



**Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Medicina  
División de estudios de posgrado e investigación**

**Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los  
Trabajadores del Estado**

**“Asociación del polimorfismo de un solo nucleótido  
G2548A del promotor del gen de leptina (rs7799039)  
y riesgo de diabetes mellitus tipo 2 en población  
mexicana”**

**Trabajo de investigación que presenta**

**Dr. Rubén Darío Barba Navarro**

**para obtener el diploma de la especialidad  
Medicina Interna**

**Asesor de Tesis:**

**Dra. Martha Eunice Rodríguez Arellano**

**Número de registro de protocolo 236.2011**



**Febrero de 2013**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Dr. Félix Octavio Martínez Alcalá**

Coordinador de CCAPADESI

**Dr. Guilebaldo Patiño Carranza**

Jefe de Enseñanza

**Dra. Martha Eunice Rodríguez Arellano**

Jefe de investigación

**Dr. Carlos Lenin Pliego Reyes**

Titular del curso de Medicina Interna

**Dra. Martha Eunice Rodríguez Arellano**

Asesor de Tesis

**El presente trabajo y el objetivo que le da razón de ser, el proceso de especialización en medicina interna, es dedicado a las personas que me han dado la fuerza para lograrlo, están en mi corazón y son mi razón de ser....**

**Mi padre, mi familia y la familia por venir**

## Índice

Resumen	6
Justificación	7
Objetivos	9
Introducción	10
Material y métodos	16
Resultados	19
Discusión	37
Conclusiones	39
Bibliografía	40

## Resumen

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es uno de los problemas de salud pública más importantes en México. Encontrar marcadores genéticos que se asocien con la enfermedad en la población permitirá la identificación temprana de sujetos en riesgo. Se buscó asociación del SNP G-2548-A (rs7799039) del promotor del gen de leptina.

**Material y métodos:** Se realizó estudio de casos y controles, con una muestra de 200 individuos, 100 con DM2 y 100 controles, de cada grupo el 50% fue obeso con IMC>30kg/m<sup>2</sup>. Se realizó caracterización genotípica para el SNP G-2548-A (rs7799039) mediante PCR en tiempo real; también se realizó historia clínica, examen físico completo y determinación de glucemia en ayuno, perfil de lípidos, urea, creatinina, ac. úrico e insulina.

**Resultados:** se detectó diferencia significativa entre grupo control y de individuos con DM2 para los siguientes antecedentes y parámetros: edad 48.34(±6.03) vs 55.29(±9.31), acantosis nigricans 2 vs 21%, nefropatía 0 vs 14%, hipertensión arterial 12 vs 47%, colesterol total 214.2(±33.8) vs 198.3(±41.4), HDL 47.7(±9.1) vs 43.9(±11.4), LDL 147.9(±30.6) vs 161.8(±40.7), triglicéridos 174.9(±59.0) vs 207.5(±125.8), La distribución genotípica y alélica para el grupo control fue AG 0.47, GG 0.39, AA 0.14, G 0.62 y A 0.37; para el grupo de individuos con DM2 fue AG 0.45, GG 0.41 AA 0.14. G 0.63 y A 0.36. No se encontró asociación significativa de genotipos ni alelos con DM2, esto incluyendo análisis para la población total y para subgrupos según sexo,

**Conclusiones:** No se demuestra asociación del SNP G-2548-A y DM2 en la población estudiada, Las frecuencias genotípicas del grupo control fueron los esperados de acuerdo a lo reportado en la literatura para poblaciones latinas.

## Justificación

La DM2 es uno de los problemas más importantes de salud pública en México. Debido a que el número de personas con DM2 crece en el mundo, la enfermedad toma una importancia nunca antes vista en las políticas de salud. Es la primera causa de muerte en nuestro país, por la cronicidad de la enfermedad, la severidad de sus complicaciones y los medios requeridos para controlarla, es un padecimiento costoso, por lo que es importante implementar medidas de prevención temprana en nuestra población.

El costo de DM2 no solo es financiero ya que tiene gran impacto sobre la calidad de vida de los pacientes y sus familias.

En el año 1991, se estimó en nuestro país un costo directo de la enfermedad de 330 millones de dólares, y uno indirecto de 100 millones, representó el 15.48% del gasto total destinado a salud y el 0.79% del producto interno bruto. El instituto nacional de salud pública de nuestro país estimó en 2005 que el gasto público aproximado destinado a diabetes fue de 320 millones de dólares equivaliendo al 4.7% de gasto público para la secretaría de salud y 6.5 para IMSS e ISSSTE

En 2004 en el ISSSTE la diabetes mellitus fue la quinta causa de estancia hospitalaria, equivaliendo a 219 millones de pesos, se gastaron 40 millones en medicamentos y estudios, 200 millones por hemodiálisis, y se otorgaron 205 mil días de incapacidad por DM2.

En el territorio nacional, se registra un aproximado de 40 mil defunciones anuales causadas por diabetes, cada hora se diagnostican 38 nuevos casos de diabetes.

La Federación Internacional de Diabetes estima que el incremento de la enfermedad en México de 1995 a 2025 será de 200%, sin la prevención la epidemia de diabetes continuará en incremento y se proyecta como una de las principales causas de muerte.

El encontrar marcadores genéticos que asocien con DM2 en la población mexicana permitirá la identificación de sujetos en riesgo de manera temprana, evitando o retrasando la aparición de la enfermedad mediante el establecimiento de medidas de prevención individualizada, que impactarán de manera directa en los programas



de salud, políticas de atención primaria y disminución de los costos de atención para esta enfermedad.

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Encontrar marcadores de riesgo genético para diabetes mellitus tipo 2 en el promotor de gen de leptina; con la finalidad de identificar individuos presintomáticos a los cuales se les ofrezcan medidas preventivas

### **Objetivos específicos**

1. Caracterización clínica y bioquímica de pacientes y controles
2. Genotipificación de individuos muestreados.
3. Analizar frecuencias alélicas y genotípicas del gen estudiado.
4. Correlacionar el SNP G-2548-A (rs7799039) con diabetes mellitus tipo 2.

## Introducción

La Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglucemia resultante en defectos en la secreción y acción de la insulina o ambas. La hiperglucemia crónica se asocia a daño, disfunción y falla de diferentes órganos especialmente ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos (1)

La DM 2 es la forma más común de diabetes a nivel mundial, con un 90% de los casos. La epidemia mundial está creciendo y se espera que el número de personas con diabetes se incremente del actual estimado de 285 millones en 2010 a 438 millones en 2030. Por lo tanto la DM2 se ha convertido en uno de los problemas de salud pública más importantes (3, 4)

Según datos de la Federación Internacional de Diabetes en 2012 a nivel mundial viven 371 millones de personas con diabetes, esto con una prevalencia de 8.3% y el 50% aún no son diagnosticados, la mitad de los diabéticos muere antes de los 60 años. En la región de Norteamérica y el Caribe existe un aproximado de 38 millones de personas con diabetes teniendo una prevalencia de 10.5% en población adulta de los cuales 29.2% no están diagnosticados. En México viven 10.6 millones de personas adultas con diabetes, de esta manera es el sexto país con más enfermos diabéticos en el mundo; con una prevalencia de 14.99%; ocurren 73 349 muertes relacionadas con diabetes al año, genera un gasto promedio de 816 dólares americanos por año para la atención de cada diabético. Se estima que para el año 2030 en México existirán 16.4 millones de adultos con diabetes esto con una prevalencia de 17.6%(5)

La patogénesis de la DM 2 es compleja e involucra la interacción de factores ambientales y genéticos. Los factores ambientales que particularmente han demostrado un rol crítico para el desarrollo de la enfermedad son la ingesta calórica excesiva y un estilo de vida sedentario lo que conlleva al desarrollo de obesidad. La presentación clínica también es heterogénea con un amplio rango de edad de inicio, gravedad de hiperglucemia y grado de obesidad. Desde un punto de vista fisiopatológico las personas con DM2 muestran tres anomalías críticas:

1. Resistencia a la acción de insulina en tejidos periféricos particularmente en músculo, tejido adiposo e hígado

2. Defecto en la secreción de insulina, particularmente en respuesta al estímulo de la glucosa
3. Producción incrementada de glucosa por el hígado

Recientemente se ha sugerido una lista de anormalidades cardinales en diabetes que pueden ser explicadas por lipólisis acelerada en adipocitos, deficiencia o resistencia de hormonas incretinas, hiperglucagonemia, incremento en la resorción tubular y el rol de la regulación metabólica por el sistema nervioso central.

La manera precisa de interacción entre los factores genéticos, ambientales y fisiopatológicos para el inicio de DM tipo 2 es desconocida exceptuando de algunas formas monogénicas.

Desde el punto de vista fisiopatológico existe incapacidad de las células beta pancreáticas a adaptarse a la reducción en la sensibilidad a insulina que tendrá como consecuencia el inicio de DM tipo 2. Las causas más comunes que incrementan la demanda de secreción de insulina por las células beta son pubertad, embarazo, estilo de vida sedentario e incremento de peso secundario a sobrealimentación. La predisposición genética parece ser un factor crítico que determina la frecuencia en la que ocurre falla de célula beta (2)

El receptor de insulina consiste en dos subunidades alfa y dos subunidades beta catalíticamente activas, ligadas por enlaces disulfuro en complejos heterotetraméricos alfa<sub>2</sub>-beta<sub>2</sub>. Cuando la insulina se une a los dominios alfa se activan las cinasas de tirosina de las subunidades beta intracelulares. (6) La subunidad beta del receptor de insulina también ha mostrado participar en la fosforilación serina/treonina, que puede disminuir la habilidad del receptor para autofosforilarse.

La subunidad beta fosforila a su contraparte en residuos tirosina específicos, que a su vez tienen funciones como la estimulación de asociación intermolecular de moléculas de señalización como el -- Sustrato del Receptor de la insulina (IRS), con varias isoformas (1,2,3,4,etc),

Los IRS actúan como proteínas distribuidoras multifuncionales activadas por la fosforilación de tirosina (7). Éstas poseen múltiples dominios funcionales – incluyendo el dominio con homología a pleckstrina (PH), dominio de unión a tirosina fosforilada (PTB) y dominios SH que interactúan con otras proteínas para mediar eventos

de señalización de insulina. PI3K, que es regulada por la interacción de proteínas IRS, es necesaria pero no suficiente para la estimulación del transportador de insulina 4 (GLUT4) mediando incremento en el transporte de glucosa en tejidos sensibles a insulina (10). El efecto primario de la insulina es la traslocación de GLUT4 a la membrana plasmática desde la reserva intracelular, principalmente en músculo esquelético, tejido adiposo y corazón (11).

La leptina es una hormona proteínica que ha sido postulada como factor de saciedad una vez unida a sus receptores en el hipotálamo(10). Esta hormona es constituida por 167 aminoácidos con una secuencia señal de 21 aminoácidos que se escinde antes de que la leptina pase por el torrente circulatorio; a un polipéptido de 146 residuos con un peso molecular de 16kD. Pertenece a la familia de las citocinas, su estructura incluye un paquete de 4 hélices alfa antiparalelas y tres hélices que conectan al paquete anterior, tiene 4 giros beta y un enlace disulfuro entre los residuos aminoácidos 117 y 167. Presenta muy pocas diferencias interespecies, así que la leptina humana presenta una homología del 84% con la del ratón y de 83% con la de la rata.(11).

La leptina presenta un ritmo circadiano relacionado, entre otros, con la pauta de ingesta, aumentando a lo largo del día en humanos (hábitos diurnos) y disminuyendo en roedores (hábitos nocturnos)(12). Su secreción es pulsátil y está regulada por insulina y otras hormonas (13). Se produce y secreta por tejido adiposo, sus concentraciones séricas reflejan la cantidad del mismo, destaca su capacidad para regular el apetito y el gasto energético vía sistema nervioso central al interactuar con neurotransmisores específicos vía serotonina, noradrenalina, dopamina, colecistocinina y neuropéptido Y, entre otros, a través de los cuales es capaz de modular los centros nerviosos de saciedad y apetito localizados en los núcleos paraventriculares y mediales del hipotálamo(11).

En los humanos los niveles de leptina incrementan conforme incrementa el tejido adiposo, se encuentran elevados en la mayoría de los obesos, sugiriendo que su funcionamiento inadecuado se debe a fenómenos de resistencia a su acción fisiológica, por lo que se ha postulado el concepto de resistencia a la leptina (14,15).

Los niveles séricos de leptina oscilan entre 1-15ng/mL en personas con normopeso, en individuos con índice de masa corporal >30 se pueden encontrar valores de 30ng/mL o incluso superiores. El

aclaramiento de la leptina es rápido, con una vida media de 25 minutos en el caso de la endógena y de 90 minutos para la exógena, la eliminación se produce en gran parte a nivel renal (16).

Una vez secretada al torrente circulatorio, la leptina circula parcialmente unida a proteínas plasmáticas, debe llegar a su órgano blanco, se reconocida por receptores proteínicos en la superficie de la membrana plasmática, Se han detectado receptores de Leptina (Ob-R) en casi todos los tejidos y se han encontrado varias isoformas dependiendo del órgano blanco. EL receptor más largo un polipéptido de alrededor de mil aminoácidos insertado en la membrana celular con dominios extracelular, transmembranal e intracelular, lo que indica una posible función de transducción de la señal al interior de la célula. Este receptor es abundante en hipotálamo, región de gran importancia en la regulación del peso corporal. Un receptor de menor talla para la leptina ya que carece del dominio intracelular se localiza en hipotálamo y otros tejidos como pulmones, riñones y cerebro, existe otro receptor aún más pequeño que carece de dominios transmembranal e intracelular y probablemente su función es transportar leptina en plasma. Las isoformas Ob-Ra, Ob-Rb, Ob-Rc, Ob-Rd y Ob-Rf presentan dominios transmembrana, aunque solamente el receptor Ob-Rb, que es la isoforma más larga, contiene una región Box 2 que permite la activación de la Janus Kinasa (JAK). Según se ha descrito, una vez que la leptina se une al receptor Ob, éste se dimeriza y se puede unir a estas proteínas JAK que, a su vez, fosforilan residuos de tirosina que serán, entonces reconocidos por las proteínas STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) citosólicas que se unen a estos residuos de tirosina fosforilados. Por su parte, las proteínas Janus Kinasa fosforilan a estas proteínas formándose dímeros de proteínas STAT que son capaces de activar la transcripción de determinados genes diana en el núcleo celular (17-19).

La leptina se encarga de la regulación del balance energético: control del apetito y consecuentemente del peso corporal. Actúa a nivel de sistema nervioso central inhibiendo la producción de neuropéptidos hipotalámicos, que incluyen el neuropéptido Y, el más potente factor estimulante del apetito conocido; la hormona estimulante de los melanocitos (αMSH), el péptido Agouti Related (AgRP), la hormona liberadora de corticotropina (CRH) o la colecistoquinina (CCK) entre otros (20).

En un principio se observó que la administración de leptina a ratones ob/ob ocasiona una disminución del peso corporal, de la temperatura corporal así como de la ingesta. A nivel del metabolismo de la glucosa, la administración de leptina exógena normaliza la hiperglucemia y la hiperinsulinemia observada en los modelos animales de obesidad genética. Entre los mecanismo implicados, la leptina inhibe la secreción de insulina por las células b-pancreáticas, estimula la utilización de glucosa, particularmente mediante la captación desde el músculo esquelético y promueve el transporte de glucosa a través del intestino delgado. Sobre el metabolismo lipídico, estimula la lipólisis en el adipocito, tanto in vivo como in vitro, provoca una modificación del reparto lipídico en el tejido muscular, estimula la termogénesis en el tejido adiposo marrón y es capaz de aumentar la síntesis de ácidos grasos en el hígado (12, 18, 20, 21).

La obesidad es el principal factor ambiental que desencadena DM2. Numerosos estudios corroboran la participación genética en el control del comportamiento de ingesta alimentaria y el gasto de energía. (20)

La justificación de que factores genéticos tienen una carga importante en el desarrollo de DM2 está apoyada por la mayor incidencia de la enfermedad en algunas familias, mayor prevalencia en diversos grupos étnicos y alta concordancia de incidencia en gemelos monocigotos.

Para entender el papel de los genes que contribuyen en el desarrollo de diabetes se han estudiado aquellos que codifican para las proteínas que participan en la incorporación y el metabolismo de la glucosa. Se han seguido tres estrategias para identificar genes responsables de DM2: clonación posicional, genes candidatos y expresión diferencial de genes. En el estudio de genes candidatos se analizan la frecuencia de polimorfismos de diversos genes que codifican para proteínas involucradas en la regulación de la glucosa y se compara en grupos de personas sanas y diabéticos.

Se ha demostrado la presencia de la asociación de leptina con diabetes, y con el metabolismo de glucosa e insulina (22,23).

Mammes sugirió que las mutaciones en el promotor de la leptina (21) o en los sitios reguladores podrían afectar la expresión de la proteína y descubrió que existe un polimorfismo G/A en el locus 2548 en el promotor del gen, que se relaciona con niveles de leptina sérica en poblaciones occidentales (24).

Li encontró asociación significativa con obesidad extrema en población caucásica y afroamericana (53).

Mammes, en el 2000 asociación significativa con obesidad no mórbida y resistencia a la insulina en hombres caucásicos (15); Le Stunff en el 2000 encontró asociación significativa con obesidad; Ren Wei y Cols. describieron la asociación de este polimorfismo con diabetes mellitus en una población china (25). Y finalmente Tsu-Nai Wang describió asociación con obesidad extrema en aborígenes Taiwaneses (26).



## Material y métodos

Se realizó un estudio de casos y controles, con un total de 200 individuos participantes distribuidos en los siguientes: grupo problema con sujetos con diagnóstico de DM2 50 y sujetos con diagnóstico de DM2 sin obesidad 50; grupo control con sujetos sin diagnóstico de DM2 ni obesidad 50 y sujetos con obesidad sin diagnóstico de DM2 50.

El reclutamiento de individuos se realizó en los servicios consulta externa de medicina interna y endocrinología, hospitalización medicina interna del Hospital Regional Lic. Adolfo López Mateos, consulta externa de unidades de medicina familiar del ISSSTE y en CLIDDA (Clínica de detección y diagnóstico automatizado) ISSSTE, también fue incluida población no derechohabiente al ISSSTE tolo lo anterior en ciudad de México.

Los criterios de inclusión fueron: 1. Grupo de problema: hombres o mujeres mayores de 30 años, diagnóstico de DM2 con obesidad (índice de masa corporal  $>30$ ) y diagnóstico de DM2 sin obesidad (índice de masa corporal  $<30$ ): 2. Grupo control: Hombres o mujeres mayores de 30 años, sin diagnóstico de DM2 con obesidad (índice de masa corporal  $>30$ ) o sin diagnóstico de DM2 sin obesidad (índice de masa corporal  $<30$ ).

Fueron excluidos los individuos que:

1 No contaron con historia clínica completa, antropometría, resultados de glucosa plasmática en ayuno y perfil de lípidos; 2. Presentar diabetes mellitus tipo 1, gestacional u otro tipo de diabetes diferente a DM2; 3. Que no acepten participar en el estudio

Se solicitó firma de consentimiento informado a los sujetos de estudio, se realizó historia clínica endocrinológica con énfasis en antecedentes familiares de DM2, examen físico que incluyó medición de la presión arterial, peso, talla, relación de diámetros de cintura cadera, índice de masa corporal (obtenido de dividir el peso en kilogramos entre el cuadrado de la estatura en metros).

A los pacientes se les tomó una única muestra de sangre de 5cc posterior a 12 horas de ayuno, con la cual se determinó la glucemia, colesterol total, colesterol de alta densidad, triglicéridos. La

determinación de colesterol de baja densidad se obtuvo de a partir de la fórmula de Friedwald.

Con la misma muestra sanguínea se obtuvo ADN genómico mediante un kit comercial (Qiagen® Flexigene Kit) El ADN fue cuantificado mediante un kit comercial (Picogreen® DSDNA Quantitation kit). Posteriormente fue utilizado para ensayos de genotipificación.

El sistema TaqMan® se basa en la actividad de la exonucleasa 5'-3' de la Taq ADN polimerasa, que da lugar al rompimiento de las sondas marcadas con fluorescencia durante la reacción de PCR, midiéndose posteriormente la intensidad de la fluorescencia, La sonda TaqMan® se alinea entre los dos oligonucleótidos lo cual permite la alineación de la sonda antes de los oligonucleótidos, esto evita un producto de PCR sin emisión de la señal fluorescente, y por lo tanto permite la detección del producto. Las sondas TaqMan® tienen dos moléculas fluorescentes, una actúa como molécula reportera de los alelos mutantes (6-carboxifluoresceína, FAM) y otra (VIC) es reportera de los alelos silvestres. Ambas tienen asociada una segunda molécula denominada apagadora, por lo que se mantiene su espectro de emisión apagado, debido a la proximidad espacial tanto de FAM como de VIC, de tal manera que la fluorescencia total es igual a cero. La degradación de la sonda TaqMan® por la ADN polimerasa liberada de la molécula reportera, la cual al estar espacialmente alejada de la molécula apagadora origina un aumento de fluorescencia, mismo que se incrementa cada vez que la sonda es degradada; así, el incremento en la intensidad de emisión de fluorescencia está en relación directa con la aparición del producto amplificado.

La técnica de PCR en tiempo real fue realizada por un equipo 7500 marca Applied Biosystems con el sistema TaqMan® Universal Master Mix. Las reacciones se llevaron a cabo utilizando 12.5µg de TaqMan® Universal Master Mix que incluye la enzima AmpliTaq Golden DNA plomerase, AmpErase UNG, dNTPs con dUTP, una molécula fluorescente como referencia pasiva, 0.625µl de la mezcla de oligonucleótidos y sondas TaqMan, con una concentración 36µM y 8µM, respectivamente y aproximadamente 20 µg de DNA genómico. El volumen de la reacción se completó a 25µl con agua. Las condiciones utilizadas en el termociclador fueron las siguientes: 50°C durante 2 min, seguido de 95° durante 10 min y 40 ciclos de : 95°C por 15s y 60°C por 1min, Al final de la reacción se realizó la discriminación alélica

El análisis estadístico del estudio de casos y controles fue: Las variables continuas se analizaron mediante la prueba de t de "Student" y las discontinuas por  $\chi^2$  en el programa estadístico SPSS 15.0. El riesgo relativo se calculó mediante razón de momios con un intervalo de confianza de 95% y una  $p < 0.05$ . Las comparaciones de los genotipos para los patrones de herencia y con las variables clínicas y antropométricas se realizaron utilizando regresión logística.

## Resultados

### Características de la población

Se incluyeron 200 individuos: 100 (50%) casos (diabéticos), 100 (50%) controles (no diabéticos). Para cada uno de estos grupos 50% hombres y 50% mujeres.

#### Edad

El promedio de edad fue de 48.34 ( $\pm 6.03$ ) años para controles y 55.29 ( $\pm 9.31$ ) para casos mostrando diferencia significativa

#### Tabaquismo

Dentro de los hábitos deletéreos de los individuos se interrogó si el paciente presentaba tabaquismo positivo activo, los resultados reportaron que en la población total estudiada, 25% del grupo control y 25% del grupo casos fuman activamente, lo cual no presenta diferencia significativa.

#### Índice de masa corporal (IMC)

La determinación del IMC nos permite evaluar en base a la medición del peso y la talla, los kilogramos por metro cuadrado de superficie corporal del paciente, y consecuentemente su estado nutricional utilizando los siguientes parámetros: 20-25: peso normal, 25.1-30: sobrepeso; 30.1-35: obesidad grado 1, 35-1-40: obesidad grado 2 y > de 40: obesidad grado 3 o mórbida.

La condición de obesidad se presentó en 50% de ambos grupos controles y casos, sin diferencia significativa por sexo

En nuestra población observamos que no existe una diferencia significativa entre los controles y los casos, el grupo de control presentó un IMC de 30.19 (30.2 en hombres y 30.1 en mujeres), en comparación con los casos que en promedio presentaron un IMC de 30.22 (29.8 en hombre y 30.5 en mujeres).

#### Cardiopatía isquémica

Solo se presentó un individuo con antecedente de cardiopatía isquemia en grupo control y otro en grupo caso por lo que no existe diferencia significativa

#### Evento vascular cerebral

Se encuentra antecedente de evento vascular cerebral en solo dos individuos del grupo de casos sin encontrar diferencia significativa con el grupo control

### **Acantosis nigricans**

El signo clínico de acantosis nigricans que ha sido descrito como una manifestación clínica de resistencia a la insulina fue encontrado en 21% de individuos del grupo de casos y 2% del grupo control, con esto una diferencia significativa

### **Tratamiento con insulina**

Este antecedente fue reportado solo en 41% de los individuos del grupo de casos

### **Hipertensión arterial sistémica**

12% del grupo de casos y 47% del grupo control presentaron antecedente de hipertensión arterial sistémica y con esto diferencia significativa

### **Dislipidemia**

La dislipidemia definida como triglicéridos séricos mayores a 150mg/dL o colesterol total mayor a 200mg/dL, o la ausencia de tal condición con tratamiento farmacológico hipolipemiente, se presentó en 96% de los controles y 86% de los casos con diferencia significativa.

El tratamiento farmacológico hipolipemiente se presentó en 10% de los controles y 32% de los casos con diferencia significativa

### **Nefropatía**

El 14% de los casos refirieron padecer nefropatía mientras no se presentó tal antecedente en controles, por lo que existe diferencia significativa. 2% recibió tratamiento de sustitución renal sin que esto representara diferencia estadísticamente significativa

### **Glucosa sérica**

El promedio de glucosa sérica fue 124.4mg/dL para grupo de casos y 98.3mg/dL para grupo de controles, con diferencia significativa

### **Triglicéridos**

Los triglicéridos presentaron promedio de 207.5mg/dL para grupo de casos y 174.9mg/dL para grupo de controles, con diferencia significativa

### **Colesterol total**

Se presentó colesterol total promedio de 198.3mg/dL para grupo de casos y 214.2mg/dL para grupo de controles, con diferencia significativa

### **Lipoproteínas de alta densidad (HDL) y lipoproteínas de baja densidad (LDL)**

Los HDL presentaron promedio de 43.9mg/dL para grupo de casos y 47.7mg/dL para grupo de controles, con diferencia significativa; este parámetro solo fue procesado para 61% de los casos y 98% de los controles. La determinación de LDL se realizó mediante la siguiente fórmula,  $LDL = \text{colesterol total} - (\text{triglicéridos}/5) - (HDL)$ , considerándose válida si los triglicéridos son  $< 400$ , el LDL fue estimado para 56% de los casos y 98% de los controles, teniendo promedio de 161.8 mg/dL para los casos y 147.9mg/dL para los controles con diferencia significativa.

### **Insulina**

La insulina sérica obtuvo un promedio de 9.1mU/mL para grupo de casos y 9.6mU/mL para grupo de controles, sin diferencia significativa; este parámetro solo fue procesado para 54% de los casos y 72% de los controles

### **Nitrógeno ureico sanguíneo (BUN) y creatinina**

La determinación de BUN y creatinina se realizó en 66% de grupo de casos y 100% de grupo control, los promedios de BUN son 14.5 y 17.0mg/dL y para creatinina 0.82 y 0.88mg/dL para los grupos de controles y casos respectivamente, no se encontró diferencia significativa

### **Ácido Úrico**

Los promedios de ácido úrico fueron 5.7 y 5.4mg/dL para grupo controles y casos, sin diferencia significativa. Este parámetro fue reportado en 98% y 29% de controles y casos.

Características de la población total (200)			
Variable	controles (100)	casos (100)	P
Edad	48.34 ( $\pm$ 6.03)	55.29 ( $\pm$ 9.31)	<0.05
Sexo masculino	50%	50%	1.0
Tabaquismo	25 %	25%	1.0
Obesidad	50%	50%	1.0
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	30.19 ( $\pm$ 5.04)	30.22 ( $\pm$ 6.41)	0.978
Cariopatía isquémica	1%	1%	1.0
Evento vascular cerebral	0%	2%	0.155
Acantosis nigricans	2%	21%	<0.001
Hipertensión arterial sistémica	12%	47%	<0.001
Dislipidemia	96%	86%	0.013
Tratamiento farmacológico hipolipemiante	10%	32%	<0.001
Nefropatía	0%	14%	<0.001
Tratamiento sustitutivo renal	0%	2%	0.155
Glucosa (mg/dL)	98.3 ( $\pm$ 9.7)	124.42 ( $\pm$ 49.70)	<0.001
Triglicéridos (mg/dL)	174.9( $\pm$ 59.0)	207.5( $\pm$ 125.8)	0.02
Colesterol total (mg/dL)	214.2( $\pm$ 33.8)	198.3( $\pm$ 41.4)	0.003
HDL (mg/dL)	47.7( $\pm$ 9.1)	43.9( $\pm$ 11.4)	0.019

LDL (mg/dL)	147.9( $\pm$ 30.6)	161.8( $\pm$ 40.7)	0.018
Insulina (mU/mL)	9.6( $\pm$ 5.2)	9.1( $\pm$ 5.9)	0.68
BUN (mg/dL)	14.5( $\pm$ 3.4)	17.0( $\pm$ 9.1)	0.012
Creatinina (mg/dL)	0.82( $\pm$ 0.16)	0.88( $\pm$ 0.45)	0.23
Ac. úrico (mg/dL)	5.7( $\pm$ 1.5)	5.4( $\pm$ 1.5)	0.24



## Distribución genotípica y frecuencias alélicas

### Grupo Control

En la distribución genotípica del grupo control, el heterocigoto AG (0.47) fue el más frecuente, seguido por el homocigoto GG (0.39) y el menos frecuente fue el homocigoto AA (0.14). Con respecto a la frecuencia del alelo G -2548 en el promotor del gen de la leptina fue del 0.62 y para el alelo A fue de 0.37, por lo que en nuestra población el alelo G es el silvestre y el A el polimórfico.

Distribución genotípica y frecuencias alélicas en grupo control del SNP G-2548-A en el promotor del gen de leptina					
Genotipo	Frecuencia	Total	Alelo	Frecuencia	Total
GG	0.39	39	G	0.625	125
AG	0.47	47	A	0.375	75
AA	0.14	14			
TOTAL		100			200

Para determinar si el SNP G-2548 A del promotor del gen de la leptina se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg se utilizaron las frecuencias alélicas del grupo control, descritas previamente, que fueron para el alelo G de 0.625 y para el alelo A 0.375. La distribución genotípica de la población no fue diferente a la distribución esperada. Es decir, el SNP G-2548 A en esta población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Equilibrio de Hardy-Weinberg		
Genotipos	Observadas	Esperadas
GG	39	39
AG	47	47
AA	14	14
TOTAL	100	100

### Grupo de casos

En la distribución genotípica del grupo de pacientes con DM2, el heterocigoto AG (0.45) fue el más frecuente, seguido por el homocigoto GG (0.41) y el menos frecuente fue el homocigoto AA (0.14). Con respecto a la frecuencia del alelo G -2548 en el promotor del gen de la leptina fue del 0.63 y para el alelo A fue de 0.36.

Distribución genotípica y frecuencias alélicas en pacientes con DM2 del SNP G-2548-A en el promotor del gen de leptina					
Genotipo	Frecuencia	Total	Alelo	Frecuencia	Total
GG	0.41	41	G	0.63	127
AG	0.45	45	A	0.36	73
AA	0.14	14			
TOTAL		100			200

### Población total

En la distribución genotípica de población total, el heterocigoto AG (0.46) fue el más frecuente, seguido por el homocigoto GG (0.40) y el menos frecuente fue el homocigoto AA (0.14). Con respecto a la frecuencia del alelo G -2548 en el promotor del gen de la leptina fue del 0.63 y para el alelo A fue de 0.37.

Distribución genotípica y frecuencias alélicas en población total del SNP G-2548-A en el promotor del gen de leptina					
Genotipo	Frecuencia	Total	Alelo	Frecuencia	Total
GG	0.40	80	G	0.37	148
AG	0.46	92	A	0.63	252
AA	0.14	28			
TOTAL	1.00	200			400

### **Análisis comparativo entre frecuencias de alelos y distribución genotípicas entre casos y controles**

Cuando se realizó el análisis comparativo entre las frecuencias alélicas del SNP G-2548-A del promotor del gen de la leptina existió diferencia entre los pacientes con DM 2 y los controles, observándose que la frecuencia del alelo A presenta una frecuencia de 0.36 en individuos con DM2 y de 0.37 en controles, mientras que la frecuencia del alelo G es (0.53 vs. 0.62), sin embargo esta diferencia no fue significativa. No se observó asociación del alelo A con DM2 (OR 0.96 IC 0.63-1.47  $p=0.83$ ) ni tampoco asociación del alelo G con protección en sujetos control (OR 1.04 IC 0.68-1.60  $p=0.83$ ).

Frecuencias alélicas del SNP G-2548-A en el promotor del gen de leptina en pacientes con DM2 y controles		
Grupo	Frecuencias	Alélicas
	G	A
Casos (100)	127 (0.635)	73 (0.365)
Controles (100)	125 (0.625)	75 (0.375)
OR 1.04 IC 0.68-1.60 $p=0.83$		

Frecuencias alélicas del SNP G-2548-A en el promotor del gen de leptina en pacientes con DM2 y controles		
Grupo	Frecuencias	Alélicas
	A	G
Casos (100)	73 (0.365)	127 (0.635)
Controles (100)	75 (0.375)	125 (0.625)
OR 0.96 IC 0.63-1.47 p= 0.83		

### **Distribución de genotipos del SNP G-2548-A en el promotor del gen de leptina en individuos con DM2 y controles**

En cuanto a las distribuciones genotípicas; el homocigoto G presentó un porcentaje de aparición mayor en los casos que en controles (41% vs. 39%), sin embargo la diferencia no es significativa y el porcentaje de homocigotos A no mostro diferencia en porcentaje entre los grupos (14% en ambos).

Distribución de genotipos del SNP G-2548-A en el promotor del gen de leptina en individuos con DM2 y controles			
Sitio	Genotipo	Controles n=100	Casos N=100
	GG	39	41
-2548	GA	47	45
	AA	14	14

### **Frecuencias alélicas del SNP G-2548-A en el promotor del gen de leptina en pacientes con diabetes y controles hombres**

Los resultados por género en los hombres, las frecuencias alélicas indicaron una mayor frecuencia del alelo G en los casos y una mayor frecuencia del alelo A en los controles.

Frecuencias alélicas del SNP G-2548-A en el promotor del gen de leptina en pacientes con diabetes y controles hombres		
Hombres (100)	G	A
Casos (50)	65 (0.65)	35 (0.35)
Controles (50)	58 (0.58)	42 (0.42)
OR 1.34 IC 0.73-2.48 p= 0.31		

Frecuencias alélicas del SNP G-2548-A en el promotor del gen de leptina en pacientes con diabetes y controles hombres		
Hombres (100)	A	G
Casos (50)	35 (0.35)	65 (0.65)
Controles (50)	42 (0.42)	58 (0.58)
OR 0.74 IC 0.40-1.37 p= 0.31		

### **Frecuencias alélicas del SNP G-2548-A en el promotor del gen de leptina en pacientes con diabetes y controles mujeres**

Los resultados indican, a diferencia de los hombres, mayor frecuencia de alelo G en controles y mayor frecuencia de alelo A en casos. No hay diferencias significativas

Frecuencias alélicas del SNP G-2548-A en el promotor del gen de leptina en pacientes con diabetes y controles mujeres		
Hombres (100)	G	A
Casos (50)	62 (0.62)	38 (0.38)
Controles (50)	67 (0.67)	33 (0.33)
OR 0.80 IC 0.43-1.50 p=0.46		

Frecuencias alélicas del SNP G-2548-A en el promotor del gen de leptina en pacientes con diabetes y controles mujeres		
Hombres (100)	A	G
Casos (50)	38 (0.38)	62 (0.62)
Controles (50)	33 (0.33)	67 (0.67)
OR 1.24 IC 0.67-2.32 p=0.46		

### **Distribuciones genotípicas del SNP G-2548-A en el promotor del gen de leptina en hombres**

Al analizar las distribuciones genotípicas en los hombres, se evidencia un aumento en la proporción del genotipo homocigoto G en los controles (40% vs. 34%) así como un aumento en la frecuencia del genotipo homocigoto A en los casos (18% vs. 10%).

Distribuciones genotípicas del SNP G-2548-A en el promotor del gen de leptina en hombres			
Hombres	GG	AG	AA
Casos (50)	17 (34%)	24 (48%)	9(18%)
Controles (50)	20(40%)	25(50%)	5(10%)

OR en diferentes alelos del SNP G-2548-A en el promotor del gen de leptina			
Comparación de alelos en población total	OR	IC	P
G vs. A	1.04	0.68-1.60	0.83
A vs. G	0.96	0.63-1.47	0.83
Comparación de alelos en hombres			
G vs. A	1.34	0.73-2.48	0.31
A vs. G	0.74	0.40-1.37	0.31
Comparación de alelos en mujeres			
G vs. A	0.80	0.43-1.50	0.46
A vs. G	1.24	0.67-2.32	0.46

### Distribuciones genotípicas del SNP G-2548-A en el promotor del gen de leptina en mujeres

En mujeres a diferencia de los hombres, presentaron aumento en la proporción del genotipo homocigoto G en los casos (44% vs. 42%) así como un aumento en la frecuencia del genotipo homocigoto A en los controles (18% vs. 10%).

Distribuciones genotípicas del SNP G-2548-A en el promotor del gen de leptina en mujeres			
Mujeres	GG	AG	AA
Casos (50)	22 (44%)	23 (46%)	5(10%)
Controles (50)	21(42%)	20(40%)	9(18%)

### Comparación de frecuencias genotípicas dominantes con recesivas

Al comparar en toda la población estudiada frecuencias genotípicas recesivas vs. dominantes, (GG vs. GA/AA y AA vs GA/GG), no se corrobora asociación.

Comparación de frecuencias genotípicas dominantes con recesivas		
Frecuencia genotípica dominante	GG	AG/AA
Casos (100)	41	59
Controles (100)	39	61
Total (200)	80	120
OR 1.09 IC 0.59-1.99 p=0.77		



Comparación de frecuencias genotípicas dominantes con recesivas		
Frecuencia genotípica dominante	AA	AG/GG
Casos (100)	14	86
Controles (100)	14	86
Total (200)	28	172
OR 1.0 IC 0.42-2.38 p=1.0		

### **Comparación de frecuencias genotípicas dominantes con recesivas en hombres**

Al comparar en la población masculina las frecuencias genotípicas recesivas vs. dominantes, (GG vs. GA/AA y AA vs. GA/GG), no se corrobora pero se observa tendencia a asociación del alelo G con enfermedad ni del alelo A con protección.

Comparación de frecuencias genotípicas dominantes con recesivas en hombres		
Frecuencia genotípica dominante	GG	AG/AA
Casos (50)	20	30
Controles (50)	17	33
Total (100)	37	63
OR 1.29 IC 0.53-3.17 p= 0.53		

Comparación de frecuencias genotípicas dominantes con recesivas en hombres		
Frecuencia genotípica dominante	AA	AG/GG
Casos (50)	5	45
Controles (50)	9	41
Total (100)	14	86
OR 0.51 IC 0.13-1.84 p= 0.25		

### Comparación de frecuencias genotípicas dominantes con recesivas en mujeres

Al comparar en la población femenina las frecuencias genotípicas recesivas vs. dominantes, (GG vs. GA/AA y AA vs. GA/GG), no se corrobora pero se observa tendencia a asociación del alelo G con enfermedad ni del alelo A con protección.

Comparación de frecuencias genotípicas dominantes con recesivas en mujeres		
Frecuencia genotípica dominante	GG	AG/AA
Casos (50)	21	29
Controles (50)	22	28
Total (100)	43	57
OR 0.92 IC 0.39-2.2 p=0.84		

Comparación de frecuencias genotípicas dominantes con recesivas en mujeres		
Frecuencia genotípica dominante	AA	AG/GG
Casos (50)	9	41
Controles (50)	5	45
Total (100)	14	86
OR 1.98 IC 0.54-7.48 p=0.25		

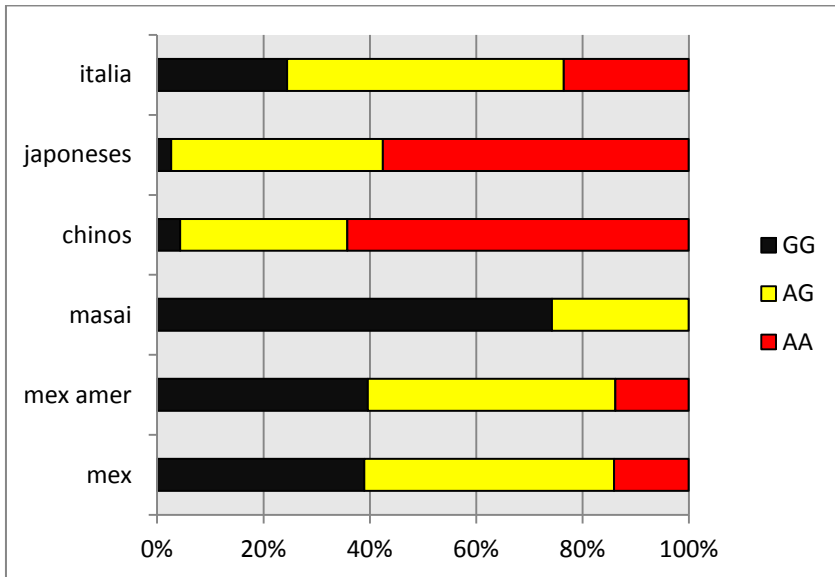
OR en diferentes genotipos del SNP G-2548-A en el promotor del gen de leptina			
Comparación de genotipos en toda la población	OR	IC	P
GG vs. GA/AA	1.09	0.59-1.99	0.77
AA vs. GA/GG	1.0	0.42-2.38	1.0
Comparación de genotipos en hombres			
GG vs. GA/AA	1.29	0.53-3.17	0.53
AA vs. GA/GG	0.51	0.13-1.84	0.25
Comparación de genotipos en mujeres			
GG vs. GA/AA	0.92	0.39-2.2	0.84
AA vs. GA/GG	1.98	0.54-7.48	0.25

### Frecuencias alélicas y distribuciones genotípicas del SNP G-2548-A en el promotor del gen de leptina en nuestra población comparada con otras poblaciones

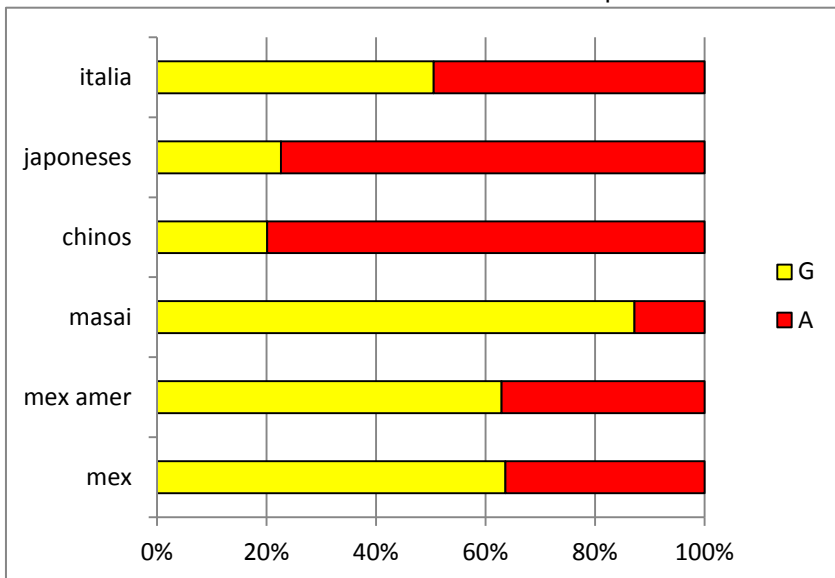
En el siguiente cuadro se muestran las distribuciones alélicas y genotípicas reportadas en distintas poblaciones y comparadas con la que se estudia en el presente documento. Los datos fueron obtenidos de HapMap

Frecuencias alélicas y distribuciones genotípicas del SNP G-2548-A en el promotor del gen de leptina en nuestra población comparada con otras poblaciones				
Población	Genotipo	Frecuencia	Frecuencia de alelo G	Frecuencia de alelo A
Mexicana (100)	GG	0.39 (39)	0.625	0.375
	AG	0.47 (47)		
	AA	0.14 (14)		
MEX-AMER (58)	GG	0.397 (23)	0.629	0.371
	AG	0.466(27)		
	AA	0.138 (8)		
MASAI (152)	GG	0.743	0.872	0.128
	AG	(113)		
	AA	0.257(39) 0		
CHINOS (137)	GG	0.044 (6)	0.201	0.799
	AG	0.314 (43)		
	AA	0.642 (88)		
JAPONESES (113)	GG	0.027 (3)	0.226	0.774
	AG	0.398(45)		
	AA	0.575(65)		
ITALIANOS (102)	GG	0.245 (25)	0.505	0.495
	AG	0.52(53)		
	AA	0.235 (24)		

Gráfica de distribución genotípica en diferentes poblaciones



Gráfica de distribución alélica en diferentes poblaciones



## Discusión

Los grupos control y de individuos con diabetes mediante el diseño del estudio fueron iguales en composición por sexo y por los antecedentes de obesidad (los promedios de IMC no tienen diferencia significativa).

No se encuentra diferencia significativa en cuanto a antecedentes de tabaquismo, cardiopatía isquémica, evento vascular cerebral y dislipidemia. Como parte de las complicaciones crónicas de diabetes se documentó antecedente de nefropatía en 14% de los diabéticos y en ningún control.

Para dislipidemia se encontró una alta prevalencia en la en ambos grupos control y casos (0.96, 0.86). Se observó mayor hipertrigliceridemia promedio en diabéticos 174.9 vs 207.4mg/dL, esto se relaciona con peores niveles glucémicos del grupo de casos 98.3 ( $\pm 9.7$ ) vs 124.42 ( $\pm 49.70$ )mg/dL; En cuanto al colesterol promedio se encontró mayor elevación en grupo control 214.2( $\pm 33.8$ ) vs 198.3( $\pm 41.4$ )mg/dL esto pudiendo ser explicado porque los diabéticos reciben con mayor frecuencia tratamiento farmacológico hipolipemiante 10% vs 32%, el perfil de lípidos observado fue más aterogénico en diabéticos por mayor LDL 147 vs 161mg/dL y menor HDL 47.7 vs 43.9mg/dL, esto últimos consistente con los cambios esperados en perfil de lípidos del diabético. Todo lo anterior con diferencias significativas.

La frecuencia alélica y geotípica de los controles es la esperada en relación a la reportada en el grupo de mexico-americanos en HapMap.

No fue posible establecer asociación significativa entre genotipos o alelos con el desarrollo de diabetes ni en población total ni al analizarlos por sexo, más aún contrario a lo descrito en la literatura el Alelo A presentó mayor frecuencia en grupo de controles con excepción del subgrupo femenino.

El presente trabajo se realiza como estudio piloto dentro de un proyecto con una muestra objetivo de 1600, los resultados es posible que sean resultado de un epifenómeno y al incrementar la muestra presenten significancia estadística.

Ya que el grupo de individuos con diabetes presenta mayor edad, es posible que individuos controles al alcanzar la edad promedio de los casos desarrollen DM, por lo que será importante aparear por edad a grupos en futuros estudios.

La asociación entre el SNP G2538A y trastornos en el metabolismo de glucosa o diabetes ha sido descrita en poblaciones no latinas por lo cual es importante corroborar tal fenómeno en latinos y especialmente mexicana.

### **Conclusiones**

1. La distribución alélica y genotípica de la población estudiada es la esperada de acuerdo a la reportada para latinos.
2. El presente trabajo no demuestra asociación significativa entre genotipos o alelos estudiados y la condición de diabetes, existe mayor frecuencia de alelo A en controles contrario a lo reportado en otros estudios.
3. Nuestra población tiene asociado a diabetes trastornos de perfil de lípidos aterogénicos y pocos reciben tratamiento farmacológico.



## Bibliografía

1. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2012;35(Suppl 1):S64–S71
2. Buse J, Polonsky K, Burant C. Type 2 Diabetes Mellitus. In: Melmed S, et al. *Williams textbook of endocrinology*.—12th ed. : USA . Elsevier: 2011: 1371-1534
3. Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*. 2001;414:782-787.
4. Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract*. 2010;87:4-14.
5. IDF Diabetes Atlas 5<sup>th</sup> Edition 2012 Update
6. White MF, Kahn CR. The insulin signaling system. *J Biol Chem*.1994;269:1-4.
7. White MF. The IRS-signaling system: a network of docking proteins that mediate insulin and cytokine action. *Recent Prog Horm Res*.1998;53:119-138.
8. Czech MP, Corvera S. Signaling mechanisms that regulate glucose transport. *J Biol Chem*. 1999;274:1865-1868.
9. Zorzano A, Sevilla L, Tomas E, et al. Trafficking pathway of GLUT4 glucose transporters in muscle. *Int J Mol Med*. 1998;2:263-271.
10. Pisbarro, R., Irrazabal, E., Recalde, A., Barrios, E., Arocena, A., Aguirre, B., Garcia-Loriente, J., Bonifazio, J., 1999. Leptina: una hormona secretada por el tejido adiposo. Primer estudio en muestra poblacional uruguaya. *Rev Med Uruguay* 15: 43–48.
11. Gong, D., Bi, S., Pratley, R., Weintraub, B., 1996. Genomic structure and promoter analysis of the human obese gene. *J Biol Chem*. 271:3971-3974.
12. Considine, R., Considine, E., Williams, C., Hyde, T., Caro, J., 1996. The hypothalamic leptin receptor in humans: identification of incidental sequence polymorphisms and absence of the db/db mouse and fa/fa rat mutations. *Diabetes*. 45:992-994.
13. Turpeinen, A., Haffner, S., Louheranta, A., Niskanen, L., Miettinen, H., Uusitupa, M., 1997. Serum leptin in subjects

- with impaired glucose tolerance in relation to insulin sensitivity and first-phase insulin response. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 21:284-287.
14. Montague, C., Farooqi, I., Whitehead, J., Soos, M., Rau, H., Wareham, N., Sewter, C., Digby, J., Mohammed, S., Hurst, J., Cheetham, C., Earley, A., Barnett, A., Prins, J., O'Rahilly, S., 1997. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature.* 387:903-908.
  15. Mohamed-Ali, V., Pinkney, J., Panahloo, A., Goodrick, S., Coppack, S., Yudkin, J., 1997. Relationships between plasma leptin and insulin concentrations, but not insulin resistance, in non-insulin-dependent (type 2) diabetes mellitus. *Diabet Med.* 5:376-380.
  16. Haffner, S., Mykkänen, L., Gonzalez, C., Stern, M., 1998. Leptin concentrations do not predict weight gain: the Mexico City Diabetes Study. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 22:695-699.
  17. Pelleymounter, M., Cullen, M., Baker, M., Hecht, R., Winters, D., Boone, T., Collins, F., 1995. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 269:540-543.
  18. Vaisse, C., Halaas, J., Horvath, C., Darnell, J.Jr., Stoffel, M., Friedman, J., 1996. Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice. *Nat Genet.* 14:95-97.
  19. Ghilardi, N., Ziegler, S., Wiestner, A., Stoffel, R., Heim, M., Skoda, R., 1996. Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:6231-6235.
  20. Campfield, L., Smith, F., Guisez, Y., Devos, R., Burn, P., 1995. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science.* 269:546-549.
  21. Peters, R., Boekholdt, S., 2002. Gene polymorphisms and the risk of myocardial infarction. An emerging relation. *N Engl J Med.* 24:1963-1965.
  22. Newman, B., Selby, J., King, M., Slemenda, C., Fabsitz, R., Friedman, G., 1987. Concordance for type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in male twins. *Diabetologia.* 10:763-768.

23. Barnett, A., Eff, C., Leslie, R., Pyke, D., 1981. Diabetes in identical twins. A study of 200 pairs. *Diabetologia*. 2:87-93.
24. Halaas, J., Gajiwala, K., Maffei, M., Cohen, S., Chait, B., Rabinowitz, D., Lallone, R., Burley, S., Friedman, J., 1995. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*. 269:543-6.
25. Widjaja, A., Stratton, I., Horn, R., Holman, R., Turner, R., Brabant, G., 1997. UKPDS 20: plasma leptin, obesity, and plasma insulin in type 2 diabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 2:654-7.
26. Cambien, F., Poirier, O., Mallet, C., Tiret, L., 1997. Coronary heart disease and genetics in epidemiologist's view. *Mol Med Today*. 5:197-203.