riesgo a desarrollar un cáncer de mama; se ha prestado una mayor atención a dicha adipocina debido a que interactúa con las diferentes estirpes celulares que componen la mama induciendo: la infiltración de macrófagos dentro del tejido mamario, la adhesión celular, la angiogénesis y una

mayor disposición de estrógenos (Andò & Catalano , 2012), por lo que se le ha considerado un mitógeno para este carcinoma.

Los niveles de leptina se incrementan conforme existe un incremento en los depósitos grasos del organismo, sin embargo, también pueden incrementarse debido a la presencia del polimorfismo de nucleótido único (SNP) en el gen de la leptina a nivel de la región promotora, LEP (G-2548A), lo que facilita la expresión del gen e incrementa los niveles circulantes de leptina. (Cleveland, et al., 2010)

Se han realizado varios estudios en donde se han relacionado los niveles en suero de la leptina con el riesgo a padecer cáncer de mama, en algunos de ellos de manera simultánea también se han relacionado con la presencia del SNP LEPG-2548A, y el cáncer de mama.

En nuestro estudio realizamos las determinaciones en suero de la leptina en función del genotipo presente para el SNP LEPG-2548A, esperando que el genotipo A/A se correlacionara con un nivel mayor en la concentración de leptina y que esto a su vez se pudiera correlacionar con el cáncer de mama.

El aparente incremento en la concentración de leptina para el alelo de riesgo "A", en condición homocigota A/A, con respecto a los genotipos G/A y G/G, que se observa en la gráfica 6, no resultó significativo según el resultado de la prueba de Kruskal-Wallis de 3.14675 con una  $P= 0.207344$ , indicando que no existen diferencia entre

los grupos, lo cual se corroboró después al someter a un análisis multivariado (Tabla 30), que arroja un valor de correlación de 0.2697 con un probabilidad de  $P= 0.0732$ , que indica que el incremento en la concentración de la leptina no puede ser atribuido totalmente a la condición homocigota mutante A/A del SNP, lo cual es contrario a lo reportado por Terrasi *et al* en el 2009 en su estudio realizado con células cancerígenas y con el incremento de casi el doble en la secreción de leptina por adipocitos que portan el genotipo de A/A con respecto de los adipocitos que portan el genotipo G/G reportado por Hoffstedt en el 2002 (Snoussi, et al., 2006)

En la gráfica 7 se puede apreciar que la concentración de la leptina se encuentra elevada en las muestras provenientes de pacientes con un índice de masa corporal (IMC) mayor o igual a  $30 \text{ Kg/m}^2$  que representa una condición de obesidad con respecto a las muestras de las pacientes con un índice de masa corporal menor de  $25 \text{ Kg/m}^2$ , resultó significativo según el resultado de la prueba de Kruskal-Wallis 27.4593 y un valor de probabilidad de  $P= 1.60433\text{E-}7$ , lo que se corroboró al realizar el estudio de análisis multivariado, arrojando un valor de correlación de 0.8025, con una probabilidad de  $P= 0.00001$  (Tabla 30), indicando la concentración de la leptina variará con respecto al IMC, lo cual es coincide con los resultados reportados por Kamal en el 2010.

La gráfica 8 ilustra la variación en la concentración de leptina con respecto a la presencia de la patología de cáncer de mama, mostrando un aparente incremento en la concentración de leptina para las personas que no tienen cáncer mama, sin

embargo dicha diferencia no es significativa, acorde al resultado del estadístico de Kruskal-Wallis 0.107417 con una probabilidad de  $P= 0.743104$ . Posteriormente se realizó el análisis multivariado para evaluar una relación entre la concentración de leptina y el cáncer de mama obteniéndose un valor de correlación de  $-0.0377$  con una probabilidad  $P= 0.8060$ , lo cual indica una débil relación entre ambas variables, corroborando que la concentración de leptina, no cosiste en un factor de diagnóstico temprano para el cáncer de mama, lo cual coincide con lo reportado por Mantzoros (1999), Coskun (2003), Sauter (2004), Stattin (2004) y Woo (2006).

## **CONCLUSIONES.**

La presencia del genotipo A/A del SNP LEPG-2548A, presente en la región promotora del gen de la leptina, representa un riesgo a desarrollar cáncer de mama, dicho riesgo se incrementa conforme hay un aumento en el índice de masa corporal así como en la edad de la mujer (estado menopáusico).

La presencia de los SNP Lys109Arg, Gln223Arg y Lys663Asn en el del receptor de la leptina no representan un riesgo a desarrollar cáncer de mama.

El SNP LEPG-2548A no está relacionado con un incremento en la concentración en suero de la leptina. De igual forma, una alta concentración de leptina en suero no tiene ninguna correlación con el riesgo a desarrollar cáncer de mama.

Cabe recalcar que tanto el cáncer de mama como la obesidad están influidas genéticamente y son entidades multifactoriales, por lo que este estudio finalmente es manejado como un estudio piloto en una muestra de pacientes mexicanas para el genotificado de los SNP dirigidos basados en la literatura internacional, destacando que este mismo estudio da pie a seguir enriqueciendo información genética en estudios posteriores.

## Referencias.

- Andò, S. & Catalano, S., 2012. The multifactorial role of leptin in driving the breast cancer microenvironment. *Nature Reviews Endocrinology*, Volumen 8, p. 263–275.
- Calle, E. E. & Thun, M. J., 2004. Obesity and Cancer. *Oncogene*, Volumen 23, pp. 6365-6378.
- Cleveland, R. J. y otros, 2010. Common genetic variations in the LEP and LEPR genes, obesity and breast cancer incidence and survival. *Breast Cancer Research Treatment*, p. 745–752.
- Coll, A. P., Farooqi, I. S. & O'Rahilly, S., 2007. The Hormonal Control of Food Intake. *Cell*, 129(2), pp. 251-262.
- Córdoba Villalobos, J., 2010. *Estrategia contra el sobrepeso y la obesidad*. s.l.:Acciones del Gobierno Federal.
- Farooqi, I. S., 2011. Genetic, molecular and physiological insights into human obesity. *European Journal of Clinical Investigation*, 41(4), pp. 451-455.
- Farooqi, I. S. & O'Rahilly, S., 2005. New advances in the genetic of early onset obesity. *International Journal of Obesity*, Volumen 29, pp. 1149-1152.
- Farooqi, I. S. & O'Rahilly, S., 2007. Genetic factors in human obesity. *Obesity Reviews*, 8(1), pp. 37-40.
- Flier, J. S. & Maratos-Flier, E., 2010. Biology of Obesity. In: *Harrison's Gastroenterology and Hepatology*. Estados Unidos: McGraw Hill, pp. 599-609.
- Garofalo, C. & Surmacz, E., 2006. Leptin and Cancer. *Journal of Cellular Physiology*, Volumen 207, pp. 12-22.
- Gautron, L. & Elmquist, J. K., 2011. Sixteen years and counting: an update on leptin in energy balance. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(6), p. 2087–2093.
- González, R. R. y otros, 2009. Leptin-signaling inhibition results in efficient anti-tumor activity in estrogen receptor positive or negative breast cancer. *Breast Cancer Research*, 11(3), p. R36.
- Graham, R. y otros, 2005. Distinguishing Different DNA Heterozygotes by High- Resolution Melting. *Clinical Chemistry*, 51(7), pp. 1295-1298.
- Grossmann, M. E. y otros, 2010. Obesity and breast cancer: status of leptin and adiponectin in pathological processes. *Cancer and Metastasis Reviews*, 29(4), pp. 641-653.

- Han, C.-Z. y otros, 2008. Associations among Lipids, Leptin, and Leptin Receptor Gene Gln223Arg Polymorphisms and Breast Cancer in China. *Biological Trace Element Research*, 126(1-3), pp. 38-48.
- Harris, H. R., Tworoger, S. S., Hankinson, S. E. & Michels, K. B., 2011. Plasma leptin levels and risk of breast cancer in pre-menopausal women. *Cancer Prevention Research*, 4(9), pp. 1449-1456.
- Hu, X., Juneja, S. C., Maihle, N. J. & Cleary, M. P., 2002. Leptin—A Growth Factor in Normal and Malignant Breast Cells and for Normal Mammary Gland Development. *Journal of the National Cancer Institute*, 94(22), pp. 1704-1711.
- Ibrahim, M. M., 2010. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obesity Reviews*, 11(1), pp. 11-18.
- Ishikawa, M., Kitayama, J. & Nagawa, H., 2004. Enhanced Expression of Leptin and Leptin Receptor (OB-R) in Human Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, Volumen 10, p. 4325–4331.
- Jardé, T., Perrier, S., Vasson, M.-P. & Caldefie-Chézet, F., 2011. Molecular mechanisms of leptin and adiponectin in breast cancer. *European Journal of Cancer*, 47(1), pp. 33-43.
- Khandekar, M. J., Cohen, P. & Spiegelman, B. M., 2011. Molecular mechanisms of cancer development in obesity. *Nature Reviews Cancer*, Volumen 11, pp. 886-895.
- Knaut, F. y otros, 2009. Cancer de Mama en México: una prioridad apremiante. *Salus Pública de México*, 51(2), pp. S335-S344.
- Koda, M. y otros, 2007. Expression of leptin and its receptor in female breast cancer in relation with selected apoptotic markers. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 45(1), pp. 187-191.
- Liew, S.-F. y otros, 2009. Prevalence of the Leptin and Leptin Receptor Gene Variant and Obesity Risk Factors among Malaysian University Students of Setapak, Kuala Lumpur. *Asian Journal of Epidemiology*, 2(3), pp. 49-58.
- Lorincz, A. & Sukumar, S., 2006. Molecular links between obesity and breast cancer. *Endocrine-Related Cancer*, Volumen 13, p. 279–292.
- Macciò, A., 2011. Obesity, Inflammation, and Postmenopausal Breast Cancer: Therapeutic Implications. *TheScientificWorldJOURNAL*, p. 2020–2036.
- Mandeville, P. B., 2008. ¿Por qué se deben centrar las las covariables en la regresión lineal?. *Ciencia UANL*, XI(3), pp. 300-305.
- Nock, N. L. & Berger, N. A., 2010. Obesity and Cancer overview of Mechanisms. En: N. A. Berger, ed. *Cancer and Energy Balance, Epidemiology and Overview*. USA: Springer, pp. 129-179.
- Okobia, M. N. y otros, 2008. Leptin receptor Gln223Arg polymorphism and breast cancer risk in Nigerian women: A case control study. *BioMedCentral Cancer*, Volumen 8, p. 338.
- Park, J., Euhus, D. M. & Scherer, P. E., 2011. Paracrine and Endocrine Effects of Adipose Tissue on Cancer Development and Progression. *Endocrine Reviews*, 32(4), p. 550–570.

- Ronti, T., Lupattelli, G. & Mannarino, E., 2006. The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clinical Endocrinology*, 64(4), p. 355–365.
- Schwartz, M. W. y otros, 2000. Central nervous system control of food intake. *Nature*, Volumen 404, pp. 661-671.
- Snoussi, K. y otros, 2006. Leptin and leptin receptor polymorphisms are associated with increased risk and poor prognosis of breast carcinoma. *BioMedCentral Cancer*, 6(38).
- Stratigopoulos, G. et al., 2009. Functional consequences of the human leptin receptor (LEPR) Q223R transversion. *Obesity*, 17(1), p. 126–135.
- Sulkowska, M. y otros, 2006. Leptin – From Regulation of Fat Metabolism to Stimulation of Breast Cancer Growth. *Pathology & Oncology Research*, 12(2), p. 69–72.
- Taliaferro-Smith, L., Nagalingam, A. & Sharma, D., 2013. Integral Role of PTP1B in Adiponectin-Mediated Inhibition of Oncogenic Actions of Leptin in Breast Carcinogenesis. *Neoplasia*, 15(1), pp. 23-38.
- Terrasi, M. y otros, 2009. Functional analysis of the -2548G/A leptin gene polymorphism in breast cancer cells. *International Journal of Cancer*, 125(5), p. 1038–1044.
- Van Vliet-Ostaptchouk, J. et al., 2009. Genetic variation in the hypothalamic pathways and its role on obesity. *obesity reviews*, 10(6), pp. 593-609.
- Vona-Davis, L. & Rose, D. P., 2007. Adipokines as endocrine, paracrine and autocrine factor in breast cancer risk and progresion. *Endocrine- Related Cancer*, Volumen 14, pp. 189-206.
- WHO, 2010. *Non-Communicable Disease Profile Metabolic Risk Factors Overweight/Obesity Mexico*. [En línea]  
Available at: [www.who.int/es/](http://www.who.int/es/)  
[Último acceso: 28 Agosto 2011].
- Wittwer, C. T. y otros, 2003. High-Resolution Genotyping by Amplicon Melting Analysis Using LCGreen. *Clinical Chemistry*, 49(6), p. 853–860.
- Yiannakouris, N. y otros, 2001. The Q223R Polymorphism of the Leptin Receptor Gene Is Significantly Associated with Obesity and Predicts a Small Percentage of Body Weight and Body Composition Variability. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(9), p. 4434–4439.