



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE QUIMICA

" Validación del método analítico para la determinación de adiponectina y leptina en suero de pacientes con cáncer de mama. "

TESIS

PARA OBTENER EL TITULO DE
QUÍMICO FARMACEUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

YOUSSEF PAOLO MENDOZA ZENIL

DIRECTOR

M. en C. Jonnathan Guadalupe Santillán Benítez

ASESOR

Dra. En CS. Eneida del Socorro Camarillo Romero



TOLUCA, MÉXICO

JUNIO 2013

Dedicatorias

A Dios Por darme vida, salud, inteligencia y llenarme de bondad cada día de mi vida, por ser un compañero que nunca me abandonara en el camino y ponerme ángeles como los son mis padres familiares y amigos.

A mis padres Gracias por su invaluable apoyo emocional que me llevado a lograr grandes cosas y hoy es una de las más importantes de nuestras vidas, no me queda más que agradecer su valor por cada día luchado para que yo obtuviera esta satisfacción, simplemente son los mejores los amo.

Al M. en C. Jonnathan Guadalupe Santillán Benítez Por ser un gran director de tesis, no hubiera podido ser posible llevar a cabo esta investigación sin su ayuda, sus conocimientos, su orientación, su dedicación, su apoyo, su tiempo, pero sobre todo su amistad.

A la Dr. Eneida del Socorro Camarillo Romero Principalmente por la gran persona que es, me llevo de usted grandes enseñanzas pero sobre todo su cariño, gracias por todo el apoyo brindado desde el inicio hasta el final del proyecto, y por acompañarme a lo largo de mi carrera y orientarme para terminar de forma exitosa.

A mi mamá mony Que a pesar de que no se encuentre ya con nosotros ella fue la principal causa de estudiar esta carrera, y de que su mayor sueño era vernos como profesionistas, pero sé que donde se encuentre estará orgullosa de esto como yo de ella, no me queda más que agradecerle por todo el tiempo que le tomo formarnos gracias.

A mis hermanos Porque siempre he contado con ellos para todo, gracias a la confianza que siempre nos hemos tenido; por el apoyo y amistad.

A Jessica Silva Guadarrama Porque más que una compañera ha sido mi más grande motivación e inspiración, llego a mi vida para enseñarme cosas tan importantes como el amor, y este es un triunfo compartido porque lucho junto a mi toda la carrera.

A mis amigos Por estar en esos momento que cuando más los necesitaban estaban ellos para escuchar y para festejar, simplemente por su compañía a lo largo de esta experiencia tan maravillosa: cardosuan, beta, chino, alexirri, more, mary, gargara, guapo, gumaro, jeny, jime, etc.

A mi familia *Gracias a todos mis familiares que directamente me impulsaron para llegar hasta este lugar, me resulta muy difícil poder nombrarlos en tan poco espacio, sin embargo gracias por ser personas tan indispensables en mi vida.*



Dr. Hugo Mendieta Zerón

M.C. Gerardo Huitrón Bravo

Principalmente por todo el apoyo económico y por cobijarme dentro del espacio académico, donde logre mis objetivos , ya que sin su apoyo no hubiera logrado tal satisfacción.

Índice

Resumen.....	3
Introducción.....	4
Capítulo I.....	5
1. MARCO TEÓRICO.....	9
1.1.1 Definición y generalidades	9
1.1.2 Etiopatogenia	9
1.1.3 Clasificación.....	10
1.1.4 Diagnóstico.....	11
1.2 OBESIDAD Y CÁNCER.....	11
1.2.1. Definición de obesidad y generalidades	11
1.2.2 Etiopatogenia	12
1.2.3 Obesidad y cáncer de mamá	12
1.3 ADIPONECTINA.....	13
1.3.1 Definición y aspectos generales	13
1.3.2 Secreción y concentraciones de Adiponectina en circulación	14
1.3.3 Receptores	15
1.3.4. Funciones fisiológicas y metabólicas de la Adiponectina.....	16
1.3.5. Mecanismo de acción de la adiponectina	16
1.4. LEPTINA	17
1.4.1 Definición y aspectos generales	17
1.4.2 Concentraciones de leptina en circulación	17
1.4.3. Secreción	18
1.4.4 Receptores	18
1.4.5. Mecanismo de acción de la leptina.....	19
1.4.6. Funciones fisiológicas y metabólicas de la Leptina	19
1.5.ADIPONECTINA, LEPTINA Y CÁNCER DE MAMA.....	20
1.6.VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO.....	22
1.6.1. Validación	23

1.6.2. Linealidad (intervalo analítico).....	23
1.6.3. Precisión	23
1.6.4. Veracidad	24
1.6.5. Exactitud.....	24
1.7. FUNDAMENTO DE LAS TÉCNICAS ANALITICAS.....	25
1.7.1. ELISA para Adiponectina y Leptina.....	25
Capítulo II.....	22
2.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	27
2.2. JUSTIFICACIÓN.....	27
2.3. HIPÓTESIS	28
2.4. OBJETIVOS	28
2.4.1. Objetivo general.....	28
2.4.2. Objetivos específicos.....	28
2.5. Metodología ELISA Adiponectina.....	29
2.6. Metodología ELISA Leptina	29
2.7. Diagrama de flujo tanto para adiponectina como para leptina.....	30
2.8. Recomendaciones	31
2.9. VALIDACIÓN DEL MÉTODO	31
2.10. Diagrama de bloques de cómo lograr la validación de un método ELISA	32
Capítulo III.....	29
3.1. Determinación de Linealidad, para adiponectina y leptina.....	34
3.2. Obtención de repetitividad	41
3.3. Clasificación de la población de acuerdo a su IMC.....	44
3.4. Determinaciones de leptina y adiponectina en los sueros de pacientes.....	45
3.5. Discusión de resultados.....	47
Conclusiones:	54
Propuestas.....	55
Referencias.....	56

Resumen

Introducción.- La validación de los métodos se determina a partir de la linealidad, la cual establece que es la capacidad del método analítico para producir resultados que son proporcionales a la concentración del analito, en la que el valor mínimo permisible es de $r = 0.998$. La repetitividad otro parámetro a evaluar es una medida estadística de la consistencia entre medidas repetidas de un mismo carácter en un mismo individuo, cuyo valor satisfactorio es por debajo del 5% permitido. **Objetivo.-** Validar el método para la cuantificación adiponectina y leptina en pacientes con cáncer de mama mediante ELISA tipo sándwich. **Material y método.-** En el proceso de validación se determinó la linealidad, repetitividad y se emplearon 37 muestras de pacientes con cáncer de mama con diferentes IMC para comprobar el método. **Resultados.-** La linealidad del método tuvo un valor de $r^2 = 0.997$ para leptina y una $r^2 = 0.999$ para adiponectina. Repetitividad obtuvo CV de 3.1% para el analista 1 y 4.1% para el analista 2, para el error relativo se obtuvo -0.0039 para adiponectina y -0.035 para leptina, en el % de recuperación se obtuvo 100.37% para adiponectina y 100.20% para leptina, estando dentro del rango establecido que es de 95-105%. **Discusión de resultados.-** Se observó la relación de los valores de adiponectina y leptina con el índice de masa corporal de cada uno de los pacientes para de esta forma ver el incremento de la leptina y el decremento de la adiponectina en su mayoría en pacientes con obesidad. **Conclusiones.-** La metodología es adecuada para ser aplicada en los laboratorios clínicos y obtener de manera satisfactoria la cuantificación tanto de la leptina como de la adiponectina en pacientes con cáncer de mama.

Introducción

En el primer capítulo de esta tesis para licenciatura se explica el marco teórico en donde se principian las características de lo que es el cáncer de mama motivación que ha dado lugar al estudio del problema planteado, se exponen la etiopatogenia así como la prevención a través de un diagnóstico para el cáncer, del mismo modo se describen el significado de obesidad y sus generalidades; Se describe la relación entre el cáncer y la obesidad, mencionando las características de la adiponectina y la leptina, así como su mecanismo de acción para contraer obesidad.

En otro apartado se describe lo que es una validación de un método analítico y la importancia de hacer la validación, se mencionan los parámetros a evaluar como lo son linealidad, repetitividad, exactitud, C.V. etc. que se han llevado a cabo para la validación del método. Finalmente, se resume el fundamento de las técnicas de ELISA tanto para leptina como para adiponectina.

En el segundo capítulo se explica la justificación y el planteamiento del problema que ha dado lugar a la hipótesis planteada, se exponen los objetivos, y se describe la metodología empleada describiendo los cambios que se realizaron, encontrando dentro de la metodología recomendaciones enfocadas para mejorar la estrategia de trabajo.

En este capítulo se muestra la determinación de la linealidad a través de los resultados, así como la obtención de la repetitividad obtenida por dos analistas determinando el coeficiente de variación y su desviación estándar, para de esta forma corroborar si pueden aplicar las buenas prácticas en el laboratorio.

De la misma forma en los resultados se analizó la clasificación de la población de acuerdo a su índice de masa corporal, con los mismos resultados de la ELISA se determinaron las concentraciones de leptina y adiponectina en los sueros de los pacientes, de esta forma se analizó la relación de las concentraciones de ambas adipocitocinas.

La validación se ha realizado comparando los resultados obtenidos con diferentes trabajos de diferentes autores se realizó la discusión de resultados, en donde se verifica que lo obtenido se realizó con una metodología válida. A través de la discusión de resultados se llegaron a diversas conclusiones con respecto a la investigación.

Para finalizar el trabajo de Tesis se presentan las principales conclusiones obtenidas, así como algunas recomendaciones de la investigación para ponerla en práctica.

Capítulo I

Marco teórico

1. MARCO TEÓRICO

1.1 CÁNCER DE MAMA

1.1.1 Definición y generalidades

El cáncer es un proceso de crecimiento y diseminación incontrolados de células. Puede aparecer prácticamente en cualquier lugar del cuerpo. El tumor suele invadir el tejido circundante y podría provocar metástasis en puntos distantes del organismo. (6) El cáncer de mama está definido según el *National Cancer Institute* como el cáncer que se forma en la estructura anatómica de la glándula mamaria, por lo general los conductos o los lobulillos, esto ocurre principalmente en mujeres, aunque el cáncer de mama masculino es raro. (7)

De acuerdo a la OMS el número de casos ha aumentado en todo el mundo, en el año 2007 se registraron aproximadamente 548 000 muertes. (8) En un panorama mundial, México ocupa el lugar 101 de incidencia y el 135 de mortalidad entre 172 países. (9) El cáncer de mama se ha convertido en el mayor problema de salud en México de mujeres en edad reproductiva, (10) tan solo una de cada ocho mujeres en México tiene la posibilidad de padecer esta neoplasia. (8)

1.1.2 Etiopatogenia

El cáncer es una enfermedad que no tiene un único origen, en ella se ven involucrados diversos factores, por lo cual no es posible encontrar una causa única. En la fisiopatología del cáncer existen de manera general dos mecanismos para la carcinogénesis. En primer lugar, debido a cambios epigenéticos, que afectan la expresión de genes y pueden permanecer en estado latente durante toda la vida de la célula. En segundo lugar, están los cánceres en los que los cambios en el material genético de la célula inducidos por mutaciones. La célula inicial crece con mayor rapidez y pierde el control de su crecimiento, llegando a la formación de un tumor primario en el tejido circundante (neoplasia) o un tumor secundario (metástasis) en tejidos distantes. (11) Todo relacionado con factores del huésped, agentes y condiciones del medio ambiente, como lo son las mutaciones del genoma producidas por agentes cancerígenos, así como por errores espontáneos o inducidos en la replicación y reparación del ADN. Del resultado de la mutación, los genes expresan proteínas alteradas, sobre expresan las normales o las expresan; al final, cualquiera de los efectos anteriores modifica las funciones de la célula, desde el control de su división (lo que se manifiesta en una excesiva proliferación y continua) o en una reducción de la apoptosis. (12)

Para el desarrollo de cáncer de mama se ven involucrados varios factores de riesgo en mujeres, donde se encuentran principalmente los antecedentes familiares, la edad temprana de la menarquía y la etapa tardía de la menopausia, la paridad, las variaciones en la población, hormonas endógenas y exógenas (exposición a estrógenos), enfermedad benigna de la mama, así como antecedentes de cáncer de endometrio u ovario. Si englobamos las causas de predisposición se consideran los factores genéticos, ambientales, hormonales, socio-biológicos, fisiológicos y nutricionales. (13)

1.1.3 Clasificación

De acuerdo a la anatomía patológica del cáncer de mama, se clasifica en:

- | <u><i>in situ</i></u> | <u>Invasivo</u> |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> 1) Ductal <i>in situ</i> 2) Lobulillar <i>in situ</i> | <ul style="list-style-type: none"> 1) Ductal infiltrante <ul style="list-style-type: none"> a. Escirroso b. Tubular c. Medular d. Mucinoso 3) Lobulillar infiltrante |

En base al hallazgo encontrado en los exámenes realizados a una mujer de la que se sospecha una patología mamaria, se clasifica de acuerdo al informe de imagen de mama como se observa en la tabla (1) y del sistema de datos (Breast Imaging Reporting and Data System, BI-RADS).

Categoría BI-RADS	Evaluación	Recomendaciones de manejo clínico
0	Evaluación incompleta	Necesarios revisar a prioridad los estudios o completarlos
1	Negativo	Continuar revisión de rutina
2	Hallazgo benigno	Continuar revisión de rutina
3	Probable hallazgo benigno	Seguimiento con una mamografía en 6 meses, después cada 6 a 12 meses por 1 a 2 años
4	Anormalidad sospechosa	Realizar biopsia
5	Alta sospecha de malignidad	Realizar biopsia y dar tratamiento, lo que sea necesario.
6	Biopsia demuestra una malignidad conocida	Asegurar que el tratamiento se complete

Tabla 1: Recomendaciones de gestión clínica para las mamografías de la categoría BI-RADS.

1.1.4 Diagnóstico

De acuerdo a lo establecido en la NOM-041-SSA2-2011, para la prevención, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer de mama, en México a toda mujer con sospecha de patología mamaria se le debe realizar una historia clínica completa enfocada a la búsqueda de factores de riesgo de cáncer de mama, un examen clínico completo con énfasis en las glándulas mamarias y zonas linfoportadoras. (14) La mamografías y ultrasonido se deben realizar de acuerdo a la edad, hallazgos y los factores de riesgo que presente cada paciente. (11) Dentro de lo que indica la norma, los estudios realizados para el diagnóstico se clasifican en dos tipos, los cuales son:

Diagnóstico histopatológico: se requiere de este diagnóstico para la confirmación citohistopatológica mediante una biopsia. Se debe seguir una descripción que incluya el grado nuclear, índice mitótico, formación de túbulos, tipo histológico, grado de diferenciación y la presencia o ausencia de invasión vascular y linfática. Así como la multicentricidad, presencia/ausencia de metástasis y receptores hormonales en el tejido tumoral por inmunohistoquímica.

Diagnóstico anatomopatológico: refiere las alteraciones anatómicas que presente la paciente en la mama a nivel macro y microscópico. El laboratorio de patología contribuye incluyendo de manera correcta la información que se requiere, la cual es la fecha de diagnóstico, el sitio primario del tumor, descripción macroscópica, tamaño de la lesión, nódulos examinados, límites y estado de los bordes quirúrgicos, Empleando tinción hematoxilina y eosina en inmunohistoquímica.

1.2 OBESIDAD Y CÁNCER

1.2.1. Definición de obesidad y generalidades

La obesidad constituye hoy en día un importante problema de salud debido a las altas cifras de morbilidad relacionadas. De acuerdo a la OMS, la obesidad está definida como la acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud, establecida con el Índice de Masa Corporal (IMC), una persona con un IMC igual o superior a 30 es considerada obesa y superior a 25 es considerada con sobrepeso. (3) Datos de 2008 reportan 1500 millones de adultos, de 20 años o más, con sobrepeso; dentro de este grupo, más de 200 millones de hombres y cerca de 300 millones de mujeres eran obesos, siendo entonces la población femenina obesa la que está en mayor proporción. Lo trascendente radica en los múltiples problemas consecuentes como el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, hepáticas, diabetes mellitus tipo 2, hipertensión arterial, dislipidemias y a últimas fechas la relación entre obesidad y cáncer. (15)

1.2.2 Etiopatogenia

La obesidad es multifactorial. La explicación inicial del desarrollo de la obesidad es su origen en un desbalance positivo de energía derivado del incremento en la ingesta de alimento, un decremento en el gasto energético, o ambos. (16)

Como principal factor para que se desarrolle se encuentra la susceptibilidad genética, a la par del género, la edad, la ocupación, la dieta y el medio, además dentro de este complejo mecanismo para el desarrollo de la obesidad se encuentran involucrados distintos genes, como el gen leptina (ob) receptor de melanocortina(13). Entonces en la obesidad están involucrados principalmente factores genéticos y otros mecanismos que implican a neurotransmisores y hormonas que contribuyen a la fragilidad para el desarrollo de la obesidad; de estas condiciones, los procesos de alimentación y la reducción significativa en el gasto energético son los aspectos más importantes. (16)

1.2.3 Obesidad y cáncer de mamá

A partir de estudios que se han realizado de obesidad y cáncer, se ha comprobado que la obesidad es un factor para el desarrollo de cáncer de mama, principalmente en mujeres postmenopáusicas, en ellas el tejido adiposo es la principal fuente de la enzima aromatasa, la cual convierte los andrógenos en estrógenos, lo que explica los altos niveles circulantes de estrógenos, de la mano con el descubrimiento de los mecanismos por los cuales se da la proliferación celular y los factores que contribuyen a ello. Se ha encontrado que el tejido adiposo favorece el desarrollo de metástasis y recurrencia del cáncer de mama, asociándolo con una mortalidad mucho mayor que en mujeres delgadas. (4)

Además, un exceso de tejido adiposo se asocia con un aumento en niveles plasmáticos de insulina y el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), que desarrollan actividades mitogénicas y están involucrados en la progresión del tumor de mama(4). Por otra parte, un IMC alto se asocia significativamente con un mayor riesgo de cáncer de mama inflamatorio, la forma más letal de cáncer de mama en las poblaciones tanto premenopáusicas y posmenopáusicas. (17) Al mismo tiempo que ocurren estos eventos, al haber un aumento del tejido adiposo, adipocitocinas involucradas en cáncer como leptina y adiponectina, sufrirán un desequilibrio, aumentado las concentraciones de leptina en circulación y disminuyendo las de adiponectina. Trayendo consigo alteraciones fisiológicas, contribuyendo al desarrollo de diversas enfermedades, incluido el cáncer.

1.3 ADIPONECTINA

1.3.1 Definición y aspectos generales

La adiponectina es una hormona secretada por los adipocitos y se expresa de manera exclusiva en los mismos. Es llamada gelatin-binding protein-28 (GBP28), AdipoQ, ACRP30 o apM1. El gen de la adiponectina humana (apM1, *adipose most abundant gene transcript protein*) está localizado en el cromosoma 3, locus 3q27 que codifica para un polipéptido de 244 aminoácidos, consiste en 3 exones y 2 intrones. (18)

Estudios genéticos demuestran que hay un locus que confiere susceptibilidad a la diabetes tipo 2, al síndrome metabólico y a la enfermedad coronaria en el cromosoma 3q27, justo donde se localiza el gen (polimorfismos) que codifica para adiponectina. Esto explicaría, en parte, la asociación entre estas patologías.

La estructura de la adiponectina consta de 4 dominios como se observa en la figura (1). En el extremo amino terminal encontramos un amino terminal (péptido de señal, que permite la secreción de la adiponectina), seguida de una secuencia sin homología (la cual es variable entre diversas especies), un dominio tipo colágeno y en el extremo carboxiterminal un dominio globular, parecido a la proteína C1q, además en su conformación tridimensional es increíblemente similar al TNF- α . (19)

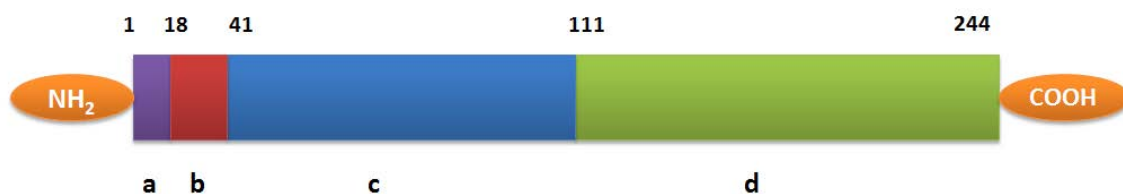


Figura 1: Representación lineal de los dominios de la adiponectina. a) Dominio amino-terminal, b) secuencia sin homología (variable entre especies), c) dominio tipo colágeno y d) dominio globular.

La adiponectina existe en la circulación en tres formas: multímeros de alto peso molecular (high molecular weight HMW), multímeros de medio peso molecular (middle molecular weight MMW) y un trímero de bajo peso molecular (low molecular weight LMW), este último es la forma predominante que se encuentra en la circulación. (15) Recientemente se ha sugerido que el complejo de adiponectina de alto peso molecular es la principal fuente de la forma activa de esta proteína. (19)

Factores endógenos influyen directamente sobre la adiponectina en circulación, la testosterona la cual reduce los niveles de adiponectina, al contrario de los estrógenos. Las mujeres tienen mayores niveles de adiponectina que los hombres independientemente de la grasa corporal o la distribución de la grasa, además el factor dietético modula las concentraciones plasmáticas de adiponectina, la restricción calórica y la pérdida de peso. Se considera un vínculo entre obesidad, resistencia a la insulina y diabetes. (19)

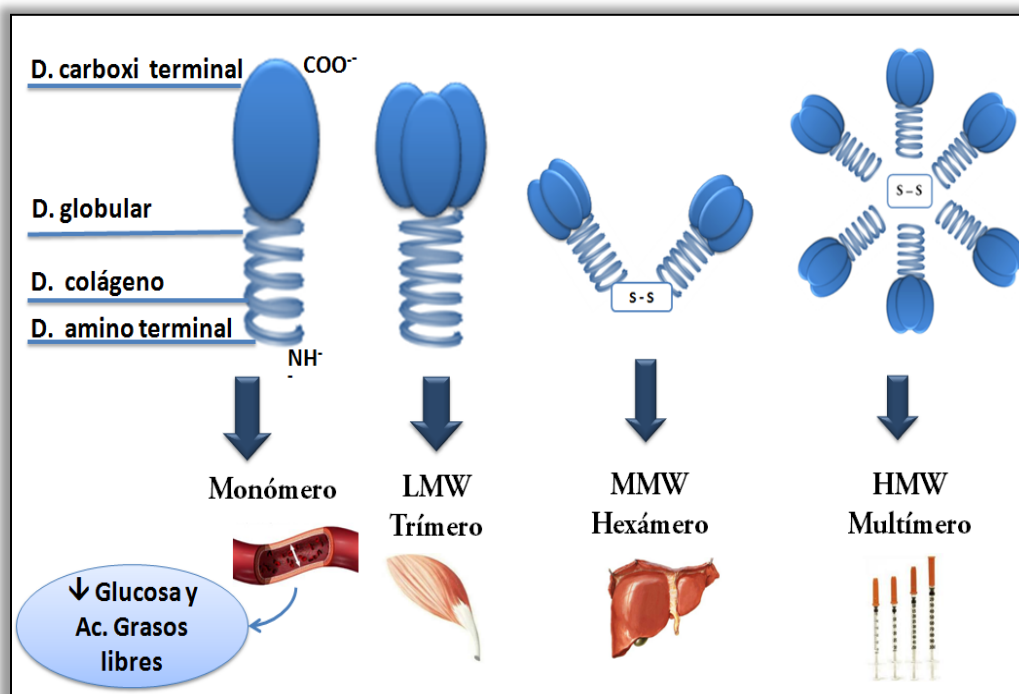


Figura 2: Isoformas de la adiponectina, representación de sus dominios y de los principales órganos donde actúa. La adiponectina globular se encuentra en circulación ejerciendo su efecto en la disminución de glucosa y ácidos grasos libres; LMW, de bajo peso molecular, sus efectos son principalmente en el músculo; MMW, de medio peso molecular, con efecto principal en el hígado y HMW, de alto peso molecular, efectos de sensibilidad a la glucosa.

1.3.2 Secreción y concentraciones de Adiponectina en circulación

La adiponectina es secretada del tejido adiposo, estando regulada por diversas hormonas, los niveles en circulación disminuyen al aumentar el IMC. (19)

(15) Se han reportado concentraciones de adiponectina en suero que van de 3 a 30 $\mu\text{g/ml}$, el 0.05% de las proteínas totales del plasma (20); de 2 a 20 $\mu\text{g/ml}$ (15); e incluso de 10 $\mu\text{g/ml}$, como se observa en la tabla (2),(5) Las variaciones de las determinaciones se deben a las diferencias de la población de estudio.

IMC (kg/m ²)	Hombres	Mujeres
< 25	4 – 26	5 – 37
25-30	4 – 20	5 – 28
> 30	2 – 20	4 – 22

Tabla 2: Niveles de adiponectina en suero, resultados obtenidos del Centro Médico ISSEMyM de Toluca.

1.3.3 Receptores

La adiponectina tiene dos receptores *AdipoR1* y *AdipoR2*, cada uno muestra una única distribución y afinidad por las diferentes formas de adiponectina en circulación. *AdipoR1* es un receptor de alta afinidad por la adiponectina globular (gAdipo), tiene una muy baja afinidad por la molécula de longitud completa y se expresa en varios sitios. Es más abundante en tejido musculo-esquelético, pero también está presente en células endoteliales y otros tejidos. *AdipoR2* tiene una afinidad intermedia por ambas formas de la adiponectina y se expresa de manera predominante en el hígado. *AdipoR1* y *AdipoR2* son proteínas integrales de membrana. (19)

La adiponectina es requerida para la regulación de la sensibilidad a la insulina y la homeostasis de la glucosa como se observa en la figura (3), acciones que se produzcan por:

- 1- Aumento de la oxidación de lípidos
- 2- Mejora de la señalización de insulina en el receptor y posterior transducción de señal.
- 3- Inhibición de la gluconeogénesis y aumento de la captación de glucosa del músculo esquelético e Inhibición de TNF en el tejido adiposo

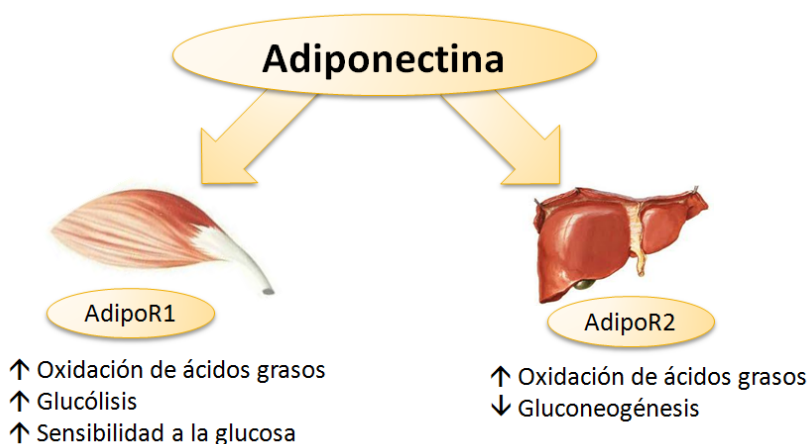


Figura 3: Efectos de la adiponectina de acuerdo al órgano y receptores

1.3.4. Funciones fisiológicas y metabólicas de la Adiponectina

Personas con un IMC elevado presentan un decremento en los niveles de adiponectina en circulación, en contraste sujetos con un IMC normal la adiponectina se encontrará en concentraciones deseables para ejercer diversos efectos protectores, como sensibilidad a la insulina, estimulando el consumo de energía por parte del tejido musculo-esquelético y a su vez suprimiendo la producción de glucosa por parte del hígado, su isoforma monomérica eleva la capacidad que tiene la insulina de suprimir la gluconeogénesis y estimular la liberación de glucosa por parte de los hepatocitos (18), también afecta el metabolismo de lípidos, incrementando la oxidación de ácidos grasos libres. (21)

1.3.5. Mecanismo de acción de la adiponectina

Algunos estudios han encontrado que el factor de necrosis tumoral alfa ejerce una fuerte inhibición de la actividad promotora de la adiponectina (19), lo que podría explicar la relación inversa entre la grasa visceral y los niveles circulantes de adiponectina.

Los mecanismos por los que la adiponectina ejerce efectos sobre la sensibilidad a la insulina han sido determinados paulatinamente e implican principalmente la activación de los receptores PPAR γ , la modulación del estímulo de insulina, y la activación de la cinasa de AMP.

El aumento del contenido tisular de triglicéridos (TGL) interfiere con la activación de la fosfatidilinositol cinasa- 3 lo que a su vez produce una translocación del transportador de glucosa 4 (GLUT-4), y disminución de la captación de glucosa.20 El efecto neto de la adiponectina sobre el músculo esquelético es la disminución del contenido de TGL.

La adiponectina aumenta la oxidación de ácidos grasos y el consumo de energía, muy probablemente a través de la activación de los receptores PPAR γ , lo que produce una disminución del contenido de TGL tanto en el hígado como en el músculo esquelético, y de manera concomitante mejora la sensibilidad a la insulina *in vivo*. En un estudio *in vitro* se midió la capacidad de unión de la adiponectina para activar los receptores PPAR γ en cultivos de miocitos expuestos a adiponectina. Los resultados mostraron que la adiponectina incrementó la actividad de los receptores PPAR γ , así como también la oxidación de los ácidos grasos.(32)

1.4 LEPTINA

1.4.1 Definición y aspectos generales

La leptina es una proteína secretada principalmente de los adipocitos. En 1994, Friedman y colaboradores reportaron el clonamiento del gen *obese* (*ob*), responsable del fenotipo de la obesidad, diabetes y resistencia a la insulina en ratones (*ob/ob*), a la par se identificó el gen homólogo en el humano. La proteína producto de este gen fue identificada y detectada en plasma, se le llamo “leptina”, que deriva del Griego “*leptos*”, delgado, lo cual identifica su función, se puede observar su estructura tridimensional en la figura (4). (24)

El gen *ob* se encuentra en el cromosoma 7, locus 7q31.3, de 650 kb y está constituido por 3 exones separados por 2 intrones. La leptina es un péptido de 167 aminoácidos con una secuencia señal de 21 aminoácidos que se separa antes de que la leptina pase al torrente circulatorio. La estructura “madura” de la leptina consta de 146 aminoácidos y 16 kD, presenta una estructura terciaria, la cual es similar a las citocinas de clase I, como la IL-2. Contiene una unión disulfuro intercadena necesaria para realizar su actividad biológica, (25) en circulación se encuentra en forma libre o unida a una proteína de unión. (26)

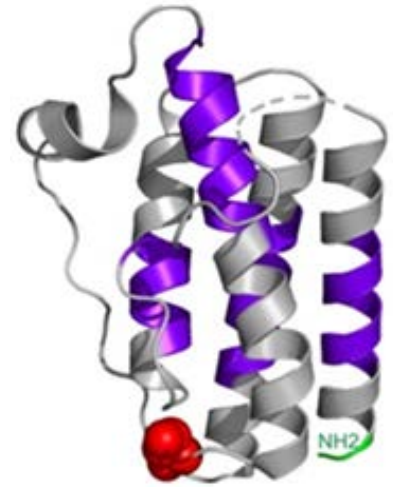


Figura 4: Estructura tridimensional de la Leptina

La leptina se incrementa de manera proporcional al IMC, la producción es mayor en el tejido subcutáneo que en el visceral y refleja no solo la cantidad de grasa almacenada sino también el desbalance de energía. (26) Desde las primeras mediciones de leptina en suero, fue clara la diferencia entre géneros, en mujeres existe un umbral más elevado en comparación a los hombres, con el mismo IMC, siendo de dos a tres veces superior en la mujer, (27) debido a que las mujeres tienden a tener una proporción más alta de grasa subcutánea y visceral, y la cantidad de estrógenos que presentan. (24, 27)

1.4.2 Concentraciones de leptina en circulación

En personas con peso normal se han reportado valores de leptina de 1 a 15 ng/mL, llegando a ser mayor a 30 ng/mL en personas con un IMC elevado de 30, (25) en un estudio diferente se reporta un valor umbral de leptina sérica que va de 25 a 30 ng/mL, incrementando de manera proporcional al IMC. (26) En general, las concentraciones de leptina están determinadas por el sexo, la edad, como se

observa en la tabla (3), otro factor que influye en la concentración de leptina es la ingesta calórica, los andrógenos, los ácidos grasos de cadena larga, las catecolaminas (estos tres últimos inhiben la síntesis de la leptina), y los glucocorticoides, estrógenos e insulina (siendo reguladores positivos). (27)

	Hombres	Mujeres
Adultos (18-61 años) IMC* 18 – 25	1.2 – 9.5	4.1 – 25.0
Adultos (19-60 años) IMC* 25 – 30	1.6 – 20.9	13.1 – 40.8

Tabla 3: Niveles de leptina en suero, resultados obtenidos del Centro Médico ISSEMyM de Toluca. (*IMC en kg/m²)

1.4.3. Secreción

La síntesis de la proteína *ob* se da principalmente, pero no de forma única, en el tejido adiposo blanco (TAB). Lo anterior, permitió proponer el hecho de que la secreción de leptina actúe como señal al cerebro, enviando información sobre la cantidad del tejido adiposo y su papel como factor saciante. Siendo mayor la producción en el tejido subcutáneo que en el visceral. Sin embargo, el tejido adiposo marrón (TAM) también realiza síntesis de leptina, aunque es mucho menos la expresión de este gen en comparación con el TAB, el rol de la leptina secretada por el TAM, aun no es del todo claro, pero pudiese actuar como aporte de esta a la cantidad total de leptina circulante en el organismo. (25)

1.4.4 Receptores

Los receptores de leptina se encuentran localizados a través del sistema nervioso central y tejidos periféricos, con al menos 6 isoformas como se observa en la figura (5), identificadas como ObRa, ObRb, ObRc, ObRd, ObRe y ObRf. Todos estos receptores tienen un dominio homólogo, pero, debido al acoplamiento diferente del ARNm, cada receptor tiene una secuencia y longitud única. Las isoformas cortas ObRa y ObRc se cree que desempeñan un papel importante en el transporte de la leptina de la sangre al cerebro. La isoforma larga, ObRb, se encuentra expresada en grandes cantidades a través del sistema nervioso central y es responsable de la señalización de la leptina, regula la homeostasis de la energía y la función neuroendocrina. La isoforma soluble ObRe se encuentra en circulación y puede antagonizar el transporte de leptina por inhibición de la unión a la superficie. (28)

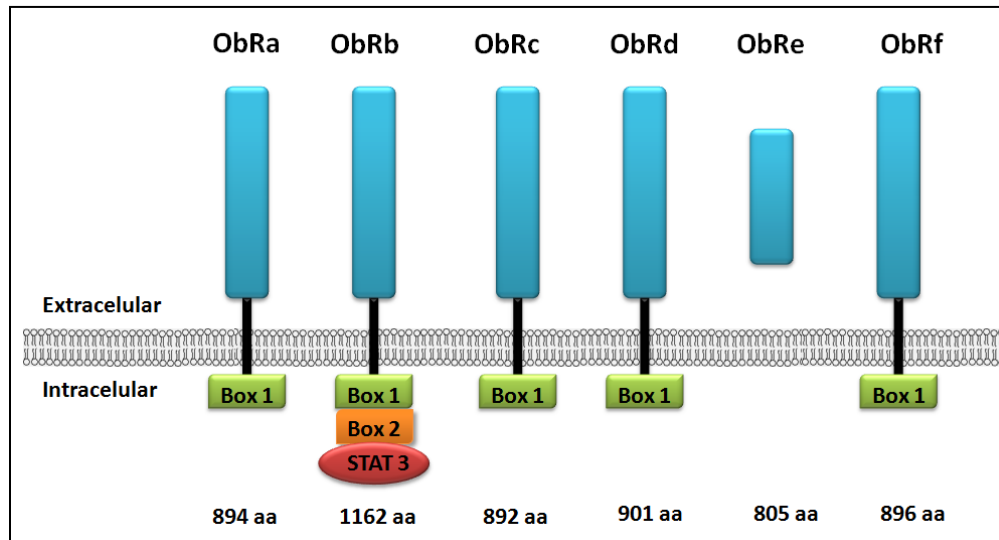


Figura 5: Isoformas de los receptores para Leptina. Las regiones de alta homología están representadas por Box 1 y para OB-Rb otra secuencia característica, la región Box 2. En la parte inferior se encuentran el número de residuos de aminoácidos para cada receptor.

1.4.5. Mecanismo de acción de la leptina

La leptina atraviesa la barrera hematoencefálica para presentar su acción central e interactuar con sus receptores hipotalámicos en neuronas de varios núcleos: arcuato, paraventricular y ventromediano.

El principal sitio de acción en el hipotálamo es el núcleo arcuato, el cual comprende dos poblaciones de neuronas: la primera libera el neuropéptido Y y representa la vía orexigénica (inductora del apetito); la segunda sus neuronas secretan propiomelancortina y representa la vía anorexigénica (inductora de saciedad). Se infiere que la leptina inhibe la vía orexigénica y estimula la anorexigénica: su función más importante es de reguladora del peso corporal (31).

1.4.6. Funciones fisiológicas y metabólicas de la Leptina

La función principal de la leptina es su papel en la regulación del peso corporal, además de que con ello se implica el balance energético, la ingesta de alimentos, así como el almacenamiento de tejido adiposo. (24, 26, 28, 29) La leptina ejerce su efecto a nivel del sistema nervioso central, actuando en sus receptores ObRb en el plexo coroideo y el hipotálamo, esta región conocida por estar involucrada en la regulación del apetito, la ingesta de alimento y el peso corporal, donde se ven involucrados mediadores como el Neuropeptido Y, la hormona estimulante de los melanocitos (α MSH), el péptido Agouti Related (AgRP), la hormona liberadora de corticotropina (CRH), la colecistoquinina (CCK), entre otros. (24)

En el sistema inmune, estimula la proliferación de linfocitos T CD4⁺ (tiene efectos mitogénicos) e incrementa la producción de citocinas por células Th-1. También afecta a las células endoteliales y aumenta directamente la angiogénesis. (29) Se ha demostrado el efecto de la Leptina con el inicio de la pubertad, así como un incremento durante el embarazo. (24, 25) Así mismo está relacionada con el metabolismo lipídico y glucídico, estimula la lipólisis e inhibe la liponeogenesis como se puede observar en la figura (6). Inhibe y antagoniza la acción de la insulina y estimula la gluconeogénesis y la glucogenólisis. (24)

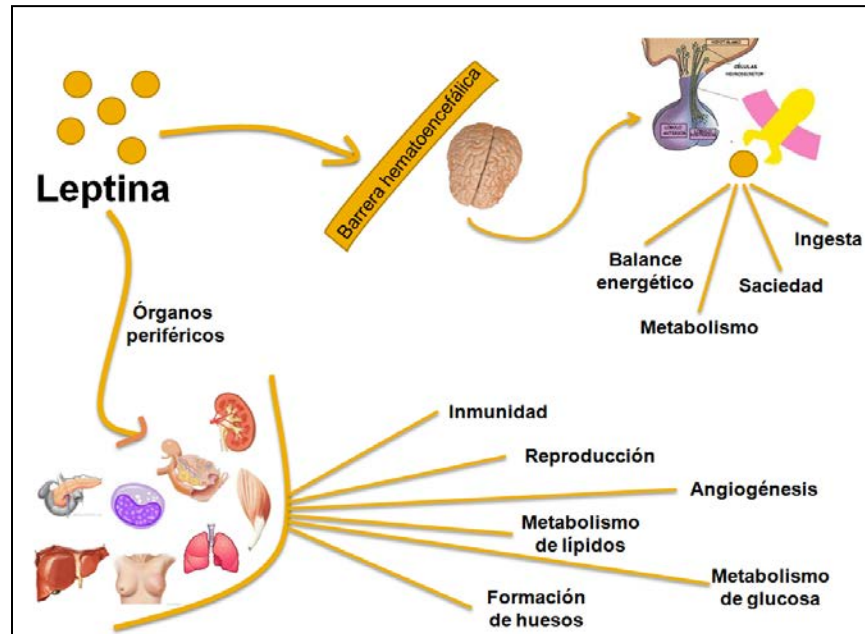


Figura 6: Funciones de la Leptina a nivel del Sistema Nervioso Central y en órganos periféricos, donde se expresa su receptor Ob-R. (Friedman 1998; Mantzoros 2011; Housa 2007)

1.5. ADIPONECTINA, LEPTINA Y CÁNCER DE MAMA

Estudios recientes muestran el papel de la Leptina y adiponectina en el cáncer de mama. Se ha encontrado que los altos niveles séricos de leptina y bajos de adiponectina se asocian con el cáncer de mama, independientemente de la condición de la menopausia. (17) La adiponectina actúa en la carcinogénesis principalmente en la resistencia a la insulina, aunque también se ha observado que puede actuar de manera directa sobre el tumor, lo anterior debido a que varios tipos de tumores expresan ambos receptores para adiponectina, incluyendo al de mama. (21) (5, 30) Estudios en líneas celulares de cáncer de mama han demostrado que la adiponectina suprime el crecimiento celular, mientras que *in vivo* la administración de adiponectina causa una reducción del tamaño del tumor. (5) Se ha visto que realiza un bloqueo de la fosforilación de Akt como la

disminución de la expresión de la ciclina D1 en líneas celulares de cáncer de mama, actuando como promotor de la apoptosis. (15)

Se ha demostrado que la adiponectina posee ciertos mecanismos por los cuales puede ejercer efecto en las células, inhibe la producción de TNF- α y su acción sobre células endoteliales, y a pesar de que se lleva pro-apoptótico, estimula la biosíntesis de estrógenos y la angiogénesis, los bajos niveles de adiponectina pueden alterar el efecto del TNF- α sobre la proliferación celular y el tumor. Además de lo anterior, en obesidad los altos niveles de adiponectina en circulación llevan al desarrollo de resistencia a la insulina, desarrollando una hiperinsulinemia crónica; ello conduce a la reducción de la síntesis en el hígado y otros tejidos, resultando en un incremento del IGF-1; la insulina y el IGF-1 señalizan a través de receptores de membrana y el receptor IGF-1, para promover la proliferación celular e inhibir la apoptosis, regulando a la alza el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF). (30)

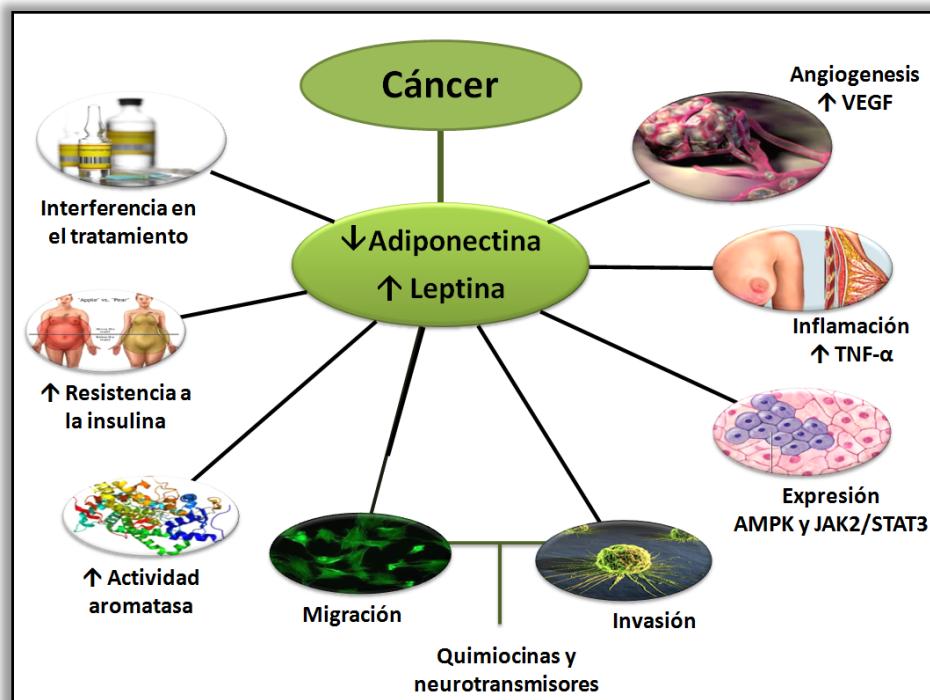


Figura 7: Adiponectina en cáncer de mama.

Por otro lado, se ha encontrado a la leptina y su receptor ObR en epitelio normal de mama y con cáncer mediante inmunohistoquímica con anticuerpos específicos. Lo relevante, es que tanto la leptina como el receptor ObR aparecen sobre expresados en el tejido con cáncer en relación con el no canceroso. La expresión de la proteína de ObR ha sido demostrada en cultivos de células de cáncer de mama.

En líneas celulares de cáncer de mama los receptores de estrógenos positivas, la leptina estimula la síntesis de ADN y el crecimiento celular actuando a través de múltiples cascadas de señalización, incluida la vías JAK/STAT, ERK1/2, y PKC. También de las clásicas señales de citocinas, la leptina es capaz de inducir la vía de supervivencia Akt/GSK3 en las células de cáncer de mama que provoca la progresión en el ciclo celular acompañada de una regulación positiva de cdk2 y ciclina D1, y la hiperfosforilación/ inactivación del inhibidor del ciclo celular, pRb. Además, no sólo induce el crecimiento celular, sino también la transformación celular (4) y modula la síntesis de estrógenos; la leptina puede regular al alza la expresión del gen de la aromatasa y la actividad de la aromatasa en células MCF-7, lo que lleva a una mayor síntesis de estrógenos. (17)

Todos los hallazgos de los estudios realizados sugieren que los niveles elevados de leptina y disminuidos de adiponectina como se observa en la figura (7), en pacientes obesas con cáncer de mama, podrían contribuir al crecimiento del tumor, el desarrollo de metástasis hematogena, la recurrencia al cáncer en órganos distantes y al desarrollo de resistencia anti-estrógenos.

1.6. VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO

La validación es el proceso establecido para la obtención de pruebas documentadas y demostrativas de que un método de análisis es lo suficiente fiable y reproducible para producir el resultado previsto dentro de intervalos definidos(Validación de métodos analíticos).(37)

La validación proporciona un alto grado de confianza y seguridad del método analítico y se realiza con carácter obligatorio cuando se desarrolla un nuevo procedimiento, ya que permite asegurar que el método sea el correcto. (37)

De la misma forma la validación comprueba la aptitud de los procedimientos de examen y refleja las condiciones reales de la aplicación de los mismos. Los datos de esta validación los informa el fabricante en los instructivos de uso de los reactivos. No obstante, el laboratorio debe verificar que puede aplicar correctamente los métodos ya validados por el fabricante, previo a su uso en los exámenes, bajo sus condiciones propias de operación (equipo, calibradores, analistas, etc.) generando evidencias objetivas, para confirmar su aplicación correcta. (37)

El laboratorio debe usar métodos y procedimientos apropiados para todos los ensayos dentro de su alcance. Estos incluyen muestreo, manejo, transporte, almacenamiento y preparación de los elementos que serán ensayados. (38)

La validación y/o confirmación del método se deberá realizar en forma inicial y/o cuando existan cambios críticos en la metodología, equipos, instalaciones, etc. (36)

1.6.1. Validación

Es la confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos del método para una utilización o aplicación específica prevista. (37) La validación de los métodos debe realizarse de acuerdo a los siguientes parámetros:

1.6.2. Linealidad (intervalo analítico)

El experimento de linealidad involucra una serie de muestras de concentración conocida o una serie de diluciones conocidas de muestras altamente concentradas. Las mediciones o los valores de las pruebas reportadas son comparados con los valores asignados o los valores de dilución. La linealidad es obtenida al trazar la mejor línea recta que toque la mayor cantidad de puntos. (37)

- a) *Regresión lineal*: El análisis de regresión consiste en emplear métodos que permitan determinar la mejor relación funcional entre dos o más variables concomitantes (o relacionadas). El análisis de correlación estudia el grado de asociación de dos o más variables.
- b) *Coefficiente de correlación*: El coeficiente de correlación permite estimar la relación entre dos propiedades y de esta manera si los puntos experimentales siguen una función lineal. (37)
- c) *Pendiente*: Indica la sensibilidad de calibración o del método y se expresa en unidades de respuesta sobre unidades de concentración o cantidad del analito. Se considera que a mayor pendiente, mayor sensibilidad y que mientras más pequeño sea el coeficiente de variación de la pendiente mayor será la linealidad (coeficientes de variación de la pendiente mayores que el 5.0% indican falta de linealidad). (38)
- d) *Intercepto*. Es el estimador que se relaciona con la presencia de interferencias o errores sistemáticos. El intervalo de confianza del intercepto debe incluir al cero para cumplir con el requisito de proporcionalidad. (38)

1.6.3. Precisión

Para conocer el valor de una magnitud se emplea un procedimiento de medición, y los resultados que se obtienen son una estimación del valor del mensurando. Tal estimación contiene un error de medida, que es la diferencia entre el valor obtenido y el valor verdadero del mensurando. (37) La precisión usualmente se especifica en términos de desviación estándar o desviación estándar relativa. Para

identificar la precisión en los procedimientos analíticos se deben realizar mediciones repetidas y aplicar conceptos estadísticos fundamentales como el cálculo de la media, la desviación estándar, la desviación estándar relativa, el coeficiente de variación y la varianza. Se debe evaluar:

Repetitibilidad: Grado de concordancia entre los resultados de mediciones sucesivas de un mismo mensurando, llevadas a cabo totalmente bajo las mismas condiciones de medición.

Reproducibilidad: Grado de concordancia entre los resultados de mediciones del mismo mensurando, realizadas en diferentes condiciones de medición. Para una declaración válida de reproducibilidad requiere que se especifiquen los cambios en las condiciones del análisis o calibración. Estos cambios pueden incluir: el principio en que se basa la medición, el método, analista/observador e instrumento, material y patrones de referencia, ubicación, condiciones de uso y tiempo.

1.6.4. Veracidad

Se define como el grado de concordancia existente entre la media aritmética de un gran número de resultados y el valor verdadero o aceptado como referencia. La veracidad se relaciona con la presencia de errores de tipo sistemático, también llamado “sesgo” o “desviación”; que puede expresarse como un valor absoluto o relativo al valor verdadero. Normalmente la veracidad se expresa en términos de sesgo. (37)

1.6.5. Exactitud

El término exactitud se utilizó durante cierto tiempo para referirse únicamente a la componente ahora denominada veracidad, pero quedó claro para muchas personas que dicho término debía indicar el desplazamiento total de un resultado con respecto a su valor de referencia, debido tanto a los efectos aleatorios como a los sistemáticos.

1.7. FUNDAMENTO DE LAS TÉCNICAS ANALÍTICAS

1.7.1. ELISA para Adiponectina y Leptina

Inmunoensayo enzimático tipo sándwich para la detección de la adiponectina total en suero. En el ensayo las muestras son incubados en pocillos pre-cubiertos con un anticuerpo monoclonal anti-adiponectina humana. Posteriormente (en cada paso hay una serie de incubaciones y lavados) se agrega un anticuerpo policlonal anti-adiponectina humana, conjugado con peroxidasa de rábano (HRP), pisteramente un substrato (TMB) con el que reaccionará el conjugado en la solución y finalmente la reacción es detenida por la adición de una solución ácida, resultando de color amarillo. La absorbancia se mide a 450 nm y es proporcional a la concentración de adiponectina/leptina en la muestra. Los resultados se obtienen mediante una curva estándar, todo el proceso del inmunoensayo se pude observar en la figura (8).

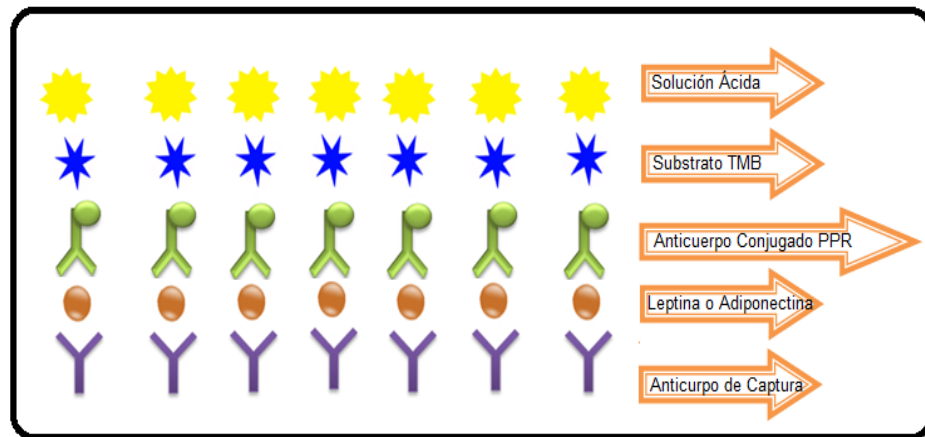


Figura 8: Diseño de ELISA tipo sándwich.

Capítulo II

Parte experimental

2.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De acuerdo a la OMS en 2008 la principal causa de muerte en el mundo fue el cáncer, con 7.6 millones de casos, principalmente por cáncer de pulmón, estómago, hígado, colón y mama. (6) En México el cáncer de mama ocupa el primer lugar en morbilidad en mujeres con una edad superior a 50 años. (47) En 2006 un estudio de la Secretaría de Salud de México, revelo que hasta dos terceras partes de las muertes por cáncer de mama se pudieron evitar de haber tenido una detección temprana de la enfermedad. (48) En estudios realizados se demuestra la relación que existe entre los altos niveles de Leptina y las bajas concentraciones de Adiponectina (4) en pacientes con cáncer de mama; se han reportado en estudios de manera individual uno de los tres marcadores, correlacionándolos con el desarrollo de cáncer de mama, o un cáncer de mama más invasivo o inclusive metástasis, (40) sin embargo no se han analizado en conjunto, por lo cual, el presente estudio pretende evaluar estos marcadores en suero de pacientes con cáncer de mama y realizar la validación del método analítico para su determinación, para con ello aplicar a futuro un uso clínico.

2.2. JUSTIFICACIÓN

La validación de un método es determinado mediante el cumplimiento de los parámetros de aceptabilidad como lo pueden ser (precisión, linealidad, reproducibilidad y repetibilidad). Es por ello que surge la necesidad de brindar una metodología validada y rápida para la cuantificación de leptina y adiponectina, realizándose ésta por la técnica de EILISA tipo sándwich, ya que esta técnica brinda confiabilidad en la cuantificación de cada uno de los analitos.

Una reveladora cantidad de estudios realizados determinan que niveles altos de leptina en circulación, así como el decremento en los niveles de adiponectina son factores que predisponen al desarrollo de cáncer. En México, existen escasos estudios reportados en la literatura sobre la determinación de los niveles de leptina y adiponectina en suero de pacientes con cáncer de mama.

La presente investigación se hizo con el objetivo de obtener y evaluar los niveles de adiponectina y leptina en suero de pacientes con cáncer de mama y validar el método analítico para su determinación por medio de una técnica de ELISA. El trabajo aportará beneficios, dado que el método validado permitirá la emisión de resultados seguros y confiables, además de ser una prueba rápida, con una toma de muestra sencilla, no invasiva y que emitirá resultados confiables, lo que permitiría al laboratorio de Biología Molecular del CICMED realizar la prueba con calidad.

2.3. HIPÓTESIS

Las pruebas de precisión, linealidad, reproducibilidad y repetitibilidad, cumplirán los criterios de aceptación de la validación del método analítico para determinar para la determinación de adiponectina y leptina en suero de pacientes con cáncer de mama.

2.4. OBJETIVOS

2.4.1. Objetivo general

Validar el método analítico para la determinación de leptina y adiponectina en suero de pacientes con cáncer de mama por medio de una técnica de ELISA.

2.4.2. Objetivos específicos

- Establecer los pasos a seguir para realizar la validación parcial de métodos analíticos cuantitativos
- Aplicar de un cuestionario a las pacientes y obtención de medidas antropométricas básicas para el estudio.
- Determinar los niveles séricos de leptina, adiponectina en suero de 37 pacientes con cáncer de mama.
- Comparar y analizar los niveles de leptina y adiponectina de pacientes con cáncer de mama en relación a su Índice de Masa Corporal.

2.4.3. Operacionalización de variables

Variable	Definición	Tipo de variable	Indicador	Escala de medición
IMC	Indicador de la relación entre peso y talla para identificar el sobrepeso y obesidad. Se calcula dividiendo el peso de una persona en kilos por el cuadrado de su talla en metros.	Independiente	kg/m ²	Cuantitativa, continua
Edad	Tiempo que una persona ha vivido desde su nacimiento.	Independiente	Años	Cuantitativa, discreta
Cáncer	Proceso de crecimiento y diseminación incontrolados de células.	Independiente	Presencia ausencia	Cualitativa, nominal
Cintura	Parte más estrecha del tronco del cuerpo humano, entre las costillas y la cadera.	Independiente	cm	Cuantitativa, discreta
Leptina	Proteína secretada por los adipocitos, actúa principalmente en la regulación del peso corporal.	Dependiente	ng/mL	Cuantitativa, continua
Adiponectina	Hormona secretada por los adipocitos, actúa principalmente en metabolismo de lípidos, insulina e inflamación.	Dependiente	µg/mL	Cuantitativa, continua

Tabla 3: Variables dependientes o independientes que puede presentar el paciente, resultados obtenidos del Centro Médico ISSEMyM de Toluca. (IMC Índice de masa corporal, ng/mL nanogramos sobre mililitros, µg/mL "picogramos sobre mililitros", kg/m² "Kilogramos sobre metro al cuadrado"

2.5. Metodología ELISA Adiponectina

Se utilizó el kit Human Adiponectin ELISA, High Sensitivity, de Genway, 40-055-200002; ensayo-inmunoenzimático tipo sandwich para la determinación cuantitativa de adiponectina humana.

En la GenWay adiponectina humana ELISA, estándares, controles de calidad y las muestras se incubaron en pocillos de la microplaca de pre-revestido con anticuerpo anti-humano de adiponectina policlonal. Después de 60 minutos de incubación previamente lavado, la adiponectina anticuerpo policlonal anti-humano, conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) se añade a los pocillos y se incubaron durante 60 minutos con la adiponectina capturado. Después de otra etapa de lavado, el restante conjugado de HRP se deja reaccionar con la solución de sustrato (TMB). La reacción se detuvo mediante la adición de solución ácida y la absorbancia del producto de color amarillo resultante se mide espectrofotométricamente a 450 nm. La absorbancia es proporcional a la concentración de la adiponectina. Una curva estándar se construye representando los valores de absorbancia frente a las concentraciones de las normas, y las concentraciones de muestras desconocidas se determina usando esta curva estándar.

2.6. Metodología ELISA Leptina

Se utilizó el kit Human Leptin ELISA, 40 055 200004, Genway, ensayo inmunoenzimático, tipo sándwich, para la determinación cuantitativa de leptina humana. En el GenWay ELISA leptina humana, calibradores, controles de calidad y las muestras se incuban en pocillos de la microplaca pre-revestidas con anticuerpo anti-leptina humana policlonal. Después de 60 minutos incubación y previamente lavadas, el anticuerpo policlonal anti-humano de leptina, conjugado con peroxidasa de rábano peroxidasa (HRP) se añade a los pocillos y se incubaron durante 60 minutos con la leptina capturada. Después de otra etapa de lavado, el restante conjugado de HRP se deja reaccionar con la solución de sustrato (TMB). La reacción se detuvo mediante la adición de solución ácida y la absorbancia del producto de color amarillo resultante se mide espectrofotométricamente a 450 nm. La absorbancia es proporcional a la concentración de leptina. Una curva estándar se construye mediante el trazado de absorbancia valores contra las concentraciones de las normas, y las concentraciones de muestras desconocidas son determinadas utilizando esta curva estándar.

2.7. Diagrama de flujo tanto para adiponectina como para leptina.



Básicamente la modificación del método de los kit tanto de adiponectina como de leptina, se encuentra en que aquí la microplaca se lava tres veces con 350µL por pocillo al inicio de la prueba (En el kit no especifican cuantas veces los lavaron) y principalmente en el tratamiento de la muestra manejan una temperatura ambiente entre los 20°C y 30 °C, y nosotros manejamos una temperatura ambiente de 25°C sin que existan variaciones de temperatura, ya que se comprobó que se obtienen los mismos resultados al realizar el lavado al inicio de la prueba y mantener una temperatura a 25°C al incubar la microplaca. La modificación realizada asegura especificidad y confiabilidad.

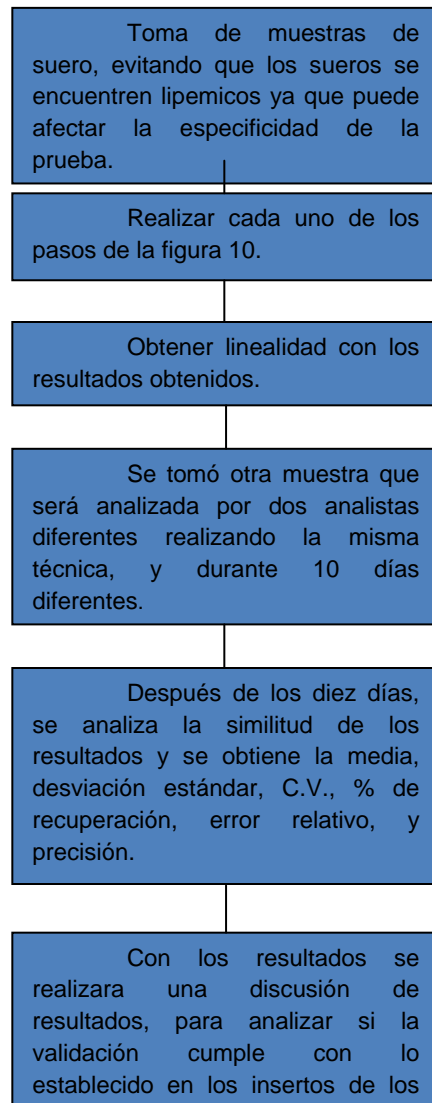
2.8. Recomendaciones:

- Tener un buen monitoreo de las micropipetas, para que no existan variaciones de volumen, ya que es crucial para la correcta determinación.
- Los sueros deben resguardarse a una temperatura entre 2 y 8°C.
- Cada suero y reactivo deben atemperarse a 25°C, media hora antes de su uso.
- La temperatura debe de ser constante, cuidando que no existan variaciones de la misma.
- Leer 5 minutos después de haber realizado el paso 11.
- Ser cuidadosos con el tiempo

2.9. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Para realizar la validación del método analítico se realizara un análisis de precisión, con el que obtendremos la reproducibilidad y repetitividad, y un análisis de linealidad con el cual conseguiremos el intercepto, la pendiente y el coeficiente de correlación, lo que nos permitirá validar el método analítico. Además de que se realizara el análisis de precisión, media, % de recuperación y desviación estándar, todo esto como se observa en el diagrama 2.10.

2.10. Diagrama de bloques de cómo lograr la validación de un método ELISA



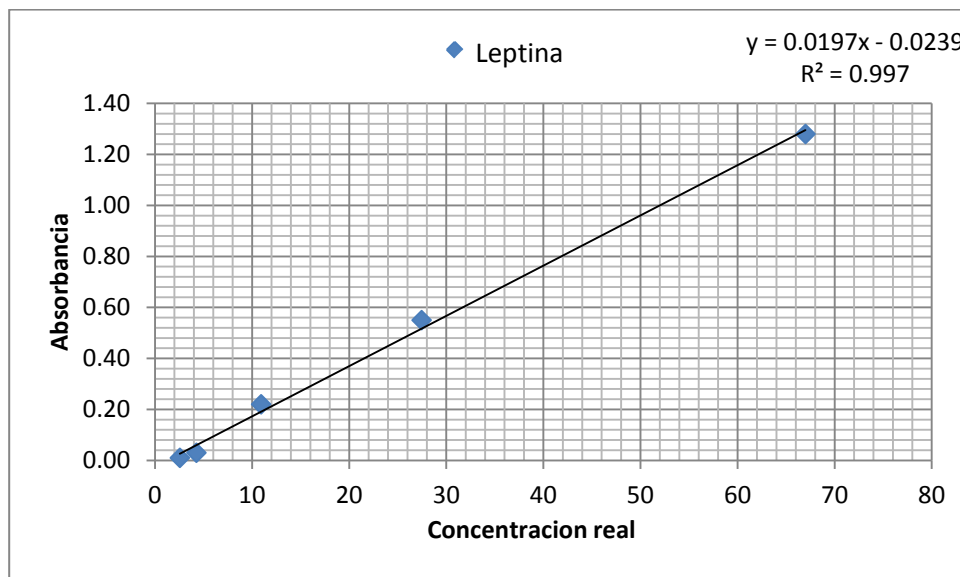
Para poder realizar una validación de una metodología se es necesario cumplir con una serie de pasos como se observa en el diagrama 2.10., en donde se explican los parámetros a seguir como lo son linealidad, reproducibilidad, media, desviación estándar, C.V., % de recuperación, error relativo y precisión, y si estos coinciden con los establecidos en los insertos de los kits, la prueba será satisfactoria para lograr una buena validación.

Capítulo III

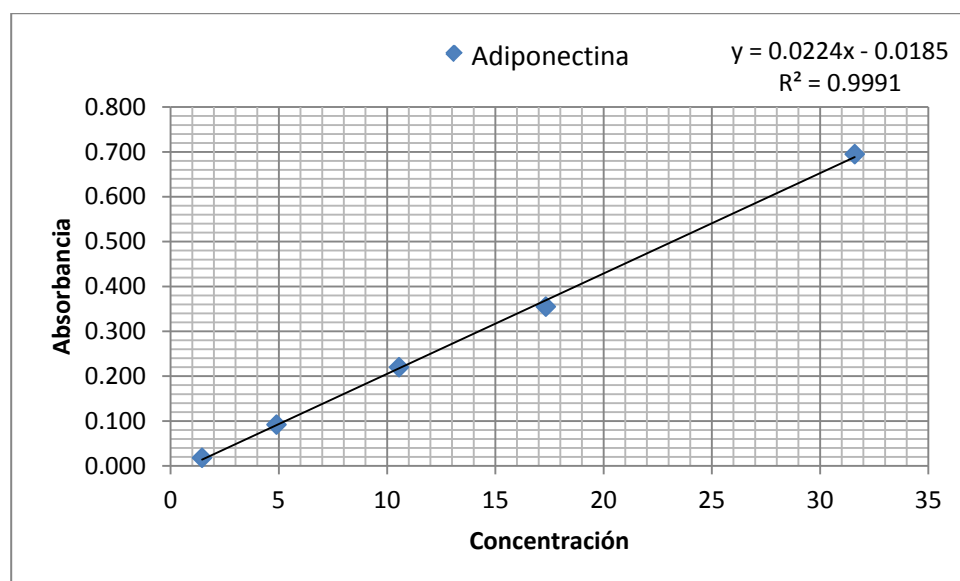
Resultados

3.1. Determinación de Linealidad, para adiponectina y leptina.

Para conocer el intervalo óptimo de las concentraciones y cumplir con el sistema de la ley de Beer, se realizó una gráfica para alcanzar una linealidad a través de una serie de soluciones patrones acuosos con concentraciones comprendidas entre los 5-50 ng/mL para leptina, y entre 150-5 ng/ml para la hormona de adiponectina, como se observa en las gráficas 3 y 4 respectivamente.



Grafica 3. Grafica de linealidad para leptina, IMC: Índice de masa corporal, ecuación de la recta: $y=0.0197x-0.0239$, Coeficiente de determinación: r^2



Grafica 4. Grafica de linealidad para Adiponectina. IMC: Índice de masa corporal. Ecuación de la recta: $y=0.0224x-0.0185$, Coeficiente de determinación: r^2

La parte lineal de las gráficas permite analizar el intervalo óptimo de una relación lineal entre la absorbancia y la concentración, De acuerdo con la *Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority* (APVMA), la linealidad debe ser establecida mediante una inspección visual y debe observarse que el comportamiento de la respuesta analítica está en función de la concentración del analito, Por lo tanto al evaluar la recta se puede observar un máximo y un mínimo de la concentración de dichos analitos.

Por lo tanto La Guía para la Validación y Verificación de los Procedimientos de Examen Cuantitativos Empleados por el Laboratorio Clínico, recomienda hacer cuatro replicas, pero un número de tres replicas es suficiente, como se muestra en la tabla 4 y 5.

Resultados del triplicado para cada una de las muestras de Leptina							
<i>Abs 1</i>	<i>Co 1 ng/mL</i>	<i>Abs2</i>	<i>Co 2 ng/mL</i>	<i>Abs 3</i>	<i>Co 3 ng/mL</i>	<i>Media Abs</i>	<i>Media Concentración real ng/mL</i>
1.292	67.08	1.277	66.327	1.245	64.719	1.271	66.04
0.507	27.633	0.495	27.03	0.485	26.528	0.496	27.06
0.187	11.553	0.176	11	0.153	9.844	0.172	10.8
0.049	4.618	0.042	4.266	0.024	3.362	0.038	4.08
0.011	2.709	0.009	2.608	0.008	2.558	0.009	2.62

Tabla 4. Concentraciones de adiponectina y leptina (ng/mL), Abs: Absorbancia λ , Co: Concentración, ng/mL: nanogramos/mililitros.

Resultados del triplicado para cada una de las muestras de Adiponectina							
<i>Abs 1</i>	<i>Co1 ng/mL</i>	<i>Abs2</i>	<i>Co2 ng/mL</i>	<i>Abs 3</i>	<i>Co3 ng/mL</i>	<i>Media Abs</i>	<i>Media Concentración real ng/mL</i>
0.679	31.17	0.699	32.07	0.678	31.13	0.685	31.5
0.361	16.91	0.389	18.17	0.354	16.6	0.368	17.2
0.229	10.99	0.213	10.27	0.199	9.65	0.214	10.3
0.098	5.12	0.086	4.58	0.081	4.35	0.088	4.7
0.026	1.89	0.018	1.53	0.015	1.39	0.02	1.6

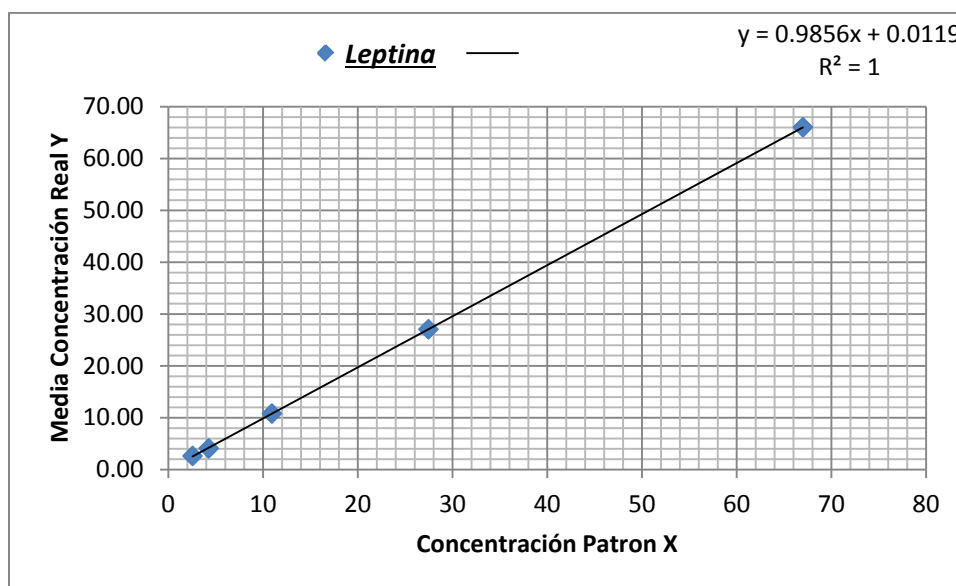
Tabla 5: Concentraciones de adiponectina y leptina (ng/mL), Abs: Absorbancia λ , Co: Concentración, ng/mL: nanogramos/mililitros.

Se realizó por triplicado para realizar una curva de calibración como se pueden observar en la tabla 4 y 5 respectivamente, cuidando que estos valores estuvieran dentro de los intervalos de la curva de calibración, se prosiguió a elaborar una curva en donde se pusiera en manifiesto la media de las concentraciones vs de las concentraciones del patrón, para verificar la linealidad utilizando los calibradores.

<i>Linealidad utilizando calibradores de leptina .</i>		
<i>Co Patron x</i> ng/mL	<i>Media Co Real y</i> ng/mL	<i>C.V.</i>
66.99	67.08	0.016
27.45	27.63	0.048
10.92	11.55	0.065
4.252	4.62	0.084
2.55	2.71	0.161

Tabla 6. Concentraciones de leptina (ng/mL) para obtener linealidad Co: Concentración, ng/mL: nanogramos/mililitros, x= Concentración patrón, y= Media Co real

La linealidad se obtuvo de la comparación de las concentraciones obtenidas de las soluciones patrones en contra de las concentraciones obtenidas de la muestra, como se observa en la tabla 6.



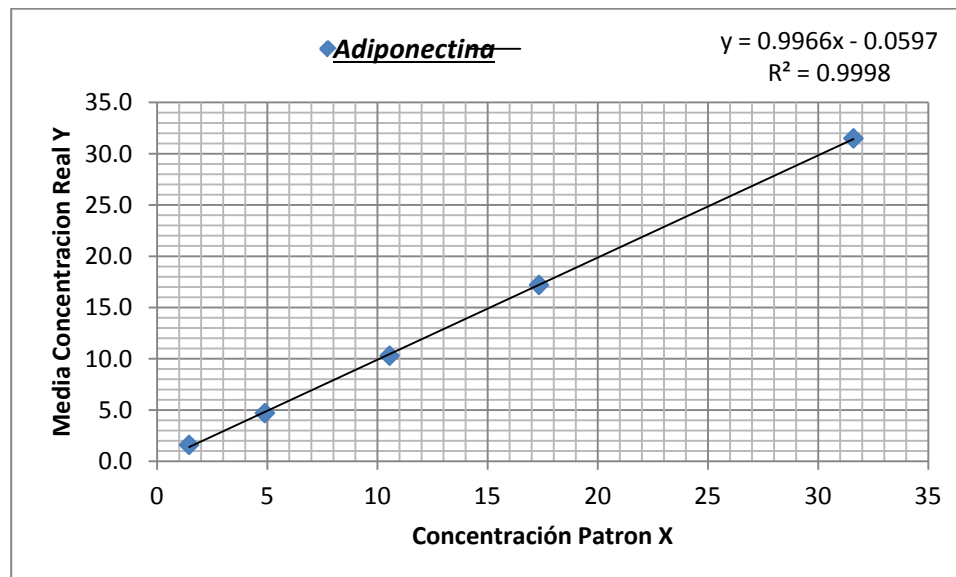
Grafica 5. Grafica de linealidad de comparación para Leptina. Ecuación de la recta: $y = 0.9856x + 0.0119$, Coeficiente de determinación: $r^2 = 1$. Co: Concentración, ng/mL: nanogramos/mililitros, x= Concentración patrón, y= Media Co real.

Para la leptina se obtuvieron valores muy parecidos, en el momento de graficar por el método de mínimos cuadrados resultando lineal con una pendiente de 1, con una intersección de 0.0119 como se puede observar en la gráfica 5.

Linealidad utilizando calibradores de adiponectina.		
Concentración patron x	Media Concentración real y	C.V.
31.6	31.5	0.531
17.33	17.2	0.831
10.55	10.3	0.670
4.89	4.7	0.395
1.45	1.6	0.27

Tabla 7. Concentraciones de Adiponectina (ng/mL) de linealidad. Co: Concentración, ng/mL: nanogramos/mililitros, x= Concentración patrón, y= Media Co real

La linealidad se obtuvo de la comparación de las concentraciones obtenidas de las soluciones patrones en contra de las concentraciones obtenidas de la muestra, esto se puede observar en la tabla 7.

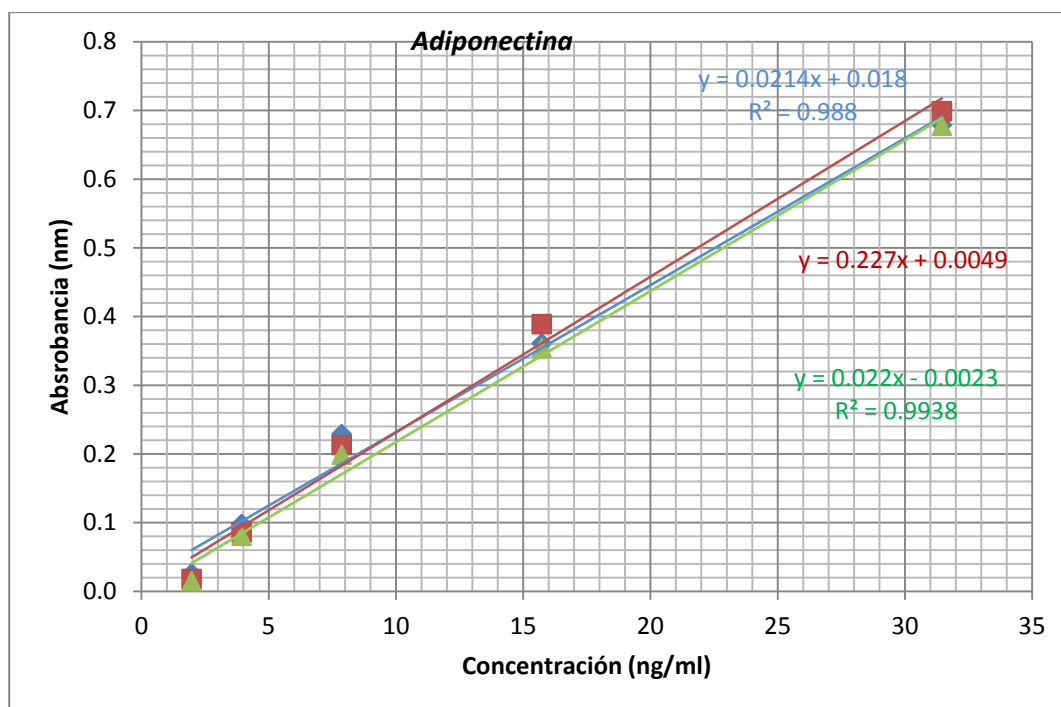


Gráfica 6. Gráfica de linealidad de comparación para Adiponectina.
Ecuación de la recta: $y=0.9966x-0.0597$ Coeficiente de determinación: r^2
Co: Concentración, ng/mL: nanogramos/mililitros, x= Concentración patrón,
y= Media Co real

Para el caso de la adiponectina se observa que se cumple la linealidad con una pendiente de 0.9998, con una interceptación de 0.0597, siendo un resultado de muy alta aceptabilidad, observándose en la gráfica 5. Una apreciación visual aceptable.

Las soluciones patrones tanto de adiponectina como de leptina se prepararon y leyeron por triplicado. El procedimiento se repitió en forma independiente, tres veces para evaluar estadísticamente la regresión lineal del sistema, como se puede observar en la gráfica 6.

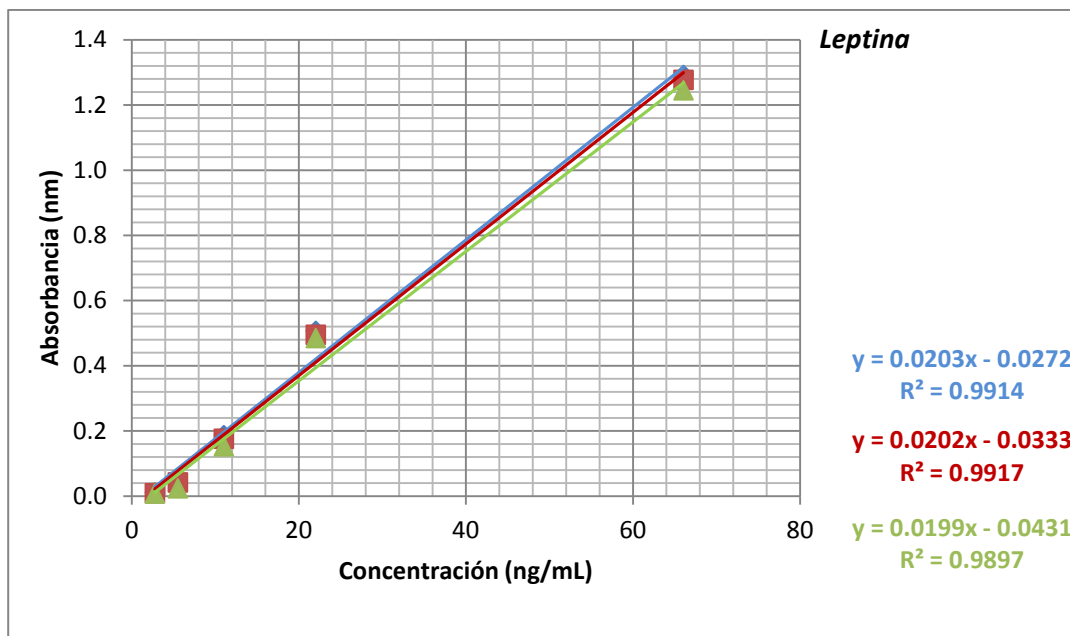
Con el promedio de los datos obtenidos se realizó la curva de calibración mediante un análisis de regresión por el método de los mínimos cuadrados y se determinaron las características de desempeño del método en estudio como se observa en la gráfica 7. En él se muestra la curva ajustada para la determinación de adiponectina y leptina en el suero por Elisa tipo sándwich.



Grafica 7. Grafica de linealidad de la muestra para la obtención de concentración de adiponectina, realizado por triplicado, ecuación de la recta: $y = mx + m$, donde m espendiente, Coeficiente de determinación: r , Co: Concentración, ng/mL: nanogramos/mililitros, x =Concentración patrón, y = Media Co real

ADIPONENECTINA CONCENTRACIONES Y ABSORBANCIAS			
Co media (ng/ml) teórica	Abs1	Abs2	Abs3
31.45	0.679	0.699	0.678
15.73	0.361	0.389	0.354
7.86	0.229	0.213	0.199
3.93	0.098	0.086	0.081
1.97	0.026	0.018	0.015

Tabla 8. Absorbancias de las muestras, en comparación con concentración media teórica. Abs: Absorbancia λ , Co: Concentración, ng/mL: nanogramos/mililitros



Grafica 8. Gráfica de linealidad de la muestra para la obtención de concentración de leptina, realizado por triplicado, ecuación de la recta: $y = mx + m$, donde m es pendiente, Coeficiente de determinación: r^2 , Co: Concentración, ng/mL: nanogramos/mililitros, x = Concentración patrón, y = Media Co real.

LEPTINA CONCENTRACIONES Y ABSORBANCIAS			
Concentración (ng/ml) teórica	Abs1	Abs2	Abs3
66.04	1.292	1.277	1.245
22.01	0.507	0.495	0.485
11.01	0.187	0.176	0.153
5.50	0.049	0.042	0.024
2.75	0.011	0.009	0.008

Tabla 9. Absorbancias de las muestras, en comparación con concentración media teórica. Abs: Absorbancia λ , Co: Concentración, ng/mL: nanogramos/mililitros.

Existen tres formas de verificar el intervalo de concentraciones para donde el modelo lineal es válido, ninguna de ellas excluye a la otra: la primera es la investigación del gráfico de residuos ($y_i - \hat{y}$) en función de la concentración. Otra manera de verificar la validez del modelo lineal es mediante el coeficiente de correlación (r) y el tercer método es el análisis de varianza de la regresión.

Por lo tanto, para comprobar si el modelo lineal simple se ajusta o no para estudiar la relación entre la absorbancia y la concentración se determinó: la ecuación de la recta y se calcularon los parámetros de la pendiente, el intercepto, el coeficiente de correlación (r), y el coeficiente de determinación (r^2), de la línea de regresión o curva de calibración ajustada mediante el método de los mínimos cuadrados como se observa en la gráfica 9.(19)

Los criterios de aceptación tomados en consideración fueron:

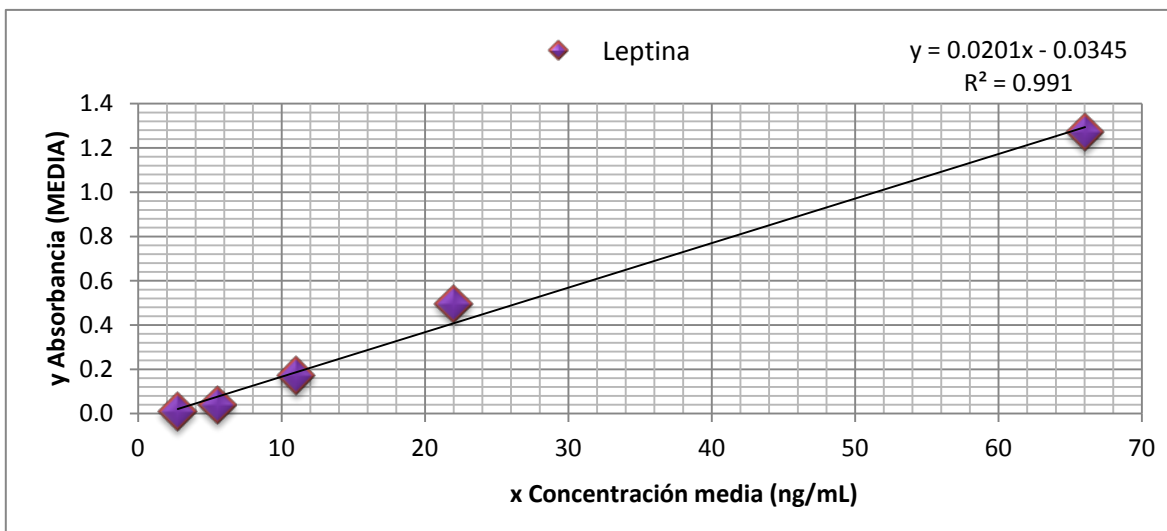
Coefficiente de correlación de la regresión lineal debe encontrarse entre 0,98 y 1.00, el coeficiente de determinación (coeficiente de correlación al cuadrado) debe ser mayor de 0.95.

- Pendiente distinta de cero
- Intercepto cercano a cero (19)

Los cálculos se realizaron y analizaron utilizando Microsoft Excel 2003, obteniéndose los siguientes resultados como se observan en la tabla (10).

<i>Leptina</i>	
<i>Abs Coeficiente de correlación (r)</i>	<i>Abs Coeficiente de determinación (r²)</i>
0.9956	0.9914
0.9958	0.9917
0.9948	0.9897
0.9955	0.9911

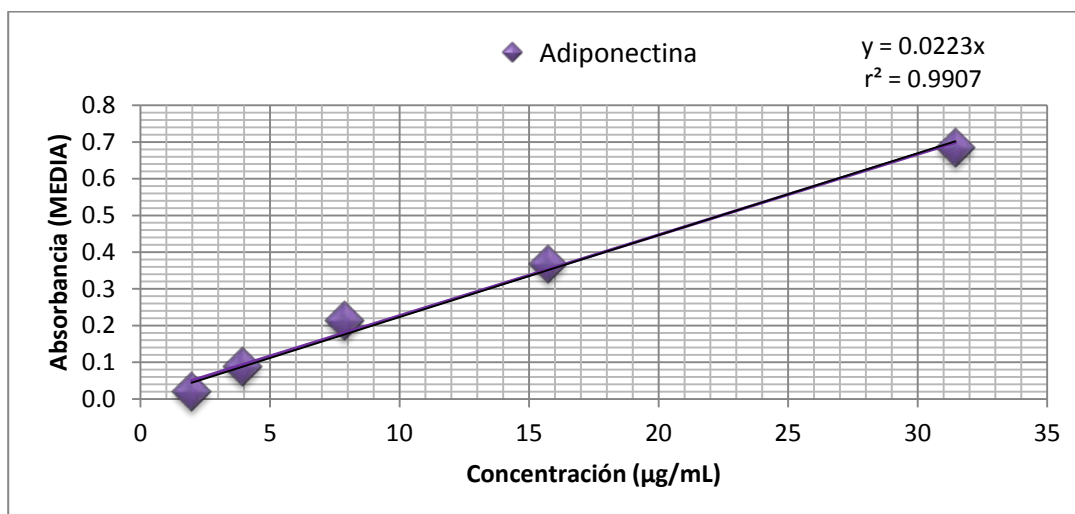
Tabla 10. Absorbancias de coeficiente de correlación y determinación.
Abs: Absorbancia λ



Grafica 9. Grafica de linealidad de la muestra para la obtención de concentración de leptina. Ecuación de la recta: $y = mx + m$, donde m es pendiente

Adiponectina	
<u>Coefficiente de correlación (r)</u>	<u>Coefficiente de determinación (r²)</u>
0.9939	0.9880
0.9948	0.9897
0.9968	0.9938
0.9955	0.9911

Tabla 11. Absorbancias de coeficiente de correlación y determinación.
Abs: Absorbancia λ



Grafica 10. Grafica de linealidad de la muestra para la obtención de concentración de Adiponectina. Ecuación de la recta: $y = mx + m$, donde m espendiente, Coeficiente de determinación: r^2 , Co: Concentración, ng/mL: nanogramos/mililitros, x = Concentración media, y = Absorbancia media.

3.2. Obtención de repetitividad

Los resultados obtenidos indican que el modelo ajustado es capaz de explicar la respuesta (absorbancia) a partir del uso de la variable concentración. De manera que, en el intervalo de concentración comprendido entre 66.990 (ng/ml) 2.550 (ng/mL) para leptina y 31.60 (ng/mL) a 1.45 (ng/mL) para adiponectina, se satisfacen las condiciones de linealidad del método analítico, ya que, se cumplen los requerimientos de un coeficiente de determinación lineal (r) mayor que 0.98 y de un coeficiente de determinación (r^2): mayor de 0.95, lo que indica correspondencia entre los valores obtenidos con la recta de ajuste y los obtenidos experimentalmente esto se puede observar en la tabla 10 y 11.

<i>Adiponectina Repetitividad</i>				
Tubo	Abs Analista 1	Co Analista 1	Abs Analista 2	Co Analista 2
1	0.724	33.2	0.527	24.4
2	0.599	27.6	0.626	28.8
3	0.553	25.5	0.603	27.8
4	0.57	26.3	0.591	27.2
5	0.577	26.6	0.621	28.6
6	0.612	28.2	0.569	26.2
7	0.573	26.4	0.614	28.3
8	0.569	26.2	0.571	26.3
9	0.606	27.9	0.555	25.6
10	0.543	25.1	0.609	28
	<i>Media</i>	26.6		27.4
	<i>Desviación estándar</i>	1.1		1.1
	<i>Coefficiente de variación</i>	4.1		4.000
	<i>% Recuperación</i>	100.37%		103.39%
	<i>Error relativo</i>	-0.00392		-0.03529
	<i>Precisión</i>	0.041		0.040

Tabla 12. Valores de las absorbancias de la repetitividad, prueba realizada por dos analistas. Abs: Absorbancia λ , Co: Concentración, ng/mL: nanogramos/mililitros.

Para los estudios de la precisión se ha generalizado en el caso de la repetitividad y la precisión intermedia, el uso de la desviación estándar relativa para evaluar la precisión del sistema o del método y el valor de la misma debe ser menor o igual al 2%, y en algunos casos puede ser igual o menor al 3%, y para la reproducibilidad puede ser 2 o 3 veces el valor de la repetibilidad.

Por otra parte, la repetibilidad en los valores de absorbancia de los análisis, con valores bajos de desviación estándar relativa, indica que el método es preciso.

La recuperación media alcanzada fue de 100.37% para el analista 1 y 103.39% para el analista 2, los insertos permiten 95% a 105% de recuperación media, encontrándonos dentro de los valores apropiados, indicando que el método muestra la exactitud necesaria para considerarlo adecuado como se puede observar en la tabla 12.

<u>Leptina Repetibilidad</u>				
<u>Tubo</u>	<u>Abs Analista 1</u>	<u>Co Analista 1</u>	<u>Abs Analista 2</u>	<u>Co Analista 2</u>
1	0.998	52.3	0.984	51.6
2	0.954	50.1	0.927	48.7
3	0.92	48.4	0.951	49.9
4	0.908	47.8	0.903	47.5
5	0.948	49.8	0.939	49.3
6	0.962	50.5	0.948	49.8
	<u>Media</u>	49.81		49.49
	<u>Desviación estándar</u>	1.61		1.36
	<u>Coefficiente de variación</u>	3.27		2.74
	<u>% Recuperación</u>	100.20%		99.55%
	<u>Error relativo</u>	-0.91411765		-0.90156863
	<u>Presición</u>	0.032		0.032

Tabla 13. Valores de las absorbancias de la repetitividad, prueba realizada por dos analistas. Abs: Absorbancia λ , Co: Concentración, ng/mL: nanogramos/mililitros.

Para los dos casos el valor de la desviación estándar se encuentra por debajo del 2%, y el coeficiente de variación total calculado es menor al 5% como se puede observar en la tabla 13 y 14, siendo aceptable de acuerdo a los insertos de cada uno de los métodos de los analitos. Los resultados obtenidos para la respetabilidad en los dos ensayos realizados y para la precisión intermedia muestran que el método cumple con las especificaciones y puede ser aplicado con seguridad y eficiencia.

La recuperación media alcanzada fue de 100.20% para el analista 1 y 99.55% para el analista 2, los insertos permiten 95% a 105% de recuperación media encontrándonos dentro de los valores apropiados, indicando que el método muestra la exactitud necesaria para considerarlo adecuado.

	<u>Adiponectina A1.</u>	<u>Adiponectina A2.</u>	<u>Leptina A1.</u>	<u>Leptina A2.</u>	<u>Kit</u>
<u>Coefficiente de determinación p.</u>	0.999	—————	0.997	—————	0.980
<u>Coefficiente de determinación m.</u>	0.993	—————	0.991	—————	0.980
<u>Media</u>	26.6	27.5	49.81	49.49	25.5
<u>Desviación estándar</u>	1.1	1.1	1.61	1.36	—————
<u>C.V</u>	4.1	4.0	3.27	274	5
<u>%Recuperación</u>	100.37%	103.39%	100.20%	99.55%	95-105%
<u>Error relativo</u>	-0.0039	-0.03529	0.914	-0.9015	2
<u>Presicion</u>	0.041	0.04	0.032	0.032	5

Tabla14. Resultados finales comparativos de adipoentcina, leptina en contra con los aceptados por los kits. A: analista, C.V.: coeficiente de variación.

Ya corroborada la metodología y analizado los resultados que se encontraran dentro de lo establecido por los kit como se observa en la tabla 14. , se pretendió

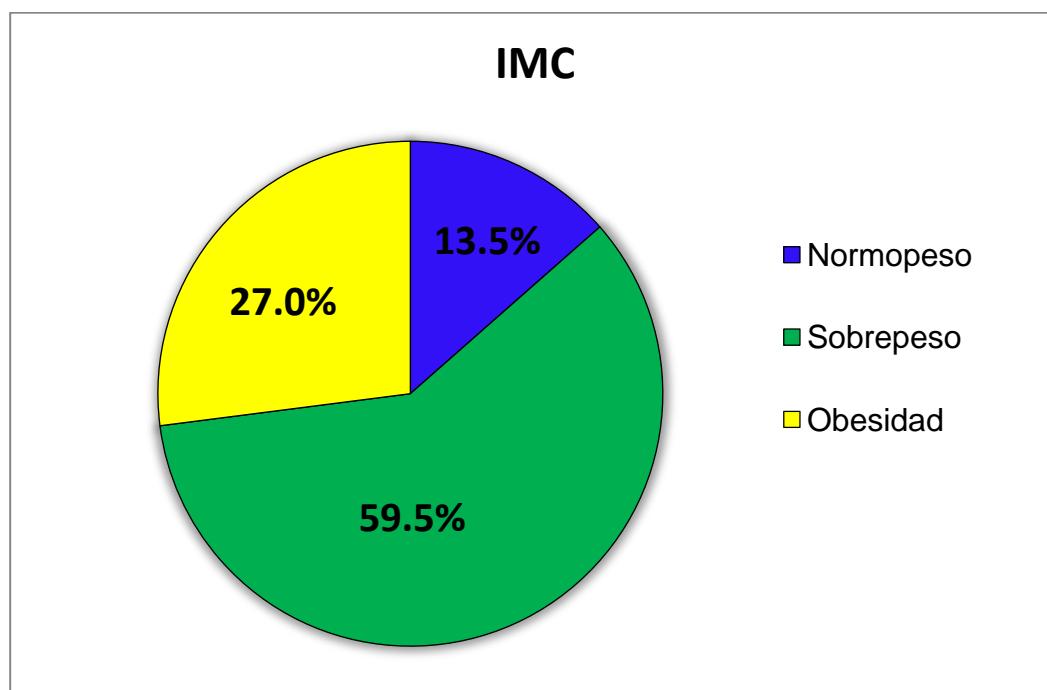
buscar la relación de los resultados con sin índice de masa corporal para de esta forma analizar el incremento o decremento de la leptina y adiponectina en los sueros de los pacientes.

3.3. Clasificación de la población de acuerdo a su IMC.

Realizamos un estudio de 37 casos, con pacientes con diagnóstico de cáncer mamario (casos). En la medición se consideró el índice de masa corporal IMC actual (peso cuantificado al momento de efectuar la investigación), como se puede observar en la tabla 15.

IMC	Frecuencia	Porcentaje
Normopeso	5	13.50%
Sobrepeso	22	59.50%
Obesidad	10	27.00%
Total	37	100.00%

Tabla 15. Clasificación de acuerdo a su IMC, de la población de estudio.



Grafica 1. Porcentaje de la población de acuerdo a su IMC, IMC: Índice de masa corporal.

3.4. Determinaciones de leptina y adiponectina en los sueros de pacientes

La determinación de las concentraciones de leptina se realizaron, a través de la técnica de ELISA, haciendo uso de kit Human Leptin ELISA, 40 055 200004, Genway, ensayo inmunoenzimático, tipo sándwich, para la determinación cuantitativa de leptina humana, los resultados pueden observarse en la tabla 16.

<i>IMC Categoría</i>	<i>IMC</i>	<i>Co Leptina</i>
<i>OBESIDAD</i>	31.4	41.1
<i>OBESIDAD</i>	30.7	43.4
<i>OBESIDAD</i>	37.4	55.7
<i>OBESIDAD</i>	37.5	62.7
<i>OBESIDAD</i>	37.3	54.2
<i>OBESIDAD</i>	32.5	22.9
<i>OBESIDAD</i>	32.1	14.2
<i>OBESIDAD</i>	30	33.6
<i>OBESIDAD</i>	33	37.5
<i>Promedio</i>	33.54	40.59

Tabla 16. Concentraciones de leptina (ng/mL), IMC: Índice de masa corporal, Co: Concentración, ng/mL: nanogramos/mililitros.

Para la determinación de adiponectina se recurrió a el uso del kit Human Adiponectin ELISA, High Sensitivity, de Genway, 40-055-200002; ensayo-inmunoenzimático tipo sandwich para la determinación cuantitativa de adiponectina humana, los resultados se pueden observar en la tabla 17.

<i>IMC Categoría</i>	<i>IMC</i>	<i>Co Adiponectina</i>
<i>OBESIDAD</i>	31.4	14.9
<i>OBESIDAD</i>	30.7	9.6
<i>OBESIDAD</i>	37.4	4.1
<i>OBESIDAD</i>	37.5	13.8
<i>OBESIDAD</i>	37.3	11.1
<i>OBESIDAD</i>	32.5	23.7
<i>OBESIDAD</i>	32.1	11.6
<i>OBESIDAD</i>	30	14.1
<i>OBESIDAD</i>	33	22.3
<i>Promedio</i>	33.54	13.91

Tabla 17. Concentraciones de Adiponectina ($\mu\text{g/mL}$), IMC: Índice de masa corporal, Co: Concentración, ng/mL: nanogramos/mililitros

En esta tabla podemos observar las concentraciones tanto de adiponectina como de leptina, solo para los pacientes que presentaron normopeso y sobrepeso.

<i>IMC Categoría</i>	<i>IMC</i>	<i>Co Leptina</i>	<i>Co Adiponectina</i>
<u>Normopeso</u>	22.8	6.6	7.5
<u>Normopeso</u>	23	2.1	20.1
<u>Normopeso</u>	23	11.4	19.7
<u>Normopeso</u>	22	7.7	21.9
<u>Sobrepeso</u>	26.8	24.4	12.9
<u>Sobrepeso</u>	28	28.4	19.7
<u>Sobrepeso</u>	27	26.7	13
<u>Sobrepeso</u>	26.3	12.5	11.4
<u>Sobrepeso</u>	25.8	14.5	13.8
<u>Sobrepeso</u>	27.1	4.8	4.6
<u>Sobrepeso</u>	25	2.9	11.9
<u>Sobrepeso</u>	28.5	16.7	11
<u>Sobrepeso</u>	26.6	18.7	11.8
<u>Sobrepeso</u>	26.8	6.2	12.1
<u>Sobrepeso</u>	29.3	21.4	11.8
<u>Sobrepeso</u>	29	9.1	16.1
<u>Sobrepeso</u>	28	6.3	18.8
<u>Sobrepeso</u>	25	13.7	13.1
<u>Sobrepeso</u>	25	15.4	23
<u>Sobrepeso</u>	25	15.3	13.3
<u>Sobrepeso</u>	26	26.6	24.3
<u>Sobrepeso</u>	28	22	25.1
<u>Promedio</u>	26.09	14.25	15.31

Tabla 18. Concentraciones de Adiponectina($\mu\text{g}/\text{mL}$) y leptina (ng/mL), IMC: Índice de masa corporal, Co: Concentración, ng/mL : nanogramos/mililitros.

Participaron 37 pacientes de los cuales 10 personas presentaron obesidad, para los pacientes con normoperso y sobrepeso no se encontraron niveles de concentración tan altos a los de referencia como puede analizarse en la tabla 18.

3.5. Discusión de resultados

Una herramienta importante para confirmar las concentraciones de leptina y adiponectina, la constituyen los métodos serológicos que se fundamentan en la detección de anticuerpos anti-leptina y anti-adiponectina en el suero del paciente. Sin embargo, es necesario contar con pruebas serológicas debidamente estandarizadas y validadas para evitar diagnósticos erróneos, evaluando mismos criterios para otras como lo puede ser un inmunoensayo, método de ELISA (67).

Mientras tanto para poder facilitar la determinación de los valores de leptina y adiponectina en pacientes con cáncer de mama, se buscó una metodología de la técnica de ELISA para el laboratorio clínico que garantice confiabilidad de una determinación analítica, que cumpla con las condiciones necesarias para que sea aceptado por el ámbito químico de la salud. (65)

Para el estudio se evaluó estadísticamente la linealidad del método analítico, para el método de ELISA, se obtuvieron coeficientes de correlación (r) y de determinación (r^2) que demuestran que existe regresión entre las variables concentraciones y las respuestas medidas (65) como se observa en las tablas 10 y 11.

Por otra parte, el estudio de precisión mostró una buena repetitividad y reproducibilidad de los resultados de acuerdo con los criterios de aceptación, mientras que los factores estudiados para cada método en el ensayo de robustez no influyeron significativamente en los resultados, por lo cual podemos considerar que dichos métodos son precisos.(37)

Gilda Toraño y cols. (76) llevaron a cabo el estudio de validación de un ensayo tipo ELISA con el objetivo de disponer de un método para la cuantificación de anticuerpos contra el polisacárido capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), en los ensayos clínicos previstos para demostrar la inmunogenicidad de una nueva vacuna conjugada, compuesta por un antígeno sintético, dentro de sus validación realizaron parámetros de linealidad dando como resultado una r de 0.9974 estando arriba del valor mínimo de que es $r=0.98$, y encontrándose nuestros valores muy cercanos siendo de 0.997 para adiponectina y 0.9991 para leptina (65)

El ensayo mostró un rango lineal entre 5-50 ng/ml para leptina, y entre 5-150 μ g/ml para la hormona de adiponectina. Este resultado es similar a otros ELISA, como el descrito por Karakufi y cols. [2].

Como resultado del análisis de la linealidad del método, dicho parámetro cumplió con los criterios de aceptación establecidos, y hubo una relación lineal esto se puede observar en las gráficas 5, 6, 7 y 8, esto se puede observar dentro concentraciones de la Adiponectina y la Leptina estudiadas y las áreas obtenidas para cada una (37).

Como se observa en la tabla 12 y 13, se obtuvieron valores de desviación estándar relativa y porcentaje de recobro (% rec) dentro de los límites establecidos en el protocolo de validación (DER menor o igual que 5,0 % y % rec = 97,0 - 103,0 %, y hubo una relación lineal entre los valores de referencia, por lo que se considera que el método es exacto (37)

En el parámetro de repetitividad como se observa en la Tabla 12. Y 13. Respectivamente, se realizaron 6 determinaciones para leptina y 10 para adiponectina fueron necesarias para asegurarse que el método es preciso, con valores de desviación estándar relativa menores que 2.0 %. Los resultados obtenidos en la reproducibilidad puede concluir que el método es reproducible cambiando el analista, ya que en ambos analistas se obtuvieron valores de coeficientes de variabilidad menores que 5.0 %.(65)

El método analítico cumple con el parámetro de límites de detección y cuantificación, ya que permite detectar y cuantificar concentraciones muy bajas tanto de adiponectina como de leptina presentes en el suero como se observa en la tabla 16, 17 y 18.

El método de ELISA empleado es adecuado para la determinación de ambas hormonas pues las variables analizadas en el parámetro de adecuabilidad cumplieron con los límites establecidos (C.V. menor o igual que 5.0 %), o sea, se obtienen picos finos, bien definidos y con buena resolución entre ellos. (65)

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, la técnica analítica propuesta para la validación del método analítico, es analizada para obtener resultados satisfactorios en las 2 hormonas estudiadas; así se demuestra en los parámetros de linealidad, precisión exactitud, límites de detección, cuantificación y especificidad. El método de Elisa es adecuado y las soluciones son estables de forma que garantizan su integridad para realizar pruebas de calidad. (37)

De esta manera se comprobó experimentalmente la utilidad del procedimiento establecido para la validación de métodos analíticos; y queda abierto el camino a la validación de todos los métodos analíticos en el control de la calidad empleando técnicas de ELISA. (65)

En términos cuantitativos, el sobrepeso en personas adultas se define como un índice de masa corporal (IMC) o índice de Quetelet, que se obtiene de dividir el peso en kilogramos por la talla en metros elevada al cuadrado. (51)

Haciendo uso del índice de masa corporal de los 37 pacientes se categorizó en tres grupos, sobrepeso con 22 personas adultas que presentaron un índice de masa corporal (IMC) de 25 a 29.9 kg/m², 10 personas con obesidad con un IMC de 30 kg/m² o más y 5 personas con un IMC aceptable entre 22 y 24.9 kg/m².(51)

La cantidad de tejido adiposo se determina por el IMC, que si bien es una medida indirecta de adiposidad se correlaciona con la grasa corporal y constituye un importante indicador para el diagnóstico de obesidad. (64). En el presente trabajo, los niveles séricos de leptina se asociaron significativamente con el IMC, siendo mayor en obesos que en sobrepeso o normopeso como se reportan en la tabla 16, presentando similitud con estudios reportados (64,65)

Los valores de la leptina en mujeres con obesidad se elevaron en un 50% casi al triple del valor observado en las mujeres con normopeso, coincidiendo con lo observado por los autores (54,55)

Al clasificar a las mujeres de acuerdo a IMC, se observó que los niveles de leptina se hacen significativamente ($P < 0.05$) superiores cuando el IMC > 24.78 kg/m², comparado con los con IMC < 19 kg/m².(59)

Del mismo modo, a medida que el índice de obesidad se incrementó, se produjo un aumento significativo ($P < 0,05$) de los niveles de leptina en mujeres. (59)

En forma similar a lo encontrado en este estudio, previamente se ha reportado que la concentración de leptina está directamente relacionada con indicadores de obesidad en mujeres lo cual sugiere que la obesidad está asociada con una resistencia funcional a la leptina. (60)

En México los niveles de prevalencia de mujeres con obesidad y sobrepeso para el 2006 fueron de 66%, además diversos estudios (epidemiológicos han revelado que la obesidad es un importante factor de riesgo para el desarrollo de diferentes tipos de cáncer como son el de ovario, próstata, colón y el cáncer de mama.

La relación existente entre la obesidad y cáncer de mama han convertido a estas dos enfermedades en un desafío para el sistema de salud en la mujer mexicana. (50,52)

La expresión y secreción de leptina es mayor en la grasa subcutánea que en la visceral (8). Clásicamente el tejido adiposo ha sido concebido como un tejido almacén de energía debido a su gran capacidad de captar ácidos grasos libres del torrente circulatorio y acumulado en forma de triglicéridos. Los estudios de este tejido se han centrado en determinar su relación con el metabolismo y almacenamiento de ácidos grasos, el desarrollo del propio tejido y su respuesta a señales endocrinas y naturales (66).

Las concentraciones de leptina están en relación con el IMC y su aumento sugiere la existencia de una resistencia a la leptina como causa de obesidad (60).

Los estudios de esta investigación para adiponectina demuestran que los pacientes con obesidad presentan concentraciones plasmáticas de leptina más bajas, demostrando similitud en estudio previo. (58)

Como se observa en la tabla 16, los niveles de leptina se encontraron elevados en un 50% a los valores de referencia, debido a este estado de resistencia es que la gran mayoría de los obesos tienen un apetito exagerado (hiperfagia) a pesar de tener un exceso de leptina, es decir esta hormona manda una información que no es registrada por el cerebro produciendo una disminución en la respuesta. Sus niveles hemáticos pueden estar elevados en la obesidad (67).

Se observa una correlación negativa como se observa en la tabla 18, entre los niveles y el índice de masa corporal. Esto contrasta con la mayoría de las adipocitocinas cuyos niveles están disminuidos en la obesidad en proporción directa con el aumento de la masa corporal.(57)

Los valores bajos de adiponectina que se puede observar en la tablas 18. Esto coincide con los descritos (67) quienes han reportado niveles de adiponectina inversamente correlacionados con el tejido adiposo y el cáncer de mama.(67).

Los hallazgos del presente estudio contribuyen a la hipótesis de que al disminuir la cantidad del tejido adiposo, aumentan los niveles de adiponectina, lo cual pudiera ser una explicación indirecta de por qué la obesidad incrementa (62), como se puede observar en la tabla 18, los niveles de adiponectina son normales en sobrepeso, mostrándose elevados en normopeso coincidiendo con los resultados de investigaciones previamente realizadas (63).

También se identificó que la adiponectina tampoco fue diferente entre los individuos con sobrepeso y obesos, sino en individuos con estado nutricional adecuado que presentaban niveles más altos de adiponectina, como se observa en la tabla 22 de normopeso (64).

Los individuos con niveles de adiponectina $< 4 \mu\text{g/mL}$ tenían un IMC más elevado que los individuos con niveles $> 4 \mu\text{g/mL}$. Hombres con IMC $> 30 \text{ kg.m}^2$ y con más de un 25% de grasa corporal, presentaban valores más bajos de adiponectina que los que tenían menor IMC como se observa en la tabla 17 y 18.(61)

Aunque individuos obesos tengan más grasa corporal, ellos también presentan niveles más elevados de leptina y TNF- α . Eso causaría una reducción en la expresión de la adiponectina y en la liberación de la adiponectina de los adipocitos. La adiponectina y TNF- α se inhiben uno al otro, Eso explicaría por qué individuos obesos tienen niveles de adiponectina circulantes más bajos, como lo han marcado ciertos autores (68).

En los individuos obesos, los niveles plasmáticos de adiponectina eran más bajos pese a que el tejido adiposo sea el único tejido de su síntesis, lo que sugiere una retroalimentación negativa en su producción impuesta por el desarrollo de la obesidad, como se puede observar en la tabla 17 y 18. Los valores son normales para sobrepeso y obesidad, pero se notan elevados los niveles de adiponectina en personas con obesidad, llegando a mismos resultados en investigaciones previas (68).

La concentración de adiponectina también depende de la cantidad y distribución de la masa corporal. A diferencia de otras adipocinas, los niveles circulantes de adiponectina son inversamente proporcionales a la obesidad (particularmente la central), Índice de masa corporal (IMC) (64).

También está demostrado que las concentraciones de adiponectina circulante son menores en pacientes con cáncer de mama, endometrio, próstata y colon (64) como se observan en las tablas 17 y 18.

Los bajos niveles circulantes de adiponectina característicos de la obesidad promueven factores de riesgo para el desarrollo de diferentes tipos de cáncer como se observa en la gráfica 2. (64)

De acuerdo a la investigación el mayor porcentaje de acuerdo a el resultado de la biopsia como se observa en la gráfica 2, el 64.9% es canalicular infiltrante, siendo el de mayor incidencia en nuestros resultados, coincidiendo con diversos autores (74).

Otro factor relacionado con tasas de mortalidad más elevadas por cáncer de mama en mujeres obesas es la dificultad que ofrece la detección del tumor, el cual generalmente es detectado en etapas más avanzadas en pacientes con un IMC

mayor de 27,5 kg/m² que en pacientes delgadas (64) como se puede observar en la tabla 19.

Puede observarse que los resultados de la leptina en la tabla 16, se encuentran elevados para los pacientes que presentaron obesidad, ya que la leptina se correlaciona positivamente con reservas adiposas y el estado nutricional, e importante en el equilibrio energético y el control para abrir el apetito.(69)

Por lo que se ha descrito la leptina se ha estudiado ampliamente como un potencial mediador de la obesidad relacionada con cáncer.(70)

De acuerdo a la tabla 15, el total de pacientes con obesidad coinciden con la agencia internacional para la investigación en cáncer que ha determinado que basado en los resultados de estudios epidemiológicos las personas que tienen obesidad están en un mayor riesgo de desarrollar varios tipos de cáncer (71)

En la muestra poblacional que se estudió, la frecuencia de sobrepeso y obesidad fue mayor en un (86.5%) como se observa en la tabla 15, mientras que el normopeso se presentó en un (13.5%) como se puede observar en la Tabla 15, (66).

Estos resultados coinciden con Hidalgo en los que los obesos desde el período neonatal hasta la ancianidad, presentan mayores niveles séricos de leptina si se compara con personas de peso normal (66).

Los resultados de adiponectina que se observan en la tabla 17 y 18., presentaron una promedio con 14.1ng/mL, encontrándose dentro del rango normal, estos resultados coinciden ya que se hallaron valores de adiponectina menores a 15 ng/mL solo en obesos y en quienes tuvieron sobrepeso. (66)

Los investigadores consideran que la adiponectina no es solo un marcador de adiposidad central, sino que en el caso particular de las mujeres contribuye al deterioro metabólico ya que existe una regulación compleja de la secreción y una depuración de adiponectina que depende de la edad y del género (68,72)

Los valores de la leptina muestran que los pacientes de este estudio se encuentran relacionados con funciones que se le atribuyen desde el control del metabolismo energético normal hasta la de intervenir en el crecimiento y proliferación de varias neoplasias, como en el coriocarcinoma, embarazo molar, cáncer mamario, adenocarcinoma prostático, insulinomas, tumores benignos del ovario, etc. (66)

El efecto de la obesidad sobre el riesgo de cáncer de mama depende, principalmente, del estado hormonal de la mujer. Esto se explica por los altos

niveles de estrógenos presentes en mujeres obesas. Los niveles de estrógenos en mujeres obesas postmenopáusicas son 50 a 100 % más elevados que en mujeres delgadas. De acuerdo con la edad de los pacientes, podemos ver que el 59.5% están en posmenopausia encontrándose entre los 50 y 90 años de edad, lo cual sugiere que los ovarios son la fuente principal de estrógenos aunque también son producidos por el tejido adiposo. Después de la menopausia, cuando los ovarios dejan de producir estrógenos, el tejido graso se convierte en la fuente más importante de esta hormona. Los tejidos sensibles a estrógenos están expuestos, por lo tanto, a mayor estímulo en mujeres obesas lo que lleva a un crecimiento más rápido de tumores de mama que responden a estrógenos. (73)

Otro factor relacionado con tasas de mortalidad más elevadas por cáncer de mama en mujeres obesas es la dificultad que ofrece la detección del tumor, el cual generalmente es detectado en etapas más avanzadas en pacientes con un IMC mayor de 27,5 kg/m² que en pacientes delgadas como se puede observar en la tabla 15.(74)

Previos análisis calculan que cerca de 11.000 mil a 18.000 mil muertes anuales por cáncer de mama en pacientes estadounidenses mayores de 50 años podrían evitarse si las mujeres mantuviesen un IMC menor de 25 kg/m² durante su vida adulta. (27) Estas estadísticas demuestran la importancia de mantener una alimentación sana y realizar actividad física para conservar un peso saludable y así disminuir los riesgos de cáncer asociados a la obesidad (7)

Conclusiones:

1. El método para la determinación de una metodología analítica nos permite determinar que a través de una técnica de Elisa es lineal en el intervalo de concentración estudiado. Basándonos en el valor obtenido de r para el coeficiente de correlación, y corroborándolo con la inspección visual de la gráfica de la curva.
2. La metodología nos permite aprobar los ensayos de repetitividad al determinarse un coeficiente de variación (C.V.) menor al 5% que nos marcan los insertos, con lo que se concluye que la metodología es precisa.
3. El estudio demostró que la metodología cumple con los criterios mínimos como lo son linealidad, exactitud y precisión, por lo que se puede mencionar que el método es aceptado para ser considerado como una validación.
4. Puede utilizarse esta metodología en cualquier determinación de las dos hormonas estudiadas, ya que cumplen con los criterios de aceptabilidad.
5. Las concentraciones de leptina para las pacientes con obesidad, se encontraron fuera de los valores normales, a diferencia de los valores de adiponectina que se encontraron dentro de los valores normales como era de esperarse.
6. La obesidad de las pacientes pudo haber sido un factor para haber podido desarrollar cáncer de mama.
7. Tanto la leptina como la adiponectina van de la mano para convertirse en un factor serio para desarrollar obesidad.
8. Sería recomendable que se establezca la costumbre de comer sanamente y hacer actividad física para evitar el exceso de peso y la obesidad. A quienes ya tienen exceso de peso o son obesos se les recomienda que eviten mayores ascensos y que adopten una dieta baja en calorías y un plan de ejercicios diarios.

Propuestas

Propuestas técnicas

- Es recomendable tener una buena estandarización de las micropipetas, ya que el buen manejo de estas ayuda a tener mejor precisión en los volúmenes y determinaciones.
- Verificar que los instrumentos, aparatos se encuentren calibrados, ya que de lo contrario pueden existir aberraciones al momento de las mediciones.
- Es recomendable revisar que los sueros no vengan lipemicos, ya que pueden afectar el resultado, y puede ser impreciso la cuantificación de los analitos.
- Seguir a conciencia cada uno de los pasos, ya que cada uno es crucial para el buen desempeño de la técnica de ELISA.

Propuestas poblacionales

- Establecer programas de educación para una buena alimentación, para promover en ellos una buena conciencia del bienestar físico.
- En las mujeres promover más la importancia de la autoexploración, ya que la mayoría de los cánceres se detecta en un nivel avanzado, convirtiéndose en un alto riesgo para contrarrestarlo.
- Hacer nacer la importancia de la activación física, y la importancia de dejar a un lado el sedentarismo.
- Comentar la importancia a los pacientes del trabajo realizado.

Referencias

1. Knaul F, Lozano R, Arreola-Ornelas H, Gómez-Dantés H. México: Numeralia del Cáncer de mama. Funsalud, Instituto Carso de la Salud México, DF. 2008
2. Knaul FM, Nigenda G, Lozano R, Arreola-Ornelas H, Langer A, Frenk J. Cáncer de mama en México: una prioridad apremiante. *salud pública de méxico*. 2009;51(supl 2).
3. Obesidad y sobrepeso [database on the Internet]. OMS 2011. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/index.html>.
4. Jardé T, Perrier S, Vasson MP, Caldefie-Chézet F. Molecular mechanisms of leptin and adiponectin in breast cancer. *European Journal of Cancer*. 2011;47(1):33-43.
5. Barb D, Williams CJ, Neuwirth AK, Mantzoros CS. Adiponectin in relation to malignancies: a review of existing basic research and clinical evidence. *The American journal of clinical nutrition*. 2007;86(3):858S.
6. Cáncer [database on the Internet]. OMS. 2011. Available from: <http://www.who.int/topics/cancer/es/index.html>.
7. Breast cancer. National Cancer Institute at the National Institutes of Health of EE.UU. ; 2011; Available from: <http://www.cancer.gov/cancertopics/types/breast>.
8. Lira LMS, Rodríguez NR, editors. Estudio mamario integral en el Hospital General de México. Frecuencia y clasificación BI-RADS. Experiencia de un año. 2011.
9. GLOBOCAN. International Agency for Research on Cancer; 2008; Available from: <http://www-dep.iarc.fr/>.
10. Martínez-Montañez OG, Uribe-Zúñiga P, Hernández-Ávila M. Políticas públicas para la detección del cáncer de mama en México. *salud pública de méxico*. 2009 51:s350-s60.
11. Brandan M, Villaseñor Y. Detección del cáncer de mama: Estado de la mamografía en México. *Rev Inst Nal Cancerol*. 2006;1:147-62.
12. Luque J, Herráez A. *Biología Molecular e Ingeniería Genética. Conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud*. Barcelona, España: Editorial ELSEVIER; 2001. 461 p.
13. Greenspan FS, Strewler GJ. *Endocrinología básica y clínica*. 4a ed. México, D.F.: El manual moderno; 2000.
14. Salud Sd. Norma Oficial Mexicana NOM-041-SSA2-2002, Para la prevención, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer de mama. *Diario oficial de la Federación*.
15. Cleary M, Grossmann M, Ray A. Effect of obesity on breast cancer development. *Veterinary Pathology Online*. 2010;47(2):202.
16. González Barranco J. *Obesidad* . 1a ed. México, D.F.: McGraw-Hill Interamericana; 2004.
17. Garofalo C, Surmacz E. Leptin and cancer. *Journal of cellular physiology*. 2006;207(1):12-22
18. Gil-Campos M, Cañete R, Gil A. Adiponectin, the missing link in insulin resistance and obesity. *Clinical Nutrition*. 2004;23(5):963-74.
19. Kelesidis I, Kelesidis T, Mantzoros C. Adiponectin and cancer: a systematic review. *British journal of cancer*. 2006;94(9):1221-5.
20. Chandran M, Phillips SA, Ciaraldi T, Henry RR. Adiponectin: more than just another fat cell hormone? *Diab Care*. 2003;26:2442-50.
21. Lang K, Ratke J. Leptin and Adiponectin: new players in the field of tumor cell and leukocyte migration. *Cell Communication and Signaling*. 2009;7(1):27.

22. Garaulet M, Hernandez-Morante JJ, De Heredia FP, Tébar FJ. Adiponectin, the controversial hormone. *Public health nutrition*. 2007;10(10):1145-50.
23. Okamoto Y, Kihara S, Funahashi T, Matsuzawa Y, Libby P. Adiponectin: a key adipocytokine in metabolic syndrome. *Clinical Science*. 2006;110:267-78.
24. Wauters M, Considine RV, Van Gaal LF. Human leptin: from an adipocyte hormone to an endocrine mediator. *European journal of endocrinology*. 2000;143(3):293.
25. Simon E, Barrio ASD. Leptina y obesidad. *Anales Sis San Navarra*. 2009;25(1):53-64. Epub
26. Mantzoros CS. The role of leptin in human obesity and disease: a review of current evidence. *Annals of internal medicine*. 1999;130(8):671.
27. San Miguel A, Calvo B, Alonso N, Iglesias R, Mazón M. 12. Leptina: implicaciones fisiológicas y clínicas.
28. Mantzoros CS, Magkos F, Brinkoetter M, Sienkiewicz E, Dardeno TA, Kim SY, et al. Leptin in human physiology and pathophysiology. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*. 2011;301(4):E567-E84.
29. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*. 1998;395(6704):763-70.
30. Mantzoros C, Petridou E, Dessypris N, Chavelas C, Dalamaga M, Alexe DM, et al. Adiponectin and breast cancer risk. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2004;89(3):1102-7.
31. Shanchun G, Mingli L, Guangdi W, Marta T, Ruben R. Oncogenic role and therapeutic target of leptin signaling in breast cancer and cancer stem cells *Biochim Biophys Acta*. 2012 April ; 1825(2): 207–222.
32. Qiao Z, Sarah M., Jinling Z, Erinn D, Jeremy N, Stephen D, Nathan A, Ofer R, Leptin deficiency suppresses MMTV-Wnt-1 mammary tumor growth in obese mice and abrogates tumor initiating cell survival, *Endocr Relat Cancer*. 2011 August ; 18(4): 491–503
33. Douglas E, Chialin C, Vasu P, Hidekazu T, Keigo M, Pluripotency factor-mediated expression of the leptin receptor (OB-R) links obesity to oncogenesis through tumor-initiating stem cells, University of Missouri, December 2, 2011
34. Ivana V, Joseph P, Obesity and cancer risk: evidence, mechanisms, and recommendations, *Annals of the new york academy of sciences*, 2012
35. Kathleen Y, Kenneth C, Graham A, Obesity and Cancer, *Epidemiology and Community Health*, 2010;15:556–565
36. Manual de procedimiento, criterios de aplicación de la norma NMX-EC-17025-IMNC-2006 / ISO/IEC 17025:2005. Entidad Mexicana de Acreditación., (2006).
37. Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico. EMA/CENAM., (2008).
38. Castillo Aguilar B, González Hernández R. Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos. *Revista Cubana de Farmacia*. 1996;30(1):0-.
39. Miyoshi Y, Funahashi T, Kihara S, Taguchi T, Tamaki Y, Matsuzawa Y, et al. Association of serum adiponectin levels with breast cancer risk. *Clinical Cancer Research*. 2003;9(15):5699-704.
40. Chen DC, Chung YF, Yeh YT, Chung HC, Kuo FC, Fu OY, et al. Serum adiponectin and leptin levels in Taiwanese breast cancer patients. *Cancer letters*. 2006;237(1):109-14.
41. Kang JH, Yu BY, Youn DS. Relationship of serum adiponectin and resistin levels with breast cancer risk. *Journal of Korean medical science*. 2007;22(1):117.

42. Tworoger SS, Eliassen AH, Kelesidis T, Colditz GA, Willett WC, Mantzoros CS, et al. Plasma adiponectin concentrations and risk of incident breast cancer. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2007;92(4):1510-6.
43. Hou W, Xu Y, Yu T, Zhang L, Zhang W, Fu C, et al. Adipocytokines and breast cancer risk. *CHINESE MEDICAL JOURNAL-BEIJING-ENGLISH EDITION*. 2007;120(18):1592.
44. Jardé T, Caldefie-Chézet F, Goncalves-Mendes N, Mishellany F, Buechler C, Penault-Llorca F, et al. Involvement of adiponectin and leptin in breast cancer: clinical and in vitro studies. *Endocrine-related cancer*. 2009;16(4):1197-210.
45. Maskarinec G, Woolcott C, Steude JS, Franke AA, Cooney RV. The relation of leptin and adiponectin with breast density among premenopausal women. *European journal of cancer prevention: the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*. 2010;19(1):55.
46. Shannon M, Weiwen C, Unhee L, Adrian A F, Robert V C, Gertraud M. Leptin, Adiponectin, and Obesity among Caucasian and Asian Women. *Mediators of Inflammation*. 2011;2011.
47. Knaul FM, López Carrillo L, Lazcano Ponce E, Gómez Dantés H, Romieu I, Torres G. Cáncer de mama: un reto para la sociedad y los sistemas de salud. *salud pública de méxico*. 2009;51:s138-s40.
48. Franco-Marina F, Lozano R, Villa B, Soliz P. La mortalidad en México, 2000-2004: Muertes evitables: magnitud, distribución y tendencias. Dirección General de Información en Salud, Secretaría de Salud México. 2006:2.
49. Aranzález I, Mockus I, Ramírez D, Mancera E, García O, The effect of aerobic exercise on serum adiponectin and leptin levels in postmenopausal females, Universidad Nacional de Colombia, 2011
50. Jaimet C, Bartoli A, Enria G, Obesidad en mujeres con cáncer de mama, Patología Mamaria del Hospital Centenario
51. Hernán C, La obesidad: un desorden metabólico de alto riesgo para la salud, Colombia medica 2012.
52. Lares A, Marchat M, Relación de las Concentraciones Plasmáticas de Leptina y la Expresión Fenotípica de CYP2E1, de acuerdo al Estado Nutricional y al Grupo Étnico, CIIDIR-IPN Unidad Durango 2010
53. Simon E, Leptina y obesidad, Departamento Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia. Universidad del País Vasco
54. Jiménez M, *Serum levels of leptin and insulin in obese and non obese subjects*, Cátedra de Semiología Médica. Hospital de Clínicas FCM. UNA. 2005
55. Esparza I, Solís P, López C, Gonzales M, Sánchez P, Osorio D, El papel de la adiponectina en la resistencia a la insulina en niños con obesidad, Facultad de Salud Pública y Nutrición, Universidad Autónoma de Nuevo León 2011.
56. Zavala L, Fisiología de la Leptina en el Control de la Ingesta y Homeostasis Energética como Enfoque Hacia la Prevención de la Obesidad, *medicrit revista de medicina interna y crítica* 2008.
57. Molero C, Morales L, Fernandez V, Casanova L, Connell L, Lissette C, Campos G, Insulina, leptina y hormona de crecimiento y su relación con índice de masa corporal e índice de obesidad, Universidad del Zulia, Maracaibo-Venezuela 2006.
58. Santillán B, Ordóñez Q, Mendieta Z, Gómez O, La leptina en la carcinogénesis mamaria
Vías de señalización, *Revista Química Viva - Número 2, año 11, agosto 2012*
59. Gonzales R, Solano R, Gonzales J, Adiponectina, insulina y glicemia, en individuos con sobrepeso u obesidad sometidos a un régimen de alimentación rico en

carbohidratos complejos, Centro de Investigaciones en Nutrición, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo. Valencia, Estado Carabobo, Venezuela 2009.

60. Silva L, Solano C, Influencia del Estado Nutricional y del VO_{2max} en los Niveles de Adiponectina en Hombres que superan los 35 Años, *Escola Nacional de Saúde Pública 2010.*}

61. Constanza M, López F, Recalde R, Vanrell R, Uvilla A, Messina L, Influencia de la leptina y la adiponectina sobre el cáncer de próstata Archivos Españoles de Urología, , Influencia de la leptina y la adiponectina sobre el cáncer de próstata, Archivos Españoles de Urología, vol. 62, núm. 2, marzo, 2009, pp. 103-108, vol. 62, núm. 2, marzo, 2009, pp. 103-108.

62. Vanrell M., Maselli M, Recalde G, Mlta N, Fontana C, Pérez E, López L, Influencia de la obesidad sobre el desarrollo del cáncer, Laboratorio de Enfermedades Metabólicas y Cáncer. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Juan Agustín Maza. Mendoza. Argentina 2008

63. Vadillo B, Vela O, Galindo R, Salazar E, Leptina y su influencia en los principales padecimientos ginecoobstétricos, *Ginecol Obstet Mex 2005;73:99-104*

64. Cannova D , Aguilar C, Simosn A, Mehudy M, Validación del Inmuno Ensayo Enzimático (ELISA) y Hemoaglutinación Indirecta (HAI) para el Serodiagnóstico de la Enfermedad de Chagas, *Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo 2005*

65. Suarez R, Arévalo E, Linares L, Ustariz F, Hernandez G, Validación de un método analítico para la determinación de magnesio eritrocitario, Laboratorio de Análisis Instrumental de la Escuela de Bioanálisis, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida 5101-Venezuela, *Avances en Química, 4(2), 53-62 (2009).*

66. Hidalgo B, Expresión de adiponectina en musculo esquelético y sus efectos en la resistencia a la insulina y la obesidad, Universidad Autónoma de Barcelona 2006.

67. Iglesias J, Erías S, Piñero R, López O, Gallego R, Fernández L, Lago F, Gonzales J, Influencia del sexo en la expresión de adiponectina y leptina en el tejido adiposo epicárdico y subcutáneo.

Estudio en pacientes sometidos a cirugía cardíaca, Unidad de Investigación en Cardiología Celular y Molecular. Servicio de Cardiología 2006.

68. Domínguez R, Adiponectina: El tejido adiposo más allá de la reserva inerte de energía, *Revista de Endocrinología y Nutrición Vol. 15, No. 3 Julio-Septiembre 2007 pp 149.*

69. Durazo Q, Capelini F, Leptina y obesidad, *Rev Mex Patol Clin, Vol. 56, Núm. 4, pp 262-264 • Octubre - Diciembre, 2009.*

70. Vucenik I, Stains J, Obesity and cancer risk: evidence, mechanisms, and recommendations, *ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES 2010*

71. Soto M, Lagos S, Obesidad y cáncer: un enfoque epidemiológico, *revista médica de costa rica y centroamerica LXVI (587) 27-32; 2009.*

72. Antista M, Adiponectina, *Gestion de calidad, Notas científicas de actualidad, 2008.*

73. Vanrell C, López F, Elizalde P, López L, Obesidad y Cáncer, Facultad de Farmacia y Bioquímica Universidad 2008.

74. Chagpar A, McMasters KM, Nurko J, Body mass index influences palpability but not stage of 10. Freedland SJ, Aronson WJ. Obesity and prostate cancer. *Urology* 65: breast cancer at diagnosis. *American Surgery* 73(6):555-60, 2007.
75. Elias S, Álvaro C, Llanque C, Cancer o carcinoma de mama, *Médicos Familiares Policlínico Manco Kápac*, *Rev Pacea Med Fam* 2008; 5(7): 14-23.
76. Shanchun G, Mingli L, Guangdi W, Marta T, Ruben R. Oncogenic role and therapeutic target of leptin signaling in breast cancer and cancer stem cells *Biochim Biophys Acta*. 2012 April ; 1825(2): 207–222.