

Alteraciones de los genes de la vía leptina/melanocortina en una serie de 17 sujetos con obesidad

Autores:

Baste Subía Ma. Nathalia*

Marcet Ortega José Miguel*

Solano Torres Guillermo Andrés*

Xavier Landívar Varas^a

Gustavo Saul Escobar

Jason Espinoza Caicedo

Cecibel Ramirez

*Egresados de la facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Católica Santiago de Guayaquil

**MD, MSc en Genética Humana, Profesor de la Cátedra de Genética Humana, Jefe del Área de Investigación en Genética Humana - Instituto de Biomedicina - Universidad Católica de Santiago de Guayaquil

***Instituto de Biomedicina - Universidad Católica de Santiago de Guayaquil

Resumen

Objetivo: Determinar la relación que existe entre la obesidad y alteraciones genéticas en la vía leptina/melanocortina en la población ecuatoriana. **Diseño:** Es una serie de casos de 17 pacientes escogidos al azar por disponibilidad durante el período de abril 2011 a abril 2012. Se obtuvo Talla, peso, edad, sexo, IMC y enfermedades hasta la segunda generación ascendente y pedigree del sujeto, una muestra sanguínea venosa. Los sujetos cumplieron con los criterios de tener entre 18 a 65 años, IMC > 35 con alguna comorbilidad o IMC > 40 sin comorbilidad, obesidad resistente a cambios en estilo de vida y que presente un patrón heredo-familiar. Se realizará el análisis estadístico de la prevalencia en la muestra. **Resultados:** Encontramos una correlación del 47% de obesidad con los padres de los sujetos. La prevalencia absoluta de alteraciones en los genes estudiados fue de 88% (n=17) **Conclusiones:** Aunque encontramos relación entre nuestros resultados y otros estudios en cuanto a la prevalencia del gen más común MC4R, encontramos alta prevalencia en otros genes como SIM1 y LEPR por lo que creemos necesario realizar estudios con controles y muestras más grandes.

Abstract

Objective: Determine the link between obesity and genetic alterations in the leptin/melanocortin system in the Ecuadorian population. **Design:** it is a clinical series of 17 patients randomly selected by availability between April 2011 and April 2012. We collected size, weight, age, sex, BMI and diseases known up to the second degree of upstream consanguinity. All study subjects had to comply with the following criteria: 18 to 65 years old, BMI > 35 kg/m² with one comorbidity or BMI > 40 kg/m², obesity resistant to lifestyle changes and familiar linkage. The prevalence of genetic alterations of the sample will be the main outcome. **Results:** We found a correlation of 47% of obesity in subject's parents. The absolute prevalence of alterations in the studied genes was 88% (n=17) **Conclusions:** Although we found a relation among our results and other studies in relation of the prevalence of the most common gene MC4R, we found a higher prevalence in other genes like SIM1 and LEPR so we think it is necessary to conduct other studies with control subjects and bigger samples.

Palabras clave:

Obesidad, genética, SIM1, LEP, LEPR, MC4R

Key words:

Obesity, genetic, SIM1, LEP, LEPR, MC4R

Introducción

Existen múltiples métodos para evaluar la obesidad de un paciente sin embargo el más comúnmente utilizado es el Índice de Masa Corporal (IMC) que corresponde al peso del individuo en kilogramos sobre la altura en metros al cuadrado (Kg/M^2) por su simplicidad y bajo costo.² La Organización Mundial de la Salud (OMS) define con sobrepeso a la persona con un IMC igual o mayor 25 y Obesidad a una persona con IMC igual o mayor a 30.¹ El mecanismo etiológico de la obesidad no es conocido por completo. Se conocen que corresponde a la interacción de múltiples factores, pero principalmente la interacción entre factores ambientales y genéticos⁴. El factor de herencia asociado al peso corporal corresponde entre un 40% a un 70% de la predisposición de un individuo a ser obeso⁵. En estudios de adopción, la severidad de obesidad fue más concordante con los padres biológicos que adoptivos.⁶ Incluso los IMC de gemelos homocigóticos tienen más similitud entre sí que la de los gemelos dicigóticos a pesar de que no hayan compartido el mismo ambiente⁷. Una de las mecanismos endocrinológicos asociados a factores genéticos de obesidad es la vía leptina/melanocortina^{12, 13}. Alteraciones en los genes implicados en esta vía, que son: los de los receptores 4, 3 y 2 de la Melanocortina (MC4R, MC3R, MC2R), del gen de la Proopiomelanocortina (POMC), el gen de la leptina (LEP) y su receptor (LEPR), además del gen homólogo humano de la proteína de la Drosophila 1 single minded (SIM1), pueden provocar obesidad^{12,13}.

En el Ecuador no hay estudios que determinen alteraciones de genes relacionados con la obesidad. Según estadísticas de la OMS en el periodo del 2000-2009 la prevalencia de sobrepeso en la población general ecuatoriana ha sido de 5,1 %, y la prevalencia de obesidad en mujeres mayores de 20 años es de 28.2% y en hombres mayores de 20 años es 15.7% ¹⁴.

En el presente estudio se ha determinado la prevalencia que existe de deleciones y duplicaciones en los genes de la vía leptina/melanocortina y sujetos con obesidad.

Materiales y métodos

Nuestro estudio es la presentación de una serie de casos, con una muestra de 22 sujetos, elegidas al azar sin importar el género y que presente obesidad clínica.

La muestra constará de todos los pacientes que durante el periodo del estudio cumplieron con los siguientes requisitos:

Criterios de inclusión: IMC > 35 con una comorbilidad asociada a la obesidad o IMC > 40 con o sin una comorbilidad, pacientes entre 18-65 años de edad, obesidad que ha sido resistente a cambios de estilo de vida, pacientes que presenten un patrón heredo-familiar de obesidad, nacionalidad ecuatoriana. Los criterios de exclusión: pacientes que tomen algún tipo de medicación que pueda alterar la calidad de la muestra sanguínea venosa, pacientes con Síndromes Genéticos conocido y finalmente que se haya descartado una causa endocrinológica de obesidad.

Una vez seleccionadas las personas elegidas para este estudio, se informó a los pacientes del procedimiento a realizarse, se realizó un consentimiento informado que explicara brevemente el propósito del estudio, la necesidad y propiedad de la toma de muestra sanguínea, las posibles complicaciones de la toma de muestra sanguínea venosa, el análisis del ADN de los participantes y el permiso para publicar los hallazgos realizados. Los sujetos de estudio firmaron este consentimiento informado. Luego se procedió con la extracción de 4 ml de sangre que se realizó con técnica aséptica utilizando un sistema de extracción de sangre venosa de tubos al vacío que contengan EDTA como anticoagulante.

Una vez extraída la muestra se le realizaron entrevistas médicas a las personas estudiadas de las cuales se extrajeron las variables: edad, peso, talla, sexo e IMC además de enfermedades conocidas hasta segunda generación ascendente para poder realizar un pedigree de su familia y así relacionarlo con el grado de consanguinidad que presentan con familiares obesos (en caso de que existan obesos en su familia).

La sangre recolectada de los 17 pacientes se la mantuvo a 4°C hasta la extracción del ADN que fue realizado con el Purelink Genomic Minikit de acuerdo a las indicaciones del fabricante y se les realizaron las pruebas genéticas utilizando la técnica de Amplificación de Sondas Múltiples ligando-dependiente o MLPA, utilizando el kit de sondas para obesidad P220 Obesity MLPA vendido por MRC-HOLLAND B.V. que contiene 38 exones para analizar 7 genes de la Vía Leptina-Melanocortina; Utilizando el protocolo determinado para el kit que corresponde a: desnaturalización del ADN, hibridación, agregación de ligandos, reacción en cadena de la Polimerasa y electroforesis capilar.

El software utilizado para el análisis de los productos de la secuenciación fue el GeneMapper X proveído por el Instituto de Biomedicina de la Universidad Católica de Santiago de Guayaquil la que nos permitió extraer los picos de los resultados a tablas de texto que fueron comparadas mediante el software Coffalyser Versión 9.4 descargado gratuitamente de la página web del fabricante del Kit P220 Obesity.

Se utilizó para el análisis de las pruebas el Instituto de Biomedicina de la Universidad Católica de Santiago de Guayaquil, especialmente el uso de la termocicladora y el equipo de secuenciación Genetic Analyzer 3500 de Applied Biosystems/ Hitachi, además del apoyo del personal de este centro de investigación.

Luego se procedió a analizar los datos y definir cuantos sujetos presentan porcentualmente deleciones o duplicaciones de los genes estudiados en muestra. Las características de la muestra fueron calculadas mediante el software estadístico SPSS Versión 20 creado por IBM.

Resultados

Procedimos a analizar los datos de 17 sujetos, las características de la población se encuentran en la tabla 1. Procedimos al análisis del factor de herencia de obesidad de acuerdo al pedigree obtenido de cada paciente. Se clasificó los ancestros de los sujetos de estudio en los grados de IMC de la Organización Mundial de la Salud y se los dividió como obesos y no obesos como se muestra en la tabla 2.

En el primer grado de consanguinidad el 47% de Padres y Madres de los sujetos son obesos, mientras que los 53% restantes de ellos no eran obesos, pero podían presentar sobrepeso.

Ambos padres presentaron obesidad en el 29% de los sujetos. En el segundo grado de consanguinidad, del lado paterno, el 29,41% de los abuelos del sujeto presentaron obesidad frente al 23,52% de los abuelos maternos. En cuanto a las abuelas, tanto maternas como paternas, de los sujetos encontramos obesidad en el 23,52% de nuestra muestra. Estos datos se presentan en los gráficos 1 y 2.

En cuanto al análisis de los genes de los sujetos por la técnica MLPA se obtuvo los siguientes resultados resumidos en la tabla 3.

De las alteraciones genéticas presentadas, encontramos duplicaciones en 13 de los 17 sujetos encontrándose la mayoría de estos en el Gen LEPR en un 58% y en el MC3R en un 42%. Cabe destacar que en el resto de los genes analizados no encontramos duplicaciones. (Grafico 3) Es importante remarcar que las duplicaciones se dieron en distintos exones siendo el más común para LEPR el exón 19 con 3 sujetos con duplicación. Mientras que en el MC3R se encontró más frecuentemente duplicación en la longitud 160 del Exón 1 de dicho gen.

Sobre las deleciones no encontramos ninguna de ellas fueron homocigotas. Se encontraron deleciones heterocigotas en 14 sujetos de nuestra muestra. De las cuales el 79% se encontró en el Sim1 siendo

más frecuentemente alterado el exón 11, LEPR le correspondió un 10% de las deleciones siendo más comúnmente halladas en el exón 10. En el Gen MC4R encontramos un 7% de las deleciones. El 4% de las deleciones se situó en el gen LEP siendo más común en el exón 3. No encontramos deleciones en el gen POMC ni en el gen MC2R.

Por lo tanto encontramos una prevalencia de 88% de los sujetos de nuestra muestra de 17 sujetos con algún tipo de alteración ya sea ésta deleción o duplicación en los genes de la vía Leptina-Melanocortina.

Tablas y figuras

TABLA 1. Características de la muestra

Estadísticos descriptivos					
	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
IMC	17	35	60	43.97	7.488
Edad	17	23	56	36.76	11.573
Talla	17	2	2	1.64	.092
Peso	17	89	155	115.09	17.559
N válido (según lista)	17				

TABLA 2. Relación de probando con grados de consanguinidad

PROBANDO	Consanguinidad 1er grado			Consanguinidad 2do grado				TOTAL	
	MAMÁ	PAPÁ	HERMANOS	ABUELO MATERNO	ABUELA MATERNA	ABUELO PATERNO	ABUELO PATERNO	Consanguinidad 1er grado	Consanguinidad 2do grado
1	O1	S		S	S	S	S	1	0
2	O1	S		N	O1	N	N	1	1
3	N	S		N	N	O1	S	0	1
4	S	O1		O2	S	(+)	(+)	1	1
5	S	O2		O1	S	O1	S	1	2
6	O2	O1	O2	O1	O1	S	S	3	2
7	S	S		S	S	S	O1	0	1
8	O2	O1		S	O3	S	S	2	1
9	O2	(+)		O1	O3	O1	O2	1	4
10	O3	O1	O3/S/O1/O2	O1	S	O2	S	5	1
11	O2	S		N	N	S	O3	1	1

12	O1	O2		S	O1	S	S	2	1
13	N	O3		S	N	S	N	1	0
14	N	S		S	(+)	N	(+)	0	0
15	S	O1		N	S	S	S	1	0
16	O1	O2	O1	+	+	+	+	3	0
17	O3	O3		S	S	O1	S	2	1
TOTAL								25	17

TABLA 3. Características de cada probando según su alteración genética y su consanguinidad con familiares obesos

PROBANDO	MUTACIÓN DE GENES							Consanguinidad con familiares obesos	
	LEP	LEPR	POMC	MC4R	MC3R	MC2R	SIM1	1er grado	2do grado
1							(+)	1	0
2		(+)			(+)		(+)	1	1
3		(+)			(+)		(+)	0	1
4		(+)						1	1
5							(+)	1	2
6		(+)			(+)			3	2
7				(+)			(+)	0	1
8							(+)	2	1
9							(+)	1	4
10							(+)	5	1
11							(+)	1	1
12		(+)		(+)			(+)	2	1
13		(+)			(+)		(+)	1	0
14		(+)			(+)		(+)	0	0
15								1	0
16	(+)	(+)					(+)	3	0
17								2	1
TOTAL	1	8		2	5	0	13	25	17

(+) = Alteración genética*

***Se entiende como alteración genética una delección o duplicación homocigota o heterocigota en los exones de cada gen**

GRÁFICO 1.

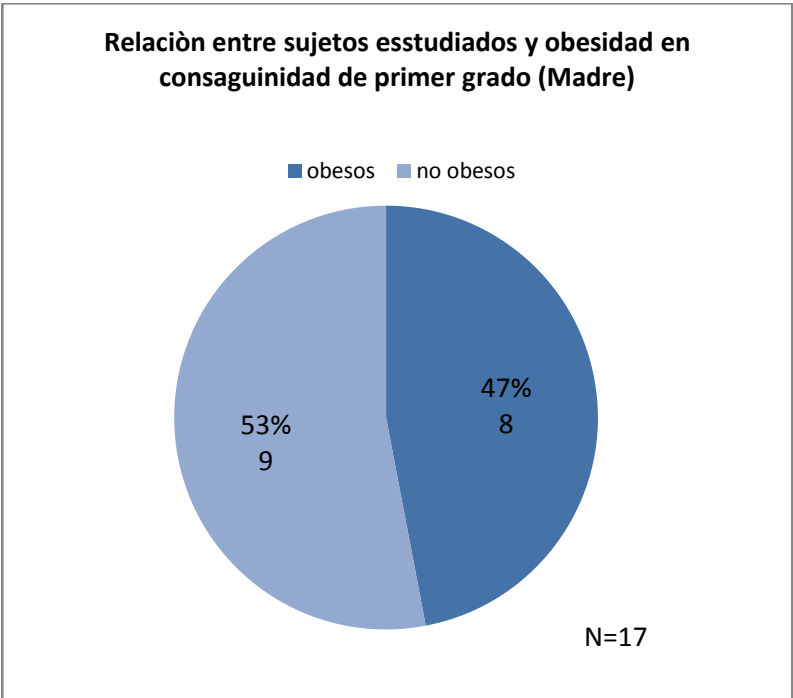


GRÁFICO 2.

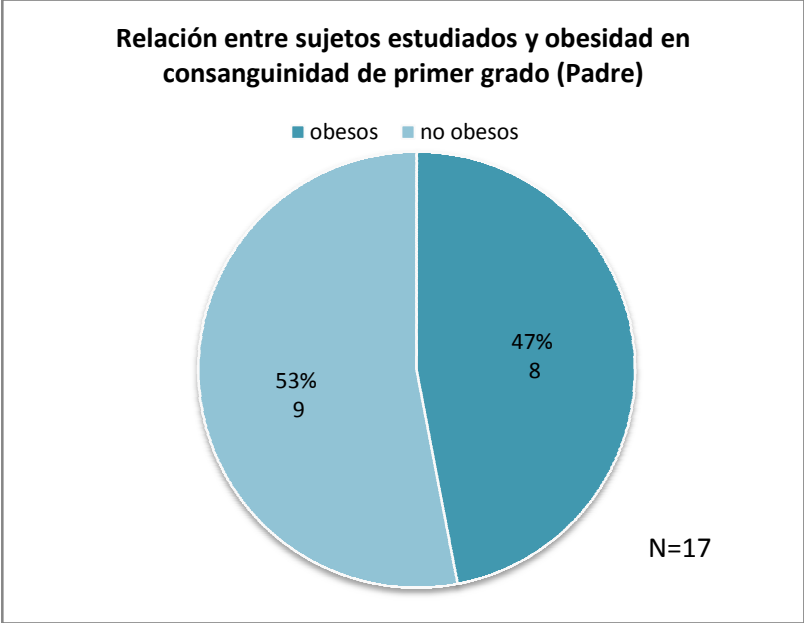


GRÁFICO 3.

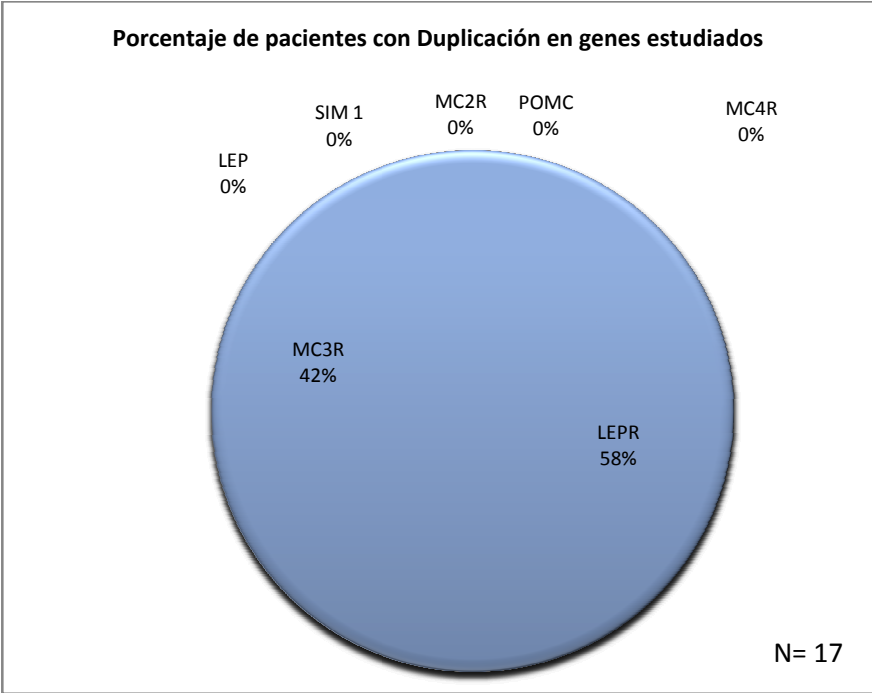


GRÁFICO 4.

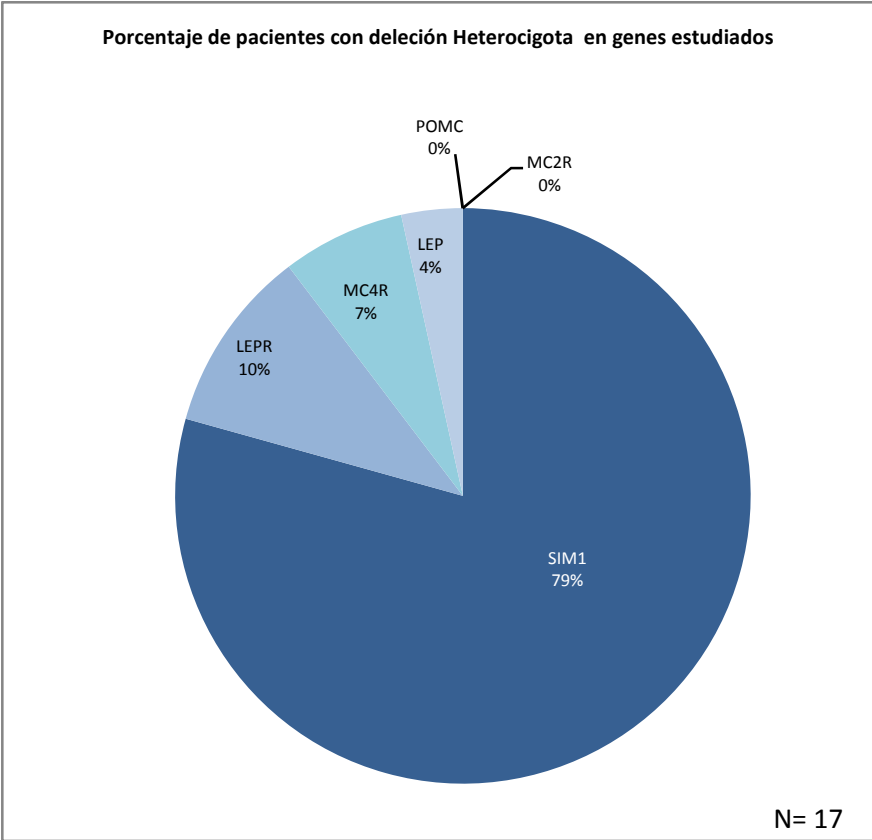
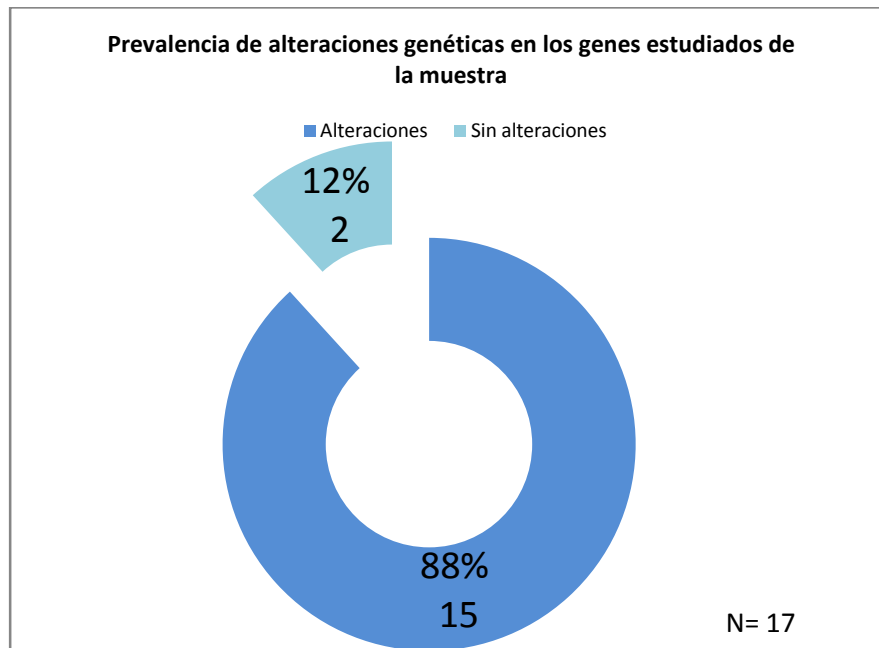


GRÁFICO 5.



Discusión

El estudio realizado es una exploración y la incursión al análisis de la obesidad monogénica en el Ecuador, puesto que no existían datos en el país. La interpretación de los resultados obtenidos debe ser cuidadosa puesto que la técnica MLPA como lo describe el proveedor no puede diferenciar con mucha certeza la ubicación de la delección puesto que mutaciones o polimorfismos cerca de los sitios ligandos de las sondas pueden alterar los resultados.

Nos llamó mucho la atención el porcentaje alto de alteraciones encontradas en la muestra que fue del 88% puesto de acuerdo a la revisión realizada la obesidad monogénica corresponde entre el 5 y 10% de las causas de obesidad.¹⁰⁻¹² Además la literatura refiere que el gen monogénico más comúnmente asociado con obesidad es el MC4R siendo este el causante del 3 al 6 % de la obesidad.^{13, 14}

Resalta el hecho de que la mayoría deleciones heterocigotas, puesto que no encontramos homocigotas, fueron en el gen SIM1 de manera especial en el Exon 11, puesto que se sabe muy poco de la conexión de este gen con la obesidad desde descrito por primera vez.¹⁵ Sin embargo se

conocer estudios principalmente en ratas que la delección heterocigótica produce hiperfagia, gasto energético corporal normal e incluso recientes estudios lo han relacionado con disminución de la expresión del MC4R y disminución de oxitocina.^{11,16} Los hallazgos en este gen deberán ser verificados con estudios que tengan controles de pacientes sin obesidad para realizar una verdadera relación in-vivo del efecto del gen.

En cuanto a las delecciones en LEPR se describe que causa obesidad en aproximadamente 3% de los sujetos, en estos pacientes no se encontraron niveles elevados de leptina¹⁷ Nuestro estudio encontró delecciones heterocigotas en un 10% de los pacientes estudiados con obesidad. Cabe recalcar que éste fue el gen donde encontramos mayor cantidad de duplicaciones sin que su significado clínico sea claro para nosotros.

Quizás el gen con el que nuestro estudio encontró mayor correlación es el MC4R como mencionamos anteriormente la prevalencia de causa de obesidad monogénica es el 6%^{13, 14} y se encontró en un 7% de la muestra. Este gen es no solo causante de obesidad monogénica sino también poli génica y se ha descrito su herencia dominante en ciertos casos.¹⁸

Más allá de los datos encontrados en este estudio nos parece primordial realizar futuros estudios con una muestra más grande y con controles especialmente para reconocer cuales alteraciones encontradas pueden tener una asociación directa con obesidad y cuales no.

Bibliografía

1. -D.M. Nguyen, H.B. El-Serag, The Epidemiology of Obesity. *GastroenterolClin N Am* 39 (2010) 1–7. doi:10.1016/j.gtc.2009.12.014
2. World Health Organization [Internet] Obesity Fact Sheet #311 Updated March 2011. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>Accesado Abril30, 2012
3. Mutch DM, Clément K, Unraveling the genetics of human obesity. *PLoS Genet* 2(12): e188. doi:10.1371/journal.pgen.0020188
4. Allison DB, Kaprio J, Korkeila M, Koskenvuo M, Neale MC, Hayakawa K. The heritability of body mass index among an international sample of monozygotic twins reared apart. *Int J ObesRelatMetabDisord.* 1996;20(6):501–506.
5. Stunkard A J, Sørensen T I.A., Hanis C., Teasdale T. W., Chakraborty R, Schull William J., and Schulsinger F. An Adoption Study of Human Obesity. *N Engl J Med* 1986; 314:193-198
6. -Stunkard A, Harris J, Pedersen N, Mc-Clearn G. 1990. The body-mass index of twins who have been reared apart. *N. Engl.J. Med.* 322:1483–87
7. Santos José L, Sistema leptina-melanocortinas en la regulación de la ingesta y el peso corporal. *Rev Méd Chile* 2009; 137: 1225-1234
8. Rankinen T, Zuberi A., Chagnon Yvon C, Weisnagel S. John, Argyropoulos G, Walts B, Pe´russe L, Bouchard C, The Human Obesity Gene Map: The 2005 Update, *Obesity.* 2006;14:529–644.
9. World Health Statistics 2011[Internet]; Global Health Observatory; World Health Organization [citado 13 de Abril del 2012] disponible en:http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/ES_WHS2011_Full.pdf
10. Reinehr T, Kleber M, de Sousa G, Andler W. Leptin concentrations are a predictor of overweight reduction in a lifestyle intervention. *Int J Pediatr Obes.* May 13 2009;1-9

11. Ranadive SA, Vaisse C. Lessons from extreme human obesity: monogenic disorders. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2008 Sep;37(3):733-51, x
12. Choquet H, Meyre D. Genetics of Obesity: What have we Learned? *Curr Genomics.* 2011 May;12(3):169-79.
13. Farooqi IS, Keogh JM, Yeo GS, Lank EJ, Cheetham T, O'Rahilly S. Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene. *N Engl J Med.* 2003 Mar 20;348(12):1085-95.
14. Branson R, Potoczna N, Kral JG, Lentes KU, Hoehe MR, Horber FF. Binge eating as a major phenotype of melanocortin 4 receptor gene mutations. *N Engl J Med.* 2003 Mar 20;348(12):1096-103.
15. Holder JL Jr, Butte NF, Zinn AR. Profound obesity associated with a balanced translocation that disrupts the SIM1 gene. *Hum Mol Genet.* 2000 Jan 1;9(1):101-8.
16. Tolson KP, Gemelli T, Gautron L, Elmquist JK, Zinn AR, Kublaoui BM. Postnatal Sim1 deficiency causes hyperphagic obesity and reduced Mc4r and oxytocin expression. *J Neurosci.* 2010 Mar 10;30(10):3803-12.
17. Farooqi IS, Wangensteen T, Collins S, Kimber W, Matarese G, Keogh JM, Lank E, Bottomley B, Lopez-Fernandez J, Ferraz-Amaro I, Dattani MT, Ercan O, Myhre AG, Retterstol L, Stanhope R, Edge JA, McKenzie S, Lessan N, Ghodsi M, De Rosa V, Perna F, Fontana S, Barroso I, Undlien DE, O'Rahilly S. Clinical and molecular genetic spectrum of congenital deficiency of the leptin receptor. *N Engl J Med.* 2007 Jan 18;356(3):237-47.
18. Ramachandrapa S, Farooqi IS. Genetic approaches to understanding human obesity. *J Clin Invest.* 2011 Jun;121(6):2080-6. doi: 10.1172/JCI46044. Epub 2011 Jun 1.