

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

Alterations in the genes of the leptin/melanocortin pathway in a series of 17 patients with obesity

SEGUNDO MEJOR TRABAJO DE GRADUACIÓN XLVIII PROMOCIÓN DE MÉDICOS, FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS, UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTIAGO DE GUAYAQUIL

María Nathalia Baste Subía¹, José Miguel Marcet Ortega¹, Guillermo Andrés Solano Torres¹, Xavier Landívar Varas², Gustavo Saúl Escobar², Cecibel Ramírez², Jason Espinoza Caicedo²

¹ Universidad Católica de Santiago de Guayaquil, Facultad de Ciencias Médicas, Guayaquil, Ecuador

² Universidad Católica de Santiago de Guayaquil, Facultad de Ciencias Médicas, Instituto de Biomedicina, Guayaquil, Ecuador

RESUMEN

Objetivo: determinar la relación que existe entre la obesidad y alteraciones genéticas en la vía leptina/melanocortina en la población ecuatoriana. **Metodología:** 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 pedigré 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:** se encontró 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 la relación entre los resultados de este estudio y otros, en cuanto a la prevalencia del gen más común MC4R, no es similar en razón de que se encontró alta prevalencia de otros genes como SIM1 y LEPR, se cree necesario y oportuno realizar estudios con controles y muestras más grandes.

Palabras clave: Obesidad. Genética. SIM1. LEP. LEPR. MC4R.

ABSTRACT

Objective: to determine the relationship between obesity and genetic alterations in the leptin/melanocortin pathway within the Ecuadorian population. **Methodology:** a case series of 17 patients randomly selected for their availability during the period from April 2011 to April 2012. We gathered information about height, weight, age, sex, BMI and diseases until the second ascending generation of the patient and a venous blood sample. The subjects met the criteria for the study: be between 18 to 65 years old, BMI > 35 with some comorbidity or BMI > 40 without comorbidity, obesity resistant to changes in lifestyle and presenting a family-inherited pattern. Statistical analysis of the prevalence in the sample was performed. **Results:** we found a correlation of 47% of obesity with the parents of the patients. The absolute prevalence of alterations in the genes studied was 88% (n = 17). **Conclusions:** although we found a connection between our results and other studies on the prevalence of the most common gene, the MC4R gene, high prevalence of other genes such as SIM1 and LEPR was also found; therefore, we feel it is necessary to carry out studies with larger samples and controls.

keywords: Obesity. Genetics. SIM1. LEP. LEPR. MC4R.

Correspondencia a:

Md. María Baste Subía

Correo electrónico: nathalia_baste@hotmail.com

Recibido: 15 de junio de 2012

Aceptado: 04 de septiembre de 2012

Introducción

Existen múltiples métodos para evaluar la obesidad de un paciente; sin embargo, el más comúnmente utilizado es el Índice de Masa Corporal (IMC) 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; sin embargo, se ha evidenciado que la interacción entre factores ambientales y genéticos⁴, participan en su aparición. La herencia asociada al peso corporal, es un factor que predispone a un individuo entre un 40 al 70%, a ser obeso.⁵ 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 ambiente.⁷ Uno de los 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), el 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 período 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 de deleciones y duplicaciones en los genes de la vía leptina/melanocortina y sujetos con obesidad.

Metodología

Este estudio presenta una serie de 22 casos, elegidos al azar, con obesidad clínica, sin importar el género.

Los criterios de inclusión son: IMC > 35 con una comorbilidad asociada a la obesidad o IMC > 40 con o sin una comorbilidad; edad de 18-65 años; obesidad que ha sido resistente a cambios de estilo de vida; pacientes que presenten un patrón heredo-familiar de obesidad; nacionalidad ecuatoriana.

Se excluyeron a los pacientes que ingerían medicación que pueda alterar la calidad de la muestra sanguínea venosa; pacientes con síndromes genéticos conocidos asociados a obesidad de causa endócrina.

Una vez seleccionadas las personas para el estudio, se les informó el procedimiento a realizarse. Se estructuró un consentimiento informado en el que se explicó 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. 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 con EDTA como anticoagulante.

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 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, aplicando la técnica de Amplificación de Sondas Múltiples ligando-dependiente o MLPA, utilizando el kit de sondas para obesidad P220 Obesity MLPA de MRC-HOLLAND B.V. que contiene 38 exones para analizar siete genes de la vía leptina-melanocortina; usando 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 empleado para el análisis de los productos de la secuenciación fue el GeneMapper X que 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 equipamiento disponible en el Instituto de Biomedicina de la Universidad Católica de Santiago de Guayaquil, en especial 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 delecciones o duplicaciones de los genes estudiados

en la serie propuesta; los datos fueron analizados usando estadística descriptiva mediante el software estadístico SPSS Versión 20 creado por IBM.

Resultados

Las características de la población se encuentran en la tabla 1. Se procedió 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.

Tabla 1. Características de la muestra. Estadísticos descriptivos

	n	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típico
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

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	01	S		S	S	S	S	1	0
2	01	S		N	01	N	N	1	1
3	N	S		N	N	01	S	0	1
4	S	01		02	S	(+)	(+)	1	1
5	S	02		01	S	01	S	1	2
6	02	01	02	01	01	S	S	3	2
7	S	S		S	S	S	01	0	1
8	02	01		S	03	S	S	2	1
9	02	(+)		01	03	01	02	1	4
10	03	01	03/S/01/02	01	S	02	S	5	1
11	02	S		N	N	S	03	1	1
12	01	02		S	01	S	S	2	1
13	N	03		S	N	S	N	1	0
14	N	S		S	(+)	N	(+)	0	0
15	S	01		N	S	S	S	1	0
16	01	02	01	+	+	+	+	3	0
17	03	03		S	S	01	S	2	1
Total		25	17						

En el primer grado de consanguinidad, el 47% de padres y madres de los sujetos son obesos, mientras que el 53% restante, no incluyó 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, encontramos obesidad en el 23.52%.

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

De las alteraciones genéticas presentadas, se detectó duplicaciones en 13 de los 17 pacientes encontrándose la mayoría en el Gen LEPR (58%) y en el MC3R (42%). En el resto de los genes analizados no se encontró duplicaciones (gráfico 1). 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.

Ninguna de las deleciones encontradas fueron homocigotas. Se encontraron deleciones heterocigotas en 14 sujetos de la muestra, de los 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 se detectó un 7% de las deleciones. El 4% de las deleciones se situó en el gen LEP siendo más común en el exón 3. No se evidenciaron deleciones en el gen POMC ni en el gen MC2R. Por lo tanto, en la serie estudiada, se encontró una prevalencia de 88% de algún tipo de alteración, ya sea ésta deleción o duplicación, en los genes de la vía Leptina-Melanocortina (gráfico 2 y 3).

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 deleción o duplicación homocigota o heterocigota en los exones de cada gen

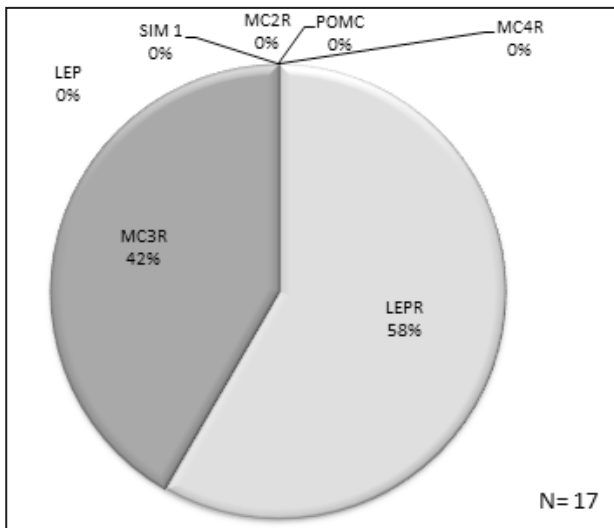


Gráfico 1. Porcentaje de pacientes con duplicación en genes estudiados.

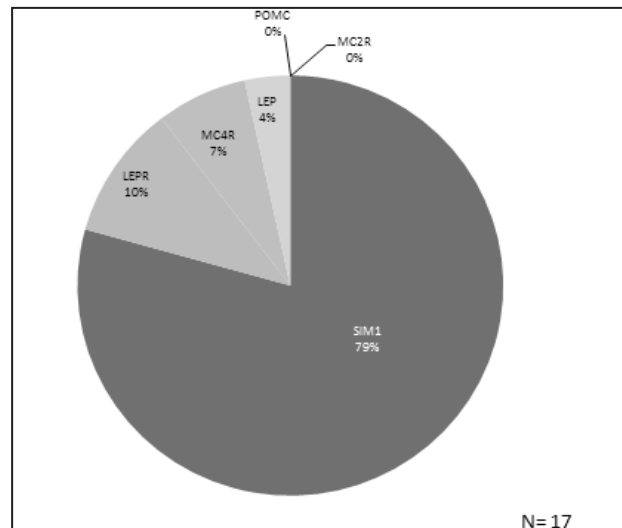


Gráfico 2. Porcentaje de pacientes con delección heterocigota en genes estudiados.

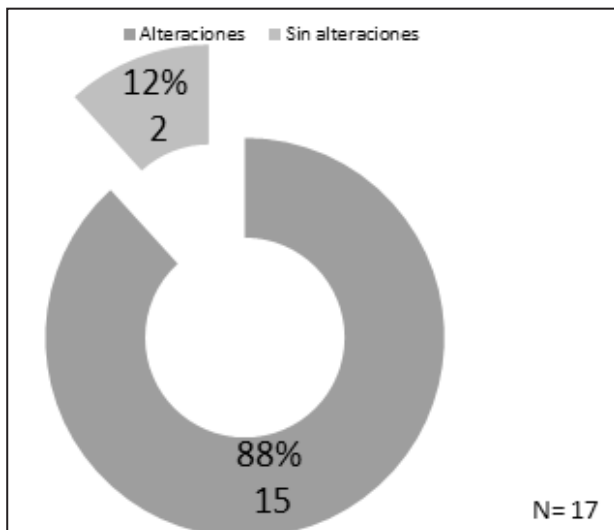


Gráfico 3. Prevalencia de alteraciones genéticas en los genes estudiados de la muestra.

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 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.

Llama la atención el porcentaje alto de alteraciones encontradas en la serie que fue del 88% puesto que de acuerdo a la literatura la obesidad mono-

génica corresponde entre el 5 y 10% de las causas de obesidad.¹⁰⁻¹² Además, los estudios refieren que el gen monogénico más comúnmente asociado con obesidad es el MC4R siendo éste el causante del 3 al 6% de la obesidad.^{13,14}

Resalta el hecho de que la mayoría de las delecciones 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 lo descrito por primera vez.¹⁵ Sin embargo, se conoce por estudios principalmente en ratas, que la delección heterocigótica produce hiperfagia, gasto energético corporal normal e incluso recientes investigaciones 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 al 3% de los sujetos; en estos pacientes no se encontró niveles elevados de leptina.¹⁷ Este estudio encontró delecciones heterocigotas en un 10% de los pacientes con obesidad. Cabe recalcar que éste fue el gen donde se encontró mayor cantidad de duplicaciones sin que su significado clínico sea claro para los autores.

Quizá el gen con el que el presente estudio encontró mayor correlación es el MC4R; como se menciona

anteriormente, la prevalencia 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 poligénica y se ha descrito su herencia dominante en ciertos casos.¹⁸

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

Referencias bibliográficas

- D.M. Nguyen, H.B. El-Serag, The Epidemiology of Obesity. *Gastroenterol Clin N Am* 39 (2010)1-7. doi:10.1016/j.gtc.2009.12.014
- World Health Organization [Internet] Obesity Fact Sheet #311 Updated March 2011. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/> Accesado Abril30, 2012.
- Mutch DM, Clément K, Unraveling the genetics of human obesity. *PLoS Genet* 2(12): e188. doi:10.1371/journal.pgen.0020188.
- 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 Obes-Relat Metab Disord*. 1996;20(6):501-506.
- Stunkard A, 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.
- 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.
- Santos José L, Sistema leptina-melanocortinas en la regulación de la ingesta y el peso corporal. *Rev Méd Chile* 2009; 137: 1225-1234.
- 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.
- 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.
- 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.
- Ranadive SA, Vaisse C. Lessons from extreme human obesity: monogenic disorders. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2008 Sep;37(3):733-51, x.
- Choquet H, Meyre D. Genetics of Obesity: What have we Learned? *Curr Genomics*. 2011 May;12(3):169-79.
- 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.
- Branson R, Potoczna N, Kral JG, Lentos 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.
- 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.
- 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.
- Farooqi IS, Wangenstein 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.
- 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.