

## Expresión de leptina en linfocitos (ARNm)

M.L. TRUJILLO GÜIZA<sup>a</sup>, O. CHAPARRO GARZÓN<sup>b</sup>  
E I. MOCKUS SIVICKAS<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Unidad de Bioquímica. Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. <sup>b</sup>Sección Sueros. Instituto Nacional de Salud. Bogotá. Colombia.

La leptina desempeña funciones en la regulación del apetito y la homeostasis energética, pero también ejerce acciones en el sistema inmune. La expresión de esta hormona y de su receptor se ha demostrado en múltiples tejidos. En linfocitos de sangre periférica se ha observado únicamente la expresión del receptor de leptina y resulta de interés establecer si en estas células se expresa también la hormona, donde podría ejercer una acción autocrina y/o paracrina. En el presente trabajo se determina mediante RT-PCR la expresión del gen de leptina (ARNm) en linfocitos de sangre periférica en un grupo de 23 niños de 8 años de edad y en un grupo de 14 adultos. Se demuestra la expresión de la leptina en 15 de los niños del grupo de 8 años, mientras que no se detecta la expresión de la hormona en ninguno de los adultos. Se observa que los niños que expresan leptina en estas células presentan índices de masa corporal menores en comparación con los niños que no expresan la hormona ( $p < 0,01$ ). Se sugiere que la regulación de la expresión de leptina en linfocitos es diferente a la descrita en tejido adiposo. Además, los resultados obtenidos permiten considerar que la expresión en linfocitos podría estar regulada durante el desarrollo. Es necesario realizar estudios más amplios para establecer el papel de leptina sobre el sistema inmune y su regulación durante el crecimiento y desarrollo.

### LEPTIN EXPRESSION (mRNA) IN LYMPHOCYTES

**Leptin plays an important regulatory role not only in appetite and energy homeostasis but also in some functions of the immune system. The expression of this hormone and its receptor has been demonstrated in several tissues. However, only leptin receptor expression has been observed in peripheral blood lymphocytes and it is important to establish whether leptin is also expressed in these cells, where they could exert an autocrine and/or paracrine action. In the present study, expression of the leptin gene (mRNA) in peripheral blood lymphocytes was determined by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) in a group of 23 eight-year-old children and in another group of 14 adults. RT-PCR showed leptin expression in 15 of the eight-year-old children but no evidence of leptin expression was found in adults. Children expressing leptin in lymphocytes had lower body mass indexes than those that did not express this hormone ( $p < 0,01$ ). These results suggest that the regulation of leptin expression in lymphocytes differs from that described in adipocytes. Moreover, expression of this hormone in lymphocytes could be regulated during development. Further studies with greater numbers of patients are required to determine the role of leptin in the immune system and its regulation during growth and development.**

*Key words:* Leptin. Leptin expression (mRNA). Lymphocytes. Immune system.

La leptina es una molécula clave en el control de la homeostasis energética y en la regulación del apetito. Es producida principalmente en el tejido adiposo blanco y en menores cantidades en el tejido adiposo pardo, algunas regiones del cerebro, estómago, placenta, epitelio gástrico y músculo esquelético<sup>1-5</sup>. Sus concentraciones séricas se relacionan con la cantidad y porcentaje de grasa corporal y con el índice de masa corporal (IMC)<sup>1,6,7</sup>. Los adipocitos de la médula ósea secretan leptina en la vecindad de células de la línea hematopoyética sugiriendo que esta hormona está comprometida en la hematopoyesis, regulando la mielopoyesis, eritropoyesis y linfopoyesis. La leptina ejerce efectos sobre la respuesta de linfocitos T, y regula su proliferación y memoria<sup>8,9</sup>. Esta hormona ejerce primordialmente sus acciones por medio de receptores tipo citocina. Se ha encontrado que el receptor de leptina se expresa en múltiples órganos como hígado, pulmón, riñón, placenta, músculo esquelético, intestino delgado, estómago y tejido adiposo entre

*Palabras clave:* Leptina. Expresión de leptina (ARNm). Linfocitos. Sistema inmune.

Correspondencia: Dra. I. Mockus Sivickas.  
Ctra. 43 A N.º 22 A-46. Bogotá, D.C. Colombia.  
Correo electrónico: imockus@multihone.net.co

Manuscrito recibido el 2-7-2001; aceptado para su publicación el 4-2-2002.

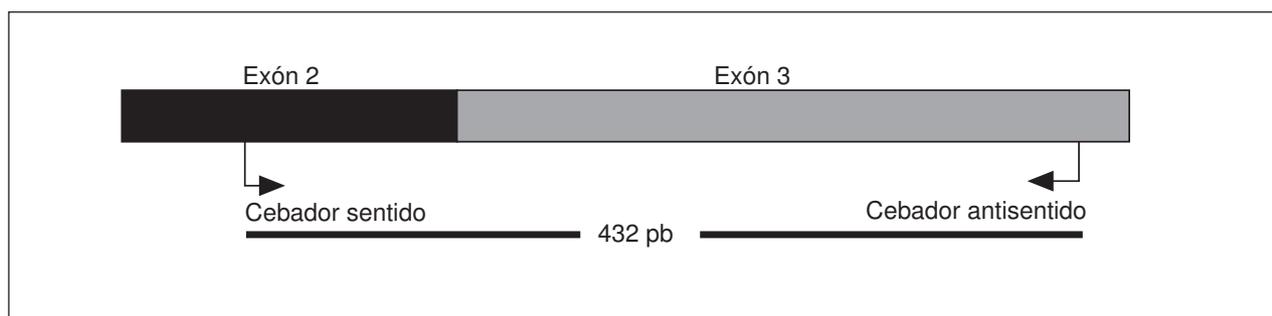


Fig. 1. Fragmento amplificado a partir de los exones 2 y 3 del gen de leptina en humano. Las flechas indican el sentido de los cebadores utilizados en la amplificación de un fragmento correspondiente a un tamaño de 432 pb.

otros<sup>3-7</sup>. Valores elevados del receptor han sido detectados además en macrófagos y linfocitos<sup>6,7</sup>. La transcripción, en tejido adiposo, músculo esquelético y en estómago, tanto de la leptina como de su receptor<sup>6</sup>, sugiere una acción paracrina y autocrina de esta citocina. La expresión de leptina y de su receptor en varios tejidos y las acciones de esta hormona sobre el sistema inmune<sup>6,7</sup> conducen a la necesidad de establecer si los linfocitos expresan no sólo el receptor sino también la hormona y determinar si existe alguna relación entre la expresión de leptina en linfocitos y algunos parámetros antropométricos. En este trabajo se estudia la expresión (ARNm) en linfocitos de sangre periférica de un grupo de niños prepúberes y se compara con la de un grupo de adultos clínicamente sanos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizó la expresión de leptina mediante la técnica de transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) en dos grupos de individuos: el grupo 1 constituido por 23 niños bogotanos con edades comprendidas entre  $\geq 8$  y  $< 9$  años, y el grupo 2 constituido por 14 adultos, de edades entre 18 y 32 años. Todos los participantes eran clínicamente sanos, sin síntomas de enfermedades infecciosas o de ingesta de medicamentos o suplementos de vitaminas y/o minerales en los 30 días previos al examen. En el grupo 1 la población estuvo conformada por 11 niñas y 12 varones y el grupo 2 por 7 varones y 7 mujeres. Se determinó el IMC para cada uno de los participantes y para cada grupo se estableció el promedio más o menos desviación estándar. Ninguno de los niños examinados presentaba inicio del desarrollo sexual puberal (Tanner 1). El trabajo cumplió con las disposiciones de la resolución n.º 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia, sobre aspectos éticos y sociales en investigaciones con menores de edad<sup>10</sup>. Tras un ayuno de 12 h se obtuvieron muestras de sangre venosa para aislar los linfocitos mediante Ficoll-Paque Plus®. El ARN de los linfocitos se aisló con Trizol® según la metodología descrita por Chomczynski et al<sup>11</sup>. Se utilizó como control positivo para las RT-PCR tejido adiposo de una mujer obesa. Se diseñaron 2 cebadores según la secuencia de una librería de ADNc de leptina de adipocitos humanos que codifica para 167 aminoácidos<sup>12</sup> (fig. 1): cebador sentido 5' CTATGTCCAAGCTGTGCCCAT 3' y cebador antisentido

5' GGCTGAGGTCCAGC TGCCAC 3'. Se amplificó un fragmento del gen de beta-actina humano<sup>13</sup> como control positivo de la RT-PCR. A partir del ARN total de linfocitos se obtuvo el ADNc con *Super Script™ Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis* (GibcoBRL-Life Technologies) y las reacciones de amplificación se realizaron con PCR Supermix (GibcoBRL). La RT se llevó a cabo en un volumen de 20  $\mu$ l con OligodT incubando 50 min a 42 °C y se inactivó la enzima a 72 °C por 15 min, 2  $\mu$ l del producto de la RT fueron amplificados en una mezcla de 50  $\mu$ l de reacción con 45  $\mu$ l de PCR Supermix y 200 nM de cada cebador. Las condiciones para la PCR fueron: 94 °C por 2 min y 32 ciclos: 94 °C por 30 s, 50 °C por 30 s y 72 °C por 45 s y se finalizó a 72 °C por 10 min. Las condiciones de RT-PCR para el control beta-actina fueron las mismas que para leptina. Se utilizó como marcador de peso molecular *123 bp DNA ladder* (GibcoBRL). Para determinar los valores séricos de leptina en niños, se utilizó un estuche comercial de microelisa, *Active Human Leptin Elisa* (Diagnostic Systems Laboratories, Inc.). Éste es un inmunoensayo de tipo sandwich de dos pasos amplificado enzimáticamente que tiene una sensibilidad o límite de detección mínimo de 0,05 ng/ml y coeficientes de variación intra e inter-ensayo menores al 4,0% y el 6,6%, respectivamente<sup>14</sup>.

Las muestras se analizaron por duplicado y se procedió de acuerdo con las instrucciones del estuche.

## Análisis estadístico

Se compararon los grupos mediante el test de la t de Student. Para el estudio de correlaciones se utilizó el coeficiente de Pearson. Se consideró significancia estadística a partir de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

A partir del ARN total aislado de linfocitos, se observó en el grupo 1 amplificación del fragmento de 432 pb (fig. 1) correspondiente a leptina, en 15 de las 23 muestras. En el grupo 2 no se obtuvo amplificación del fragmento de 432 pb correspondiente a leptina en ninguna de las muestras (fig. 2). En todas las muestras se detectó beta-actina.

En la tabla 1 se presentan las edades y los índices de masa corporal de los 15 niños que expresan leptina en linfocitos, de los niños que no la expresan y de los

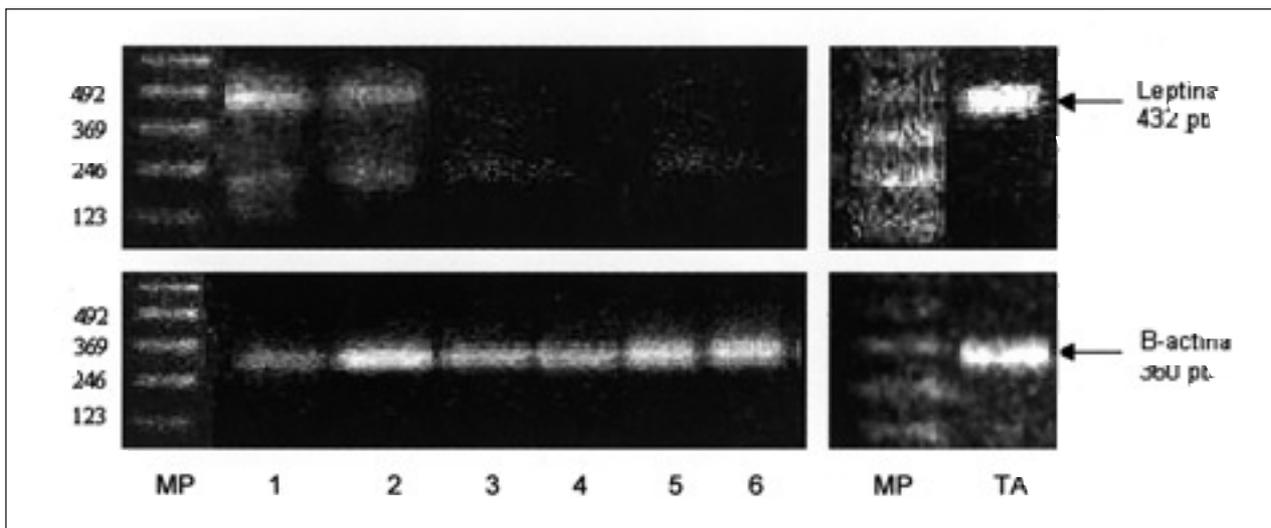


Fig. 2. Expresión del gen de leptina en linfocitos. Se presentan algunas fotografías de las RT-PCR representativas de la expresión de ARNm de leptina y beta-actina (control) en linfocitos. Marcador de peso molecular (MP). Las líneas 1 y 2 corresponden a niños del grupo 1 que expresan leptina en linfocitos; las líneas 3 y 4 son muestras de niños del grupo 1 que no expresan leptina en linfocitos; la línea 5 corresponde a un adulto obeso del grupo 2 y la línea 6 corresponde a un adulto no obeso del grupo 2. Tejido adiposo (TA).

**TABLA 1. Edad e índice de masa corporal en los sujetos estudiados**

Grupo		Edad (años) Promedio ± DE	IMC (kg/m <sup>2</sup> ) media ± DE
Grupo 1	Toda la población (n = 23)	8,6 ± 0,2	15,5 ± 1,5
	Niños que expresan leptina en linfocitos (n = 15)	8,6 ± 0,2	14,8 ± 1,0*
	Niños que no expresan leptina en linfocitos (n = 8)	8,5 ± 0,2	16,7 ± 1,5
Grupo 2	Toda la población (n = 14)	20,8 ± 3,8	25,4 ± 5,4
	Adultos no obesos (n = 7)	19,3 ± 0,9	20,7 ± 1,8
	Adultos obesos (n = 7)	22,3 ± 4,6	30,2 ± 2,3

Los niños se clasifican según la expresión de leptina en linfocitos. Ninguno de los adultos expresa leptina. Significación estadística: \*p < 0,01.

**TABLA 2. Distribución de los sujetos del grupo 1 por sexo**

N	Niños			Niñas		
	Expresión 8	No expresión 4	p	Expresión 7	No expresión 4	p
Edad media ± DE (años)	8,5 ± 0,2	8,6 ± 0,2	NS	8,7 ± 0,2	8,4 ± 0,2	NS
IMC media ± DE (kg/m <sup>2</sup> )	15,0 ± 0,9	17,1 ± 2,1	< 0,05	14,6 ± 1,1	16,4 ± 0,9	< 0,05
Leptina media ± DE (ng/ml)	1,68 ± 1,32	3,29 ± 1,30	NS	1,53 ± 0,73	2,74 ± 1,90	NS

Comparación de número, edad, índice de masa corporal y valores séricos de leptina según la expresión o no de leptina en linfocitos.

14 adultos. El grupo de niños que no expresa leptina presenta IMC mayor (p < 0,01) que los niños que sí expresan la hormona. Es de anotar que, a diferencia de los niños, no se detectó en ningún adulto expresión de leptina en linfocitos, a pesar del amplio rango de IMC de estos sujetos.

Al comparar los sujetos del grupo 1 que expresan la leptina en linfocitos con los que no la expresan, se encuentra que los primeros presentan niveles séricos de leptina significativamente inferiores (1,61 ± 1,05 frente a 3,01 ± 1,53 ng/ml; p < 0,02).

Se observa una correlación positiva entre los niveles séricos de leptina y el IMC de los sujetos del grupo 1 (r = 0,73; p < 0,001).

El grupo 1 está constituido por 11 niñas y 12 niños; no se encuentran diferencias en las edades (8,6 ± 0,2 frente a 8,5 ± 0,2 años), IMC (15,3 ± 1,3 frente a 16,7 ± 1,7 kg/m<sup>2</sup>) ni valores séricos de leptina (1,97 ± 1,33 frente a 2,20 ± 1,50 ng/ml) al comparar todos los individuos del grupo según el sexo.

En la tabla 2 se presentan distribuidos por sexo los promedios ± desviación estándar (DE) de las edades, de los IMC y de los valores séricos de leptina de los sujetos del grupo 1. Se observa que la proporción de niñas y niños que expresa la hormona en linfocitos es similar (7/11 y 8/12, respectivamente). Cuando se discriminan los sujetos según el sexo, no se observan diferencias en las edades entre los individuos

que expresan leptina en linfocitos y los que no lo hacen; el IMC es significativamente menor en los individuos que sí expresan la hormona en linfocitos. Si bien se observan valores menores de leptina sérica en los individuos que expresan la leptina en linfocitos, la diferencia no es estadísticamente significativa al separar por sexos.

## DISCUSIÓN

Según nuestro conocimiento ésta es la primera vez que se logra detectar la expresión de leptina ARNm en linfocitos de sangre periférica. En este trabajo se demuestra que 15 de los 23 niños estudiados expresan a escala transcripcional el gen de la leptina en linfocitos circulantes.

Al medir los valores séricos de leptina en los niños, se encuentra una correlación positiva entre las concentraciones de la hormona y el IMC. Investigaciones anteriores han demostrado que los niños obesos secretan más leptina que los que no lo son y que los valores séricos de esta hormona se correlacionan con la cantidad de tejido adiposo<sup>1,4,6,7,15</sup>. A su vez, estudios previos han mostrado una relación positiva de los valores circulantes de leptina con el porcentaje de masa grasa y el IMC. En el presente trabajo se utiliza el IMC ya que es fácil de establecer, y ha sido un parámetro ampliamente utilizado y recomendado por varios grupos de investigación como indicador de adiposidad<sup>16-20</sup>.

En la bibliografía se describen diferencias en los valores séricos de leptina entre los sexos, y los valores son mayores en mujeres; este dimorfismo sexual no se ha detectado en la niñez ni en la prepubertad, en tanto que se hace evidente en estadios de desarrollo sexual Tanner 4 y/o 5<sup>21</sup>. En este trabajo se confirma que los niños y niñas de 8 años de edad, con estadio de desarrollo sexual Tanner 1, no presentan diferencia en los valores circulantes de leptina.

Al considerar el IMC y la expresión de leptina en linfocitos, se encuentra que el grupo de niños que expresa la hormona en linfocitos presenta un promedio de IMC significativamente inferior que el grupo que no la expresa; además, sus valores séricos de leptina son menores. Estos resultados sugieren que los mecanismos de regulación de la expresión de leptina en linfocitos difieren de los del tejido adiposo. El hecho de que en el grupo de 14 adultos no se detecte la expresión de la leptina, mientras que ésta sí se observa en varios niños, permite sugerir que la expresión de leptina en linfocitos podría estar regulada durante el desarrollo. Al parecer, a medida que se avanza en el crecimiento y se aumenta de peso la leptina deja de expresarse en los linfocitos. Acontecimientos relacionados con la prepubertad, como modificaciones en la secreción de hormonas hipofisarias y gonadales, podrían estar ejerciendo influencias sobre la expresión del gen de leptina en linfocitos; pero los resultados de este trabajo no permiten argüir una relación entre de-

sarrollo prepuberal y expresión de leptina en estas células, ya que no se estudiaron gonadotropinas ni hormonas sexuales.

Finalmente, el hallazgo del presente trabajo en conjunto con los resultados de otros autores sobre la expresión de receptores de leptina en linfocitos sugiere que la leptina podría ejercer funciones autocrinas y/o paracrinas en el sistema inmune.

En conclusión, las observaciones sobre la expresión del gen de la leptina en los niños con los índices de masa corporal más bajos, pero no en los adultos analizados, plantean la necesidad de ampliar los estudios para establecer si, como sugieren estos resultados, el gen de la leptina en linfocitos de sangre periférica está sometido a una regulación durante el desarrollo.

## AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestro agradecimiento a los niños participantes, CINDEC Universidad Nacional de Colombia y Dr. José Peñaranda.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Houseknecht KL, Baile CA, Matteri RL, Spurlock ME. The biology of leptin: a review. *J Anim Sci* 1998;5:1405-20.
2. Esler M, Vaz M, Collier G, Nestel P, Jennings G, Kaye D, et al. Leptin in human plasma is derived in part from the brain, and cleared by the kidneys. *Lancet* 1998;351:879.
3. Wang J, Liu R, Hawkins M, Barzilai N, Rossetti L. A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature* 1998;393:684-8.
4. Harris R. Leptin- much more than a satiety signal. *Annu Rev Nutr* 2000;20:45-75.
5. Auwerx J, Staels B. Leptin. *Lancet* 1998;351:737-42.
6. Flier J. Leptin expression and action: new experimental paradigms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:4242-5.
7. Baile CA, Della-Fera MA. Regulation of metabolism and body fat mass by leptin. *Annu Rev Nutr* 2000;20:105-27.
8. Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, Lechler RI. Leptin modulates the T-cell immune response and reserves starvation-induced immunosuppression. *Nature* 1998; 394:897-901.
9. Martín-Romero C, Santos-Álvarez J, Goberna R, Sánchez-Margalet V. Human leptin enhances activation and proliferation of human circulating T lymphocytes. *Cellular Immunology* 2000;199:15-24.
10. Ministerio de Salud, Dirección Desarrollo Científico y Tecnológico. Normas Científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud. Resolución N.º 008430 de 1993. Santafé de Bogotá. D.C. 1993.
11. Chomczynski P, Sacchi N. Single step method for RNA isolation by acid guanidine thiocyanate-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-61.
12. Considine RV, Considine EL, Williams CJ, Nyce MR, Magosin SA, Bauer TL, et al. Evidence against either a premature stop codon or the absence of obese gene mRNA in human obesity. *J Clin Invest* 1995;95:2986-9.
13. Álvarez-Domínguez C, Stahk P. Interferon-selectively induces Rab5a synthesis and processing in mononuclear cell. *J Biol Chem* 1998;273:33901-4.
14. Imagawa K, Matsumoto Y, Numata Y, Morita A, Kikuoka S, Tamaki M, et al. Development of a sensitive ELISA for human leptin, using monoclonal antibodies. *Clin Chem* 1998;44:2165-71.
15. Palmert MR, Radovick S, Boepple PA. Leptin levels in chil-

**Trujillo Güiza ML, et al. Expresión de leptina en linfocitos (ARNm)**

- dren with central precocious puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:2260-5.
16. Blum WF, Engaro P, Hanitsch S, Juul A, Hertel NT, Müller J, et al. Plasma leptin levels in healthy children and adolescents: dependence on body mass index, body fat mass, gender, pubertal stage and testosterone. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:2904-10.
  17. Seidell JC. Obesity: a growing problem. *Acta Paediatr Suppl* 1999;428:46-50.
  18. Kennedy A, Gettys TW, Watson P, Wallace P, Ganaway W, Pan Q, et al. The metabolic significance of leptin in humans: gender-based differences in relationship to adiposity, insulin sensitivity, and energy expenditure. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:1293-300.
  19. Sardinha LB, Going SB, Texeira PJ, Lohman TG. Receiver operating characteristic analysis of body mass index, triceps skinfold thickness, and arm girth for obesity screening in children and adolescents. *Am J Clin Nutr* 1999;70:1090-5.
  20. Lazarus R, Baur L, Webb K, Blyth F. Adiposity and body mass indices in children: Benn's index and other weight for height indices as measures of relative adiposity. *Int J Obes Relat Metab Disor* 1996;20:406-12.
  21. Horlick MB, Rosenbaum M, Nicolson M, Levine LS, Fedun B, Wang J, et al. Effect of puberty on the relationship between circulating leptin and body composition. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:2509-18.