

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EFFECTO AGUDO DEL EJERCICIO Y LOS CARBOHIDRATOS DE ALTO INDICE
GLICÉMICO SOBRE LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE LEPTINA

Tesis sometida a la consideración de la comisión del Programa de Posgrado en Ciencias
Biomédicas, para optar al grado de Magíster Scientiae en Fisiología

ALFREDO JESÚS LÓPEZ DÁVILA

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica
2006

DEDICATORIA

A mi Padre:

Sr. Alfredo López Cháves.

Por derrochar sacrificios en este hijo, aún hoy.

Con tus pocas palabras y tu inagotable humanismo, me educas con el ejemplo.

Siempre has sido de quién más y mejor aprendo.

Más allá de estas letras, sé que la única forma de honrarte es siendo un hombre de bien.

A mi Madre:

Marlene Dávila Ordeñana. M.Sc.

Por tanta paciencia y comprensión.

Por habernos dado siempre un hogar con leche y miel. Primero en la barriga y después en la casa.

A mi hijo:

Jesús López B.

Diluvio de estrellas.

Sol de amor, belleza, inocencia y ternura.

A Andrea:

Dios siempre puso en mi camino ángeles, en mis manos tesoros, y en mi vida bendiciones.

Tú eres la evidencia definitiva de este enunciado.

Nos elevaremos como las aves, tú y yo, ala con ala, sueño con sueño.

Eres quien marca en mi vida la diferencia significativa ($p < 0.000$).

AGRADECIMIENTOS

Lo mejor de nosotros es el paso.
La pierna que se mueve
para humillar al barro.
El talón que resuena
por dentro del zapato.

Lo mejor de nosotros es el paso.
La huella misma,
la huella que es como un triunfo sobre el barro.
El golpe del tacón que suena a golpe
de lucha en el asfalto.

Si no hubiéramos hecho tantos dioses,
podríamos adorar al señor paso.

Jorge Debravo, Costa Rica.

Este pequeño paso nunca hubiera sido dado sin el apoyo esencial de las siguientes personas e instituciones, para todas ellas mi agradecimiento.

Adrián González	Adriana Suárez	Aileen Fernández
Alexander Jiménez	Alfredo López Ch.	Allan Mora
Andrea Solera	Andrés Arguedas	Cándida Dávila O.
Carlos Ballestero	Carlos Calderón	Carlos Acevedo
Christian Meléndez	Derby Muñoz	Diego Arguedas
Edward Castro	Emmanuel Zumbado	Elías Ovares
Elyin Espinoza	Ernesto Solórzano	Fiorella Fortado
Flor Quesada	Flora Ordeñana	Francisco Ramírez
Gabriel Sáenz	Georgina Gómez	Grettel Villalobos
Guido Ulate	Guisselle Herrera	Hammer Arias
Herberth Solís	Ivan Vargas	Jarvy Loaiza
Jeremy Quesada	Jhonny Alvarado	Jhonny Montoya
Joaquín Garro	Jose Moncada	Juan Delcoso
Juan M. Campos	Juliana Malavassi	Julieta Escalante
Liza Buzano	Lizeth Rojas	Luis F. Aragón
Luis Meneses	Maikol Rodríguez	Marcos Fallas
María L. Campos	María J. Sandí	Maritza Calderón
Marta Sisfontes	Melissa Carazo	Míriam Murillo
Nini Alvarado	Osvaldo Calderón	Pablo Astorga
Pilar Salas	Ricardo Mora	Ricardo Peñalosa
Róger Miranda	Silvia Quesada	Víctor Castillo
Walter Salazar	Xinia Arrieta	Sandra Silva

Instituto Nacional de Investigaciones en Salud. (INISA)

Gatorade Sport Science Institute (GSSI).

Laboratorio de Análisis Clínicos y Moleculares S.A.

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONICIT).

Sistema de Estudios de Posgrado de la Universidad de Costa Rica.

Escuela de Microbiología. Universidad de Costa Rica.

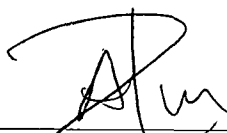
Departamento de Fisiología de la Escuela de Medicina. Universidad de Costa Rica.

“Esta tesis fue aprobada por la comisión del Programa de Posgrado en Ciencias Biomédicas de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar por el grado de Magíster Scientiae en Fisiología”.

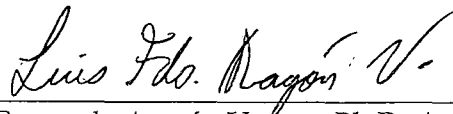


Adriana Suárez Urhan. M.Sc.

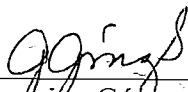
En representación del Sistema de Estudios de Posgrado.



Aileen Fernández Ramírez. M.Sc. Tutora.



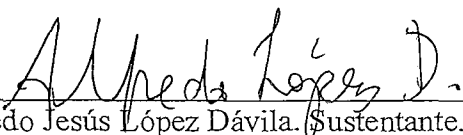
Luis Fernando Aragón Vargas. Ph.D. Asesor.



Georgina Gómez Salas. M.Sc. Asesora.



Silvia Quesada Mora. Ph.D. Directora del Posgrado en Ciencias Biomédicas.



Alfredo Jesús López Dávila. Sustentante.

INDICE

Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
Hoja de aprobación	v
Índice	vi
Resumen	vii
Lista de cuadros	viii
Lista de figuras	ix
Lista de abreviaturas	x
Cuerpo del trabajo	01
Anexo 1: Revisión bibliográfica.	16
Anexo 2: Metodología completa.	53
Anexo 3: Objetivos e hipótesis.	65
Anexo 4: Detalle de resultados.	67
Anexo 5: Referencias bibliográficas.	78
Anexo 6: Varios.	86

RESUMEN

Efecto agudo del ejercicio aeróbico y los carbohidratos de alto índice glicémico sobre la concentración plasmática de leptina.

Se diseñó un estudio que evaluara el efecto del ejercicio aeróbico (60% del $\dot{V}O_{2max}$, 50 min de duración) sobre la concentración plasmática de leptina, en sujetos en ayunas y después de ingerir carbohidratos. Diez sujetos activos, sanos, masculinos se asignaron aleatoriamente en cuatro condiciones (AR: ayuno-reposo, AE: ayuno-ejercicio, DR: desayuno-reposo, DE: desayuno-ejercicio). Durante todas las condiciones se dieron disminuciones significativas de la concentración plasmática de leptina ($p < 0.05$). Además se presentó una interacción significativa entre las condiciones AR y DR ($P < 0.05$).

La condición DR presentó los mayores incrementos de glicemia e insulinemia y a partir de las 14:00 horas (cinco horas después de ingerir los carbohidratos) las concentraciones plasmáticas de leptina fueron significativamente mayores que en la condición AR ($p < 0.05$). La condición DE presentó también incrementos de glicemias e insulinemias, pero significativamente menores que la condición DR ($p < 0.05$) y sus concentraciones plasmáticas de leptina nunca fueron mayores que los de la condición AR. La condición AE presentó glicemias e insulinemias siempre basales, y sus concentraciones plasmáticas de leptina no llegaron a superar a las correspondientes a la condición AR. No se encontró un efecto agudo del ejercicio aeróbico sobre la concentración plasmática de leptina en sujetos en ayunas. Cuando los sujetos ingirieron un desayuno alto en carbohidratos y permanecieron en reposo, presentaron un efecto que se inició 5 horas después de la ingesta. La actividad física practicada luego de ingerir carbohidratos, neutralizó el efecto que estos generaron en ausencia de ejercicio aeróbico. El ejercicio no demostró un efecto en ayunas, pero tendió a disminuir los cambios inducidos por los carbohidratos.

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1: Características de los sujetos experimentales	04
Cuadro 2: Agentes reguladores de la leptina. Se incluyen agonistas y antagonistas.	40
Cuadro 3: Efectos crónicos del ejercicio sobre la concentración de leptina en plasma.	43
Cuadro 4: Efectos agudos del ejercicio sobre las concentraciones de leptina en plasma.	51
Cuadro 5: Estadística descriptiva de las concentraciones plasmáticas de leptina registradas durante cuatro condiciones experimentales	68
Cuadro 6: Estadística inferencial de las concentraciones plasmáticas de leptina registradas durante cuatro condiciones experimentales	69
Cuadro 7: Estadística descriptiva de las glicemias registradas durante cuatro condiciones experimentales	71
Cuadro 8: Estadística inferencial de las glicemias registradas durante cuatro condiciones experimentales	73
Cuadro 9: Estadística descriptiva de las concentraciones plasmáticas de insulina registradas durante cuatro condiciones experimentales	76
Cuadro 10: Estadística inferencial de las concentraciones plasmáticas de insulina registradas durante cuatro condiciones experimentales	76

LISTA DE ILUSTRACIONES Y FIGURAS.

Figura 1: Representación gráfica del diseño experimental	05
Figura 2: Concentración plasmática de leptina durante cuatro diferentes condiciones experimentales	07
Figura 3: Glicemia durante cuatro diferentes condiciones experimentales	08
Figura 4: Concentración de insulina plasmática durante cuatro diferentes condiciones experimentales	08
Figura 5: Comparación entre dos ratones carentes de leptina.	18
Figura 6: Esquema resumen de los experimentos de parabiosis de varios autores.	19
Figura 7: Respuestas fisiológicas a la leptina.	21
Figura 8: Representación esquemática de las acciones generales de la leptina	24
Figura 9: Mecanismo de señalización intracelular de la leptina.	25
Figura 10: Acciones de varios factores hipotalámicos que regulan la ingesta y el gasto calórico.	26
Figura 11: Proceso de proteólisis de la proopiomelanocortina y génesis de la hormona melanocito estimulante alfa.	27
Figura 12: Incremento del gasto calórico causado por la leptina y las proteínas desacoplates tipo 1.	29
Figura 13: Integración de los efectos moleculares y sistémicos de la leptina.	31

LISTA DE ABREVIATURAS

LARENFISA: Laboratorio de Rendimiento Físico y Salud.	01
TMB: Tasa Metabólica Basal.	03
VO _{2max} : Consumo máximo de oxígeno.	03
RCD: Requerimiento calórico diario.	03
IMC: Índice de masa corporal.	04
MG: Masa grasa. Como porcentaje de la masa total corporal.	04
Hc: Hematocrito.	04
Hg: Hemoglobina.	04
GA: Glicemia en ayunas.	04
Kcal: Kilocaloría.	04
AR: Condición control, ayuno y reposo.	05
AE: Condicion experimental de ayuno y ejercicio.	05
DR: Condición experimental de desayuno y reposo.	05
DE: Condición experimental de desayuno y ejercicio.	05
ANOVA: Análisis de varianza.	06
OB-R: Receptor de leptina. Se divide en los subtipos a, b, c, d y e	22
JAK: Janus quinasa	23
STAT: transcrito activador de la transducción de señal	23
ADN: Acido desoxiribunucleico	23
NPY: Neuropeptido Y	25
AgRP: Proteina relacionada a la hormona “agouty“	25
MCH: Hormona concentradora de melanina	25

α MSH: Hormona melanocito estimulante alfa	26
cAMP: Adenosina monofosfato cíclico	26
POMC: Pro-opiomelanocortina	26
MCXR: Receptor de melanocortina. La posición "X" es siempre un número que indica el subtipo de receptor	27
CART: Transcripto regulado por cocaína y anfetamina	28
UCP-1: proteínas desacoplantes tipo 1	28
ARNm: ácido ribonucleico mensajero	33
PAR-Q: Cuestionario relacionado a la actividad física	55
VO ₂ : Consumo de oxígeno	58
VCO ₂ : Producción de dióxido de carbono	58
RPM: Revoluciones por minuto	58
FCM: Frecuencia cardíaca máxima	59
FA: Factor de actividad física.	59
ET: Efecto térmico de los alimentos	59
CVP: Cambio en el volumen plasmático	63
VPI: Volumen plasmático inicial	63
VPF: Volumen plasmático final	63

INTRODUCCION

La leptina es una hormona producida principalmente en el tejido adiposo. A largo plazo su concentración plasmática se correlaciona directamente con la adiposidad de cada persona y constituye una señal aferente, que estimula centros integradores hipotalámicos. En ratones se ha demostrado que como respuesta a la hormona se generan eferencias que disminuyen la ingesta y aumentan el gasto de calorías, por lo que esta retrocontrola negativamente la masa corporal (Friedman 2002, Hickey, Calsbeek 2001, Nelson, Cox 2004). En humanos se ha encontrado que de manera aguda, la concentración plasmática de leptina se ve aumentada o disminuida por estados de balance energético positivos o negativos, respectivamente (Cammisoto, Buckowiecki 2002, Fred, Ricci, Russell, Lafarette 2000, Soliman, Elzalabany, Salama, Ansari 2000).

Con respecto al efecto agudo del ejercicio sobre las concentraciones de esta hormona en plasma, los diferentes estudios publicados hasta la fecha han generado ideas inconsistentes (Duclos, Corcuff, Ruffie, Roger, Manier 1999, Fisher, Van Pelt, Zinder, Landt, Khort 2001, Gomez-Merino, Chennaoui, Drogou, Boneau, Guezennec 2002, Hickey, Considine, Israel *et al* 1996, Landt, Lawson, Helgeson, *et al* 1997, Leal-Cerro, García-Luna, Astorga *et al* 1998, Nindi, Kraemer, Arciero *et al* 2002, Racete, Coppack, Landt, Klein 1997, Torjman, Zafeiridis, Paolone, Wilkerson, Considine 1999, Weltman, Pritzlaff, Wideman *et al*, 2000). Las diferencias en los resultados se deben a las variaciones metodológicas aplicadas.

Algunos estudios implican realización de ejercicio altamente intenso o prolongado (Duclos *et al* 1999, Gomez-Merino *et al* 2002, Leal-Cerro *et al* 1998,) mientras que en otros se realiza un ejercicio de alta y baja intensidad de manera alternada (Fisher *et al* 2001).

Algunos autores realizaron sus mediciones con los sujetos en ayunas de 8 a 13 horas, (Hickey *et al* 1996, Landt *et al* 1997, Racete *et al* 1997, Torjman *et al* 1999, Weltman *et al* 2000), mientras que otros estudiaron a los sujetos recién desayunados (Fisher *et al* 2001). En ciertas ocasiones se realizaron mediciones únicas de la hormona al inicio, al final, o al poco tiempo de finalizado el ejercicio (Duclos *et al* 1999, Gomez-Merino *et al* 2002, Hickey *et al* 1996, Landt *et al* 1997), mientras que otras se han realizado mediciones múltiples y periódicas durante varias horas tras su finalización (Weltman *et al* 2000).

Para integrar los principales tratamientos aplicados hasta ahora, se procedió a combinar los posibles efectos del ayuno, de la ingesta de carbohidratos, del ejercicio y del reposo (algo hasta ahora no realizado, según la revisión bibliográfica efectuada), incluyendo condiciones de control y mediciones repetitivas y prolongadas.

Se ha señalado que la insulina es un secretagogo de la leptina, de hecho, uno de sus reguladores críticos (Thong, McLean, Graham 2000). También se ha postulado a la glucosa como otra de las variables implicadas en la regulación de la leptina en humanos (Griffen, Oostema, Stanhope *et al* 2005). Debido a lo anterior, se decidió medir las variables de glicemia e insulina, con el objetivo de determinar el efecto agudo del ejercicio sobre la concentración de leptina plasmática, tanto en presencia como en ausencia de ingesta de alimentos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sujetos experimentales. Se reclutaron diez sujetos masculinos sanos, magros (no más de 20% de grasa), no fumadores, jóvenes y físicamente activos ($n = 10$; ver sus características en el cuadro 1). Todos firmaron una hoja de consentimiento informado, y los procedimientos efectuados fueron aprobados por el Comité Ético-Científico de investigaciones de la Universidad de Costa Rica.

Datos descriptivos. En una visita previa al Laboratorio de Rendimiento Físico y Salud (LARENFISA) de la Universidad de Costa Rica, los sujetos realizaron una entrevista médica para verificar su estado de salud. Adicionalmente se les tomó una muestra de sangre (14 horas de ayuno) y se midió su porcentaje de grasa corporal, tasa metabólica basal (TMB), consumo máximo de oxígeno (VO_{2max}) y requerimiento calórico diario (RCD). El porcentaje de grasa corporal fue determinado utilizando la metodología de Jackson & Pollock (American College of Sport Medicine 2000), con un medidor de grasa Lange (Cambridge, Estados Unidos de América). La TMB fue determinada con el procedimiento descrito por Matarese (1997) y el VO_{2max} con el de Lucía, Hoyos, Santalla, Pérez y Chicharro (2002). Ambas mediciones se realizaron con un analizador de gases Cosmed, modelo Quak b² (Roma, Italia). El RCD se determinó según lo descrito por Mahan, Escott-Stump (1998).

Diseño experimental. Los sujetos se asignaron aleatoriamente y con un descanso de al menos 7 días a cada una de las cuatro condiciones (Figura 1). Antes de iniciar cada sesión, los participantes completaron entre 8 y 10 horas de ayuno, no realizaron actividad física tres días antes, e ingirieron una cantidad de calorías equivalente a su RCD al menos un día antes. Se recolectó una muestra de sangre cada 30 minutos durante las ocho horas de duración de cada una de las condiciones experimentales y de control, y se les administró a los sujetos 200 mL de agua cada 30 minutos con el fin de evitar su deshidratación. Durante las condiciones DR y DE los sujetos ingirieron un desayuno inmediatamente al final de la línea base.

Condición AR: ayuno y reposo (condición control).

Línea base	Ayuno y reposo
2 horas	6 horas

Condición AE: ayuno y ejercicio.

Línea base	reposo	ejercicio	recuperación de ejercicio
2 horas	1 hora	1 hora	4 horas

Condición DR: desayuno y reposo.

Ingesta del desayuno
↓

Línea base	reposo
2 horas	6 horas

Condición DE: desayuno y ejercicio.

Ingesta del desayuno
↓

Línea base	reposo	ejercicio	recuperación de ejercicio
2 horas	1 hora	1 hora	4 horas

Figura 1. Representación gráfica del diseño experimental

Cuadro N° 1.
Estadística descriptiva de los sujetos de estudio

Variable	Promedio \pm desviación estándar	Mínimo	Máximo
Edad (años)	21.6 \pm 2.5	18	25
Estatura (m)	1.76 \pm 0.1	1.69	1.89
Peso (Kg)	71.4 \pm 6.1	64.3	82.1
IMC (Kg/m ²)	23 \pm 1.4	20.9	24.9
MG (%)	10.5 \pm 3.3	8	17.2
Hc (%)	46.3 \pm 2	42.8	49
hg (g/dL)	15.6 \pm 1	13.2	16.7
GA (mg/dL)	91.4 \pm 8.2	72	99
Colesterol total	147.1 \pm 29.7	128	212
Colesterol LDL	87.1 \pm 22.1	71	138
Colesterol HDL	43.3 \pm 9.7	40	64
Triglicéridos	83.7 \pm 33.3	56	129
TMB (Kcal/día)	1549.2 \pm 243.2	1144.2	1789.3
RCD (Kcal/día)	2772.5 \pm 413.2	2139.7	3149.1
VO ₂ max (mL/Kg/min)	52 \pm 5.9	41	60.8

IMC, índice de masa corporal; MG, porcentaje de grasa corporal; Hc, hematocrito; hg, Hemoglobina; GA, glicemia en ayunas; TMB, tasa metabólica basal; RCD, requerimiento calórico diario; VO₂max, consumo máximo de oxígeno.

Periodos de ejercicio: En los momentos indicados en el diseño experimental, los sujetos realizaron un ejercicio que consistió en un calentamiento al 40% del VO₂max por 10 minutos y luego 50 minutos más al 60% del VO₂max. Se utilizó un cicloergómetro Monark, Modelo 818 E (Varberg, Suecia).

Desayuno: En los momentos indicados por el diseño experimental, los sujetos ingirieron un desayuno de 439 kilocalorías, con la siguiente composición: 250 mL de leche entera, 30 g de cereal de maíz y dos bananos (83% carbohidratos, 4.87% grasa, 11.6% proteína, índice glicémico de 67).

Análisis sanguíneos: Para caracterizar la muestra de estudio se realizaron determinaciones de perfil lipídico por método enzimático de punto final, glicemia por glucosa oxidasa (Beckman Coulter Synchron CX9. Illinois, Estados Unidos de América) y hemograma por dispersión de rayos láser (SF-3000 Sysmex. Nueva York, Estados Unidos de América). Las muestras recolectadas durante la aplicación de las condiciones experimentales se obtuvieron directamente de un catéter colocado en el antebrazo con una llave de tres vías. Después de extraídas, las muestras se manejaron según el procedimiento descrito por

Hilton, Loucks (2000) y Brady, Lovegrove, Lesauvage, Gower, Minihane, Williams, Lovegrove (2004).

Las concentraciones de leptina en suero fueron medidas por medio de radioinmunoensayo (Active Human Leptin IRMA, Diagnostic Systems Laboratories Inc. Texas, Estados Unidos de América). La concentración de insulina en suero fue determinada por quimioluminiscencia (Inmulite 2000. Nueva York, Estados Unidos de América). Para medir la glicemia se utilizaron tiras reactivas y el glucómetro Accu-Check Advantage (Indianápolis, Estados Unidos de América). Para corregir el efecto de la hemoconcentración, se aplicó el procedimiento de Dill y Costill (1974) a las muestras recolectadas durante los periodos de ejercicio y tras una hora después de su finalización (condiciones AE y DE).

Análisis estadístico: para determinar las diferencias en las concentraciones de leptina, insulina y glicemia en las cuatro condiciones de estudio, se realizó un análisis de varianza de dos vías (4 condiciones x 16 mediciones, con medidas repetidas en ambos factores) con sus respectivos análisis de efectos simples. El nivel de significancia se fijó en $P < 0,05$.

RESULTADOS

Durante las condiciones experimentales (AE, DR, DE) y de control (AR) se dieron disminuciones significativas de la concentración de leptina en plasma ($P < 0.05$). No obstante, este patrón no tuvo igual magnitud en todas ellas, pues al final de la condición DR, la disminución de la concentración de leptina es menor que en el control, AR (interacción significativa, $P < 0.05$). Las dos condiciones que incluyeron ejercicio (AE y DE) no presentaron diferencias significativas entre sí, ni con respecto al control. Las condiciones AE y DE tampoco presentaron diferencia significativa con respecto a la condición DR, excepto a las 14:000 horas, en que la condición DR presenta un promedio significativamente superior que la condición AE. Lo anterior puede observarse en la figura 2. En cuanto a la glicemia, esta presentó una disminución significativa durante las dos condiciones que implican ayuno (AR, AE. $P < 0.05$). Se presentó además un incremento significativo de la variable treinta minutos después de la ingesta del desayuno en las dos condiciones correspondientes (DR y DE. $P < 0.05$). Este incremento posprandial fue

significativamente mayor en la condición DR con respecto a la condición DE ($p < 0.05$). También se dio otro aumento significativo de la glicemia en la condición DE, específicamente

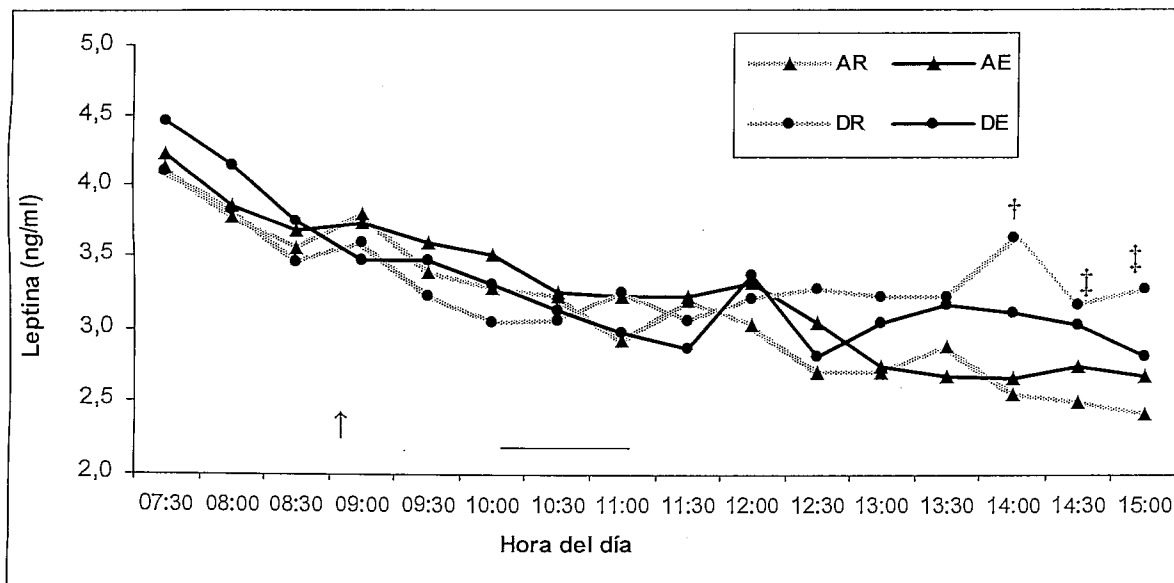


Figura 2. Promedios de leptina plasmática en cuatro condiciones experimentales (AR: ayuno y reposo, AE: ayuno y ejercicio, DR: desayuno y reposo, DE: desayuno y ejercicio). †: Significativamente superior que AR y AE. ‡: Significativamente superior que AR. —: Período de ejercicio (AE y DE). †: Momento en que se ingiere el desayuno (DR, DE).

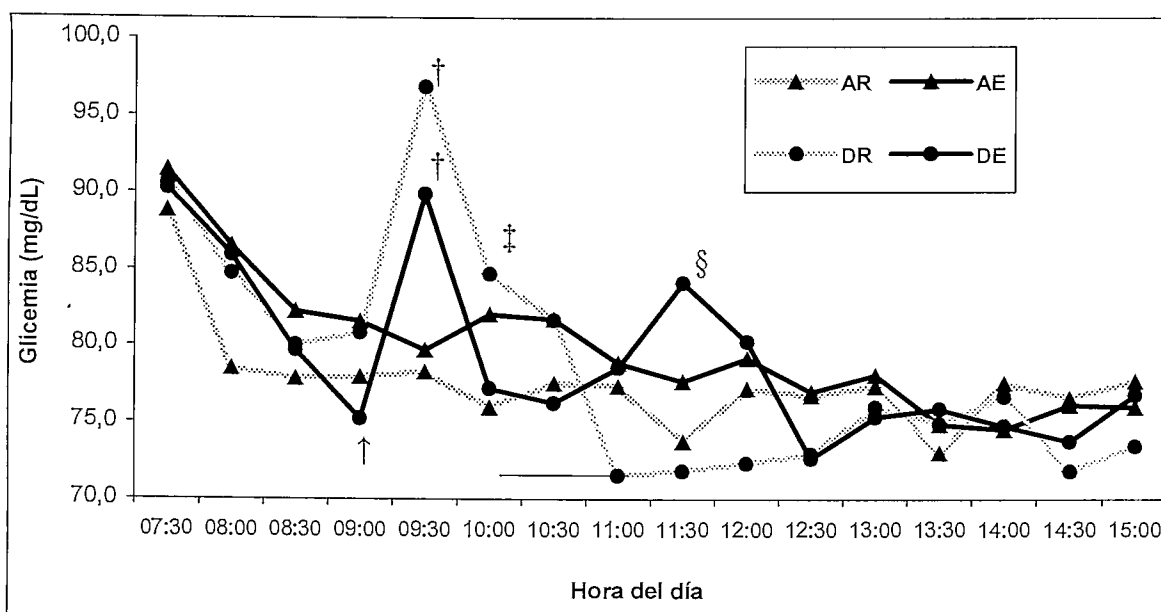


Figura 3. Promedios de glicemia en cuatro condiciones experimentales. (AR: ayuno y reposo, AE: ayuno y ejercicio, DR: desayuno y reposo, DE: desayuno y ejercicio). †: Significativamente superior que AR y AE. ‡: Significativamente superior que AR. §: Significativamente superior que AR y DR. — Período de ejercicio (AE y DE). †: Momento en que se ingiere el desayuno (DR y DE).

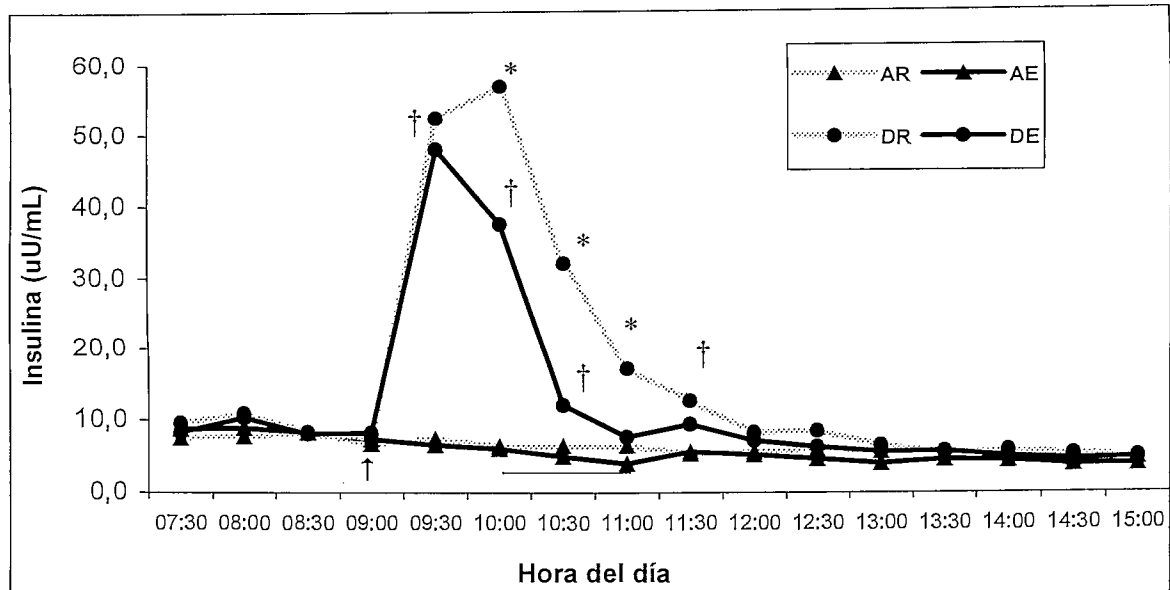


Figura 4. Promedios de insulina en cuatro condiciones experimentales. (AR: ayuno y reposo, AE: ayuno y ejercicio, DR: desayuno y reposo, DE: desayuno y ejercicio). †: Significativamente superior que AR y AE. *: Significativamente superior que AR, AE y DE. —: Período de ejercicio (AE y DE). †: Momento en que se ingiere el desayuno (DR y DE).

específicamente cuando finaliza la actividad física ($P < 0.05$). Los patrones de glicemia se representan en la figura 3. La insulina, se mantuvo estable en las condiciones de ayuno (AR y AE), con incrementos significativos en las condiciones de desayuno (DR, DE. $P < 0.05$). Su concentración plasmática presentó aumentos significativamente mayores en la condición DR con respecto a la condición DE ($P < 0.05$). La figura 4 ilustra las variaciones registradas en la insulina.

DISCUSIÓN

Los promedios basales de leptina en las cuatro condiciones experimentales (07:30 horas) se encuentran dentro del rango esperado para sujetos magros en ayunas, que según Gomez-Merino *et al* (2002) es de 3.8 ± 1.8 ng/mL. En los datos obtenidos también se aprecia que todas las condiciones experimentan una disminución de la concentración plasmática de leptina durante las horas de la mañana. Esto es coincidente con el ritmo circadiano señalado por estudios como los de van Aggel-Leijssen, van Baak, Tenenbaum, Campfield, Saris (1999) y Hilton, Loucks (2000). También se da la presencia de pulsos o picos de secreción

muy similares a los de van-Aggel-Leijssen *et al* (1999) o Monteleone, Bortolotti, Fabrazzo, La Rocca, Fuschino, Maj (2000). Un hallazgo importante en el presente estudio, es que la concentración de leptina fue significativamente mayor en la condición DR con respecto al control (AR), a partir de las 14:00 horas. Lo anterior se debió a que la concentración de la hormona se mantuvo prácticamente constante a partir de las 09:30 horas en la condición DR, cosa que no ocurrió en la condición AR, que presenta posteriores disminuciones significativas. Esto implica que la ingesta de carbohidratos en reposo generó alteraciones en la concentración plasmática de leptina con respecto a la condición control, pero luego de 5 horas de la ingesta. Este fenómeno se presenta de manera muy similar en el estudio de Romon, Lebel, Velly, Marecaux, Fruchart y Dallongeville (1999) que comparó el efecto de la ingesta de carbohidratos con el ayuno en sujetos en reposo.

El realizar ejercicio aeróbico en ayunas (condición AE) o luego de ingerir carbohidratos (condición DE), no generó diferencias significativas con respecto a la condición control (AR). Lo observado en la condición AE indica que la actividad física por sí sola no tuvo ningún efecto, y lo observado en la condición DE indica que al hacer ejercicio luego de ingerir carbohidratos, el efecto de la ingesta fue disminuido por la actividad física.

En muchos estudios se evalúa el efecto agudo del ejercicio aeróbico sobre la leptina únicamente en sujetos en estado de ayuno (de 8 a 13 horas); sin que se detectara un efecto en ellos (Hickey *et al* 1996, Landt *et al* 1997, Racete *et al* 1997, Torjman *et al* 1999, Weltman *et al* 2000). En el presente estudio se incluyeron condiciones de ejercicio en ayunas (8 horas) y luego de ingerir carbohidratos, observándose que la actividad física inhibió el efecto que los carbohidratos generaron en los sujetos en reposo.

En algunos estudios se han realizado mediciones de la hormona por periodos relativamente cortos de tiempo, que abarcan solamente el periodo de ejercicio (desde unos cuantos minutos, hasta unas dos horas y media), sin detectar efectos agudos (Perusse, Collier, Gagnon *et al* 1997, Hickey *et al* 1996, Lant *et al* 1997, Racette *et al* 1997). En el presente estudio se realizaron mediciones durante 4 horas posteriores a la actividad física, lo que permitió detectar el efecto del ejercicio en los sujetos que desayunaron. En los estudios de Torjman *et al* (1999) y Weltman *et al* (2000), se realizaron mediciones posteriores al ejercicio, de manera periódica durante 4 y 3.5 horas respectivamente, reportándose que no

se observó efecto de la actividad física. Estos estudios no obstante se realizaron únicamente con sujetos en ayunas.

En el estudio de Jurimae y Jurimae (2005) se reporta una disminución aguda de la leptina de manera inmediata al finalizar una sesión de ejercicio aeróbico de alta intensidad durante 30 minutos. Desgraciadamente, no hay manera de determinar si esta disminución es un efecto del tiempo (como el presente en las cuatro condiciones de éste estudio) o del tratamiento, pues no se incluyó una condición control. En el estudio de Fisher *et al* (2001) la leptina se incrementa significativamente al hacer ejercicio luego de desayunar, con respecto a la condición control en que se desayuna y se permanece en reposo. Lo anterior no contradice directamente nuestros resultados si se toma en cuenta que en ese estudio la actividad realizada fue más intensa y causó importantes incrementos en el cortisol, molécula que se considera un agonista de la producción y secreción de leptina por parte del adipocito (Baile *et al* 2000, Mantzoros 1999). Adicionalmente en el experimento de Fisher *et al*, los periodos de ayuno siempre fueron menores que en el presente protocolo.

Una cantidad creciente de reportes señalan a la insulina como un regulador importante, capaz de aumentar la concentración de leptina plasmática (Thong *et al* 2000, Pasma, Wasterter-Platenga, Saris 1998, Gower, Nagy, Goran, Smith, Kent 2000, Hickey *et al* 1996, Monteleone *et al* 2000, Fisher *et al* 2001, Mantzoros 1999). La mayoría de estudios indica que el efecto observado de la insulina se debe al aporte de glucosa al adipocito que esta genera (Baile, Della-Fera, Martin 2000, Griffen *et al* 2005). Esto podría justificar las diferencias en la concentración plasmática de leptina detectadas entre las condiciones AR y DR, pues en esta última se registraron las mayores glicemias e insulinemias. Precisamente, en el estudio de Romon *et al* (1999) luego de la ingesta de carbohidratos se dieron incrementos significativos de la insulina antes de que apareciera el efecto sobre la leptina. A su vez, el que en las condiciones AR y AE se hayan registrado las menores concentraciones plasmáticas de leptina, principalmente en las últimas horas (sin diferencias significativas entre sí, en ninguna de las mediciones), podría ser el resultado de los largos periodos que los sujetos permanecieron con las glicemias e insulinemias disminuidas en esas dos condiciones experimentales. Los aumentos de la glicemia registrados en las condiciones DR y DE, generaron los esperados aumentos de la concentración plasmática de insulina. Los resultados denotan además que en la condición DR, los incrementos de esta

variable fueron significativamente mayores que en la condición DE. Esta diferencia se debe a la inhibición de la secreción pancreática de insulina causada por la activación del sistema nervioso simpático durante ejercicio (Berne, 1998). Teóricamente, se podría señalar que los diferentes tejidos corporales –entre ellos los adipocitos- estuvieron expuestos a mayores concentraciones de insulina en la condición DR, con respecto a la condición DE. En esta última, la actividad física redujo la secreción de insulina y habría desviado gran parte de la glucosa hacia el músculo esquelético, por lo que los adipocitos posiblemente tuvieron menos insulina y glucosa disponible. Lo anterior explicaría que sea la condición DR -y no la DE- la que presentó promedios significativamente mayores de concentración de leptina en plasma con respecto a la condición control (AR), a partir de las 14:00 horas.

En algunos estudios que implicaron ejercicios sumamente demandantes, tales como correr una carrera de maratón (Leal-Cerro *et al*, 1998), correr dos horas a una intensidad entre el 65% al 75% del VO_{2max} (Duclos *et al* 1999), o realizar cuatro días de entrenamiento militar extenuante (Gomez-Merino *et al* 2002) se reportaron disminuciones significativas de la concentración de leptina plasmática. Es posible que en estos estudios, el ejercicio haya generado el efecto mencionado al disminuir la disponibilidad de glucosa al adipocito. Únicamente en el trabajo de Gomez-Merino *et al* (2002) se midió la insulina, la cual se encontró muy disminuida al final del tratamiento.

En estudios como el de Griffen *et al* (2005) y van-Aggel-Leijssen *et al* (1999), la concentración de leptina plasmática se incrementa de una manera retrasada con respecto al incremento de insulina y la glicemia inducido por la ingesta de alimentos, cosa que coincide con nuestros resultados y que se amolda perfectamente con el rol señalado de la leptina, como regulador de la ingesta y el gasto calórico a mediano y largo plazo (Friedman 2002, Gómez, Alvarado 1999) pero no a corto plazo (Romon *et al* 1999).

En conclusión, se realizó un estudio con medidas de control y periodos de seguimiento adecuados, e incluyendo un espectro de condiciones que la mayoría de estudios previos han realizado solo de manera parcial. No se encontró un efecto agudo del ejercicio aeróbico sobre la concentración plasmática de leptina en sujetos en ayunas. Cuando los sujetos ingirieron un desayuno alto en carbohidratos y permanecieron en reposo, presentaron un efecto que se inició 5 horas después de la ingesta. La actividad física practicada luego de

ingerir carbohidratos, neutralizó el efecto que estos generaron en ausencia de ejercicio aeróbico.

REFERENCIAS

American College of Sport Medicine. Guidelines for exercises testing and prescription, 6th Ed, Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2000: 63-66.

Baile C, Della-Fera M, Martín R. Regulation of metabolism and body fat mass by leptin. *Annu Rev Nutr* 2000; 20: 105-127.

Berne R, Levy M. Physiology, 4a ed, London: Ed Mosby, 1998:959.

Brady L, Lovegrove S, Lesauvage S, et al. Increased n-6 PUFA intake does not attenuate effects of dietary long chain n-3 PUFA on insulin sensitivity or triacylglycerol reduction in Indian Asians. *American Journal of Clinical Nutrition* 2004; 79:983-991.

Cammisoto P, Buckowiecki L. Mechanisms of leptin secretion from white adipocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 283: C244-C250.

Dill B, Costill D. Calculation of percentage changes in volumes of blood, plasma and red cells in dehydration. *J. App. Physiol.* 1974; 37(2): 247-248.

Duclos M, Corcuff J, Ruffie A, Roger P, Manier G. Rapid leptin decrease in immediate Post-Exercise recovery. *Clinical Endocrinology* 1999; 50: 337-342.

Fisher J, Van Pelt R, Zinder O, Landt M, Khort W. Acute exercise effect on postabsorptive serum leptin. *J Appl Physiol* 2001; 91: 680-686.

Fred S, Ricci M, Russell C, Lafarrere B. Regulation of leptin production in humans. *J Nutr* 2000; 130:3127S-3131S.

Friedman J. The function of leptin in nutrition, weight and physiology. *Nutrition reviews* 2002; 60: S1-S14.

Gomez G, Alvarado M. Obesidad y mecanismos reguladores del apetito. *Rev Med Hosp. Nal Niños Costa Rica* 1999; 34: 139-144.

Gomez-Merino D, Chennaoui M, Drogou C, Boneau D, Guezennec C. Decrease in serum leptin after prolonged physical activity in men. *Med Sci Sport Exerc.* 2002; 34: 1594-1599.

- Gower B, Nagy T, Goran M, Smith A, Kent E. Leptin in postmenopausal women: influence of hormone therapy, insulin, and fat distribution. *The Journal of Clinical Endocrinology and metabolism* 2000; 85: 1770-1775.
- Griffen S, Oostema K, Stanhope K et al. Administration of Lispro insulin with meals improves glycemic control, increases circulating leptin and suppresses ghrelin compared with regular/HPH insulin in female patients with type-I diabetes. *J Clin Endocrin Metab* 2005; doi:10.1210/jc.2005-1338.
- Hickey M, Calsbeek D. Plasma leptin and exercise. Recent Findings. *Sports Med* 2001; 31: 583-589.
- Hickey M, Considine R, Israel R et al. Leptin is related to body fat content in male distance runners. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1996; 271: E938-E940.
- Hilton LK, Loucks AB. Low energy availability not exercise stress suppresses the diurnal rhythm of leptin in healthy young women. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 278: E 43-E 49.
- Jurimae J, Jurimae T. Leptin responses to short term exercise in college level male rowers. *Br. J. Sport Med.* 2005, 39: 6-9.
- Landt M, Lawson G, Helgeson J et al. Prolonged exercise decreases serum leptin concentrations. *Metabolism* 1997; 46: 1109-1112.
- Leal-Cerro A, García-Luna P, Astorga R et al. Serum leptin levels in male marathon athletes before and after the marathon run. *Journal of clinical Endocrinology and Metabolism* 1998; 83: 2376-2379.
- Lucía A, Hoyos J, Santalla A, Perez M, Chicharro JL. Kinetics of VO_2 in professional cyclists. *Med Sci Sports Exerc* 2002; 34 (2): 320-5.
- Mahan K, Escott-Stump S. Nutrición y dietoterapia de Krause. 9ª ed, México: Mc Graw-Hill, 1998: 17-30.
- Matarese L. Indirect calorimetry: technical aspect. *J Am Diet Assoc* 1997; 97 (suppl): S154-60.
- Mantzoros, C. The role of leptin in human obesity and disease: A review of current evidence. *Ann Intern Med.* 1999; 130: 671-680.
- Monteleone P, Bortolotti F, Fabrazzo M, La Rocca A, Fuschino A, Maj M. Plasma leptin response to acute fasting and refeeding in untreated women with bulimia nervosa. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2000; 85: 2499-2503.
- Nelson D, Cox M. Lehninger principles of biochemistry, 4a ed, New York: Worth Publishers, 2004: 890-900.

- Nindi B, Kraemer W, Arciero P, et al. Leptin concentrations experience a delayed reduction after resistance exercise in men. *Med Sci Sport and exerc* 2002; 34:608-613.
- Pasman W, Wastertert-Platenga M, Saris W. The effect of exercise training on leptin levels in obese humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1998; 37: E280-E286.
- Perusse L, Collier G, Gagnon J et al. Acute and chronic effects of exercise on leptin levels in humans. *J Appl Physiol* 1997; 83: 5-10.
- Racete S, Coppack S, Landt M, Klein S. Leptin production during moderate-intensity aerobic exercise. *Journal of clinical endocrinology and Metabolism* 1997; 82: 2275-2277.
- Romon M, Lebel P, Velly C, Marecaux N, Fruchart J, Dallongeville J. Leptin response to carbohydrate or fat meal and association with subsequent satiety and energy intake. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1999; 277: E855-E861.
- Soliman A, Elzalabany M, Salama M, Ansari B. Serum leptin concentration during severe protein-energy malnutrition: correlation with growth parameters and endocrine function. *Metabolism* 2000; 49: 819-825.
- Thong F, McLean C, Graham T. Plasma leptin in female athletes: relationship with body fat, reproductive, nutritional, and endocrine factors. *J Appl Physiol* 2000; 88: 2037-2044.
- Torjman M, Zafeiridis A, Paolone A, Wilkerson C, Considine R. Serum leptin during recovery following maximal incremental and prolonged exercises. *Int J Sports Med* 1999; 20: 444-450.
- van Aggel-Leijssen D, van Baak M, Tenenbaum R, Campfield R, Saris W. Regulation of average 24 h human plasma leptin level; the influence of exercise and physiological changes in energy balance. *International Journal of Obesity* 1999; 23:151-158.
- Weltman, Pritzlaff, Wideman et al. Intensity of acute exercise does not affect serum leptin concentration in young men. *Med Sci Sport Exerc* 2000; 32:1556-1561.

Efecto agudo del ejercicio aeróbico y los carbohidratos de alto índice glicémico sobre la concentración plasmática de leptina

Alfredo López Dávila¹⁻², Aileen Fernández Ramírez¹⁻².

1 Departamento de Fisiología, Escuela de Medicina.

2 Laboratorio de Rendimiento Físico y salud. LARENFISA.

Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

RESUMEN

López Dávila Alfredo, Fernández Ramírez Aileen. Efecto agudo del ejercicio aeróbico y los carbohidratos de alto índice glicémico sobre la concentración plasmática de leptina.

Se diseñó un estudio que evaluara el efecto del ejercicio aeróbico (60% del VO_{2max} , 50 min de duración) sobre la concentración plasmática de leptina, en sujetos en ayunas y después de ingerir carbohidratos. Diez sujetos activos, sanos, masculinos se asignaron aleatoriamente en cuatro condiciones (AR: ayuno-reposo, AE: ayuno-ejercicio, DR: desayuno-reposo, DE: desayuno-ejercicio). Durante todas las condiciones se dieron disminuciones significativas de la concentración plasmática de leptina ($p < 0.05$). Además se presentó una interacción significativa entre las condiciones AR y DR ($P < 0.05$).

La condición DR presentó los mayores incrementos de glicemia e insulinemia y a partir de las 14:00 horas (cinco horas después de ingerir los carbohidratos) las concentraciones plasmáticas de leptina fueron significativamente mayores que en la condición AR ($p < 0.05$).

La condición DE presentó también incrementos de glicemias e insulinemias, pero significativamente menores que la condición DR ($p < 0.05$) y sus concentraciones plasmáticas de leptina nunca fueron mayores que los de la condición AR. La condición AE presentó glicemias e insulinemias siempre basales, y sus concentraciones plasmáticas de leptina no llegaron a superar a las correspondientes a la condición AR. No se encontró un efecto agudo del ejercicio aeróbico sobre la concentración plasmática de leptina en sujetos en ayunas. Cuando los sujetos ingirieron un desayuno alto en carbohidratos y permanecieron en reposo, presentaron un efecto que se inició 5 horas después de la ingesta. La actividad física practicada luego de ingerir carbohidratos, disminuyó el efecto que estos generaron en ausencia de ejercicio aeróbico. El ejercicio no demostró un efecto en ayunas, pero tendió a disminuir los cambios inducidos por los carbohidratos.

Balance energético, carbohidratos, leptina, ejercicio.

ANEXO 1

Revisión Bibliográfica

Presentación del Tema

A pesar del creciente aumento en la incidencia de la obesidad por factores ambientales, fisiológicamente es claro que el peso corporal normalmente se mantiene estable. De hecho, el balance energético positivo generado por la inactividad física y sobrealimentación se refleja de manera mínima sobre el incremento gradual del peso corporal de los individuos. Los siguientes son ejemplos ofrecidos por autores de países desarrollados:

Una mujer promedio gana entre una y dos decenas de kilogramos de peso corporal entre los 25 y los 65 años pero en ese periodo ingiere aproximadamente unos 20000 kilogramos de alimentos. El exceso ingerido en ese mismo periodo puede ser de cientos o miles de kilogramos (Casanueva, Dieguez, 1999).

Otros han calculado este fenómeno de forma distinta: En una década, un adulto promedio ingiere 10 millones de calorías a pesar de que su aumento de peso en ese periodo es de unos cuantos kilogramos. Esto último implica que la ingesta calórica y el gasto, se diferencian tan solo en un 0.2 % por década aproximadamente, lo que sugiere la existencia de un preciso sistema biológico que balancea el gasto y la ingesta de calorías (Friedman. 2002.)

Se ha sugerido que los niveles de grasa corporal son regulados de forma muy exacta por un mecanismo de control fisiológico, capaz de mantener prácticamente constante el nivel de reservas de energía corporal.

Además, algunos estudios en gemelos denotan un alto componente genético de la obesidad siendo la heredabilidad de ésta equivalente a la de la estatura y excediendo la de muchos desórdenes generalmente considerados de base genética. Se ha llegado a la conclusión de que varios genes codifican componentes moleculares del sistema de regulación de peso corporal, siendo claves dentro de este sistema los genes que codifican por la leptina y su receptor (Friedman. 2002)

Reseña Histórica

En 1953, G. C. Kennedy postuló la teoría lipostática, con los siguientes enunciados:

- a) El peso corporal es mantenido en equilibrio al regular los niveles de grasa almacenada en el individuo.
- b) Los niveles de grasa corporal son regulados por una señal derivada del tejido graso.
- c) Esta señal posee acción lipostática y actúa a nivel de sistema nervioso central, específicamente en el hipotálamo.
- d) Dicha señal modula la ingesta calórica y por lo tanto establece un sistema de control sobre la cantidad de tejido adiposo (a mayor cantidad de tejido graso, mayor secreción de la señal por parte de éste, lo que conduce a una disminución del apetito retrocontrolando negativamente los niveles de grasa). (Caro, Sinha, Kolaczynsky, Zhank, Considine 1996, Casanueva, Dieguez 1999, Harris 2000)

La existencia de este factor lipostático se confirmó con estudios de parabiosis en ratones, según lo desarrollado entre otros por Hervey en 1959, Hausberger en 1959, Coleman y Hummel en 1969, Coleman en 1973 y Harris en 1990 (Casanueva, Dieguez 1999, Caro *et al* 1996).

La parabiosis es un sistema de unión crónica, en este caso de dos ratones por medio de suturación de músculos y peritoneo, lo que permite intercambio a nivel capilar pero sin conexiones directas de los grandes vasos. Los dos organismos viven juntos, compartiendo sus fluidos vasculares, pero este intercambio es tan lento que solo moléculas con una larga vida media cruzan de un animal al otro. (Caro *et al*, 1996).

En su estudio de 1959, Hervey consiguió que uno de los ratones de cada par se tornara hiperfágico lesionando el hipotálamo ventromedial. El proceso resultante fue el progresivo incremento del peso corporal del ratón lesionado, tornándose obeso, mientras que su respectivo par se volvía afágico y magro. Esto indica que el incremento en el peso produjo un factor presente en la sangre del animal lesionado, que al alcanzar al animal sano actúa sobre éste produciendo saciedad. El proceso de engorde del ratón lesionado indica que el receptor de dicho factor se encuentra en el hipotálamo. Estos resultados se confirmaron con estudios en los que los ratones se inducían a la obesidad por medio de

estimulación del hipotálamo lateral, o por alimentación masiva con un tubo gástrico (Casanueva, Dieguez 1999).

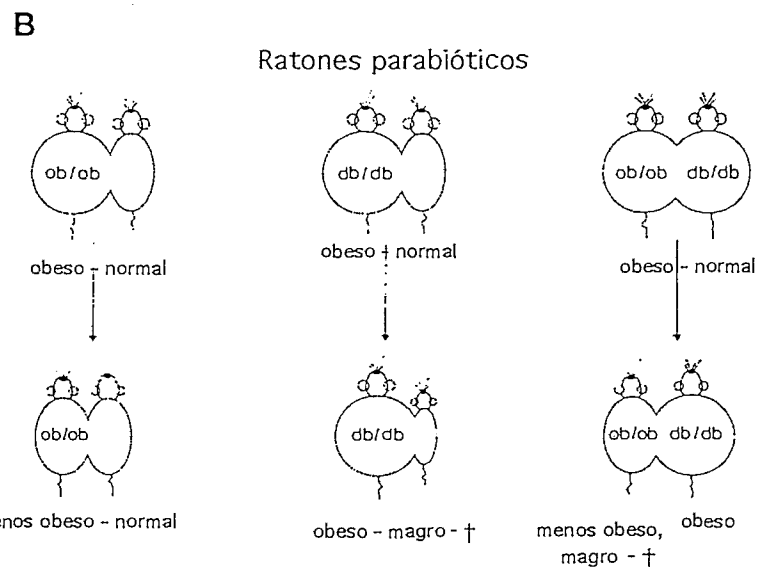
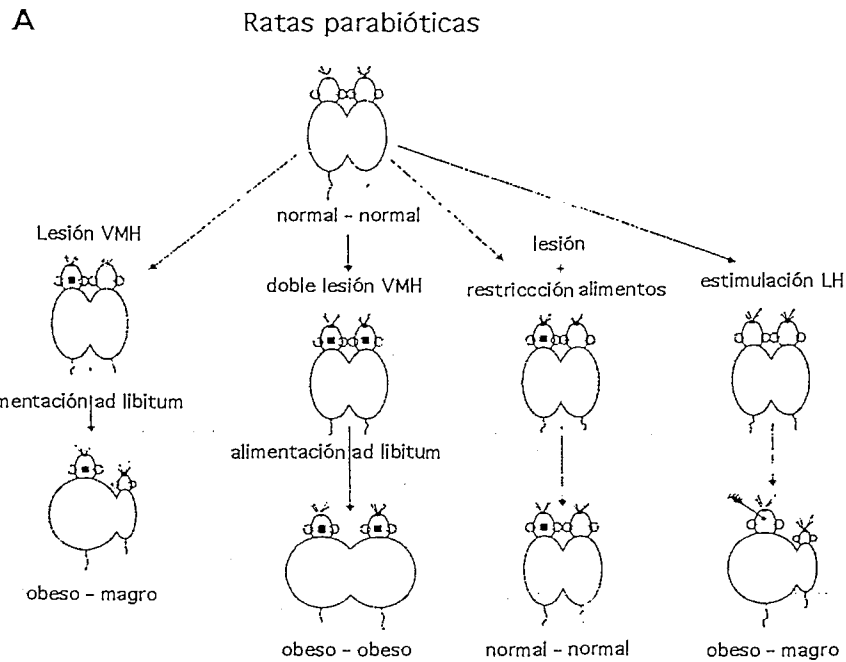
Se dedujo alguna evidencia más convincente a partir de experimentos de parabiosis con ratones genéticamente obesos como los realizados por Coleman en 1969 y 1973. Las mutaciones recesivas en los genes *ob* (codifica proteína reguladora, la hasta entonces desconocida leptina) y *db* (codifica receptor de la proteína reguladora) resultan en obesidad y diabetes, en un síndrome que simula a la obesidad mórbida humana. Los ratones *ob/ob* y *db/db* tienen un fenotipo idéntico, pesando más de un 300% que un ratón normal (Casanueva, Dieguez 1999). En la figura 5 se muestran dos ratones de la misma edad, ambos con mutaciones en el gen que codifica la leptina (*ob*). El de la derecha fue tratado con leptina diariamente y tiene un peso corporal de 35 gramos, mientras que el de la izquierda no ha sido tratado y presenta un peso corporal de 67 gramos (Nelson, Cox 2004).



Figura 5. Comparación entre dos ratones carentes de leptina.
Tomado de Nelson, Cox. 2004.

En la unión de un ratón *db/db* con uno normal, el primero no tuvo ningún cambio pero el segundo dejó de comer, perdió peso y murió de inanición. Cuando se unió un ratón *ob/ob* con uno normal, el primero disminuyó ligeramente su ingesta de alimento mientras que el normal no fue afectado. Los estudios explicados indican que el ratón *db/db* produce el factor controlador pero no lo detecta a nivel central, mientras que los ratones *ob/ob* no lo

producen pero sí lo podrían detectar y responden a él. La interpretación anterior se confirma con la parabiosis entre un ratón *ob/ob* con uno *db/db*: el ratón *db/db* no se afecta pero el *ob/ob* se torna afágico y muere de inanición. En la figura 6 se resumen los diferentes experimentos descritos, mediante la técnica de parabiosis (Casanueva, Dieguez. 1999).



ob/ob → sin señal
db/db → sin receptor para la señal

Figura 6. Estudios de parabiosis. Tomado de Casanueva, Dieguez. 1999.

En 1994, J. M. Friedman y J. L. Halas identificaron y caracterizaron el gen *ob*. Ellos mostraron que codifica una hormona, que llamaron leptina (del griego *leptos*, delgado) y se expresa altamente en el tejido adiposo blanco. En 1995 el clonaje del receptor de leptina, expresado en el hipotálamo y otros tejidos por el gen *db*, generó evidencia definitiva de que se había detectado un sistema de regulación del peso corporal, haciendo a todos recordar un importante capítulo de la historia de la fisiología, debido a la identificación del factor lipostático y su receptor hipotalámico postulados por Kennedy 40 años antes. También se entendería el proceso de retrocontrol negativo en que dicho factor interviene. (Friedman, Halas 1994)

Se notó que la leptina se expresa en los adipocitos, sitio de almacenaje de grasa, y que su secreción en cada uno se incrementa cuando éstos aumentan en tamaño. La hormona circula en plasma en cantidades proporcionales a la cantidad de tejido adiposo y actúa a nivel hipotalámico, lo que la convierte en una señal aferente. Su acción a nivel central desencadena como respuestas un incremento del gasto calórico y una disminución del apetito (Hickey, Calsbeek 2001). En la figura 7, se esquematizan las dos respuestas a la leptina anteriormente descritas (Nelson, Cox 2004).

En condiciones normales, los efectos vendrían a invertir el estímulo que les dio origen, (incremento en el tejido adiposo) por lo que se trata de un sistema de retrocontrol negativo. La destrucción de ciertas áreas del hipotálamo conduce a obesidad y a hiperleptinemia, lo que comprueba que la variable -concentración de leptina en plasma- se controla por la respuesta efectuada sobre el tejido adiposo a partir de la acción de la propia hormona sobre el sistema nervioso central. Se ha demostrado en ratas, que la administración de leptina en niveles crecientes, resulta en una disminución dosis-dependiente del peso debido a la hipofagia y el aumento del gasto calórico, conduciendo en algunos casos incluso a la muerte por inanición. (Casanueva, Dieguez 1999, Harris 2000)

Hoy en día es conocido que los sistemas que controlan el comportamiento de ingestión de nutrientes así como el balance energético se componen de un sistema a corto plazo y un sistema a largo plazo. Los cambios en la concentración de glucosa plasmática, temperatura corporal, aminoácidos plasmáticos colecistocinina y otras hormonas así como la activación de quimio y mecanoreceptores del tracto gastrointestinal modulan la ingesta de alimentos en el corto plazo. La leptina regula la ingesta calórica principalmente (y no

exclusivamente) a largo plazo, dependiendo de la energía que se intercambia con el ambiente. (Gómez, Alvarado 1999, Friedman 2002).

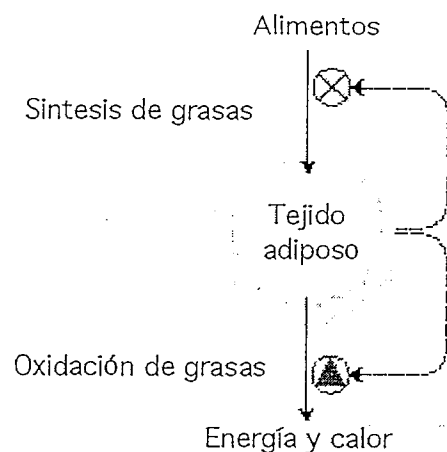


Figura 7. Respuestas fisiológicas a la leptina.

Tomado de Nelson, Cox: principles of biochemistry, 4a ed., 2004.

Características de la leptina

La leptina es una hormona codificada por el llamado gen de la obesidad; *ob2*, y es principalmente secretada por el tejido adiposo blanco (Cammisoto, Buckowiecki 2002), aunque también es secretada por tejidos como la placenta, músculo esquelético, cerebro y células de la mucosa gástrica, entre otros (Korbonits, Chitnis, Gueorguiev *et al* 2001).

Su vida media en el plasma es de 1.6 horas. (Claire, Reid, Riter 2002). Consiste en un polipéptido de 167 aminoácidos, de los cuales 21 son la secuencia de señal secretora (Caro *et al* 1996) y circula en el plasma como un monómero de 146 aminoácidos, forma en la que es secretada. (Claire *et al* 2002, Hickey, Calsbeek 2001, Landt, Lawson, Helgeson *et al* 1997). La leptina no es modificada “post-traduccion”, pues la masa molecular de la proteína nativa es idéntica a la predicha a partir de la secuencia primaria (pero sin la señal secretora) (Friedman 2002). Su forma de transporte en plasma puede ser libre, o unida al llamado receptor soluble de leptina, (OB Re) y las células adiposas son capaces de liberar

leptina en su forma libre, unida a su receptor soluble y también el receptor soluble por sí solo (Brabant, Nave, Mayr, Behrend, van Harmelen, Arner 2002).

Su secreción presenta un patrón circadiano, con el *cenit* cerca de la media noche y el *nadir* en las primeras horas de la mañana. (Fisher, Van Pelt, Zinder, Landt, Khort 2001) Además del ritmo circadiano presenta oscilaciones ultradianas relacionadas al patrón de alimentación. Su secreción es pulsátil, consistiendo de aproximadamente 32 pulsos cada 24 horas (van Aggel-Leijssen, van Baak, Tenenbaum, Campfield, Saris 1999, Fred, Ricci, Russell, Lafarrere 2000).

Receptores, Mecanismos de Señalización Intracelular y Efectos Sistémicos de la Leptina

Con respecto al receptor de la hormona, (OB-R) es un miembro de la familia de receptores de citoquinas clase I (Nakata, Yada, Soejima, Maruyama 1999) y está codificado por el gen *ob-r* (Halaas, Friedman 1997), el cual codifica al menos cinco formas de editaje alternativo del receptor, entre las que se encuentran las siguientes:

OB-Ra, OB-Rc, OB-Rd, que son las formas cortas (por su pequeña dimensión intracelular, de unas tres decenas de aminoácidos cada uno). Además existe el OB-Rb, que es la forma larga, cuya dimensión intracelular (mayor que el resto de las isoformas, 304 aminoácidos) y mecanismo de transducción de señal son bien conocidos y en cuyo caso un codón de terminación prematuro lo torna inoperante en los ratones *db/db*. Por último, existe la isoforma OB-Re, la cual es soluble o secretada (no tiene dominio intracelular). Con excepción de ésta última, las otras cuatro formas se diferencian entre sí por la presencia alternativa de un exón carboxilo terminal diferente, y además se asemejan en que poseen el mismo dominio extracelular (840 aminoácidos). (Huang, Zhuowei, Cai 2001, Machinal-Quélin, Dieudonné, Leneuve, Pecquery y Giudicelli 2002, Tartaglia 1997). Cada isoforma del receptor está expresada en una gran variedad de tejidos, pero en diferentes niveles, lo que se entiende como un mecanismo de regulación de actividad biológica en los diferentes tejidos blanco. (Halaas, Friedman, 1997, Machinal-Quélin *et al* 2002)

Una de estas variantes de receptor, el OB-Rb, (o forma larga) está altamente expresada en el hipotálamo, (en los núcleos: arqueado, lateral, ventromedial, y medial dorsal; los cuales previamente se conocía estaban involucrados en la regulación del peso

corporal) y es el responsable de los efectos centrales de la leptina (Jequier, Tappy 1999, Tartaglia 1997, Friedman 2002). El hipotálamo lateral y el hipotálamo ventromedial se proyectan tanto a lo interno como a lo externo del hipotálamo y modulan la actividad del sistema nervioso autónomo (rama parasimpática y simpática respectivamente). El hipotálamo medial dorsal también modula al sistema nervioso parasimpático y ha sido implicado en la integración de la información entre el hipotálamo ventromedial, lateral y paraventricular. El hipotálamo paraventricular modula la secreción de péptidos de la glándula hipófisis y se proyecta a núcleos con aferencias simpáticas y parasimpáticas. Además posee proyecciones a centros superiores que modulan comportamientos motivacionales. Estos núcleos hipotalámicos expresan varios neuropéptidos y neurotransmisores que regulan la ingesta de alimentos. (Friedman 2002). Esto se representa en la figura 8.

Se ha notado que la leptina es un orquestador que modula ciertos productos hipotalámicos relacionados con efecto orexígeno y anorexígeno de la manera que se describe a continuación:

La activación del receptor OB-Rb por parte de la leptina en el hipotálamo desencadena la vía de transducción de señal intracelular JAK – STAT. Este receptor es de un solo segmento transmembrana, y dimeriza cuando la hormona se une extracelularmente a dos monómeros. Posteriormente estos dos monómeros son fosforilados en residuos de tirosina intracelulares por una Janus Kinasa. (JAK). Estos residuos de tirosina fosforilados son sitios de unión para tres proteínas que son transductores de señal activadores de la transcripción (STATs 3, 5 y 6, a veces llamadas “Fat STATs”). Las STATs se unen al dímero de receptores y son posteriormente fosforiladas por la misma JAK que fosforiló a cada monómero receptor. La enzima JAK tiene dos “caras” por lo que toma su nombre del dios Janos de la mitología romana, dios de los umbrales. Una vez fosforiladas, las STATs se dimerizan, se liberan del receptor de leptina y emigran al núcleo celular donde interactúan con secuencias específicas del ácido desoxiribonucleico (ADN), favoreciendo la transcripción de ciertos genes y reprimiendo la de otros (Nelson, Cox 2004, Machinal-Quélin *et al* 2002). El mecanismo de acción intracelular de la leptina, a través del receptor Ob-Rb, presente en el hipotálamo, se puede observar en la figura 9 (Nelson, Cox 2004).

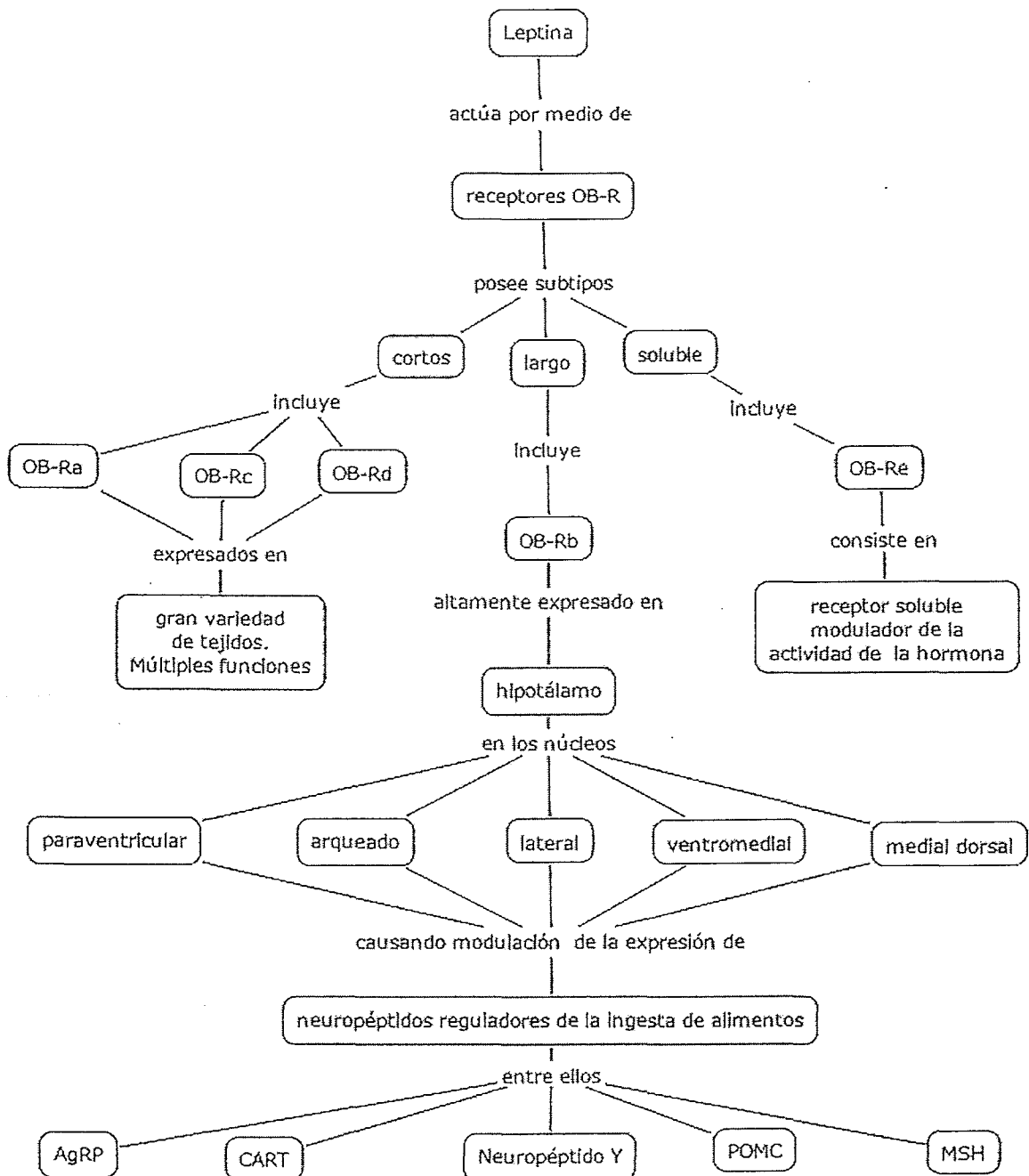


Figura 8: representación esquemática de las acciones generales de la leptina.

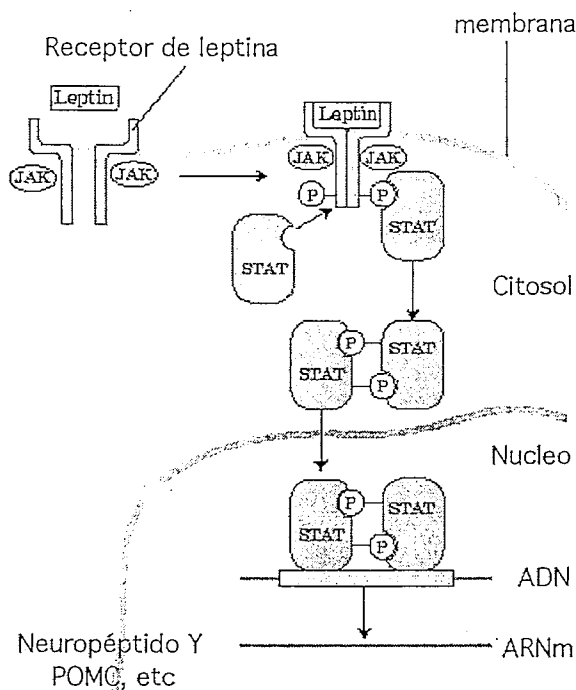


Figura 9. Mecanismo de señalización intracelular de la leptina.

Tomado de Nelson, Cox. *Lehninger principles of biochemistry*, 4a ed., 2004.

La acción de la leptina en el hipotálamo por el receptor OB-Rb causa la inhibición de la transcripción de neuropeptido Y (NPY), así como de su sinergista, la proteína relacionada a la hormona paracrina agouty (AgRP), en las neuronas encargadas de su síntesis. El NPY y la AgRP, ambos de carácter hipotalámico son moléculas orexígenas, pues estimulan la ingesta de alimentos. Ambas moléculas son coexpresadas por las mismas neuronas y se ha visto que reducen la termogénesis (Nelson, Cox 2004, Xu, Kaelin, Takeda, Akira, Schwartz y Barsh 2005). En la Figura 10, se representan las acciones anorexígenas del NPY y la AgRP (Nelson, Cox 2004).

La hormona concentradora de melanina (MCH, neuropeptido expresado en el hipotálamo lateral) se encuentra incrementada en ratones carentes de leptina y además su administración en ratones sanos ha incrementado la ingesta calórica de éstos. Los ratones con mutaciones de esta hormona son hipofágicos y magros lo que confirma que esta es una molécula orexígena. Las neuronas que expresan MCH reciben estímulos por parte de las que expresan neuropeptido Y presentes en el núcleo arqueado, y parecen transmitir la señal orexígena del neuropeptido Y a numerosos sitios del cerebro.

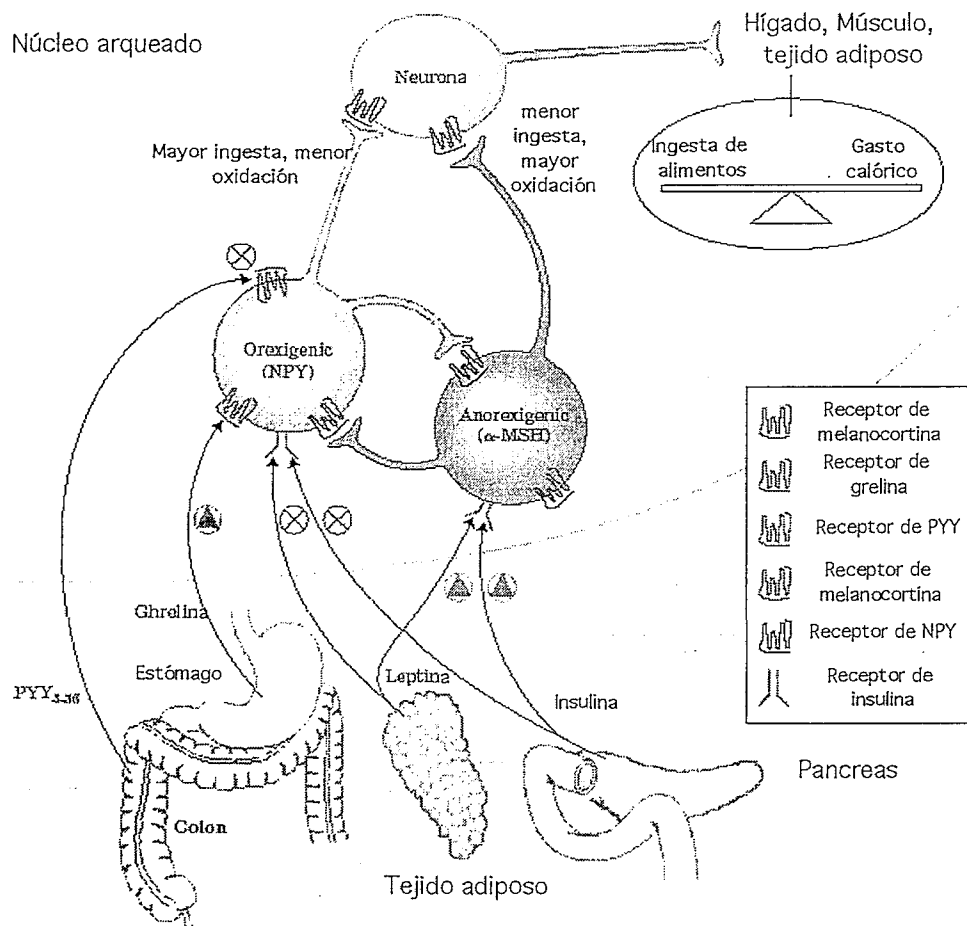


Figura 10. Acciones de varios factores hipotalámicos que regulan la ingesta y el gasto calórico. Nótese la acción reforzada de la leptina por parte de la insulina así como la inhibición recíproca entre las neuronas que producen NPY y α MSE.

Tomado de Nelson, Cox. Lehninger principles of biochemistry, 4a ed., 2004.

Estas neuronas productoras de MCH se proyectan precisamente a muchos de los mismos sitios donde se proyectan las neuronas que producen hormona melanocito estimulante alfa (α MSE, molécula anorexígena). Ambas actúan por distintos receptores y la α MSE incrementa, mientras que la MCH disminuye la concentración de adenosinmonofosfato cíclico (cAMP) intraneuronal, causando disminuciones y aumentos en el apetito respectivamente (Friedman 2002).

Además la respuesta hipotalámica a la leptina incluye la activación de la transcripción de proopiomelanocortina (POMC) en las neuronas que la sintetizan, las cuales

a su vez secretan la mencionada hormona α MSH (derivada intraneuronalmente de la proopiomelanocortina por medio de cortes de proteasas y que también se cree está involucrada en movilización periférica de lípidos. Ver Figura 11), hormona que al ser secretada interactúa con las neuronas que expresan el receptor melanocortina 3 y 4 (MC3R y MC4R respectivamente), que al activarse inhiben el apetito en las zonas cerebrales y por los mecanismos ya mencionados (Forbes, Bui, Robinson, Hochgeschwender, Brennan 2001). De hecho, se considera que el efecto sinergista de la AgRP con el NPY es realizado por la primera al ser un antagonista del receptor de melanocortina 3 y 4 (MC3R y MC4R respectivamente) (Qian, Chen, Weingarth *et al* 2002). Se ha reportado recientemente que en humanos, la mutación del receptor MC3R produce incrementos en la masa grasa, con el consecuente aumento de la concentración plasmática de leptina. Al expresar este receptor mutante en cultivos de células, se observó una disminución en la esperada generación de AMPc, cuando dichas células fueron expuestas a α MSH. (Feng, Young, Aguilera, Puricelli, Adler-Wailes, Sebring, *et al* 2005).

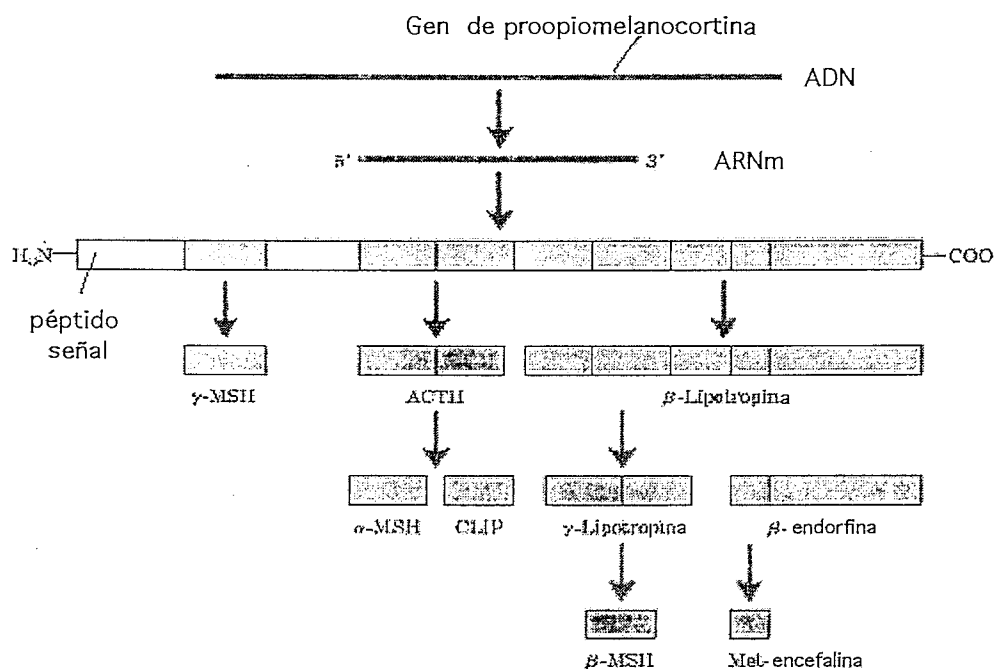


Figura 11. Proceso de proteólisis de la proopiomelanocortina y génesis de α MSH (hormona alfa melanocito estimulante). Tomado de Nelson, Cox. Lehninger principles of biochemistry, 4a. Ed., 2004.

Por otra parte, existen reportes que indican que algunas de las alteraciones del receptor MC4R (se conocen varias decenas de mutaciones de este receptor) generan hiperfagia, obesidad, hiperinsulinemia e incremento en la eficiencia calórica en humanos. Además, en algunos de los individuos con mutaciones en este receptor, se observa que sus concentraciones de leptina plasmática no guardan la esperada correlación con la masa grasa corporal, lo que sugiere que el retrocontrol negativo existente entre las concentraciones de leptina en plasma y el tejido adiposo, está alterado. (Branson, Potoczna, Kral, Lentos, Hoehe y Horber, 2003). Finalmente, existen recientes publicaciones que ya empiezan a involucrar al receptor tipo 1 de melanocortina (MC1R) con la obesidad. (Bell, Meyre, Samson, Boyle, Lecoœur, Tauber *et al* 2005).

El CART, (cocaine and amphetamine-regulated transcript) de origen hipotalámico es otra sustancia supresora del apetito (Nelson, Cox, 2004). Se ha notado que éste disminuye la ingesta calórica mientras que sus anticuerpos la incrementan, y se le ha implicado en la respuesta a la acción hipotalámica de la leptina, notándose que está colocalizado en ciertas neuronas hipotalámicas que presentan α MSH y receptor de leptina (Friedman 2002).

Además de la inhibición de la expresión de NPY y AgRP, y de la activación de la transcripción de POMC y secreción de α MSH, la leptina estimula otra función a nivel hipotalámico, que incrementa el gasto calórico. El estímulo inducido por la leptina sobre ciertas neuronas simpáticas hipotalámicas, causa un incremento en la secreción de norepinefrina a nivel de sinapsis con adipocitos, la cual actúa en receptores adrenérgicos β 3 induciendo la síntesis de proteínas desacoplantes tipo 1 (UCP 1), principalmente en el tejido adiposo pardo (Nelson, Cox 2004, Zhou, Lin, Coughlin, Vallega, Pilch 2000). En la figura 12 se representa la acción de la leptina sobre las UCP 1. (Nelson, Cox 2004)

Las anteriores son las vías básicas a nivel hipotalámico que se modulan ante el estímulo generado por la leptina y que poseen un efecto general de disminución del apetito con incremento del gasto calórico. No obstante, los ratones carentes de los genes que codifican AgRP (Knock out), no presentan alteraciones de fenotipo, locomoción, crecimiento, composición corporal o ingesta calórica. También presentan respuestas normales a la inanición y la sobrealimentación, así como a la administración de leptina y de NPY exógenos. Lo anterior se presenta de manera muy similar en ratones sin genes de

NPY y también en los carentes de los genes de ambos péptidos, lo que sugiere que ninguno de los dos es un orexigénico esencialmente requerido. Todo esto sugiere que existen otras vías de acción no exploradas capaces de regular la homeostasis energética en ausencia de los dos orexigénicos clásicamente relacionados con los efectos de la leptina sobre la composición corporal y el balance energético (Qian *et al* 2002). Adicionalmente, no se tiene a la fecha del todo claro, de que manera la leptina inhibe a un tipo de células (las productoras de NPY y AgRP) mientras que estimula a otras (productoras de POMC). De hecho, se han propuesto mecanismos complementarios y alternativos a la señalización de la vía JAK-STAT. (Xu *et al* 20005).

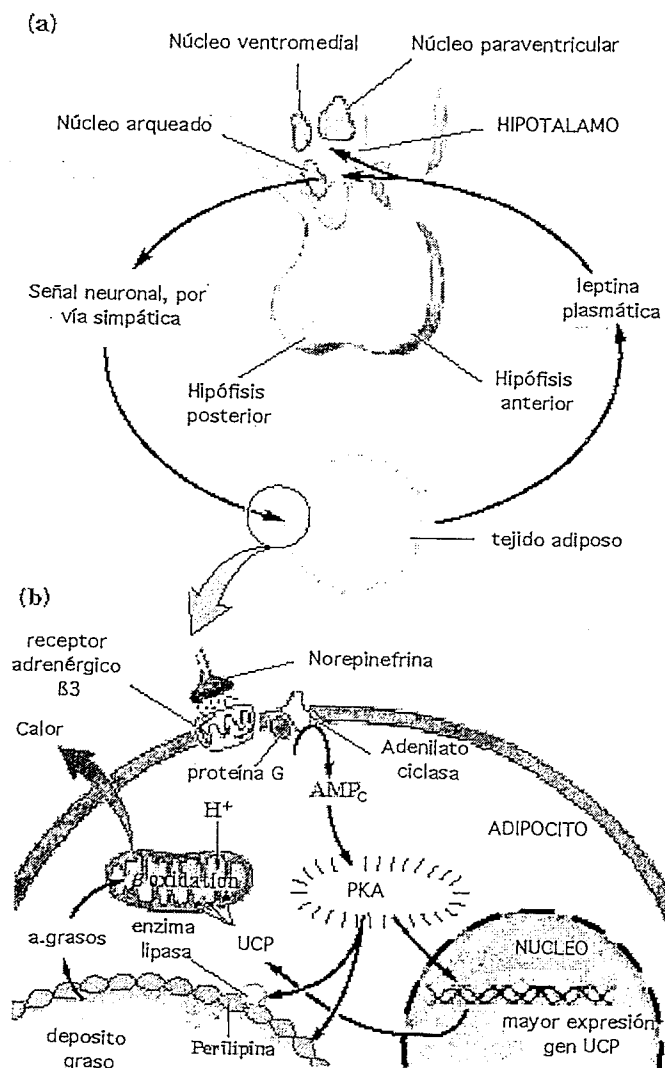


Figura 12. Incremento del gasto calórico causado por la leptina y las UCP 1.

Tomado de Nelson, Cox. Lehninger principles of biochemistry, 4a ed., 2004.

En los ratones *db/db*, (tienen una mutación en el receptor OB-Rb, debido a un editaje anormal) no se presenta activación hipotalámica ante la administración de leptina, confirmando que el OB-Rb es requerido para que se dé la acción de la leptina sobre la ingesta y el gasto calórico (Halas, Friedman 1997).

La isoforma larga del receptor también se encuentra presente (aunque en menor medida) y puede activar transducción de señal en una gran variedad de tejidos periféricos, que incluyen el tejido adiposo (lo que convertiría a la leptina en una hormona autocrina y paracrina a nivel adiposo) células T, células endoteliales, vaso, corazón, plexo coroideo y riñón, lo que puede contribuir con los muchos efectos biológicos periféricos de la leptina (Huang *et al* 2001, Machinal-Quélin *et al* 2002).

De las isoformas cortas del receptor, el OB-Ra es la más expresada, con gran representación en riñón, pulmón, intestino, corazón, testículos, tejido adiposo, plexo coroideo y microvasos cerebrales, siendo éstos dos últimos, sitios de las barreras hematocefalorraquídea y hematoencefálica respectivamente, lo que sugiere que está envuelto en el transporte de la leptina a través de tales barreras permitiéndole alcanzar el hipotálamo, cosa que se refuerza con los hallazgos de reducidos niveles de leptina en el líquido cefalorraquídeo de animales con mutaciones de la isoforma en cuestión (Huang *et al* 2001). Esta isoforma corta también se expresa en menor medida en una gran variedad de otros tejidos, tales como hígado, músculo esquelético, glándulas suprarrenales, vaso, y células B pancreáticas. Precisamente la variedad de tejidos en los que se expresan los diferentes receptores de leptina, le permiten una gran variedad de funciones, adicionales a la regulación de la ingesta y el gasto calórico, que ya están siendo ampliamente estudiados, como la modulación de la presión arterial, hematopoyesis, termogénesis, angiogénesis, metabolismo de lípidos, reproducción, respuesta inmunológica, función pancreática, intestinal, renal (Machinal-Quélin *et al* 2002, Correia, Morgan, Sivitz, Mark, Haynes 2001).

Finalmente la isoforma soluble (OB-Re) o secretada de receptor, circula en el plasma y es capaz de unirse a la leptina. El nivel de este receptor y de la hormona se incrementa hasta 40 veces en las etapas finales de gestación en ratas, lo que sugiere que el receptor modula la acción biológica de la hormona *in vivo*. De hecho, se ha demostrado que la sobre expresión del receptor soluble causa incrementos en la cantidad de leptina circulante, sin afectar su expresión. La elevación se debe a un lento aclaramiento de la

hormona, generado por la sobre expresión del receptor soluble. También se ha demostrado en ratones *ob/ob*, que el efecto sobre gasto calórico y apetito debido a la administración exógena de leptina es mayor cuando el receptor soluble está sobre expresado (Huang *et al*, 2001). Su presencia en humanos ya ha sido reportada (Brabant *et al* 2002).

En la figura 13 se resumen de manera integrada los principales efectos de la leptina, a nivel molecular y sistémico.

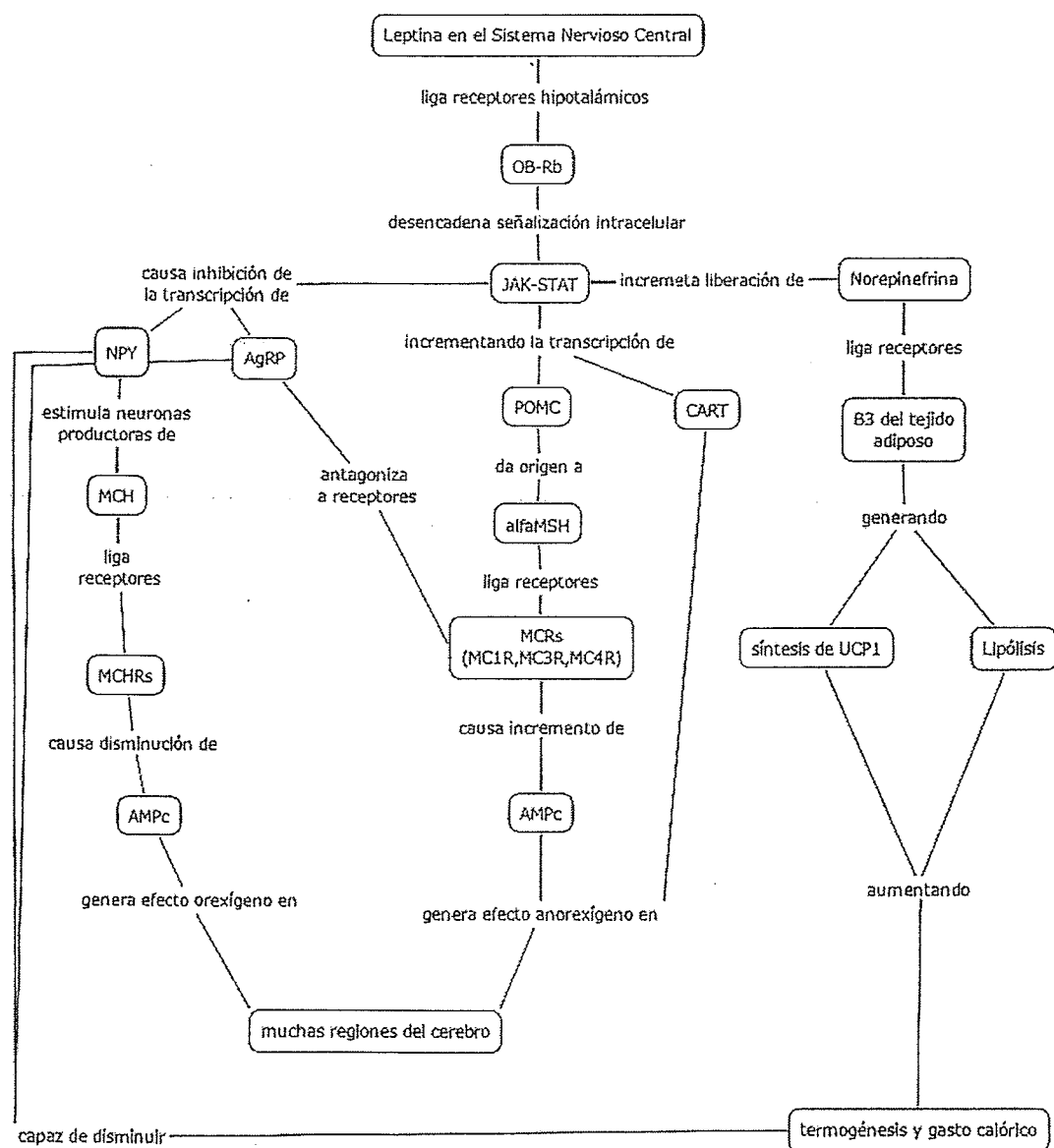


Figura 13. Integración de los efectos moleculares y sistémicos de la leptina.

Correlación Entre la Concentración Plasmática de Leptina y Otras Variables Fisiológicas

Correlaciones entre la composición corporal y los niveles de leptina en plasma

En humanos existe una fuerte correlación positiva entre los niveles de leptina y la masa grasa corporal. La expresión de leptina por los adipocitos y su concentración plasmática se correlaciona positivamente con la adiposidad total (Jurimae, Jurimae, 2005, Cammisoto *et al* 2002). La hormona se correlaciona positivamente con el índice de masa corporal, el porcentaje de grasa y la masa grasa en humanos obesos y magros (Claire *et al* 2002, Ostlund, Yang, Klein, Gingerich 1996, Fred *et al* 2000). Los sujetos obesos poseen más adipocitos, además de que cada uno de ellos produce más leptina que los de un sujeto delgado. Al respecto se ha establecido que, en promedio, los sujetos obesos producen el doble de leptina por gramo de masa grasa que los sujetos delgados. Si tomamos en cuenta que un adipocito de un sujeto obeso posee un tamaño de 2 a 4 veces mayor que un adipocito de un sujeto delgado, se estima que los adipocitos de los sujetos obesos producen hasta 7 veces más leptina que los de un sujeto delgado. Entre las causas de esta producción incrementada se han hecho hipótesis humorales, (hiperinsulinemia) paracrina (producción incrementada de citoquinas en el tejido adiposo) y mecánicas (estiramiento del adipocito). Por otro lado, las mujeres poseen significativamente más leptina que los hombres para una dada cantidad de grasa corporal (masa grasa) y los niveles incrementan aún más en la fase luteal del ciclo menstrual (hasta 45%), lo que sugiere que las hormonas sexuales son importantes moduladoras de su secreción o que al menos éstas interactúan con la leptina (Horlick, Resenbaum, Nicolson *et al* 2000, Gower, Nagy, Goran, Smith, Kent 2000, Kohrt, Landt, Birge Jr 1996, Hickey, Houmard, Considine *et al* 1997, Thong, McLean, Graham 2000, Fred *et al* 2000). Solamente en un mínimo de casos en humanos la obesidad se ve relacionada con una inadecuada producción de leptina, debido a mutaciones en el gen responsable, pero esto refuerza el concepto de que la hormona ejerce retrocontrol negativo sobre la cantidad de masa grasa. En pacientes con trastornos alimentarios como anorexia nerviosa, la leptina también correlaciona como en los demás sujetos con la masa grasa, presentando niveles muy disminuidos (Grinspoon, Gulick, Askari *et al* 1996). Algunos autores sugieren que en personas obesas evidentemente la leptina por alguna razón no está cumpliendo su función, de reducción de apetito y aumento del gasto calórico. (Jequier,

Tappy 1999). Se ha determinado que los niveles de ARNm de leptina así como la secreción de la misma es mayor en adipocitos subcutáneos que en omentales (Fred *et al* 2000).

Correlación entre el balance energético y los niveles de leptina en plasma

Además de estar controlada por la cantidad de masa grasa, la concentración de leptina circulante se modifica debido a otros factores independientes al nivel de adiposidad (Claire *et al* 2002). Ya se ha determinado que el ayuno prolongado reduce sus niveles plasmáticos, alterando su patrón de secreción circadiana (Landt 2000, Landt *et al* 1997). Se ha descubierto que las alteraciones agudas del balance energético son capaces de alterar los niveles de leptina sin alteraciones de la composición corporal (Fred *et al* 2000). Ya ha sido ampliamente reportado que sus concentraciones se modulan agudamente por varias condiciones fisiológicas que alteran el balance energético, como lo son la restricción de ingesta calórica, realimentación y sobrealimentación (Soliman, Elzalabany, Salama, Ansari 2000, Cammisoto *et al* 2002). Una reducción de un 10% del peso corporal está asociada con una disminución de un 53% en el nivel de leptina. El incremento en el peso en un 10% genera un incremento de 300% en la leptina en plasma. Un día de sobrealimentación masiva, incrementó en un 40% los niveles de leptina sin alterar el peso corporal y el ayuno también disminuye sus niveles antes de alterar el peso. Otros reportes señalan que entre uno y dos días de ayuno, se han producido disminuciones de la concentración plasmática de leptina de un 64 a un 72% respectivamente, sin presentarse alteraciones en composición corporal. Las grandes alteraciones en las concentraciones plasmáticas de la hormona ante modificaciones discretas o nulas en el peso corporal y la masa grasa, generadas por cambios en el balance energético implica que la leptina tiene un doble papel: En situación de balance energético refleja el nivel de triglicéridos almacenados en el tejido adiposo, pero cuando tal balance se rompe, censa las alteraciones en éste, perdiendo momentáneamente la correlación con el nivel de masa grasa. Dicho de otra forma, se ha visto que la leptina censa la cantidad de masa grasa corporal pero además cumple una segunda función: censa el balance energético (Jurimae, Jurimae 2005, Hickey *et al* 1997, Caro *et al* 1996, Hickey, Calsbeek 2001, Monteleone, Bortolotti, Fabrazzo, La Rocca, Fuschino, Maj 2000, Thong,

Hudson, Ross, Janssen, Graham 2000, Kolaczynski, Considine, Ohannesian *et al* 1996, Pasman, Wastertert-Platenga, Saris 1998).

Recientemente se reportó que los niveles de leptina en plasma se redujeron en un 48.8% luego de 36 horas de ayuno en sujetos con lesión de espina dorsal (IMC 25.9 +/- 1.5, edad 37 +/- 3 años) mientras que se redujeron en un 38.6% en ese mismo periodo de ayuno en sujetos sin tal tipo de lesión (IMC 29.1 +/- 1.9, edad 35 +/- 3.5 años). Se notó que la disminución en las concentraciones plasmáticas de la hormona se inició a las 12 horas de ayuno en el grupo control, mientras que en el grupo de sujetos con lesión espinal esta disminución inició hasta las 24 horas de no ingerir alimentos. Entre las razones de esta diferencia se aducen la mayor cantidad de grasa corporal del grupo experimental con respecto al grupo control (33.8 +/-3 % y 24.1 +/- 2.9 respectivamente) así como el efecto que la lesión del sistema nervioso podría estar ejerciendo. Esta última posibilidad garantiza la llegada de estudios orientados a explorar tal condición (Jeon, Harber y Stedward, 2003).

Gran parte del interés inicial sobre la leptina recayó en su posible función “anti-obesidad”. No obstante este sistema fisiológico probablemente evolucionó como un mecanismo que logró ser capaz de ajustar la actividad y metabolismo de los animales durante periodos de ayuno e inanición, y no durante periodos de sobrealimentación. Las disminuciones en los niveles de leptina observadas durante la privación de alimentos obviamente inactiva sus efectos termogénicos, cosa que causa economía de calorías (ver figura 8). Cuando la leptina disminuye, lo hace también la hormona tiroidea, mientras que se incrementa la producción de glucocorticoides. Al reducir el gasto calórico a un mínimo y movilizar las reservas endógenas de energía la leptina media las respuestas que permiten al animal sobrevivir en periodos de ayuno (Nelson, Cox 2004).

Regulación de las Concentraciones Plasmáticas de Leptina

La regulación dual de la producción de leptina recuerda el comportamiento de otras hormonas. La producción de vasopresina aumenta cuando se incrementa la osmolalidad del plasma y se inhibe cuando ésta disminuye, (regulación mediada por osmoreceptores hipotalámicos) pero cuando se produce hipovolemia su secreción incrementa

independientemente de la osmolaridad plasmática (control por baroreflejo) (Caro *et al* 1996, Kolaczynski *et al* 1996, Berne, Levy 1998, Boron, Boulpaep 2003). Otro ejemplo de regulación dual es el de la hormona de crecimiento, la cual se secreta durante ayuno en cantidades elevadas así como durante ejercicio agudo y en casos de alimentación elevada en proteínas (aunque esta última no parece ser estrés fisiológico). La alimentación con carbohidratos no estimula su secreción por parte de la adenohipófisis (Berne, Levy 1998).

Regulación por insulina

Algunos reportes iniciales han señalado que en ratones la insulina estimula aguda y crónicamente los niveles de expresión de leptina por parte del adipocito (Estudios *in vitro* e *in vivo*). Mientras tanto, se ha señalado a su vez que en humanos la insulina no parece estimular agudamente el incremento de leptina en plasma, habiéndolo hecho solo de forma crónica, en promedio luego de 48 horas de estímulo continuo, posiblemente como efecto trófico de la insulina sobre los adipocitos, más que como las respuestas clásicas metabólicas a la insulina (transporte de glucosa, inhibición de la lipólisis y otros derivados de la señalización intracelular) (Caro *et al* 1996).

Congruentemente con esta postura, Kolaczynski *et al* (1996) no encontraron durante 36 horas de ayuno en humanos correlación significativa entre las tasas de disminución de la insulina y de la leptina plasmáticas, no pudiendo reportar ningún efecto regulatorio de la insulina sobre la leptina, habiendo ésta última disminuido significativamente mucho más que la insulina además de haberlo hecho de manera anticipada. En este mismo estudio, al realimentar a los sujetos, la insulina se elevó significativamente en mayor magnitud y velocidad que la elevación de la leptina. Los autores concluyeron que ni la disminución de insulina en ayuno ni los mecanismos que ésta modula en tal estado son reguladores primarios de la leptina.

Khort *et al* (1996) mencionan que, en ratones en estado de ayuno, la administración de insulina rápidamente eleva la síntesis de ARNm de leptina, sugiriendo que la primera induce la síntesis de la segunda. No obstante en humanos los autores denotan que se requiere más investigación para probar tal efecto. En el estudio de Pasman *et al* (1998) se

reporta correlación entre la disminución de la concentración de leptina e insulina plasmáticas, ante la restricción calórica prolongada y de manera independiente a cambios en la composición corporal. No obstante, no logran establecer una relación causal entre la disminución de la concentración de insulina debido al ayuno y una consecuente disminución en la concentración de leptina como resultado.

Reportes posteriores señalan un posible efecto de la insulina como agente capaz de inducir la síntesis de leptina de manera aguda y crónica. (Hickey, Calsbeek 2001) Al respecto Harris (2000) señala incrementos en la expresión de leptina en adipocitos humanos y de ratón expuestos a insulina. Sobre este fenómeno *in vivo* se reportan iguales efectos de la insulina en cuestión de horas o días, resultados que no obstante no han sido reproducibles por muchos investigadores. Esta inconsistencia es planteada en la revisión de Cammisotto *et al* (2002) quienes indican que muchos grupos reportan este efecto de la insulina como inductor de la síntesis de leptina en adipocitos *in vitro*, mientras que otros descartan tal efecto, controversia que se mantiene en los ensayos *in vivo*.

El estudio de Fisher *et al* (2001) indica que la inconsistencia del efecto de insulina sobre leptina se debe a la ausencia de controles en estado de ayuno, condición donde los niveles de leptina plasmática disminuyen. Cuando se ha contado con grupo control en ayuno –indica este autor-, se ha demostrado un claro efecto agudo de la insulina como inductor de la síntesis de leptina, efecto que se manifiesta de esta forma: bajas dosis de insulina durante ayuno, eliminan la disminución de la concentración de leptina en plasma de sujetos experimentales ayunando (disminución que sí se observa en los controles en ayuno y sin dosis de insulina). Además en este mismo contexto, dosis mayores de insulina han causado incluso incrementos en los niveles de leptina circulantes durante las condiciones explicadas. Estos datos son también mencionados por Fred *et al* (2000) quienes añaden que tales diferencias se hacen notorias en términos de una hora.

Posiblemente el mantenimiento estable de la concentración de leptina durante el ayuno (sin disminuir pero sin incrementar) llevó a muchos autores a concluir que no hay efecto de insulina sobre la síntesis de leptina, debido a la ausencia de grupos control que mostraran disminuciones en la leptina plasmática durante el ayuno. Esta es una posible

explicación a las inconsistencias observadas entre los diferentes estudios practicados en sujetos humanos.

En los reportes más recientes, algunos autores señalan que es cada vez mayor la evidencia que demuestra que la insulina es un regulador crítico de la expresión de leptina, por lo que a la primera se le considera un secretagogo de la segunda (Jurimae, Jurimae 2005).

Regulación por glucosa

En el estudio de Kolaczynski *et al* (1996) se administraron cantidades pequeñas de glucosa durante 6 horas a sus sujetos, iniciando con 0.2 y terminando con 1.6 mg/kg/min luego de 10.5 horas de ayuno (equivalente a la gluconeogénesis esperada durante ese período). Este tratamiento permitió que se mantuviera constante el nivel de leptina, o sea se impidió su esperada y conocida disminución plasmática durante el ayuno (sin disminuciones adicionales a partir de la administración de glucosa) al tiempo que se mantuvieron constantes la glicemia, insulina y cetonas. Los autores concluyeron que los mismos mecanismos que censan la disminución en el glucógeno hepático y activan la gluconeogénesis y la cetogénesis también regulan los niveles de leptina de manera independiente a la regulación por insulina.

Fisher *et al* (2001) de igual forma señalan que la glucosa estimula la producción de leptina directamente al menos en músculo esquelético, lo que incluso podría significar que el efecto de la insulina sobre las concentraciones plasmáticas de leptina se deba a su capacidad de facilitar el ingreso de glucosa a las células, aspecto señalado además por Fred *et al* (2000) quienes indican que el metabolismo propio de la glucosa es generador de señales capaces de regular la síntesis de leptina. Esto es secundado por otros estudios en los que se reporta que inhibidores de los transportadores de glucosa y de la glicólisis causaron disminución en la secreción de leptina en adipocitos de ratón aún en presencia de insulina. Esta inhibición se da de manera dosis dependiente (Baile, Della-Fera, Martín 2000). La idea del efecto de la insulina mediado por la captación de glucosa en el adipocito, es altamente reforzada con el estudio de Griffen, Oostema, Stanhope *et al* (2005). Estos autores utilizaron sujetos con diabetes del tipo 1 y los sometieron a dos diferentes

condiciones experimentales. En una de las condiciones los sujetos se inyectaron insulina de acción rápida dos veces al día (una vez al desayunar y otra vez al almorzar). En la otra condición experimental los sujetos se inyectaron una sola dosis de insulina de acción rápida mezclada con insulina de acción intermedia, justo antes de desayunar. En ambas condiciones la totalidad de insulina administrada fue la misma. Se detectó que la dosis doble de insulina de acción rápida aplicada en cada comida, causó un comportamiento de la insulinemia mucho más similar al registrado en individuos sanos, cosa que no se dio en la condición de una dosis única de insulina de acción rápida mezclada con la de acción intermedia. Adicionalmente, con la doble dosis de insulina, la glicemia de los sujetos se redujo significativamente más que con la dosis única, lo que implica que los tejidos (incluyendo el adiposo) captaron más glucosa en ese caso. Durante la condición de insulina de acción rápida inyectada dos veces al día, se registraron concentraciones plasmáticas de leptina significativamente superiores.

Regulación por cortisol

Se ha demostrado que la administración de glucocorticoides aumenta la secreción de leptina y este efecto se ha probado *in vivo* e *in vitro* tanto en humanos como en ratones. Además en sujetos con síndrome de Cushing y adenoma adrenal se presentan niveles incrementados de leptina, mientras que en pacientes adrenalectomizados ocurre todo lo contrario, esto hace consistencia entre clínica y reportes experimentales (Baile *et al* 2000).

In vivo, la administración específica de dexametasona ha causado incrementos en la concentración de leptina en humanos en cuestión de horas, así como en la cantidad de ARNm de la hormona presente en el adipocito en un plazo de 2 días. En estudios *in vitro*, los adipocitos de sujetos obesos mantienen la producción de leptina al ser expuestos a insulina y cortisol de forma conjunta (una producción elevada que permanece durante una semana de monitoreo), mientras que los adipocitos de sujetos delgados, de hecho incrementan su producción de leptina al ser sometidos a tales condiciones (a partir del primer día de seguimiento y durante los 7 días de observación). Se ha sugerido que el efecto del cortisol podría deberse a la hiperinsulinemia que genera, pero actualmente se

consideran efectos sinérgicos el de cortisol e insulina, e incluso ya se mencionan regiones promotoras de la transcripción del gen de leptina que responden a insulina y glucosa o cortisol (Fred *et al* 2000, Baile *et al* 2000, Harris 2000, Hickey, Calsbeek 2001).

En situaciones de ejercicio prolongado se han reportado incrementos de cortisol que se correlacionan con mantenimiento estable de las concentraciones de leptina durante las pruebas, mientras que en ejercicio de corta duración se presenta menor elevación de este corticoesteroide, a la vez que las concentraciones de leptina decrecen durante tales condiciones (Fisher *et al* 2001).

Regulación por norepinefrina y sistema nervioso simpático

En la región promotora del gen de leptina se han detectado elementos que responden al AMPc. En presencia de isoproterenol los adipocitos humanos cultivados denotan disminución en la liberación de leptina así como en su cantidad de ARNm, cosa que ocurre aún aplicando insulina y dexametasona en el cultivo (Fred *et al* 2000). Este efecto está mediado por la síntesis de AMPc, la cual puede ser inducida por hormonas adrenérgicas o sus agonistas no selectivos sintéticos con resultados similares en plazos cortos (horas) (Cammisoto *et al* 2002).

En sujetos humanos se ha reportado que la administración de isoproterenol o norepinefrina disminuyó entre un 19% y un 27% la concentración de leptina en plasma en un plazo de dos horas. En otros reportes se indica que la administración de dosis de norepinefrina -mantenidas por tres horas- de igual magnitud que la observada durante ejercicio, causó una disminución de la concentración plasmática de la hormona en un 22%, así como de la abundancia de ARNm de leptina en adipocitos subcutáneos y abdominales en un 47%. Otras formas de activación del sistema nervioso simpático que se han probado en humanos –como le es la exposición al frío- también ha demostrado generar tales disminuciones (Fred *et al* 2000, Baile *et al* 2000).

Con base en los mecanismos anteriores se ha elaborado el cuadro 2, que contempla la regulación de la producción y secreción de leptina, y que incluye sus agonistas y antagonistas.

Cuadro 2: Agentes reguladores de la leptina. Se incluyen agonistas y antagonistas

Agente	Efecto sobre la concentración de leptina plasmática	Observaciones	Referencias Bibliográficas
Insulina	Impide su disminución cuando se ha administrado durante periodos de ayuno. Cada vez más evidencia la señala como un secretagogo de leptina.	Inconsistencias entre diferentes investigaciones, atribuidas a falta de grupos control en algunas de ellas	Fisher <i>et al</i> (2001) Fred <i>et al</i> (2000) Jurimae, Jurimae (2005)
Glucosa	Impide su disminución cuando se ha administrado durante periodos de ayuno	Se ha sugerido que el efecto de la insulina es indirecto, al proveer glucosa a miocitos y adipocitos	Kolaczynski <i>et al</i> (1996) Fisher <i>et al</i> (2001) Fred <i>et al</i> (2000)
Cortisol	Incremento	Consistencia entre diferentes tipos de estudios: <i>in vivo</i> , <i>in vitro</i> , en ejercicio, en humanos, en ratones, clínicos	Baile <i>et al</i> (2000) Fred <i>et al</i> (2000) Harris (2000) Hickey, Calsbeek (2001). Fisher <i>et al</i> (2001)
Norepinefrina	Disminución	Efecto se impone al de los agonistas	Cammisoto <i>et al</i> (2002). Baile <i>et al</i> (2000) Fred <i>et al</i> (2000)

Necesidad de Estudios In Vivo y en Condiciones Fisiológicas.

No es extraño encontrar ensayos *in vitro* que aunque son muy controlados, (lo que les da gran validez interna) poseen poca aplicabilidad, pues por ejemplo en algunos estudios que buscan algún efecto pre adipogénico sobre preadipocitos de rata por parte de la leptina, se ha recurrido tradicionalmente a experimentos en los que se expone a los preadipocitos a concentraciones de la hormona que rondan entre 40 y 440 veces su concentración plasmática en las ratas, o sea de 10 a 120 nM. (Maquinal-Quelin 2002). Esto llama a practicar ensayos *in vivo*, y en humanos, que puedan poseer una mayor validez externa y procurando obtener el mayor grado de control posible.

Leptina y Ejercicio

En el área específica de la leptina en relación con la actividad física se han estudiado dos vertientes principales. La influencia del ejercicio sobre los niveles plasmáticos de leptina a nivel crónico (adaptación al entrenamiento físico) y el efecto agudo de la actividad física sobre los mismos (respuesta).

Efecto crónico del ejercicio sobre los niveles plasmáticos de leptina

Muchos estudios coinciden en que como parte de las adaptaciones al entrenamiento físico, se reducen los niveles de leptina en plasma de manera indirecta, al reducir los porcentajes de grasa del sujeto. Además se da una disminución de la relación leptina / masa grasa, lo que para ciertos autores sugiere que el tamaño de los adipocitos es un estímulo importante que determina la producción de la hormona por parte de los mismos. Estos estudios indican que no parece haber un efecto directo de la actividad física regular sobre la variable dependiente (Kohrt *et al* 1996), lo que se confirma con los estudios que reportan disminuciones similares de los niveles de leptina relacionados con pérdida de peso inducida tanto por una dieta como por un programa de ejercicio (Thong *et al* 2000, Reseland, Andersen, Solvoll *et al* 2001). Este último estudio además reporta un efecto aditivo de ambos tratamientos al aplicarlos conjuntamente.

Otros autores no comparten la tesis anterior, indicando que las diferencias en los niveles de leptina entre sedentarios y atletas no se explican solamente por diferencias en la composición corporal (Jurimae, Jurimae 2005, Hickey, Calsbeek, 2001).

El estudio de Hickey *et al* (1997) encontró disminuciones de leptina en mujeres sin alteraciones en la composición corporal luego de 12 semanas de ejercicio aeróbico, lo que implica un efecto directo del ejercicio sobre la concentración de leptina plasmática de manera independiente a la cantidad de tejido adiposo. Dicho efecto no se dio en hombres en el mismo estudio, pues éstos luego de las 12 semanas no alteraron ni su composición corporal ni su nivel plasmático de leptina.

Existe un estudio en el que se examinaron los efectos agudo y crónico (éste último determinado luego de 20 semanas de ejercicio en bicicleta a intensidades entre 50% y 70 % del consumo máximo de oxígeno, con duraciones de 30 minutos cada una) del ejercicio sobre la leptina (Perusse, Collier, Gagnon *et al* 1997). Los autores concluyeron que no existe efecto agudo, mientras que el efecto crónico se da indirectamente (mediado por la disminución de la masa grasa) pero sólo en hombres.

En otra investigación se reporta un efecto del ejercicio crónico, que consistió en la disminución de los niveles de leptina en plasma de manera independiente al efecto sobre la composición corporal (Pasman *et al*, 1998); mientras que en el trabajo de Noland, Baker, Boudreau *et al* (2001) se denota un efecto del incremento del volumen de entrenamiento en natación sobre la composición corporal sin un efecto paralelo sobre los niveles plasmáticos de leptina. Cabe señalar que en este estudio no se toma en cuenta la fase del ciclo menstrual de las mujeres participantes, ni el uso de anticonceptivos orales. En los hombres no se encontró un efecto del incremento del volumen de entrenamiento de natación sobre la composición corporal, ni sobre los niveles de leptina en plasma. Una precaución fundamental que está ausente en este estudio, es el control del efecto de las alteraciones del volumen plasmático inducidas por el ejercicio. Esto altera las concentraciones de la hormona independientemente de su producción. Los estudios mencionados se resumen en el cuadro 3.

Las inconsistencias existentes entre los estudios anteriores pueden deberse a varias razones ya señaladas por otros autores (Hickey, Calsbeek 2001), entre las cuales se pueden citar las siguientes:

- a) Mediciones únicas de leptina en pre test y en post test, en lugar de establecer el área bajo la curva luego de varias horas de determinaciones continuas. Esto puede crear confusiones debido a la naturaleza pulsátil de secreción de la hormona y a su ciclo circadiano.
- b) Ausencia de control en el estado del balance energético de los sujetos al realizar las mediciones de leptina. En muchos estudios no se controla este factor manipulando la dieta de los sujetos (como debería ser), ni en su defecto se toman registros de las calorías y los nutrientes ingeridos por los participantes en los días y minutos previos a las mediciones de leptina.

Cuadro 3. Efectos crónicos del ejercicio sobre la concentración de leptina en plasma.

Efecto crónico de la actividad física	Observaciones	Tratamiento	Referencia Bibliográfica
Disminución de la concentración de leptina plasmática	Efecto indirecto mediado por disminución de la masa grasa.	Dos meses ejercicios de flexibilidad y nueve meses ejercicio aeróbico (60-80% FCM)	Kohrt <i>et al</i> (1996),
	Efecto indirecto mediado por ejercicio o por control de la alimentación.	Ejercicio diario, de tipo aeróbico durante doce semanas (80% FCM).	Thong <i>et al</i> (2000)
	Efecto indirecto mediado por ejercicio o por control de la alimentación, y además aditivo si se combinan los tratamientos.	Ejercicio aeróbico tres veces por semana. (moderada intensidad)	Reseland, Andersen, Solvoll <i>et al</i> (2001)
	Efecto se da sin cambios en la composición corporal.	Ejercicio aeróbico durante 12 semanas. (85% FCM)	Hickey <i>et al</i> (1997)
		Ejercicio aeróbico de baja intensidad por 16 meses	Pasman <i>et al</i> (1998)
No demuestra efecto	Disminución de la concentración de leptina debido a la pérdida de tejido adiposo. Efecto presente en hombres pero no en mujeres.	Ejercicio aeróbico durante 20 semanas. (50-70% VO ₂ max	Perusse, Collier, Gagnon <i>et al</i> (1997)
	No controla posibles cambios de volumen plasmático. Se da disminución de la masa grasa únicamente en mujeres.	Natación, 4000 metros diarios. (atletas)	Noland, Baker, Boudreau <i>et al</i> (2001)

Estas posibilidades toman fuerza al observar que en algunos sujetos los niveles de leptina en el post test son mayores que en el pre test, mientras que en otros se da exactamente lo contrario a pesar de haber recibido el mismo tratamiento de actividad física (Hickey *et al.* 1996). Así las cosas, en muchos estudios de tipo crónico -si bien se comparan sujetos activos con sedentarios, o un mismo grupo de sujetos antes y después de realizar actividad física por varias semanas- no se previene el efecto que las citadas circunstancias generan sobre las concentraciones plasmáticas de leptina, las cuales son capaces de alterarlas en alta medida.

En los estudios en que se han tomado las precauciones necesarias se ha reportado el efecto indirecto sobre la leptina por composición corporal, ejemplo de esto es el estudio de Thong *et al* (2000)

Efecto agudo del ejercicio sobre las concentraciones plasmáticas de leptina

La mayoría de los estudios realizados referentes el efecto agudo del ejercicio aeróbico sobre las concentraciones plasmáticas de leptina, reportan ausencia de un efecto de la actividad física sobre dicha variable dependiente. Esta apreciación se ha basado en la ausencia de un incremento en la concentración plasmática de leptina durante ejercicio o en las horas sucesivas a su ejecución. Al analizar los diferentes estudios se pueden realizar varias observaciones que demandan aclarar los resultados de dichas publicaciones. Estas se analizan a continuación.

Para impedir posibles alteraciones de los efectos del ejercicio debido al conocido efecto del balance energético sobre la leptina; se han realizado los protocolos de ejercicio y su respectiva condición control (reposo) en ayunas. De esta manera se ha esperado que los resultados encontrados obedezcan a un efecto exclusivo de la actividad física y no a uno inducido por la ingesta de alimentos en las horas previas a la sesión de actividad física. No obstante no se ha prestado atención a un fenómeno interesante, que consiste en una disminución de los niveles de leptina plasmáticos durante el periodo control (reposo), mientras que en las condiciones experimentales (ejercicio aeróbico) los niveles de leptina plasmáticos tienden a mantenerse estables tanto durante como después del ejercicio.

La disminución en los niveles de leptina en las condiciones de reposo se ha atribuido a dos factores, uno de los cuales es el conocido efecto del ayuno (Soliman *et al* 2000, Cammisotto, Bukowiecki, 2002). Generalmente se ha realizado un ayuno de 8 a 10 horas antes de las condiciones, y éstas toman un mínimo de 2 a 5 horas, totalizando hasta 15 horas de ayuno en muchos casos. El otro factor es el ritmo circadiano que presenta la hormona, que implica que la concentración plasmática de ésta disminuya durante el día y se incremente durante la noche. (Fisher *et al* 2001, Hickey, Calsbeek, 2001). La falta de disminución observada en los niveles de leptina en plasma a pesar del ayuno prolongado y

del ritmo circadiano en las condiciones experimentales (ejercicio) podría ser interpretado como un efecto mediado por la actividad física. El fenómeno descrito se ha presentado en sujetos sedentarios corriendo en banda sin fin a diferentes intensidades (Torjman, Zafeiridis, Paolone, Wilkerson, Considine 1999, Weltman, Pritzlaff, Wideman *et al* 2000), en sujetos competitivos corriendo una distancia de 20 millas (Hickey, Considine, Israel *et al* 1996), en sujetos sedentarios en ayunas ejercitándose en bicicleta a una intensidad del 50% de su consumo máximo de oxígeno calculado por el procedimiento de Karvonen (Racette, Coppack, Landt, Klein, 1997) y hasta en protocolos de ciclismo sumamente intensos (Landt *et al* 1997).

Otro elemento que se presenta en muchos estudios que reportan que no existe efecto agudo, es la falta de grupo o condición control (Hickey *et al* 1996, Racette *et al* 1997). Esto explica por qué en algunos casos la ausencia de elevación de la concentración en plasma de leptina post ejercicio se haya entendido como ausencia de efecto. No obstante en estos estudios se obvió a nivel teórico el ritmo circadiano y el efecto del ayuno, pues está ampliamente documentado que ambos reducen los valores de leptina en plasma, cosa que no se dio en sus estudios y que pudo interpretarse como posible efecto del ejercicio.

Otra posible razón por la cual los resultados obtenidos hasta ahora pueden no ser fidedignos, consiste en que en muchos estudios se realizaron mediciones de la hormona en plasma una sola vez como pre test y una sola vez como post test, (Hickey *et al* 1996, Landt *et al* 1997, Leal-Cerro, García-Luna, Astorga *et al* 1998, Duclos, Corcuff, Rufie, Roger, Manier, 1999, Gomez-Merino, Chennaoui, Drogou, Bonneau, Yannick Guezennec, 2002) lo que expone al investigador a errores en la medición, debido al patrón de secreción pulsátil de la hormona, que consiste en 32 pulsos por cada 24 horas (van Aggel-Leijssen *et al* 1999). Este patrón de secreción obliga a realizar un seguimiento detallado de la concentración en plasma de la leptina con múltiples mediciones tanto para pre-test como para post-test, lo cual permite establecer similitudes o diferencias en las concentraciones plasmáticas de la hormona antes y después de los tratamientos con mejor criterio de comparación, (a partir de comparaciones de áreas bajo la curva de concentración) obteniendo conclusiones más sólidas. Precauciones tales como realizar las muestras únicas de pre-test y post-test a las mismas horas del día son insuficientes para controlar ritmos circadianos y secreción pulsátil.

Cabe señalar que algunos estudios reportan profundas disminuciones en las concentraciones plasmáticas de leptina inducidas por ejercicio. No obstante esto se presenta en protocolos de ejercicio de extremada duración, tales como carrera continua durante 35 horas (35.8% de disminución) (Landt *et al* 1997), por correr la prueba de maratón, con un tiempo promedio de 3 horas 17 minutos (Leal Cerro *et al* 1998), o por hacer ejercicio de remo, a intensidades sumamente elevadas durante periodos de 30 minutos (Jurimae, Jurimae 2005). Estos efectos son tan marcados que incluso se dan sin corregir los datos por el efecto de la hemoconcentración inducida por ejercicio. No obstante es sabido que este fenómeno obedece a la conocida regulación de la leptina por el balance energético, que en tales protocolos es extremadamente negativo, cosa que produce disminución de los niveles plasmáticos de esta hormona (Landt 2000, Landt *et al* 1997). Se ha sugerido que esta disminución podría ser beneficiosa para el atleta, pues los efectos de la leptina sobre el apetito no son deseables luego de una competencia que crea déficit energético (Duclos *et al* 1999, Gómez-Merino *et al* 2002). Desgraciadamente el efecto de la leptina sobre el apetito en humanos no está totalmente esclarecido, aunque en ratones se ha documentado constantemente su efecto inhibitor de la ingesta de alimentos. (Nelson, Cox, 2004, Forbes *et al* 2001, Qian *et al* 2002).

El estudio de Weltman *et al* (2000) toma como pre-test una línea base de determinaciones de leptina en plasma cada 10 minutos durante dos horas, procedimiento envidiable desde el punto de vista de las mediciones, pero lo hace con sus sujetos en ayunas de 13 horas. Realiza protocolos de ejercicio en 5 condiciones de diferente intensidad de ciclismo, con duraciones de 30 minutos cada una. Al final de las mediciones post-ejercicio (que se prolongaron por tres horas y media) los sujetos contabilizaban 17 horas de ayuno. En tales circunstancias sus conclusiones de ausencia de efecto agudo post-ejercicio a diferentes intensidades son muy objetables, pues cualquier posible efecto pudo quedar enmascarado por uno de los protocolos de ayuno de mayor duración en los estudios de leptina y ejercicio. En ninguna de las condiciones experimentales del ensayo (múltiples intensidades) se da disminución de los niveles de leptina en plasma durante su transcurso, pero tampoco se da tal disminución en la condición control, dato que refuta cualquier efecto de la actividad física. Sin embargo, el posible enmascaramiento de sus resultados por el factor ayuno se evidencia en niveles de leptina sumamente reducidos desde la línea base,

(apenas 2 a 3 ng/mL, que puede deberse a estudiar sujetos excesivamente magros, en condiciones extremas de ayuno o ambas), la ausencia de una disminución de los niveles de leptina a partir de la hora 13 de ayuno, -en que se procedió a trazar tal línea base e interponer las diferentes condiciones- y la ausencia de patrón circadiano en sus sujetos en el transcurso de las condiciones.

En el estudio de Nindi, Kraemer, Arciero *et al* (2002) también se reporta ausencia de efecto agudo del ejercicio y los sujetos no estaban en ayunas, por lo que sus resultados no estarían influenciados por tal proceder (Dieta mixta previa a condiciones). No obstante el estudio consistió en ejercicio de pesas, lo que le impide ser comparado con la mayoría restante. Se reporta un efecto de disminución en los niveles de leptina en la condición físicamente activa (experimental) a las horas 9, 10, 12 y 13 post ejercicio, efecto que los autores atribuyeron al impacto del protocolo de la actividad física sobre el balance calórico negativo de los sujetos.

Un estudio bastante completo es el realizado por Fisher *et al* (2001), donde se utilizaron sujetos sedentarios pero sin sobrepeso (no presentaban niveles extremos de leptina). Además el estudio no se realizó en ayunas (eliminando confusión por efecto ayuno) pues los participantes desayunaron un bagel (50 gramos de carbohidratos -CHO-, 11 de proteína y 2 de grasa, índice glicémico de 72) y 355 ml de jugo de naranja (índice glicémico de 51). El índice glicémico del desayuno es aproximadamente de 65 y el valor calórico es de 425 calorías. Se practicó ejercicio aeróbico de intervalos en bicicleta durante 45 minutos, con un gasto calórico calculado de 475 calorías (condición experimental, nótese similitud ingesta-gasto calórico), y se realizó reposo como condición control.

Lo interesante del estudio es que a partir de los 45 minutos de finalizado el ejercicio, se encontró un incremento en la concentración plasmática de leptina en la condición experimental, tendencia que se fue incrementando y que llegó a ser un 10% mayor que en la condición control al cabo de tres horas post ejercicio, estableciendo diferencias significativas. En la condición control (reposo) no se dio la acostumbrada disminución en los niveles de leptina con el paso del tiempo, cosa que era de suponerse por la ausencia del factor ayuno y que apoya la idea de que tal estado ha afectado los resultados obtenidos en otros estudios.

A diferencia de la mayoría de los otros ensayos, se realizaron mediciones de otras variables que sustentan claramente sus conclusiones. Así por ejemplo, se determinaron las concentraciones plasmáticas de cortisol, hormona que se incrementó significativamente durante ejercicio, solo en la condición experimental. Se determinó además la insulinemia, notándose que ésta se disminuyó significativamente durante el ejercicio por debajo de la condición control, pero volvió a elevarse una vez finalizada la actividad (parte de la respuesta simpaticoadrenal al ejercicio, normalmente apreciada y que coincide con las determinaciones de catecolaminas en el estudio). Finalmente, también se determinó la glicemia durante las condiciones, notándose que ésta se mantuvo constante durante ejercicio pero se incrementó de manera significativa una vez finalizado éste. En la condición control esta variable nunca se alteró significativamente durante su transcurso.

Se nota en este estudio que en el minuto 45 post-ejercicio se encuentran elevados el cortisol (diferencias significativas respecto a condición control), la glicemia (diferencias significativas respecto a condición control) y la insulina (diferencias significativas respecto al pre-test), mientras que en la condición de reposo en dicho momento estas tres variables presentan niveles muy inferiores y con valores similares a la línea base. En ese momento se inicia el incremento en las concentraciones plasmáticas de leptina en la condición activa.

Una primera causa de las diferencias en las respuestas en ambas condiciones puede ser la ingesta de carbohidratos antes del ejercicio pues existen numerosos reportes que indican que estos son los nutrientes con mayor capacidad de elevar los niveles de leptina en plasma post-ingesta (Herrman, Bean, Black, Wang, Coleman, 2001, Romon, Lebel, Velly, Marecaux, Fruchart, Dallongeville, 1999, Jenkins, Markovic, Fleury, Campbell, 1997, Evans, Clark, Frayn 2001, Dirlwanger, Vetta, Guenat *et al* 2000), impidiendo que tanto en la condición de reposo como en ejercicio se den las acostumbradas disminuciones en la concentración de leptina en plasma.

Además, la elevación en los niveles de cortisol en la condición de ejercicio es otro posible causante del incremento en la concentración de leptina plasmática post-ejercicio, cosa que no se da en la condición control. Al respecto los autores establecen que la administración de glucocorticoides ha causado incrementos en la concentración de leptina en humanos en otros estudios. Esto es coincidente con lo señalado por Fred *et al* (2000) quienes indican que la administración de cortisona en humanos elevó los niveles de ARNm

de leptina en adipocitos subcutáneos en un plazo de dos horas, así como la concentración plasmática de la hormona en un plazo de 9 horas. Este efecto del cortisol parece ser menor en sujetos magros y además se ha pensado que es indirecto, pues los glucocorticoides producen hiperinsulinemia. Este efecto indirecto no está confirmado, por lo que los efectos de insulina y cortisol se consideran sinérgicos.

Adicionalmente, Fisher *et al* establecen en su estudio que la administración de insulina aún en bajos niveles previene la disminución de la concentración de leptina inducida por ayuno, además de que en mayores dosis (siempre en rangos fisiológicos) causa incrementos en su concentración plasmática. Controles a los que se les administra solución salina en lugar de insulina denotan disminución en los niveles plasmáticos de leptina y tales diferencias entre grupos son detectables en términos de una hora. Esta información coincide con lo expuesto por Fred *et al.* (2000). Sobre este mismo tema, Cammisotto y Bukowiecki (2002) confirman estos resultados en insulina, y además ofrecen interesantes vías de señalización intracelular que median tal efecto. Gómez-Merino *et al* (2002) denotan disminuciones significativas de leptina plasmática (67%) luego de cuatro semanas de entrenamiento físico extenuante. El ejercicio en cuestión causó balance energético negativo e hipoinsulinemia, la cual según los autores causó la disminución observada en la leptina. No se dieron alteraciones en el índice de masa corporal.

Señalan además Fisher *et al* que la glucosa estimula la producción de leptina directamente en músculo esquelético y que éste incrementa su consumo de glucosa luego de la actividad contráctil de forma independiente y aditiva con la insulina, lo que representa un doble mecanismo de captación de glucosa post-ejercicio en estas células. Esto implicaría que el músculo esquelético produzca más leptina post-ejercicio siempre y cuando exista suministro de glucosa adecuado al finalizar la actividad física. Lo anterior es aseverado por otros autores y hasta se ha sugerido que el efecto de insulina es únicamente de tipo indirecto al favorecer la captación de glucosa, pero esto no necesariamente armoniza con su efecto aditivo con el cortisol. Se debe estudiar más para esclarecer esa posibilidad (Fred *et al* 2000).

La acción simultánea de cortisol, insulina y glicemia post-ejercicio, así como la ingesta previa de carbohidratos de alto índice glicémico explican el incremento plasmático

de leptina observado una vez finalizada la actividad física en la condición experimental en el estudio de Fisher *et al* (2001).

En el estudio de Duclos *et al* (1999), se dio desayuno a los sujetos pero no se encontró el mismo efecto que en el de Fisher *et al*, sino una disminución en los niveles de leptina post-ejercicio en la condición activa, cosa que no contradice directamente los resultados de este último por varias razones: las mediciones de la hormona se iniciaron hasta dos horas de finalizada la actividad física, cuando el posible efecto del ejercicio pudo haber finalizado o estar disminuido. Además la alimentación previa a las condiciones incluye un porcentaje mucho menor de carbohidratos en el estudio de Duclos (sólo 55% de las calorías ingeridas en el desayuno, contra un 90% en el estudio de Fisher *et al*). Adicionalmente entre el tiempo de desayuno y el inicio del ejercicio transcurrieron dos horas en el estudio de Duclos *et al* y solo 45 minutos en el de Fisher *et al*. Por último el protocolo de ejercicio de Duclos *et al* es mucho más severo que el de Fisher *et al* (2 horas vs. 45 minutos, intensidades semejantes). Precisamente el grupo de Duclos explica sus resultados por efecto del balance energético negativo inducido por su protocolo sobre los niveles de leptina, más que por el efecto directo del ejercicio. Además se debe mencionar que las mediciones de la concentración de leptina en el grupo de Duclos son únicas, mientras que las del grupo de Fisher son múltiples, cosa que le da mayor credibilidad a este último si fuera necesario comparar ambos estudios. En el cuadro 4 se esquematizan los principales estudios publicados sobre el efecto agudo de la actividad física sobre los niveles plasmáticos de leptina.

Con base en la revisión bibliográfica referente al efecto agudo de la actividad física sobre las concentraciones plasmáticas de leptina, se planteó una investigación experimental que involucre las condiciones de: ingesta de alimentos, ejercicio, la combinación de ambas (ingesta de alimentos y ejercicio) y condición control (ayuno y reposo), con la intención de integrar todas estas en un solo estudio, y examinar su efecto sobre las concentraciones de la hormona en plasma.

Se optó por investigar bajo las mencionadas cuatro condiciones debido a que (según la revisión bibliográfica) éstas no se han plasmado en los estudios de manera conjunta, ya que por lo general se han incluido sólo algunas, como parte de diferentes ensayos. Lo

anterior ha generado que se manipule solo de manera parcial la totalidad de las principales variables capaces de modificar la concentración de leptina en el plasma.

Cuadro 4. Efecto agudo del ejercicio sobre la concentración plasmática de leptina. Nótese las diferencias entre las conclusiones de los diferentes estudios.

Efecto agudo reportado	Tratamientos y sujetos	Observaciones	Referencias bibliográficas
No hay efecto agudo del ejercicio	Sedentarios en banda sin fin a varias intensidades	Las concentraciones plasmáticas de leptina se mantienen durante ejercicio, no se disminuyen. Se da disminución en los grupos control, en los estudios que lo poseen.	Torjman et al 1999 Weltman et al 2000
	Entrenados en carrera de 20 millas		Hickey et al 1996* †
	Sedentarios en ayunas, ejercicio en bicicleta a intensidad moderada		Racette et al 1997*
	Entrenados en bicicleta a altas intensidades		Landt et al 1997 †
	Ejercicio con pesas	No puede ser comparado con los restantes, por el tipo de ejercicio	Nindi et al 2002
Disminución de la concentración plasmática de leptina	Entrenados corriendo maratón	Mediciones únicas de la leptina en el pre test y el post test †	Leal-Cerro et al 1998
	Carrera continua durante 35 horas		Landt et al 1997
	Sujetos entrenados. Dos horas de ejercicio de intervalos en bicicleta		Duclos et al 1999
	Soldados entrenados. Actividad física intensa y privación de sueño.		Gómez-Merino et al 2002
Incremento de la concentración plasmática de leptina	Sedentarios sin sobrepeso. Ejercicio aeróbico interválico en bicicleta,	Se ingieren carbohidratos antes del ejercicio, Diferencias metodológicas marcadas con respecto a otros estudios.	Fisher et al 2001

- * no posee grupo o condición control.
- † realiza mediciones únicas de leptina en el pre test y el post test.

ANEXO 2

METODOLOGÍA

Diseño Experimental.

Descripción de las condiciones experimentales.

Cada sujeto participó en cuatro condiciones experimentales, las cuales se realizaron aleatoriamente y con una diferencia de al menos 8 días entre cada una de ellas. Las condiciones experimentales aplicadas fueron:

AR) Ayuno y reposo (condición control).

AE) Ayuno y ejercicio.

DR) Desayuno y reposo.

DE) Desayuno y ejercicio.

Las condiciones se aplicaron con al menos 8 horas de ayuno, y se iniciaron a las siete de la mañana en el Laboratorio de Rendimiento Físico y Salud (LARENFISA) de la Universidad de Costa Rica. Cada sesión tuvo una duración de 8 horas, durante las cuales se recolectó una muestra de sangre venosa cada treinta minutos, de manera continua. Para lo anterior, se colocó un catéter en el antebrazo derecho, que se mantuvo habilitado colocando una llave de tres vías y aplicando 2 mL. de solución salina isotónica heparinizada cada treinta minutos. Este manejo fue realizado por personal entrenado. Las ocho horas de duración de cada condición se desglosan de la siguiente manera:

- a) Periodo de línea base: A partir de las 7 de la mañana se recolectaron muestras de sangre cada treinta minutos, durante dos horas. En todas las condiciones del estudio, durante este periodo los sujetos se mantuvieron en reposo y en ayuno.
- b) Periodo de desayuno: Luego del periodo de línea base, los sujetos consumieron el desayuno correspondiente y se recolectaron muestras de sangre cada 30 minutos durante una hora, (en las condiciones DR y DE). Los sujetos se alimentaron en un máximo de 15 minutos y reposaron por cuarenta y cinco minutos más. El desayuno ingerido en las condiciones que lo requerían tuvo un aporte de 439 Kcal., con la siguiente composición: 250 mL. de leche entera, 30

- g. de cereal de maíz y dos bananos (83% de carbohidratos, 4.87% de grasa y 11.6% de proteínas, con un índice glicémico de 67). Este desayuno se seleccionó con el fin de ofrecer una cantidad de calorías y un porcentaje de carbohidratos similar a aquellos del desayuno utilizado por Fisher *et al* (2001). Cuando no debían desayunar (condiciones AR y AE), los sujetos esperaron una hora en ayunas y reposo luego de determinar la línea base.
- c) Periodo de ejercicio: Cuando se cumplieron los periodos ya mencionados, se recolectaron muestras de sangre cada treinta minutos durante una hora, durante la cual se realizó ejercicio aeróbico (condiciones AE y DE) que consistió en diez minutos de calentamiento a una intensidad del 40% del consumo máximo de oxígeno y 50 minutos de ejercicio a una intensidad del 60% del consumo máximo de oxígeno. Los sujetos reposaron durante tal período cuando no debían realizar ejercicio (condiciones AR y DR).
- d) Periodo post ejercicio: Una vez transcurridos los periodos anteriores, los sujetos reposaron durante cuatro horas para continuar con la mencionada recolección de muestras de sangre cada treinta minutos.

Durante las cuatro condiciones, los sujetos ingirieron 200 mL. de agua cada 30 minutos y se les permitió orinar cada vez que lo desearon. En la figura 1 se representa gráficamente el diseño experimental.

Sujetos Experimentales:

Se seleccionó una muestra de 10 sujetos adultos varones, con un rango de edad de los 19 a los 25 años. No se seleccionaron individuos con porcentajes de grasa superiores al 20%, ni inferiores al 8%, para evitar rangos muy amplios en la concentración de leptina plasmática de los sujetos y para obtener una muestra homogénea, que sea comparable con otros estudios que utilizan los panículos adiposos en su análisis antropométrico (Hickey *et al* 1996). En algunos estudios se ha medido el porcentaje de grasa corporal por el método de pesaje hidrostático (Perusse, Collier, Gagnon *et al* 1997, Noland, Baker, Boudreau *et al* 2001), no obstante, dentro del rango de porcentaje de grasa mencionado, las concentraciones de leptina plasmática en los sujetos no varían sustancialmente entre éstos estudios y los que utilizan el método de panículos adiposos (Hickey *et al* 1996).

Condición AR: ayuno y reposo (condición control).

Línea base	Ayuno y reposo
2 horas	6 horas

Condición AE: ayuno y ejercicio.

Línea base	reposo	ejercicio	recuperación de ejercicio
2 horas	1 hora	1 hora	4 horas

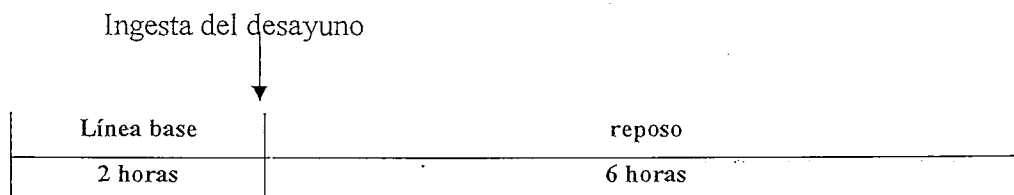
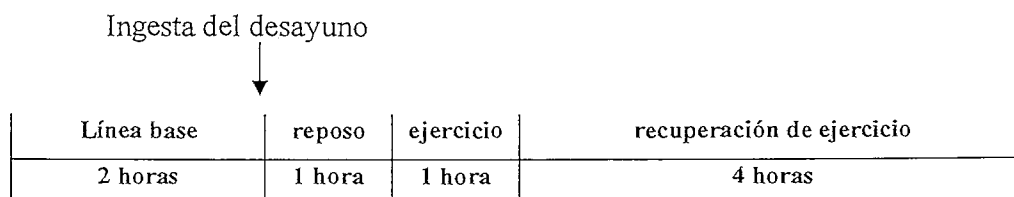
Condición DR: desayuno y reposo.**Condición DE: desayuno y ejercicio.**

Figura 1. Representación gráfica del diseño experimental

Los sujetos escogidos tampoco presentaron alteraciones significativas de la química sanguínea, antecedentes de patologías hepáticas, renales, tiroideas, cardiovasculares o respiratorias, ni eran fumadores. Esta selección se realizó por medio de un examen de sangre y de auto reportes de salud por escrito, suministrados a los posibles participantes (ver anexo 6.1). Además se efectuó el test llamado Cuestionario Relacionado a la Actividad Física (PAR-Q, ver anexo 6.2) para asegurarse de que los sujetos están en condición de

realizar actividad física sin ninguna complicación. Los individuos incluidos en el estudio fueron personas físicamente activas, aunque no de nivel competitivo, y practicaban un mínimo de dos sesiones de ciclismo por semana. La selección de la muestra se realizó luego de que los posibles participantes realizaron una visita al LARENFISA, donde se determinaron sus características antropométricas y se les proporcionaron los auto reportes de salud y de actividad física (PAR-Q), así como una fórmula de consentimiento informado (ver anexo 6.3). A los sujetos seleccionados para participar en el estudio, se les realizó además de las mediciones antropométricas y del análisis de su química sanguínea, determinaciones de su tasa metabólica basal, consumo máximo de oxígeno y requerimiento calórico diario.

Mediciones Antropométricas

Se determinó el peso en kilogramos (balanza digital SECA ALPHA 770. Berlín, Alemania. Lectura mínima de 0.1 Kg). Además se midió la estatura del sujeto en metros utilizando una cinta métrica -adherida a una pared- y una escuadra con un ángulo de 90 grados. El sujeto se paró con los pies juntos y sin zapatos, en contacto total con el piso, con las rodillas y caderas extendidas, manteniendo los talones, glúteos, espalda, y cabeza en contacto con la pared, con una postura erguida. A partir del peso y la talla se calculó el índice de masa corporal (IMC), dividiendo el peso (Kg.) entre la talla (m) elevada al cuadrado ($IMC=Kg/m^2$).

Posteriormente se determinó el porcentaje de grasa corporal de los participantes, por el método de panículos adiposos (medidor de panículos adiposos LANGE. Maryland, Estados Unidos de América) aplicando el procedimiento descrito por Jackson y Pollock (ACSM 2000) de la siguiente manera:

a) Se midieron en milímetros los pliegues de grasa subcutánea del pecho (pliegue diagonal, en el punto medio entre la línea axilar anterior y el pezón, al lado derecho), muslo (pliegue vertical, sobre la línea media anterior del muslo derecho, en el punto medio entre el borde proximal de la patela y el pliegue inguinal) y abdomen (pliegue vertical, a dos centímetros a la derecha del ombligo).

b) Se realizó la sumatoria de los tres pliegues de grasa mencionados para obtener la densidad corporal, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Densidad corporal} = 1.10938 - 0,0008267 (\text{sumatoria de pliegues}) + 0.0000016 (\text{suma de pliegues})^2 - 0.0002574 (\text{edad})$$

c) Una vez obtenida la densidad corporal se aplicó la ecuación de Siri, para obtener el porcentaje de grasa.

$$\text{Porcentaje de grasa} = (495 / \text{densidad corporal}) - 450$$

Análisis Sanguíneos

Los posibles participantes se presentaron en el LARENFISA con catorce horas de ayuno a las siete de la mañana. Se obtuvo una muestra de sangre venosa, que fue conservada para su posterior análisis, el cual incluyó determinaciones de perfil lipídico, glicemia, y hemograma completo, con el fin de excluir a aquellos que presentaran las siguientes características:

- a) Glicemia en ayunas superior a 100 g/dL.
- b) Colesterol LDL superior o igual a 190 mg/dL.
- c) Colesterol HDL inferior a 40 mg/dL.
- d) Triglicéridos superiores a 200 mg/dL.
- e) Hematocrito inferior a 41 %
- f) Hemoglobina menor a 12 g/dL

Los valores de perfil lipídico fueron seleccionados según los propuestos por la Asociación Americana del Corazón, el Colegio Americano de la Fundación de Cardiología y el Instituto Nacional de Pulmón, Corazón y Sangre (2004). Los valores de glicemia fueron seleccionados según los parámetros de la Asociación Americana de Diabetes (ADA, 2004) y los valores hematológicos según los parámetros utilizados por la Asociación Americana del Corazón (2004). La metodología empleada para realizar estas determinaciones se indica más adelante.

Determinación de la Tasa Metabólica Basal y del Consumo Máximo de Oxígeno.

Se midió la tasa metabólica basal por el método de calorimetría indirecta (anализador de gases Quark b², Cosmed. Roma, Italia). Para esto, se aplicó el protocolo descrito por Matarese (1997), en el cual los sujetos reposan acostados una hora en condiciones termoneutrales y después de un mínimo de dos horas de ayuno (en el presente estudio fueron 8 horas de ayuno), para posteriormente medir su consumo de oxígeno y producción de dióxido de carbono de manera continua hasta encontrar un estado estable, definido por la aparición de un período de cinco minutos con las siguientes características:

- a) una variación promedio en el consumo de oxígeno (VO_2) y la producción de dióxido de carbono (VCO_2) menor a un 10%.
- b) una variación promedio del cociente respiratorio (VCO_2 / VO_2) menor a un 5%.

El tiempo esperado para observar el descrito estado estable es de 15 a 20 minutos, cosa que se presentó en la totalidad de los sujetos. Posteriormente y empleando los valores obtenidos de VO_2 y CO_2 en litros por minuto, se aplicó la siguiente ecuación para determinar la tasa metabólica basal (TMB):

$$TMB \text{ (kcal / min)} = (3.9 \times VO_2) + (1.1 \times VCO_2)$$

Después de determinar la TMB, se ofreció un desayuno con las mismas características que el empleado para las condiciones experimentales (250 mL de leche entera, 30 gramos de cereal de maíz y dos bananos. Aporte de 439 Kcal., 83% carbohidratos, 4.87% grasa, 11.6% proteína. Índice glicémico de 67). Luego los participantes descansaron una hora para posteriormente determinar el consumo máximo de oxígeno (VO_{2max}), utilizando el protocolo para cicloergómetro descrito por Lucía, Hoyos, Santalla, Pérez y Chicharro (2002). Los sujetos debieron pedalear en un cicloergómetro (Monark 818 E. Varberg, Suecia) a revoluciones constantes (entre 70 y 90 r.p.m.). Se realizó un calentamiento de 5 minutos a 40 vatios de potencia, seguido de 4 minutos más con una carga de 75 vatios. A partir de entonces se aumentó la carga en 25 vatios cada minuto, hasta que el sujeto alcanzó el consumo máximo de oxígeno. El criterio para establecer el VO_{2max} fue la aparición de tres de los siguientes fenómenos, indicados por diferentes autores (Pedersen, Sørensen, Jensen, Johansen y Levin 2002, Bickham, Gibbons, y Rossignol 2004 y Judelson, Rundell, Beck, King y Laclair 2004, Taylor, Buskirk, Henschel 1955)

- a) aparición de una meseta (un aumento no mayor de 2 ml/Kg/min) o disminución en el consumo de oxígeno al incrementar la carga de trabajo
- b) incremento del cociente respiratorio por encima de 1.1
- c) equivalente ventilatorio de oxígeno superior a 30 L/L,
- d) frecuencia cardíaca igual o superior al 90% de la frecuencia cardíaca máxima (FCM) según la siguiente fórmula: $FCM = 220 - \text{edad}$.

El tiempo requerido para alcanzar el consumo máximo de oxígeno se mantuvo entre los 8 y 10 minutos (la prueba fue realizada con el analizador de gases Quark b², Cosmed, Roma, Italia).

Determinación del Requerimiento Calórico Diario.

Se determinó el requerimiento calórico diario (RCD) de los sujetos según la siguiente fórmula (Mahan, Escott-Stump 1998):

$$\text{RCD} = (\text{TMB} \times \text{FA}) \times \text{ET}$$

TMB: tasa metabólica basal.

FA: factor de actividad física (ver anexo 6.4).

ET: Efecto térmico de los alimentos, valor constante de 1.10.

Manejo de los Sujetos Antes de ser Sometidos a las Diferentes Condiciones Experimentales

Los participantes se abstuvieron de realizar ejercicio tres días antes de participar en cada condición experimental, debido a que la actividad física ha demostrado en diferentes estudios, alteraciones de los niveles plasmáticos de leptina a corto, mediano y largo plazo post-ejercicio, (entre 10 minutos y 24 horas según Hindi, Kraemer, Arciero *et al* 2002 y Landt *et al* 1997). En esos tres días previos siguieron un plan de alimentación diseñado para satisfacer su requerimiento calórico total. El valor energético total de este plan de alimentación se desglosó en un 60% de carbohidratos, un 15% de proteínas y un 25% las grasas. La distribución seleccionada de calorías por cada macro nutriente coincide con la

recomendada por American Society for Clinical Nutrition (2004), y también coincide altamente con la ingesta real del costarricense (Ministerio de Salud de Costa Rica, 2001). Se evaluó la dieta de los participantes mediante un recordatorio de alimentación de 24 horas (ver anexo 6.5), que cada sujeto completó antes de realizar cada una de las cuatro condiciones de estudio que conforman el protocolo experimental.

Pruebas de Laboratorio

Las muestras de sangre obtenidas antes de la aplicación de las condiciones experimentales, con el fin de seleccionar a los sujetos participantes, fueron analizadas con un hemograma completo por dispersión de rayos láser (SF-3000 Sysmex. Nueva York, Estados Unidos de América), perfil lipídico por método enzimático de punto final (Beckman Coulter Synchron CX9. Illinois, Estados Unidos de América) y glicemia por glucosa oxidasa (Beckman Coulter Synchron CX9. Illinois, Estados Unidos de América).

Las muestras recolectadas durante la aplicación de las condiciones experimentales fueron analizadas para determinar la concentración de leptina en suero (Active Human Leptin IRMA. Diagnostic Systems Laboratorios Inc. Texas, Estados Unidos de América. Ver anexo 6.6), glicemia (tiras reactivas y glucómetro Accucheck Advantage. Indianápolis, Estados Unidos de América), insulinemia (quimioluminiscencia. Inmulite 2000. Nueva York, Estados Unidos de América), hemoglobina y hematocrito (dispersión de rayos láser, SF-3000 Sysmex. Nueva York, Estados Unidos de América). Estos últimos para detectar y corregir posibles casos de hemoconcentración. Los análisis de estas muestras fueron realizados en el Instituto Nacional de Investigaciones en Salud (INISA) de la Universidad de Costa Rica y en el Laboratorio de Radioinmunoanálisis del Hospital San Juan de Dios.

Todas las muestras de sangre fueron obtenidas en el LARENFISA. Las que se obtuvieron en el proceso de selección de la muestra de sujetos (5 mL), se colocaron directamente en tubos al vacío con anticoagulante (EDTA) y se almacenaron a -20 grados centígrados para ser analizados posteriormente.

Las muestras recolectadas durante la aplicación de las condiciones experimentales (2 ml), se obtuvieron directamente del catéter con una llave de tres vías y se colocaron en tubos plásticos, estériles y sin anticoagulante. Después de extraídas, las muestras se

manejaron según el procedimiento descrito por Hilton, Loucks (2000) y Brady, Lovegrove, Lesauvage, Gower, Minihane, Williams, Lovegrove (2004) en el que se deja coagular la sangre (en unos 5 minutos) y luego las muestras son centrifugadas a temperatura ambiente durante 10 minutos a 3000 revoluciones por minuto (centrífuga International SBV, Boston. Estados Unidos de América); luego se separa el suero con pipetas para almacenarlo a -70 grados centígrados en tubos plásticos sellados, identificados con marcador indeleble.

Una vez a la semana las muestras recolectadas se trasladaron a los laboratorios mencionados para ser analizadas, para lo cual los tubos se colocaron en rejillas, que a su vez se depositaron en bolsas plásticas cerradas de manera segura, las cuales se colocaron en una hielera. De esta manera las muestras se mantuvieron a temperaturas cercanas a los 0 grados centígrados y estuvieron aisladas del resto de contenido de la hielera durante el tiempo que tomó su transporte.

Análisis Estadístico

Estadística descriptiva

Se calculó el promedio y la desviación estándar de las variables medidas con el fin de caracterizar a la muestra de sujetos. Estas variables incluyeron:

- a) Edad
- b) Peso
- c) Índice de masa corporal (IMC)
- d) Porcentaje de grasa
- e) Glicemia en ayunas
- f) Colesterol LDL
- g) Colesterol HDL
- h) Colesterol total
- i) Triglicéridos
- j) Hematocrito
- k) Hemoglobina
- l) Consumo máximo de oxígeno
- m) Tasa metabólica basal

Estadística inferencial

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías de medidas repetidas en condiciones y tiempo de mediciones (4X16), para determinar el efecto de las condiciones, el tiempo de las mediciones y la interacción de ambas sobre las concentraciones de leptina en suero.

Posteriormente se realizó el análisis de post hoc de efectos simples para localizar entre cuáles promedios se dieron diferencias significativas. El nivel de significancia empleado fue de 0.05. Se procedió de igual manera para analizar el comportamiento de la glicemia y la insulina durante cada condición.

Cabe destacar que este modelo de análisis estadístico es el empleado en los estudios de Hilton y Loucks (2000) y Torjman y otros (1999), publicaciones de relevancia en las que se estudian los cambios en las concentraciones plasmáticas de leptina durante periodos de varias horas de duración, en diferentes condiciones experimentales.

Estudio Piloto

Para comprobar la viabilidad práctica de la ejecución del diseño experimental propuesto, se realizó un estudio piloto, en el cual dos sujetos ejecutaron de manera completa cada una de las condiciones “AR” “AE” “DR” y “DE” (dos cada uno). Los sujetos empleados en el estudio piloto no fueron posteriormente reclutados durante la verdadera recolección de datos del proyecto de investigación.

La ejecución del estudio piloto demostró la viabilidad de las condiciones experimentales. Además este estudio evidenció que los sujetos presentaron hemoconcentración al realizar ejercicio, pero que esta se eliminó a los treinta minutos posteriores al cese de la actividad física. Este comportamiento hemodinámico coincide con el reportado por estudios recientes como el de Jurimae, Jurimae (2005). Debido a lo anterior se procedió a medir los cambios en el volumen plasmático durante y 60 minutos después del ejercicio, para posteriormente corregir los valores registrados de concentración de insulina y leptina en plasma en tales mediciones con el procedimiento de Dill y Costill (1972), en el que se calcula el cambio en el volumen plasmático y se corrige la lectura respectiva de la variable medida en plasma de la siguiente manera:

$$CVP = (VPF - VPI) / VPI$$

CVP = cambio porcentual en el volumen plasmático

VPF = volumen plasmático final

VPI = volumen plasmático inicial

El resultado de la fórmula corresponde al porcentaje de contracción o expansión del plasma, por lo que una lectura realizada a partir de una muestra con esa alteración de volumen plasmático, debe ser multiplicada por dicho factor para ser corregida.

El volumen plasmático inicial (como porcentaje del volumen sanguíneo total antes de iniciar el ejercicio) se calcula de la siguiente manera:

$$VPI: 100 - hc.$$

El número 100 es una constante (porcentaje total de sangre) y hc representa el hematocrito antes de iniciar el ejercicio.

El volumen plasmático final (como porcentaje del volumen sanguíneo total antes de iniciar el ejercicio) se calcula de la siguiente manera:

$$VPF: (VSF \times hcf.) \times 100$$

El término hcf representa el hematocrito del sujeto luego de haber realizado un periodo de ejercicio.

El término VSF representa el volumen sanguíneo luego de realizar un periodo de ejercicio, y se calcula de la siguiente manera:

$$VSF: (hg \text{ pre} / hg \text{ post}) \times 100$$

El término hgpre representa la hemoglobina (g/dL) antes de realizar ejercicio, y el término hg post representa la hemoglobina luego de un periodo de ejercicio.

ANEXO 3

OBJETIVOS

- 1) Determinar las diferencias en la concentración plasmática de leptina, de insulina y en la glicemia entre las cuatro condiciones experimentales.
- 2) Determinar las diferencias en la concentración plasmática de leptina, de insulina y en la glicemia entre las mediciones efectuadas cada treinta minutos.
- 3) Determinar la interacción entre las mediciones de concentración plasmática de leptina, de insulina y glicemia en las diferentes condiciones experimentales.

HIPÓTESIS EXPERIMENTALES

- 1) Existen diferencias significativas entre la concentración plasmática de leptina, de insulina y glicemia, de las cuatro condiciones experimentales.
- 2) Existen diferencias significativas entre la concentración plasmática de leptina, de insulina y glicemia, de las mediciones realizadas cada 30 minutos.
- 3) Existe interacción significativa entre las cuatro condiciones experimentales y las mediciones realizadas cada 30 minutos, influenciando la concentración plasmática de leptina, insulina y glucosa.

ANEXO 4

RESULTADOS.

Características de los Sujetos de Estudio.

En el cuadro 1 presentado en el cuerpo del trabajo se representaron las características físicas, hematológicas y metabólicas de la muestra seleccionada. Se aprecia que los parámetros de la química sanguínea se encuentran entre los rangos considerados adecuados, y previamente definidos en la sección de metodología. Además los sujetos no reportan valores extremos de peso y porcentaje de grasa corporal, aspectos que pueden generar alteraciones importantes de las concentraciones de leptina plasmática.

Análisis de las Variables Glicemia, Insulina y Leptina.

Tal y como se indica en la sección de metodología, las tres variables dependientes del presente estudio son la leptina, la insulina y la glicemia. Estas variaron en función del tiempo y de los tratamientos asignados a cada condición experimental. Las condiciones incluyeron el estado de ayuno y reposo (AR), ayuno y ejercicio (AE), desayuno y reposo (DR), y desayuno ejercicio (DE). El análisis del comportamiento de las variables mencionadas se desglosa a continuación.

Leptina.

En el cuadro 5, se incluyen los valores de los promedios y las desviaciones estándar (X, DE) de las mediciones de leptina, en cada una de las diferentes horas de medición y condiciones.

Al observar la tendencia general de la concentración de leptina en plasma, se nota que esta se mantuvo en disminución durante las diferentes condiciones experimentales, aunque no necesariamente en iguales magnitudes en cada una de ellas. Los resultados del análisis de varianza de dos vías, de medidas repetidas en los dos factores (4 condiciones x 16 mediciones) se presentan en el cuadro 6. Específicamente en la condición DR, la disminución de la concentración de leptina en plasma es menor que en la condición AR. Debido a la existencia de interacción significativa entre las condiciones y la hora de medición en la variable de leptina, se procedió a realizar el análisis post hoc de efectos simples, con sus respectivos análisis post hoc de Tuckey.

Cuadro N° 5
Estadística Descriptiva de Leptina
(Unidades en ng/mL)

Hora de Medición	Condición AR (ayuno y reposo $x \pm DE$)	Condición AE (ayuno y ejercicio $x \pm DE$)	Condición DR (desayuno y reposo $x \pm DE$)	Condición DE (desayuno y ejercicio $x \pm DE$)
07:30	4,13 1,62	4,23 1,39	4,10 2,64	4,45 2,03
08:00	3,77 1,76	3,85 1,24	3,83 1,93	4,14 1,76
08:30	3,55 1,96	3,67 1,34	3,46 2,04	3,75 1,51
09:00	3,80 1,61	3,72 1,39	3,60 1,40	3,47 1,56
09:30	3,39 1,84	3,60 1,22	3,23 1,85	3,47 1,64
10:00	3,28 1,59	3,52 1,41	3,05 1,85	3,32 1,81
10:30	3,22 1,61	3,26 1,19	3,06 1,84	3,13 1,40
11:00	2,93 1,46	3,23 1,20	3,26 2,04	2,99 1,41
11:30	3,20 1,48	3,22 1,26	3,06 1,77	2,87 1,44
12:00	3,04 1,68	3,33 1,52	3,21 2,06	3,38 1,74
12:30	2,70 1,40	3,06 1,20	3,28 1,99	2,81 1,61
13:00	2,71 1,19	2,75 1,16	3,23 2,00	3,06 1,47
13:30	2,88 1,33	2,69 1,16	3,22 2,06	3,18 1,57
14:00	2,55 1,32	2,66 1,02	3,63 1,99	3,12 1,66
14:30	2,51 1,17	2,74 1,12	3,17 1,94	3,04 1,5294
15:00	2,42 1,19	2,68 1,10	3,28 2,23	2,82 1,49

Cuadro N° 6
Resultados de leptina obtenidos por el ANOVA de dos vías
(Medidas repetidas en ambos factores)

Variable	F	p	ω^2
Condición	,124	,945	-
Hora de la Medición	20,503	,000	48%
Interacción Condición x Hora de la Medición	2,132	,000	2.65%

Análisis de la hora de medición.

14:00 horas: la concentración plasmática de leptina en la condición DR es significativamente mayor que la registrada en las condiciones AR y AE (F calculada 8.63 > F tabular 2.6 (3,405) $p \leq 0.05$).

14:30 horas: la concentración plasmática de leptina en la condición DR es significativamente mayor que la registrada en la condición AR (F calculada 3.17 > F tabular 2.6 (3,405) $p \leq 0.05$).

15:00 horas: la concentración plasmática de leptina en la condición DR es significativamente mayor que la registrada en la condición AR (F calculada 4.58 > F tabular 2.6 (3,405) $p \leq 0.05$).

Análisis de la condición experimental.

Condición AR: la concentración plasmática de leptina de la medición de las 07:30 horas es significativamente superior que la registrada en todas las mediciones a partir de las 10:00 horas, incluyendo esta última. Además las mediciones de las 08:00 y 09:00 horas son significativamente superiores que la de las 11:00 horas, y que todas las mediciones a partir de las 12:30 horas, incluyendo esta última. (las mediciones de las 08:00 y 09:00 horas no son significativamente distintas entre sí). Adicionalmente, la medición de las 08:30 horas es significativamente superior que las mediciones de las 12:30, 13:00, 14:00, 14:30, y 15:00 horas. También la medición de las 09:30 horas es significativamente superior que todas las mediciones a partir de las 14:00 horas, incluyendo esta última. Finalmente, la medición de las 10:00 horas es significativamente superior que la medición de las 15:00 horas (F calculada 9.14 > F tabular 1.67 (15,405) $p \leq 0.05$). Todo esto refleja una constante disminución de la concentración plasmática de leptina durante esta condición.

Condición AE: la concentración plasmática de leptina de la medición de las 07:30 horas es significativamente mayor que la registrada en todas las mediciones a partir de las 10:30 horas, incluyendo esta última. Además las mediciones de las 08:00, 08:30, 09:00 y 09:30 horas (no son significativamente diferentes entre sí), son significativamente superiores que

todas las mediciones a partir de las 13:00 horas, incluyendo esta última. Por último, la medición de las 10:00 horas es significativamente superior que las mediciones de las 13:30, 14:00 y 15:00 horas. (F calculada 8.23, $> F$ tabular 1.67 (15,405) $p \leq 0.05$). Nuevamente, se nota una tendencia de disminución continua de la concentración plasmática de leptina durante esta condición.

Condición DR: la concentración plasmática de leptina de la medición de las 07:30, es significativamente superior que la registrada en todas las mediciones a partir de las 09:30 horas (incluyendo a esta última), con excepción de la medición de las 14:00 horas. (F calculada 3.13 $> F$ tabular 1.67 (15,405) $p \leq 0.05$). En esta condición —a diferencia de las dos anteriores—, se nota que la concentración plasmática de leptina se mantiene constante a partir de las 09:30 horas.

Condición DE: la concentración plasmática de leptina de la medición de las 07:30 horas, es significativamente superior que la registrada en todas las mediciones restantes a partir de las 09:00 horas, incluyendo a esta última. También la medición de las 08:00 horas es significativamente superior que las mediciones de las 10:00, 10:30, 11:00, 11:30, 12:30, 13:00, 13:30, 14:00, 14:30 y 15:00 horas. Finalmente, la medición de las 08:30 horas es significativamente superior que las mediciones de las 11:30, 12:30, y 15:00 horas (F calculada 7.76 $> F$ tabular 1.67 (15,405) $p \leq 0.05$). Nuevamente se nota una tendencia a la disminución, aunque en menor magnitud que en condiciones tales como AR y AE. En la figura 2 del cuerpo del trabajo, se representan los promedios de leptina en las diferentes condiciones y mediciones, y se señalan las diferencias significativas detectadas entre ellos.

Glicemia.

En el cuadro 7, se incluyen los valores de los promedios y las desviaciones estándar de las mediciones de glicemia, en cada una de las diferentes mediciones, y condiciones. En este cuadro puede apreciarse la tendencia a la disminución durante el transcurso de las dos condiciones que implican ayuno. Se nota además un incremento de la glicemia a los treinta minutos posteriores a la ingesta del desayuno en las dos condiciones correspondientes.

Cuadro N° 7
Estadística Descriptiva de Glicemia
(Unidades en mg/dL)

Hora de Medición	Condición AR (ayuno reposo x ± DE)	Condición AE (ayuno ejercicio x ± DE)	Condición DR (desayuno reposo x ± DE)	Condición DE (desayuno ejercicio x±DE)
07:30	88.80 6.41	91.43 7.56	90.60 7.75	90.23 5.80
08:00	78.45 9.68	86.50 6.75	84.70 9.84	85.90 7.16
08:30	77.80 7.66	82.20 8.00	80.00 7.44	79.65 7.05
09:00	77.90 9.10	81.55 6.52	80.80 5.83	75.20 5.53
09:30	78.20 6.84	79.65 10.25	96.80 15.14	89.85 9.07
10:00	75.90 9.00	82.00 9.37	84.70 19.06	77.15 16.53
10:30	77.50 9.52	81.70 6.72	81.60 11.52	76.20 6.89
11:00	77.30 9.66	78.80 11.65	71.50 16.26	78.50 8.66
11:30	73.70 8.31	77.60 11.13	71.80 12.02	84.10 10.00
12:00	77.10 7.65	79.10 7.34	72.30 9.84	80.20 4.29
12:30	76.65 9.48	76.90 8.85	72.90 8.70	72.60 7.06
13:00	77.30 5.89	78.00 8.89	75.90 7.61	75.30 8.26
13:30	73.00 9.73	74.80 7.94	74.85 7.00	75.80 8.50
14:00	77.50 8.64	74.50 10.17	76.60 10.80	74.70 6.52
14:30	76.50 8.50	76.05 7.15	71.80 7.81	73.70 6.25
15:00	77.60 6.35	75.90 5.97	73.40 7.99	76.70 11.07

Cuadro N° 8
Resultados de glicemia obtenidos por el ANOVA de dos vías
(Medidas repetidas en ambos factores)

Variable	F	p	ω²
Condición	0.459	0.713	-
Hora de la Medición	12.163	0.000	19%
Interacción de condición x hora de la Mediciones	2.216	0.000	5%

Además se presenta un segundo aumento de la glicemia en la condición de desayuno y ejercicio, específicamente cuando finaliza la actividad física.

Los resultados del análisis de varianza de dos vías, de medidas repetidas en los dos factores (4 condiciones x 16 mediciones) se presentan en el cuadro 8. Debido a la existencia de interacción significativa entre las condiciones y la hora de medición en la variable de glicemia, se procedió a realizar el análisis post hoc de efectos simples, con sus respectivos análisis post hoc de Tuckey

Análisis de la hora de medición.

09:30 horas: la glicemia en la condición DE, es significativamente superior que la registrada en las condiciones AR y AE. De igual manera, la glicemia de la condición DR es significativamente superior que la registrada en las condiciones AR y AE. Las condiciones DR y DE no son significativamente diferentes entre sí (F calculada 13.7 > F tabular 2.6 (3,405) $p \leq 0.05$).

10:00 horas: la glicemia en la condición DR es significativamente superior que la registrada en la condición AR (F calculada 3.0 > F tabular 2.6 (3,405) $p \leq 0.05$).

11:30 horas: la glicemia en la condición DE es significativamente superior que la registrada en las condiciones AR y DR (F calculada 5.22, > F tabular 2.6 (3,405) $p \leq 0.05$).

Análisis de la condición experimental.

Condición AR: la glicemia registrada en la medición de las 07:30 horas es significativamente superior que la correspondiente a las mediciones de las 10:00, 11:30, 12:00, 12:30, 13:30 y 14:30 horas (F calculada 1.98 > F tabular 1.67(15,405) $p \leq 0.05$). Se aprecia una disminución marcada al inicio de la condición experimental, con una tendencia posterior de estabilización.

Condición AE: la glicemia en la medición de las 07:30 horas es significativamente superior que la registrada a las 09:30 horas y también es superior a todas las mediciones restantes a partir de las 11:00 horas, incluyendo a ésta última. Además la medición de las

08:00 horas es significativamente superior que las mediciones de las 13:30 y 14:00 horas (F calculada $3.5 > F$ tabular $1.67 (15,405) p \leq 0.05$). Nuevamente, se nota una disminución marcada al inicio de la condición experimental, con una tendencia posterior de estabilización.

Condición DR: la glicemia en la medición de las 07:30 horas es significativamente superior que la registrada en todas las mediciones restantes a partir de las 11:00 horas, incluyendo ésta última. Además las mediciones de las 08:00 y 10:00 horas (no son significativamente distintas entre sí), son significativamente superiores que las mediciones de las 11:00, 11:30, 12:00, 12:30 y 14:30 horas. Finalmente, la medición de las 09:30 horas es significativamente superior que todas las demás, exceptuando únicamente a la medición de las 07:30 horas (F calculada $9.8 > F$ tabular $1.67 (15,405) p \leq 0.05$). Se nota una disminución marcada al inicio de la condición, seguida de un incremento importante en la glicemia luego del desayuno. Finalmente se nota una rápida y marcada disminución de la variable.

Condición DE: la glicemia en la medición de las 07:30 horas es significativamente superior que la registrada en las mediciones de las 09:00, 10:00, 10:30, 11:00, 12:30, 13:00, 13:30, 14:00, 14:30 y 15:00 horas. También la medición de las 08:00 horas es significativamente superior que las mediciones de las 12:30 y 14:30 horas. Finalmente, la glicemia en la medición de las 09:30 horas es significativamente superior que la registrada a las 09:00, 10:00, 10:30, 12:30, 13:00, 13:30, 14:00, 14:30, y 15:00 horas. (F calculada $5.45 > F$ tabular $1.67 (15,405) p \leq 0.05$). Se presentó, al igual que en las condiciones restantes una disminución inicial de la variable, seguida de dos incrementos importantes: uno después de desayunar y otro al finalizar el ejercicio. En la figura 3 del cuerpo del trabajo se representan los promedios de glicemia en las diferentes condiciones y mediciones, y se señalan las diferencias significativas detectadas entre ellos.

Insulina

En el cuadro 9 se incluyen los valores de los promedios y las desviaciones estándar de las mediciones de insulina, en las diferentes mediciones, y condiciones.

Cuadro N° 9
Estadística Descriptiva de Insulina
(Unidades en uU/mL)

Hora de Medición	Condición AR (ayuno reposo $x \pm DE$)	Condición AE (ayuno ejercicio $x \pm DE$)	Condición DR (desayuno reposo $x \pm DE$)	Condición DE (desayuno ejercicio $x \pm DE$)
07:30	7,54 3,18	8,72 3,11	9,54 7,04	8,33 2,92
08:00	7,73 1,87	8,90 2,80	10,86 7,57	10,25 3,54
08:30	8,25 2,22	8,31 3,81	8,33 2,43	8,09 2,45
09:00	6,70 1,64	7,33 3,44	7,44 3,28	8,25 2,08
09:30	7,41 2,42	6,53 2,67	52,49 17,77	48,10 18,25
10:00	6,40 1,86	6,03 2,33	57,04 19,17	37,60 14,65
10:30	6,41 2,62	4,95 2,88	32,06 9,43	12,03 2,53
11:00	6,50 2,79	4,04 1,81	17,08 4,13	7,68 1,11
11:30	5,34 2,53	5,64 2,02	12,61 4,06	9,36 3,21
12:00	5,54 1,43	5,14 1,43	8,21 3,57	7,17 2,38
12:30	5,96 1,81	4,59 1,84	8,47 3,14	6,30 1,54
13:00	5,62 1,32	3,98 2,34	6,49 2,27	5,64 1,68
13:30	5,44 1,58	4,55 1,86	5,53 1,63	5,67 1,74
14:00	5,34 1,46	4,36 1,82	5,81 2,28	4,93 1,61
14:30	4,53 1,93	3,83 1,27	5,30 1,67	4,60 1,40
15:00	4,75 2,10	3,87 1,47	4,99 1,07	4,77 1,60

Cuadro N° 10
Resultados de insulina obtenidos por el ANOVA de dos vías
(Medidas repetidas en ambos factores)

Variable	F	p	ω^2
Condición	39,053	,000	12%
Hora de la Medición	80,633	,000	35%
Interacción Condición x Hora de la Medición	35,559	,000	35%

En dicho cuadro puede notarse el mantenimiento estable en las condiciones de ayuno, y los incrementos abruptos en las condiciones de desayuno. Se aprecia que la concentración de insulina aumenta más en la condición de desayuno y reposo que en la de desayuno y ejercicio. Los resultados del análisis de varianza de dos vías, de medidas repetidas en los dos factores (4 condiciones x 16 mediciones) se presentan en el cuadro 10. Debido a la existencia de interacción significativa entre las condiciones y la hora de medición en la variable de insulina, se procedió a realizar el análisis post hoc de efectos simples, con sus respectivos análisis post hoc de Tuckey.

Análisis de la hora de medición.

09:30 horas: la concentración plasmática de insulina en la condición DE es significativamente superior que la registrada en las condiciones AR y AE. También la concentración de insulina en la condición DR es significativamente superior que la registrada en las condiciones AR y AE (F calculada $306 > F$ tabular $2.6 (3,405) p \leq 0.05$).

10:00 horas: la concentración plasmática de insulina en la condición DR es significativamente superior que la registrada en las restantes tres condiciones (AR, AE, DE). Adicionalmente, la concentración de insulina en la condición DE es significativamente superior que la registrada en las condiciones AR y AE (F calculada $304.8 > F$ tabular $2.6 (3,405) p \leq 0.05$).

10:30 horas: la concentración plasmática de insulina en la condición DR es significativamente superior que la registrada en las restantes tres condiciones (AR, AE, DE). Adicionalmente, la concentración de insulina en la condición DE es significativamente superior que la registrada en las condiciones AR y AE (F calculada $76.14 > F$ tabular $2.6 (3,405) p \leq 0.05$).

11:00 horas: la concentración plasmática de insulina en la condición DR es significativamente superior que la registrada en las restantes tres condiciones (AR, AE, DE). (F calculada $15.86 > F$ tabular $2.6 (3,405) p \leq 0.05$).

11:30 horas: la concentración plasmática de insulina en la condición DR es significativamente superior que la registrada en las condiciones AR y AE (F calculada 5.76 > F tabular de 2.6 (3,405) $p \leq 0.05$).

Análisis de la condición experimental.

Condición DR: la concentración plasmática de insulina en las mediciones de las 09:30 y 10:00 horas, es significativamente superior que la registrada en todas las demás mediciones (los promedios de las 09:30 y 10:00 horas no son significativamente diferentes entre sí). Además la medición de las 10:30 horas es significativamente inferior que las mediciones de las 09:30 y 10:00 horas, mientras que es significativamente superior que todas las demás mediciones. También la medición de las 11:00 horas es significativamente inferior que las mediciones de las 09:30, 10:00 y 10:30 horas, y significativamente superior que todas las demás mediciones, exceptuando las de las 8:00 y las 1130 horas. Adicionalmente, la medición de las 11:30 horas es significativamente superior que las mediciones de las 13:30, 14:30 y 15:00 horas (F calculada 134.42 > F tabular 1.67 (15,405) $p \leq 0.05$). Lo anterior denota un incremento de la concentración plasmática de insulina luego del desayuno. Este aumento alcanza su punto máximo una hora después de la ingesta de carbohidratos, reduciéndose luego de manera gradual.

Condición DE: la concentración plasmática de insulina en las mediciones de las 09:30 y 10:00 horas es significativamente superior que la registrada en todas las demás. Además la medición de las 09:30 horas es significativamente superior que la de las 09:30 horas). Adicionalmente la medición de las 10:30 horas, es significativamente superior que las mediciones de las 14:00, 14:30 y 15:00 horas (F calculada 75.37 > F tabular de 1.67 (15,405) $p \leq 0.05$). De igual manera, se aprecia un aumento en la concentración plasmática de insulina luego de la ingesta, pero se presentan disminuciones de los valores de manera anticipada con respecto a la condición DR. En la figura 4 del cuerpo del trabajo, se representan los promedios de insulina en las diferentes condiciones y mediciones, y se señalan las diferencias significativas detectadas entre ellos.

ANEXO 5

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

American College of Sport Medicine. Guidelines for exercises testing and prescription, 6th Ed, Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2000: 63-66.

American diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2004; 27(1): 55-59.

American Heart Association. Anemia and its relationship to clinical outcome in heart failure. *Circulation* 2004; 110:149-154.

American Heart Association. Implications of recent clinical trials for the national cholesterol education program adult treatment panel III guidelines. *Circulation* 2004; 110: 227-239

American Society for Clinical Nutrition. Chronicle of the Institute of Medicine. Physical activity recommendation: how a physical activity recommendation came to be among dietary recommendations. *Am J Clin Nutr* 2004; 79 (supl): 921S-30S

Baile C, Della-Fera M, Martín R. Regulation of metabolism and body fat mass by leptin. *Annu Rev Nutr* 2000; 20: 105-127.

Bell, Meyre, Samson, Boyle, Lecoeur, Tauber *et al* . Asociación of Melanin-concentrating hormone receptor polymorphism with early-onset extreme obesity. *Diabetes* 2005; 54:3049-3055.

Berne R, Levy M. Physiology, 4a ed, London: Ed Mosby, 1998: 898, 903-904, 959.

Bickham C, Gibbons C, Le Rossignol P. VO₂ is attenuated above the lactate threshold in endurance-trained runners. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 2004; 36 (2): 297-301.

Boron W, Boulpaep E. Medical physiology, New York: Ed Saunders, 2003: 871-875, 950, 1066.

Brabant G, Nave H, Mayr B, Behrend M, van Harmelen V, Arner P. Secretion of free and protein-bound leptin from subcutaneous adipose tissue of lean and obese women. *J Clinical Endocrinol Metab* 2002; 87: 3966-3970.

Brady L, Lovegrove S, Lesauvage S, Gower B, Minihane A, Williams C, Lovegrove J. Increased n-6 PUFA intake does not attenuate effects of dietary long chain n-3 PUFA on insulin sensitivity or triacylglycerol reduction in Indian Asians. *American Journal of Clinical Nutrition* 2004; 79:983-991.

Branson R, Potoczna N, Kral J, Lentjes KL, Hoehe M, Horber F. Binge eating as a major phenotype of melanocortin 4 receptor gene mutations. *The New England Journal of Medicine*. 2003; 348(12): 1096-1103.

Cammisoto P, Buckowiecki L. Mechanisms of leptin secretion from white adipocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 283: C244-C250.

Caro J, Sinha M, Kolaczynski J, Zhank P, Considine R. Leptin: the tale of an obesity gene. *Perspectives in diabetes* 1996; 45: 1455-1462.

Casanueva F, Dieguez C. Neuroendocrine regulation and actions of leptin. *Frontiers in neuroendocrinology* 1999; 20: 317-363.

Claire M, Reid D, Riter R. Daily CCK injection enhances reduction of body weight by chronic intracerebroventricular leptin infusion *Am J Physiol Regulatory Integration Comp Physiol* 2002; 282: R1368-R1373.

Correia M, Morgan D, Sivitz W, Mark A, Haynes W. Leptin acts in the central nervous system to produce dose-dependent changes in arterial pressure. *Hypertension* 2001; 37: 936-942.

Dill B, Costill D. Calculation of percentage changes in volumes of blood, plasma and red cells in dehydration. *J. App. Physiol.* 1974; 37(2): 247-248.

Dirlewanger M, di Vetta V, Guenat E et al. L. Effects of short-term carbohydrate or fat overfeeding on energy expenditure and plasma leptin concentrations in health female subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; 24: 1413-1418.

Duclos M, Corcuff J, Ruffie A, Roger P, Manier G. Rapid leptin decrease in immediate Post-Exercise recovery. *Clinical Endocrinology* 1999; 50: 337-342.

Evans K, Clark M, Frayn K. Carbohydrate and fat have different effects on plasma leptin concentrations and adipose tissue leptin production. *Clinical Science* 2001 100: 493-498.

Feng N, Young S, Aguilera G, Puricelli E, Adler-Wailes D, Sebring N, et al. Co-occurrence of two partially inactivating polymorphisms of MC3R is associated with pediatric-onset obesity. *Diabetes*. 2005; 54: 2663-2667.

Fisher J, Van Pelt R, Zinder O, Landt M, Khort W. Acute exercise effect on postabsorptive serum leptin. *J Appl Physiol* 2001; 91: 680-686.

Forbes S, Bui S, Robinson B, Hochgeschwender U, Brennan M. Integrated control of appetite and fat metabolism by the leptin-proopiomelanocortin pathway. *PNAS* 2001; 98:4233-4237.

Fred S, Ricci M, Russell C, Lafarrere B. Regulation of leptin production in humans. *J Nutr* 2000; 130:3127S-3131S.

- Friedman J. The function of leptin in nutrition, weight and physiology. *Nutrition reviews* 2002; 60: S1-S14.
- Friedman J, Halaas J. Leptin and the regulation of body weight in humans. *Nature* 1998; 395: 763-2
- Gomez G, Alvarado M. Obesidad y mecanismos reguladores del apetito. *Rev Med Hosp. Nal Niños Costa Rica* 1999; 34: 139-144.
- Gomez-Merino D, Chennaoui M, Drogou C, Boneau D, Guezennec C. Decrease in serum leptin after prolonged physical activity in men. *Med Sci Sport Exerc.* 2002; 34: 1594-1599.
- Gower B, Nagy T, Goran M, Smith A, Kent E. Leptin in postmenopausal women: influence of hormone therapy, insulin, and fat distribution. *The Journal of Clinical Endocrinology and metabolism* 2000; 85: 1770-1775.
- Griffen S, Oostema K, Stanhope K, Graham J, Styne D, Glaser N, et al. Administration of Lispro insulin with meals improves glycemic control, increases circulating leptin and suppresses ghrelin compared with regular/HPH insulin in female patients with type-1 diabetes. *J Clin Endocrin Metab* 2005; doi:10.1210/jc.2005-1338.
- Grinspoon S, Gulick T, Askari H et al. Serum leptin levels in women with anorexia nervosa. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1996; 81: 3861-3863.
- Halaas J, Friedman J. Obesity and the adipocyte. Leptin and its receptor. *Journal of Endocrinology* 1997; 155: 215-216.
- Harris B. Leptin-much more than a satiety signal. *Ann Rev Nutr* 2000; 20: 45-75.
- Herrmann S, Bean M, Black T, Wang P, Coleman R. High glicemic index carbohydrate diet alters the diurnal rhythm of leptin but not insulin concentrations. *Experimental Biology and Medicine* 2001; 226: 1037-1044.
- Hickey M, Houmard J, Considine R et al. Gender-dependet effects of exercise training on serum leptin levels in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1997; 35: E562-E566.
- Hickey M, Calsbeek D. Plasma leptin and exercise. Recent Findings. *Sports Med* 2001; 31: 583-589.
- Hickey M, Considine R, Israel R et al. Leptin is related to body fat content in male distance runners. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1996; 271: E938-E940.
- Hilton LK, Loucks AB. Low energy availaviliy not exercise stress suppresses the diurnal rhythm of leptin in healtly young women. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 278: E 43-E 49.

Horlick M, Resenbaum M, Nicolson et al. Effect of puberty on the relationship between circulating leptin and body composition. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2000; 85: 2509-2518.

Huang L, Zhuowei W, Cai L. Modulation of circulating leptin levels by its soluble receptor. *The Journal of Biological Chemistry* 2001; 276: 6343-6349.

Jenkins A, Markovic T, Fleury A, Campbell L. Carbohydrate intake and short-term regulation of leptin in humans. *Diabetologia*. 1997; 40: 348-351.

Jequier E, Tappy L. Regulation of body weight in humans. *Physiological Reviews* 1999; 79: 451-480.

Jeon JY, Harber VJ, Steadward RD. Leptin response to short-term fasting in sympathectomized men: role of the SNS. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003, 284(3): E634-40.

Judelson D, Rundell K, Beck K, King T, Laclair K. Effect of high intensity sub-maximal work, with or without rest, on subsequent VO_{2max} . *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 2004, 36 (2): 292-296

Jurimae J, Jurimae T. Leptin responses to short term exercise in college level male rowers. *Br. J. Sport Med*. 2005, 39: 6-9.

Kohrt W, Landt M, Birge Jr S. Serum leptin levels are reduced in response to exercise training, but not hormone replace therapy in older women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1996; 81: 3980-3985.

Kolaczynski J, Considine R, Ohannesian J et al. Responses of leptin to short-term fasting and refeeding in humans. A link with ketogenesis but not ketones themselves. *Diabetes* 1996; 45: 1511-1515.

Korbonits M, Chitnis M, Gueorguiev M et al. The release of leptin and its effect on hormone release from human pituitary adenomas. *Clinical Endocrinology* 2001; 54: 781-789.

Landt M, Lawson G, Helgeson J et al. Prolonged exercise decreases serum leptin concentrations. *Metabolism* 1997; 46: 1109-1112.

Landt M. Leptin binding capacity in serum. *Clinical Chemistry* 2000; 46: 379-384.

Leal-Cerro A, García-Luna P, Astorga R et al. Serum leptin levels in male marathon athletes before and after the marathon run. *Journal of clinical Endocrinology and Metabolism* 1998; 83: 2376-2379.

LM Brady, S Lovegrove, S Lesauvage, B Gower, AM Minihane, C Williams, J Lovegrove. Increased n₆ polyunsaturated fatty acids do not attenuate the effects of long-chain n₃

polyunsaturated fatty acids on insulin sensitivity or triacylglycerol reduction in Indian Asians 1-3. *Am J Clin Nutr* 2004;79:983-91.

Lucía A, Hoyos J, Santalla A, Perez M, Chicharro JL. Kinetics of VO_2 in professional cyclists. *Med Sci Sports Exerc* 2002; 34 (2): 320-5.

Machinal-Quélin F, Dieudonné M, Leneveu M, Pecquery R, Giudicelli Y. Proadipogenic effect of leptin on rat preadipocytes *in vitro*: activation of MAPK and STAT3 signaling pathways. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 282: C853-C863.

Mahan K, Escott-Stump S. Nutrición y dietoterapia de krause. 9ª ed, México: Mc Graw-Hill, 1998: 17-30.

Mantzoros, C. The role of leptin in human obesity and disease: A review of current evidence. *Ann Intern Med.* 1999; 130: 671-680.

Matarese L. Indirect calorimetry: technical aspect. *J Am Diet Assoc* 1997; 97 (suppl): S154-60.

Ministerio de Salud de Costa Rica. Guías alimentarias para la educación nutricional en Costa Rica. 3ª ed. corregida, San José, Costa Rica: Ministerio de Salud de Costa Rica, 2001: 35-51.

Monteleone P, Bortolotti F, Fabrazzo M, La Rocca A, Fuschino A, Maj M. Plasma leptin response to acute fasting and refeeding in untreated women with bulimia nervosa. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2000; 85: 2499-2503.

Nakata M, Yada T, Soejima N, Maruyama I. Leptin promotes aggregation of human platelets via the long form of its receptor. *Diabetes* 1999; 48: 426-429.

Nelson D, Cox M. Lehninger principles of biochemistry, 4a ed, New York: Worth Publishers, 2004: 890-900.

Nindi B, Kraemer W, Arciero P, et al. Leptin concentrations experience a delayed reduction after resistance exercise in men. *Med Sci Sport and exerc* 2002; 34:608-613.

Noland R, Baker J, Boudreau S et al. Effects of intense training on plasma leptin in male and female swimmers. *Med Sci Sports Exerc* 2001; 33: 227-231.

Ostlund R, Yang J, Klein S, Gingerich R. Relation between plasma leptin concentration and body fat, gender, diet, age, and metabolic covariates. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1996; 81: 3909-3913.

Pasman W, Wastertert-Platenga M, Saris W. The effect of exercise training on leptin levels in obese humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1998; 37: E280-E286.

Pedersen P, Sørensen J, Jensen K, Johansen L, Levin K. Muscle fiber type distribution and nonlinear VO₂-power output relationship in cycling. *Med Sci Sport and exerc* 2002; 34 (4) 655-661.

Perusse L, Collier G, Gagnon J et al. Acute and chronic effects of exercise on leptin levels in humans. *J Appl Physiol* 1997; 83: 5-10.

Qian S, Chen H, Weingarh D et al. Neither agouti-related protein nor neuropeptide Y is critically required for the regulation of energy homeostasis in mice. *Molecular and cellular biology* 2002; 22: 5027-5035.

Racete S, Coppack S, Landt M, Klein S. Leptin production during moderate-intensity aerobic exercise. *Journal of clinical endocrinology and Metabolism* 1997; 82: 2275-2277.

Reseland J, Andersen S, Solvoll K et al. Effect of long-term changes in diet and exercise on plasma leptin concentrations. *Am J Clin Nutr* 2001, 73: 240-245.

Romon M, Lebel P, Velly C, Marecaux N, Fruchart J, Dallongeville J. Leptin response to carbohydrate or fat meal and association with subsequent satiety and energy intake. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1999; 277: E855-E861.

Soliman A, Elzalabany M, Salama M, Ansari B. Serum leptin concentration during severe protein-energy malnutrition: correlation with growth parameters and endocrine function. *Metabolism* 2000; 49: 819-825.

Tartaglia L. The leptin receptor. *The Journal of Biological Chemistry* 1997; 272: 6093-6096.

Taylor HL, Buskirk E, Henschel A. Maximal oxygen uptake as an objective measure of cardiorespiratory performance. *J Appl Physiol* 1955; 8: 73-80

Thong F, Hudson R, Ross R, Janssen I, Graham T. Plasma leptin in moderately obese men: independent effects of weight loss and aerobic exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 279: E307-E313.

Thong F, McLean C, Graham T. Plasma leptin in female athletes: relationship with body fat, reproductive, nutritional, and endocrine factors. *J Appl Physiol* 2000; 88: 2037-2044.

Torjman M, Zafeiridis A, Paolone A, Wilkerson C, Considine R. Serum leptin during recovery following maximal incremental and prolonged exercises. *Int J Sports Med* 1999; 20: 444-450.

Weltman, Pritzlaff, Wideman et al. Intensity of acute exercise does not affect serum leptin concentration in young men. *Med Sci Sport Exerc* 2000; 32:1556-1561.

van Aggel-Leijssen D, van Baak M, Tenenbaum R, Campfield R, Saris W. Regulation of average 24 h human plasma leptin level; the influence of exercise and physiological changes in energy balance. *International Journal of Obesity* 1999; 23:151-158.

Xu A, Kaelin C, Takeda K, Akira S, Schwartz M, Barsh G. PI3K integrates the action of insulin and leptin on hypothalamic neurons. *The journal of clinical investigation*. 2005; 115(4): 951-958.

Zhou M, Lin B, Coughlin S, Vallega G, Pilch P. UCP-3 expression in skeletal muscle: effects of exercise hypoxia, and AMP-activated protein kinase. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 279: E622-E629.

ANEXO 6.

Anexo 6.1

Cuestionario De Aptitud Para La Actividad Física (PAR-Q).

NOMBRE: _____ EDAD: _____ SEXO: F M

La actividad física regular es agradable y saludable, cada día son más las personas que se vuelven más activas. El aumento de la actividad física es muy seguro para la mayoría de las personas. Sin embargo algunas personas deben consultar con su médico antes de aumentar su actividad física. Si usted va a aumentar su actividad física, primero responda las siguientes 7 preguntas. Si usted se encuentra entre los 15 y 69 años, el test le indicará si debe consultar con su médico antes de aumentar la actividad física. Si tiene más de 69 años y no es su costumbre hacer ejercicio, consulte con su médico. El sentido común es el mejor guía para responder a estas preguntas. Lea las preguntas cuidadosamente y responda con honestidad.

Por favor responda marcando con una "X" la casilla correspondiente	SI	NO
¿En alguna ocasión su médico le ha indicado que usted tiene algún padecimiento cardíaco, o que solamente puede realizar actividad física recomendada por un doctor?		
¿Siente usted dolor de pecho cuando hace actividad física?		
¿En el mes pasado, tuvo usted dolor de pecho cuando no hacía ningún tipo de actividad física?		
¿Tiende a perder el equilibrio debido a mareos o en alguna oportunidad ha perdido la conciencia?		
¿Tiene usted algún problema en los huesos que puede empeorar con la actividad física?		
¿Su médico le ha prescrito algún medicamento recientemente? Por ejemplo para la presión arterial o el corazón.		
¿Conoce usted alguna otra razón por la cual no podría hacer ejercicio? (dolores de espalda, hernias, lesiones musculares, cirugías recientes, u otras enfermedades?		

Producido de la fórmula desarrollada por la sociedad Canadiense de fisiología del ejercicio y publicada por el Colegio Americano de Medicina del Deporte (2000). Si tiene dudas después de completar éste cuestionario, consulte con su médico antes de aumentar su actividad física.

Anexo 6.2

Autoreportes de Salud

Por favor lea detenidamente cada pregunta y responda de la manera más exacta posible. Si tiene dudas sobre alguna pregunta no dude en consultar con la persona que le facilitó este documento.

I. Preguntas de carácter general.

- 1) ¿Ha tenido usted alteraciones en su peso corporal en los últimos 6 meses? Si las ha tenido, por favor indique cuántos kilogramos ha perdido o ganado en ese periodo.
- 2) ¿Ha tenido usted cambios en su apetito en los últimos 6 meses? Si ha notado alteraciones en su apetito, por favor descríbalas con sus propias palabras.
- 3) ¿Se ha sentido usted fatigado sin razón aparente en los últimos 6 meses?, ¿Siente fatiga por las mañanas o sin realizar ningún esfuerzo importante?

II. Preguntas sobre el sistema cardiovascular y respiratorio.

- 1) ¿Es usted fumador? Si fuma, indique cuántos cigarros por día (promedio),
- 2) ¿Ha sentido usted que le falta el aire sin razón aparente?
- 3) ¿Ha notado usted que le falta el aire al acostarse?
- 4) ¿Ha sufrido mareos a menudo, cuando se levanta de una silla o cambia de posición?
- 5) ¿Sufre usted a menudo de tos? De ser así, indique si presenta usted flemas y si le es difícil expulsarlas.
- 6) ¿Ha sentido dolores en la región del tórax?
- 7) ¿Ha percibido fuertes palpitaciones de forma repentina?
- 8) ¿Ha notado sonidos en sus pulmones cuando respira?
- 9) ¿Ha tenido usted mareos que le obliguen a tomar asiento, o ha sufrido pérdidas de conciencia? (desmayos)
- 10) ¿En alguna ocasión se le han hinchado los tobillos, brazos u otras partes del cuerpo sin una razón aparente?
- 11) ¿Ha notado alguna vez tener los dedos o los labios morados sin razón aparente?

III. Preguntas sobre el sistema urinario.

- 1) ¿Ha sentido usted dolor en las fosas renales?
- 2) ¿Ha sentido usted ardor al orinar?
- 3) ¿Ha tenido en ocasiones repetidas severos dolores musculares después de hacer ejercicio, que le hayan dificultado seriamente moverse por uno o más días?
- 4) ¿Ha notado cambios súbitos en la coloración de la orina? ¿Ha orinado de color oscuro? (color té, rojizo, o color cocacola)

IV. Preguntas sobre trastornos hepáticos.

- 1) ¿Ha notado usted cambios en la coloración de las heces? Explique.
- 2) ¿Ha sentido dolor en la región hepática?
- 3) ¿Ha notado cambios en la coloración de su piel, principalmente tonos amarillentos?
- 4) ¿Ha sufrido Dolores abdominales fuertes sin razón aparente??

V. Preguntas sobre el sistema endocrino.

- 1) ¿Presenta usted polidipsia, poliuria o polifagia?
- 2) ¿Suele usted sentirse mal después de ingerir harinas, dulces u otros alimentos?
- 3) ¿Es usted muy poco tolerante al frío o al calor?
- 4) ¿Ha notado usted periodos de hiperquinesis o de letargia?

VI. Preguntas sobre el sistema nervioso.

- 1) ¿Sufre usted de dolores de cabeza recurrentes?
- 2) ¿Ha tenido convulsiones?
- 3) ¿Ha sufrido alteraciones del ciclo vigilia-sueño?
- 4) ¿Ha notado cambios notorios de personalidad ?
- 5) ¿Ha sufrido alteraciones en la motricidad? (movimientos anormales, parálisis)
- 6) ¿Ha sentido partes del cuerpo dormidas, con hormigueos, dolor, ardor o insensibilidad?

Las respuestas de los posibles sujetos serán revisadas por un médico, el cual determinará si éstos son aptos para ser incluidos en el estudio, o descartados del mismo.

Anexo 6.3

Fórmula de Consentimiento Informado

Efecto del ejercicio y de los carbohidratos de alto índice glicémico sobre las concentraciones plasmáticas de leptina: efectos agudos e interacciones.

Código del proyecto en vicerrectoría de investigación:

Nombre del investigador principal:

Nombre del participante:

A. Propósito del proyecto.

La presente investigación tiene como objetivo determinar si el ejercicio aeróbico ejerce alteraciones en la concentración plasmática de la hormona leptina durante o luego de su ejecución.

La leptina es una hormona relacionada con la cantidad de grasa corporal, la ingesta y el gasto de calorías. La información que se obtenga en este estudio contribuirá a comprender mejor el comportamiento de esta hormona ante la práctica de ejercicio, lo que contribuirá a entender aspectos poco conocidos sobre esta hormona y sobre las reacciones que el ser humano presenta al ejercicio.

B. Procedimientos a realizar dentro de la participación en el estudio

Se me realizará una entrevista escrita para explorar mi estado de salud física. Esto incluye preguntas sobre padecimientos actuales y pasados, síntomas específicos y hábitos de alimentación.

Se me realizará una entrevista escrita para determinar si me encuentro en condiciones de realizar ejercicio aeróbico de forma adecuada y segura.

Se me realizará una determinación de mi porcentaje de grasa corporal, que consiste en medir directamente el grosor en milímetros de ciertos pliegues de tejido adiposo, como los del pecho, muslo y abdomen.

Se me practicará una prueba de consumo de oxígeno en reposo para determinar mi tasa metabólica basal. Esta prueba consiste en respirar aire atmosférico mientras que se recolecta con una manguera ubicada en la boca y nariz el aire espirado, -proveniente de mis pulmones- para que sea analizado por una unidad metabólica.

Se me practicará una prueba de consumo máximo de oxígeno que consiste en correr ejercitarse en bicicleta durante 10 ó 15 minutos con niveles de esfuerzo progresivos, mientras que respiro aire atmosférico y se recolecta al aire que espiro para ser analizado por una unidad metabólica.

Se me tomará una muestra de sangre luego de 14 horas de ayuno (dos tubos) para ser analizados en las variables de: perfil lipídico, hemograma, glicemia.

Asistiré en cuatro ocasiones al laboratorio de rendimiento físico y salud de la escuela de medicina en estado de ayunas, permaneciendo durante ocho horas en dicho laboratorio en cada una de estas cuatro ocasiones. Habrá una semana de tiempo entre cada una de estas cuatro visitas.

Durante mi permanencia en el laboratorio se incluyen actividades tales como:

Reposar durante dos horas.

Desayunar un cereal de maíz con leche y bananos.

Reposar durante una hora.

Realizar ejercicio aeróbico durante una hora.

Reposar durante cuatro horas.

Tomar una muestra de sangre cada treinta minutos durante estas ocho horas, para lo cual se me colocará desde el inicio una vía intravenosa con un sello de heparina.

Tres días antes de cada una de las cuatro visitas al laboratorio ya mencionadas y descritas, me abstendré de realizar cualquier tipo de ejercicio como asistir al gimnasio, salir a correr o jugar deportes diversos.

Tres días antes de cada una de las cuatro visitas al laboratorio ya mencionadas y descritas, seguiré al pie de la letra un plan de alimentación elaborado por una nutricionista, especialmente diseñado para mis necesidades alimenticias en lo referente a la cantidad de calorías a consumir por día. Dicho plan de alimentación incluye una ingesta de alimentos principalmente basada en carbohidratos con el fin de poder realizar adecuadamente el ejercicio programado en las visitas al laboratorio. La confirmación de que el plan de alimentación fue cumplido se hará por medio de un reporte de alimentación de 24 horas, que deberé completar al inicio de las actividades en las visitas al laboratorio.

C. Riesgos

Las molestias que pueden derivarse de mi participación en este estudio incluyen:

Las generadas en la recolección de la muestra de sangre para análisis de perfil lipídico, hemograma y glicemia.

Las generadas por la colocación de una vía intravenosa con sello de heparina para recolectar las muestras de sangre en las cuatro visitas al laboratorio.

Las molestias posibles de los dos puntos anteriores incluyen la posibilidad de sentir dolor al tomar la vía venosa, así como la posibilidad de presentar un hematoma en la zona adyacente al punto donde se tomen las muestras.

Otras posibles molestias son las generadas por la práctica de ayuno de varias horas antes de las visitas al laboratorio, así como por la ejecución de una prueba de consumo máximo de oxígeno, que genera fatiga extrema, y ocasionalmente mareos y visión borrosa o ganas de vomitar.

Si sufriera algún daño como consecuencia de los procedimientos a los que seré sometido para la realización de este estudio, los investigadores participantes me remitirán ante los profesionales adecuados para recibir el tratamiento necesario para mi total recuperación.

D. Beneficios

Como resultado de mi participación en este estudio obtendré los siguientes beneficios:

Determinación de mi tasa metabólica basal.

Determinación de mi requerimiento calórico diario.

Consulta gratuita con una nutricionista de la Universidad de Costa Rica

Exámenes de perfil lipídico, hemograma y glicemia gratuitos.

Exámenes de mis concentraciones plasmáticas de leptina gratuitos.

Prueba de consumo máximo de oxígeno gratuita.

Además colaboraré con la salud y la calidad de vida de los costarricenses a través de los conocimientos que se obtengan de este estudio.

E. He hablado con ALFREDO LOPEZ DAVILA sobre este estudio y me ha contestado todas mis preguntas. Si quisiera más información mas adelante, puedo obtenerla llamando el teléfono 207 4482, 222 4898, 356 9697. Además puedo consultar al Ministerio de Salud-CONIS al 233-3594 sobre los Derechos de los Sujetos Participantes en Proyectos de Investigación. Cualquier consulta adicional podré realizarla en la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica a los teléfonos 207 4201 y 207 5839.

F. Recibiré una copia de esta fórmula para mi uso personal.

G. Mi participación en este estudio es voluntaria. Tengo el derecho de negarme a participar o discontinuar mi participación en cualquier momento sin que esto afecte la calidad de la atención, médica (o de otra índole) que requiero.

H. Mi participación en este estudio es confidencial, los resultados podrían aparecer en una publicación científica pero de manera anónima.

I. No perderé ningún derecho legal por firmar este documento.

J. Las muestras obtenidas para esta investigación podrían transferirse a otros investigadores bajo el Acuerdo de Transferencia de material Biológico (MTA).

CONSENTIMIENTO

He leído toda la información descrita en esta fórmula antes de firmarla. Se me ha brindado la oportunidad de hacer preguntas y éstas han sido contestadas en forma adecuada. Por lo tanto accedo a participar como sujeto de investigación en este estudio.

NOMBRE, FIRMA Y CEDULA DEL SUJETO FECHA

NOMBRE, FIRMA Y CEDULA DEL TESTIGO FECHA

NOMBRE, FIRMA Y CEDULA DEL INVESTIGADOR FECHA

Anexo 6.4

Factores Para Estimar Las Necesidades Energéticas Diarias Totales En Diversos Niveles De Actividad General Para Hombres Y Mujeres De 19 A 50 Años.

<i>Nivel general de actividad física</i>	Factor de actividad*
Muy leve Hombres	1.3
Muy leve mujeres	1.3
Leve hombres	1.6
Leve mujeres	1.5
Moderado hombres	1.7
Moderado mujeres	1.6
Intenso hombres	2.1
Intenso mujeres	1.9
Excepcional hombres	2.4
Excepcional mujeres	2.2

* = Se debe multiplicar el gasto energético en reposo, por el factor de actividad correspondiente. Al producto resultante se le debe sumar el 10% de su valor. El producto final es el requerimiento calórico diario estimado.

Anexo 6.5

Recordatorio De Alimentación De 24 Horas.

Por favor complete el siguiente cuadro indicando de manera completa y sincera la información que se le solicita a continuación. Las respuestas que usted ofrezca serán de suma importancia para este proceso de investigación, el cual tiene un costo económico y logístico elevado.

	Alimento 1	Alimento 2	Alimento 3	Bebidas
Desayuno				
Media mañana				
Almuerzo				
Media tarde				
Noche				
OTROS				

No dude en señalar toda clase de alimentos, y por favor haga un esfuerzo sincero para recordar a conciencia lo que ha ingerido en las últimas 24 horas.

NOTA: Si el sujeto está de acuerdo, este instrumento le puede ser suministrado un día antes de la ejecución de las condiciones de la investigación, para que lo complete a lo largo del día.

Anexo 6.6

*Kit De Leptina Dsl-23100. Irma***Principio del test:**

Se trata de un ensayo inmunoradioactivo de dos sitios (IRMA). El ensayo es NO COMPETITIVO y en éste la hormona –en este caso la leptina- es fijada en medio de dos anticuerpos. Uno de los anticuerpos está inmovilizado en las paredes de los tubos, mientras que el otro está radioetiquetado para realizar la detección. Los agentes presentes en la muestra que no se fijan son removidos decantando y lavando los tubos.

Sensibilidad del test.

La sensibilidad teórica, o mínimo límite de detección se calculó a partir de la interpolación del promedio mas dos desviaciones estándar de 18 réplicas de 0 ng/ml de leptina. Su resultado es 0.10 ng/ml.

Precisión del test.

Coefficiente de variación INTRA ENSAYO determinado con el promedio de doce réplicas para cada una de tres muestras de plasma en una misma “corrida”. Unidades en ng/ml.

MUESTRA	N	Promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)
I	12	2.75	0.10	3.7
II	12	13.50	0.67	4.9
III	12	73.60	1.94	2.6

Coefficiente de variación INTER ENSAYO determinado del promedio de 10 “corridas” por separado con las mismas tres muestras de plasma. Unidades en ng/ml.

MUESTRA	N	Promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)
I	10	2.83	0.19	6.6
II	10	14.35	0.76	5.3
III	10	73.87	2.71	3.7

Comparación con otras pruebas: El Kit DSL 23-100 ha sido comparado con otros disponibles comercialmente. Al establecer una correlación entre los resultados de este kit con respecto a los obtenidos en el de HUMAN LEPTIN RIA (LINCO) se obtuvo una correlación de 0.98 (calculada a partir de 320 muestras comparadas).

Anexo 6.7
Varios

Limitaciones del estudio

Entre las limitaciones del estudio, se pueden enumerar las siguientes, principalmente debido a factores económicos:

1. El tiempo de duración de las condiciones experimentales no es el más adecuado. Es deseable aumentar el tiempo de recolección de datos, pasando de 8 a 12 horas de seguimiento.
2. La frecuencia de la recolección de las muestras es un tanto baja. Es deseable aumentar la frecuencia de las mediciones, principalmente en las cuatro horas finales de cada condición experimental, pasando de una muestra cada treinta minutos a una muestra cada diez minutos.
3. Las mediciones de glicemia presentan un cierto margen de error por los dispositivos empleados. Es deseable realizar las mediciones de glicemia con un método diferente al glucómetro automático, pues este es un dispositivo clínico y no para fines de investigación.

Recomendaciones a futuro:

1. Solventar las limitaciones señaladas, para lo cual se requiere de un presupuesto considerablemente mayor. Esto podría realizarse aplicando a múltiples opciones de financiamiento dentro y fuera del país, y recurriendo la cooperación de los centros de investigación de la Universidad de Costa Rica.
2. Estudiar en mujeres los fenómenos descritos en el presente proyecto.
3. Investigar la gerarquía existente entre insulina, glicemia y balance energético como variables reguladoras de la leptina en sangre.



September 21, 2005

Dear Alfredo López Dávila,

We are pleased to inform you that your student grant proposal “**ACUTE EFFECT OF EXERCISE AND ENERGETIC BALANCE ON SERUM LEPTIN CONCENTRATIONS**” has been approved for funding through the Gatorade Sports Science Institute.

We are prepared to offer you **\$1750 USD** in support of your project. Please contact us by e-mail listed below to indicate whether you will accept this research award or if you wish to withdraw your application. We need your decision by September 30, 2005.

If you decide to accept this award, along with your response please identify the name of the department or division to which the check should be made payable. You must also provide proof of ethics committee submission or approval for your project before October 20, 2005 otherwise funds cannot be released to the university. For your convenience my FAX number is listed below.

Congratulations on an excellent research proposal and application. Good luck with your project and future educational pursuits.

Sincerely,

Luis Fdo. Aragón V.

Luis Fernando Aragón V., Ph.D., FACSM
Senior Scientist for Latin America and Europe
Gatorade Sports Science Institute
Tel. & Fax +506 278-2678
COSTA RICA

Luis.Aragon@gatorade.com

San José, 16 de diciembre de 2003

MBA. Fernando Gutiérrez Ortiz
Ministro de Ciencia y Tecnología
Presidente del Fondo de Incentivos
Presente

Estimado Ministro:

La presente es para saludarle y presentarme ante usted y su despacho como aspirante a financiamiento a través del fondo de incentivos del CONICIT.

Mi intención es llevar adelante mi proyecto de tesis del Programa de Posgrado Centroamericano en Ciencias Biomédicas, mención en Fisiología Humana de Sistemas del cual ya he cursado todos los créditos necesarios a excepción de los referentes a tesis o proyecto de graduación.

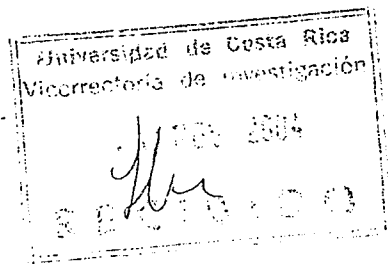
Dicho proyecto de graduación ya está formulado y se denomina "Efecto agudo del ejercicio y el ayuno sobre las concentraciones plasmáticas de leptina: efectos simples e interacciones".

En caso de ser respaldado por el fondo de incentivos, invertiría dicha ayuda en compra de reactivos de laboratorio necesarios para recolectar los resultados de mi estudio.

Agradezco su valiosa atención y me despido atentamente,

Bach. Alfredo López Dávila
Cédula 1-951-501

San José



11 de noviembre de 2004

Señor
Edgar Roy Ramírez. Ms.C.
Coordinador Comité Ético-Científico.
Universidad de Costa Rica
Presente

Estimado señor.

Reciba mis atentos saludos.

Le escribo para solicitar ante el Comité Ético-Científico de la Universidad de Costa Rica, la revisión del proyecto denominado *Efectos agudos del ejercicio y el balance energético sobre los niveles plasmáticos de leptina*, que pretendo desarrollar como proyecto de graduación de la maestría en ciencias biomédicas de la escuela de medicina, Universidad de Costa Rica.

Adjunto copia del procedimiento experimental, de la fórmula de consentimiento informado para los sujetos experimentales, y demás anexos que considero oportunos.

Agradeciendo su amable atención se despide:

A handwritten signature in cursive script that reads "Alfredo López Dávila".

Alfredo López Dávila
Profesor de la Escuela de Medicina. Universidad de Costa Rica
Egresado de la maestría en Ciencias Biomédicas. SEP-UCR.



UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN
COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO
Teléfonos:(506) 207-4201 Telefax: (506) 224-9367

14 de febrero del 2005
VI-1151-CEC-44-05

Señor
Alfredo López Dávila
Estudiante
Maestría en Ciencias Biomédicas

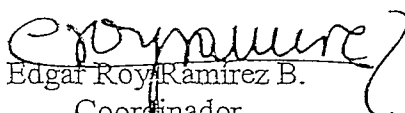
Estimado señor:

El Comité Ético Científico en su Sesión No. 82, del 9 de febrero del 2005, sometió a consideración las modificaciones realizadas al consentimiento informado y la aclaración solicitada, acerca del proyecto de Trabajo Final de Graduación "Efecto agudo de ejercicio y el balance energético sobre las concentraciones plasmáticas de leptina"

Después del análisis respectivo este Comité acuerda:

Acuerdo: Aprobar el proyecto de Trabajo Final de Graduación "Efecto agudo de ejercicio y el balance energético sobre las concentraciones plasmáticas de leptina" presentado por el estudiante Alfredo López Dávila.

Sin otro particular, se despide cordialmente,;


Edgar Roy Ramírez B.
Coordinador



ERRB/eqch
C.c: Archivo
Consecutivo



UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

TELEFONOS: 207 4697 / 207 4757 / 207 5086 / 207 5232
Dirección Electrónica sepucr@cariari.ucr.ac.cr



EXAMEN DE CANDIDATURA
ACTA No. 0561-2004

Dr. Jorge Murillo Medrano
Decano

Estimado señor:

Le informamos que el (a) estudiante Alfredo López Dávila, carné No. 941960, nacionalidad costarricense, del Programa de Posgrado en Ciencias Biomédicas (Fisiología).

Aprobó

Reprobó

Su examen de candidatura el día 18 de noviembre del 2004, con el proyecto y avance: "Efecto agudo del ejercicio y el balance energético sobre las concentraciones ~~plásticas~~ de leptina".
plasmáticas

TRIBUNAL EXAMINADOR

Nombre	Firma	No. Cédula
M.Sc. Adriana Suárez Urhan Decano (a) del SEP / Representante		8 053500
M.Sc. Aileen Fernández Ramírez Profesor (a) Consejero (a)		1-4126-556
Dr. Luis Fernando Aragón Vargas Asesor (a)		
M.Sc. Georgina Gómez Salas Asesor (a)		1-646-636
Dra. Cecilia Díaz Oreiro Director (a) el Programa/ Representante		101 665

OBSERVACIONES

Nota: En cada caso, firmarán el acta solamente los responsables de la actividad descrita.

R/Evelyn
21/7/04