

Influencia del polimorfismo -3826 A → G en el gen de la UCP1 sobre los componentes del síndrome metabólico

Influence of the polymorphism 03826 A → G in the UCP1 gene on the components of metabolic syndrome

Ll. Forga¹, M. Corbalán¹, A. Martí², C. Fuentes¹, M.A. Martínez-González³, A. Martínez²

RESUMEN

Fundamento. La proteína desacoplante UCP1 se ha relacionado con el desarrollo y/o mantenimiento de la obesidad a través de su implicación en la regulación del balance energético. El papel de esta proteína mitocondrial en humanos es incierto por la escasa presencia del tejido adiposo pardo en el individuo adulto. El polimorfismo -3826 A/G de la UCP1 solo o conjuntamente con la mutación Trp64Arg del receptor adrenérgico β3 se ha asociado con obesidad, diabetes mellitus y enfermedades relacionadas aunque con resultados contradictorios.

Con objeto de conocer la influencia del polimorfismo -3826 A/G de la UCP1 sobre los componentes clásicos del síndrome metabólico en nuestra población, se han estudiado 159 individuos obesos y 154 en normopeso, con un diseño de casos y controles. A todos ellos se les ha determinado IMC, índice cintura/cadera, % de grasa corporal, TA, perfil lipídico, leptina, glucemia e insulinemia basales. Asimismo se les ha analizado la presencia de la mencionada mutación en el gen de la UCP1.

Resultados. Se obtuvieron diferencias significativas en todas las variables estudiadas entre obesos (casos) y normopeso (controles). Dentro del grupo de obesos, el polimorfismo -3826 A/G del gen de la UCP1 (n=53) se asoció con un mayor IMC (p=0,03), mayor % de grasa corporal (p=0,04) y TA más elevada tanto sistólica (p=0,009) como diastólica (p=0,02). No hubo diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los demás índices evaluados.

Conclusión. El factor fundamental que influye sobre los componentes del síndrome metabólico es la obesidad. No obstante, el polimorfismo -3826 A/G del gen de la UCP1 se asocia con un mayor grado de obesidad y unas cifras más elevadas de TA.

Palabras clave. Polimorfismo -3826 A/G gen UCP1. Síndrome metabólico. Obesidad, Tensión arterial (TA).

An. sis. sanit. Navar. 2003; 26 (2): 231-236.

1. Servicio de Endocrinología. Hospital de Navarra.
2. Dpto. de Nutrición. Universidad de Navarra.
3. Dpto. de Medicina Preventiva. Universidad de Navarra.

Este trabajo ha sido realizado parcialmente a través de un proyecto concedido por el Departamento de Salud del Gobierno de Navarra y con financiación de la Universidad de Navarra (Línea Especial Nutrición-Obesidad).

Aceptado para su publicación el 12 de junio de 2003.

ABSTRACT

Background. The uncoupling protein UCP1 has been related to the development and/or maintenance of obesity through its involvement in regulating energy balance. The role of this mitochondrial protein in humans is uncertain due to the scarce presence of the brown adipose tissue in the adult individual. The polymorphism -3826 A/G of the UCP1 alone or in conjunction with the mutation Trp64Arg of the adrenergic receptor β3 has been associated with obesity, diabetes mellitus and related diseases although with contradictory results.

With the aim of determining the influence of polymorphism -3826 A/G of the UCP1 on the classical components of the metabolic syndrome in our population, we studied 159 obese individuals and 154 of normal weight, with a study design of cases and controls. In all of them Body Mass Index (BMI), hip/waist index, % of body fat, arterial tension (AT), lipidic profile, leptine, basal glucemia and basal insulinemia were determined. Similarly, the presence of the above mentioned mutation of the UCP1 gene was analysed.

Results. Significant differences were obtained in all of the variables studied between obese (cases) and normal weight (controls). Within the obese group, polymorphism -3826 A/G of the UCP1 gene (n=53) was associated with a greater BMI (p=0.03), greater percentage of body fat (p=0.04) and higher AT both systolic (p=0.009) and diastolic (p=0.02). There were no statistically significant differences in any of the other indices evaluated.

Conclusion. The fundamental factor that influences the components of the metabolic syndrome is obesity. However, the polymorphism -3826 A/G of the UCP1 gene is associated with a greater degree of obesity and very high figures of AT.

Key words. Polymorphism -3826 A/G of the UCP1 gene. Metabolic syndrome. Obesity. Arterial tension (AT).

Correspondencia

Dr. Lluís Forga Llenas
Servicio de Endocrinología
Hospital de Navarra
C/ Irunlarrea s/n
31008 Pamplona
Teléfono: 948422037
Fax: 948422038
E-mail: lforga@cfnavarra.es

INTRODUCCION

En fisiología humana, y con respecto al mantenimiento del peso corporal, es deseable la obtención del equilibrio energético¹. Dicho equilibrio o balance existe cuando el gasto energético corporal total iguala la ingesta de energía de la dieta. La termogénesis es uno de los mecanismos implicados en el gasto energético y, a su vez, la familia de las proteínas desacoplantes o UCP participa del proceso de pérdida de energía en forma de calor². Hasta la actualidad se han descrito 5 proteínas desacoplantes (UCP1, UCP2, UCP3, UCP4 y BMCP-1). La UCP1 actúa como un transportador de protones, desacoplando la cadena transportadora de electrones de la fosforilación oxidativa, a través de la membrana mitocondrial interna, evitando así la síntesis de ATP y disipando la energía como calor³.

La localización habitual de la UCP1 en humanos se sitúa en el tejido adiposo pardo que participa así de la termorregulación⁴. No obstante, dada la escasa presencia de dicho tejido adiposo pardo en adultos, la función de la UCP1 es incierta. A pesar de ello, se trata de una proteína candidata a jugar un papel en la aparición de obesidad y metabolopatías asociadas que configuran el síndrome de resistencia insulínica.

El gen de la UCP1 humano fue clonado en 1990 y está localizado en el cromosoma 4, en la región 4q28-q31⁵. Se ha identificado un polimorfismo, resultante del cambio de una adenina por una guanina en la posición -3826 de la región 5' del promotor del gen⁶ que ha sido asociado con obesidad, diabetes mellitus y enfermedades relacionadas⁷.

En el presente trabajo se evalúa la presencia del polimorfismo -3826 A/G en el gen de la UCP1 en una muestra de población de Navarra, obesos y en normopeso, y se analiza su posible relación con la presencia y grado de obesidad así como con las restantes metabolopatías que caracterizan el síndrome metabólico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Población estudiada

Se estudiaron 313 personas con edades comprendidas entre 20 y 60 años. El estu-

dio se basó en un diseño de casos y controles. Los casos (índice de masa corporal: $IMC > 30 \text{ Kg/m}^2$) se reclutaron desde el Servicio de Endocrinología del Hospital de Navarra. Fueron criterios de exclusión: llevar cualquier tipo de tratamiento hormonal, obesidad secundaria a endocrinopatía y enfermedad intercurrente severa. Los sujetos afectados de diabetes mellitus tipo 2 que no llevaban tratamiento farmacológico hipoglucemiante entraron en el estudio, representando el 9% de los casos. Los controles se incluyeron desde el Servicio de Medicina Laboral del mismo hospital y eran individuos sanos, con $IMC < 25 \text{ Kg/m}^2$ y $TA < 130/90$. En total 159 pacientes obesos ($IMC: x=37,6 \pm 5,7 \text{ Kg/m}^2$) y 154 individuos con peso normal ($IMC: x=22,3 \pm 1,8 \text{ Kg/m}^2$) fueron seleccionados.

El estudio fue aprobado por el Comité Ético de la Universidad de Navarra y todos los sujetos dieron su consentimiento informado por escrito antes de su participación. La presente investigación se ha llevado a cabo de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki.

Métodos

Las medidas antropométricas (peso, talla, IMC, índice cintura/cadera -ICC-) y la TA sistólica y diastólica fueron realizadas por procedimientos validados y la masa grasa se midió por impedancia bioeléctrica. Siguiendo un ayuno de 12 horas, se extrajo sangre venosa para medir: glucosa, colesterol total, HDL-colesterol y triglicéridos en plasma por métodos enzimáticos convencionales. El colesterol LDL se calculó a través de la fórmula de Friedewald. La insulina sérica se midió por radioinmunoanálisis y la leptina plasmática por enzoinmunoensayo (EIA-1863).

Se obtuvieron muestras de sangre para la extracción de ADN genómico de los leucocitos. El segmento de DNA conteniendo el gen de la UCP1 fue amplificado por PCR. La PCR se realizó en un volumen de 30 μl que contenía 100 ng/ μl de muestra de ADN, 3 μl de tampón 10X, 0,9 μl de Cl_2Mg , 1,2 μl de solución de dNTPs, 1 μl de cada una de las dos soluciones de cebadores (sentido: 5'-CCAGTGGTGGCTAATGAGAGAA-3'; antisentido: 5'-GCACAAAGAAGAAGCAGA-

GAGG-3'), 0,16 µl de ADN polimerasa y el resto de agua autoclavada. La mezcla se incubó en el termociclador siguiendo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial durante 5 minutos a 95°C, 35 ciclos que comprendieron desnaturalización (30 segundos a 95°C), emparejamiento (25 segundos a 66°C) y extensión (30 segundos a 72°C) finalizando con una extensión durante 10 minutos a 72°C.

La digestión enzimática para generar los fragmentos de restricción se realizó en un volumen final de 20 µl que contenían 10 µl del producto de PCR, 2 µl de tampón, 6 U/µl de BclI y el resto de agua autoclavada. Se incubó la mezcla a 50° C durante 2 horas.

El proceso experimental consiste en la elección de dos cebadores^s que generan un fragmento de 279 pb que contienen la zona correspondiente a la mutación. Este fragmento es digerido con la enzima de restricción BclI que reconoce la secuencia T/GATCA originándose 2 fragmentos (123 y 156 pb) si la secuencia del gen es normal. Cuando se produce la mutación, una base de la zona de restricción cambia (A → G) y la enzima ya no reconoce la diana. Dependiendo de si el individuo es heterocigoto u homocigoto se generarán 3 fragmentos (123, 156 y 279 pb) ó 1 (279 pb) correspondiente a la banda del producto de PCR inicial, respectivamente.

Los fragmentos de restricción generados se visualizan mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio.

Análisis estadístico

Los valores correspondientes a las variables analizadas se expresan como la

media y su intervalo de confianza al 95%. Se consideran diferencias significativas cuando $p < 0,05$ y altamente significativas cuando $p < 0,01$ mediante el test de la t de Student, con las variables ajustadas por edad y sexo.

RESULTADOS

La frecuencia alélica de la variante -3826G en el grupo de los casos (obesos) es 0,19 y en el grupo de controles (normopeso) 0,21, no existiendo diferencias significativas entre ambas (test χ^2 ; $p=0,574$). La prevalencia del genotipo normal entre la población obesa y con normopeso es similar y, en cuanto al genotipo heterocigoto u homocigoto, tampoco existen diferencias entre ambas poblaciones (Tabla 1).

Los casos mostraban valores significativamente más elevados no sólo de IMC, % de grasa corporal e ICC, sino también de TA sistólica y diastólica, glucosa, insulina, leptina, colesterol total, LDL-colesterol y triglicéridos que los controles. Las cifras de HDL-colesterol fueron significativamente menores en casos que en controles (Tabla 2).

Los obesos que presentaban la mutación -3826G en el gen de la UCP1 tenían mayor IMC, % grasa corporal y TA sistólica y diastólica que aquellos otros obesos sin dicha mutación. No hubo diferencias significativas en el resto de los índices evaluados (Tabla 3).

DISCUSIÓN

El síndrome metabólico o síndrome de resistencia insulínica (entre otras denominaciones), se caracteriza por obesidad abdominal, dislipemia aterogénica, hipertensión arterial, resistencia a la insulina

Tabla 1. Frecuencia alélica y prevalencia de la mutación -3826G en el gen de la proteína desacoplante UCP1. Casos: obesos; controles: normopeso.

	Casos (n= 159)	Controles (n= 154)
Frecuencia alélica -3826G	0,19	0,21
Prevalencia (%)		
-3826 A/A	66,7	63,6
-3826 A/G	28,9	31,2
-3826 G/G	4,4	5,2

Tabla 2. Diferencias entre casos (obesos) y controles (normopeso). IC: intervalo de confianza; IMC: índice de masa corporal; ICC: índice cintura/cadera; TAS: Tensión arterial sistólica; TAD: Tensión arterial diastólica.

	<i>Casos (159)</i>		<i>Controles (154)</i>		p
	<i>Media</i>	<i>IC 95%</i>	<i>Media</i>	<i>IC 95%</i>	
IMC	37,6	36,7-38,5	22,3	22-22,6	< 0,001
% GRASA	43,4	42,3-44,6	27,5	26,7-28,3	< 0,001
CC	0,89	0,88-0,9	0,8	0,79-0,80	< 0,001
TAS	138	135-141	111	109-113	< 0,001
TAD	88	86-90	69	68-70	< 0,001
GLUCEMIA mg/dl	101	97-106	92	90-95	0,001
INSULINA pmol/l	148,5	126-171	54,3	49,3-59,2	< 0,001
LEPTINA ng/ml	34,4	29,5-39,3	7,9	6,7-9,1	< 0,001
Colesterol total mg/dl	209	201-212	197	189-201	< 0,05
HDL-colesterol mg/dl	54	50-54	62	62-66	< 0,001
LDL-colesterol mg/dl	131	127-139	120	116-124	< 0,05
Triglicéridos mg/dl	113	104-122	61	60-69	< 0,001

Tabla 3. Diferencias entre pacientes obesos según presentaran o no la mutación -3826G en el gen de la UCP1. IC: intervalo de confianza; IMC: índice de masa corporal; ICC: índice cintura/cadera; TAS: Tensión arterial sistólica; TAD: Tensión arterial diastólica.

	<i>Mutados (53)</i>		<i>No Mutados (106)</i>		p
	<i>Media</i>	<i>IC 95%</i>	<i>Media</i>	<i>IC 95%</i>	
IMC	39	37,4-40,6	36,9	35,8-38	< 0,05
% GRASA	45,1	43,3-46,9	42,6	41,2-44,1	< 0,05
ICC	0,9	0,88-0,92	0,89	0,88-0,90	0,278
TAS	142	137-148	136	132-140	< 0,01
TAD	90	87-93	86,5	84-89	< 0,05
GLUCEMIA mg/dl	103	95-108	101	95-106	0,835
INSULINA pmol/l	151,4	111,8-191	147,1	119-175,2	0,871
LEPTINA ng/ml	34,8	26,8-42,8	34,2	28-40,5	0,958
Colesterol total mg/dl	205	193-216	209	205-216	0,333
HDL-colesterol mg/dl	54	50-54	50	46-54	0,449
LDL-colesterol mg/dl	128	120-139	135	128-143	0,206
Triglicéridos mg/dl	122	104-139	113	104-122	0,354

(con o sin intolerancia a la glucosa) y estados protrombótico y proinflamatorio⁹. En nuestro estudio hemos comprobado que la obesidad “per se” es el principal determinante de las modificaciones metabólicas que caracterizan el síndrome metabólico, puesto que todos los parámetros evaluados eran más aterogénicos en los casos que en los controles.

El polimorfismo -3826 A/G en el gen de la UCP1 se ha asociado con obesidad, diabetes mellitus y enfermedades relaciona-

das e integrantes de dicho síndrome aunque con resultados contradictorios⁷. Además, en adultos humanos, la UCP1 puede ser detectable pero no se puede cuantificar el tejido adiposo pardo que es el lugar donde se expresa de forma exclusiva¹⁰, por lo que su papel es incierto.

Oppert et al⁶ establecieron la relación entre el polimorfismo -3826 en el gen de la UCP1 y la capacidad para ganar peso en individuos canadienses y Clement et al¹¹ hallaron lo mismo en franceses. En cam-

bio, estos resultados no se han reproducido en población danesa¹², holandesa¹³ ni polaca¹⁴. En nuestro trabajo hemos podido observar que esa mutación se acompaña de mayor obesidad y % de grasa corporal, por lo que coincidimos con los primeros autores. Posiblemente características metodológicas diferenciales entre los distintos estudios o aspectos de tipo étnico expliquen las divergencias.

A pesar de que algunos autores opinan que existe una asociación entre el polimorfismo objeto de este estudio y la diabetes mellitus en humanos⁷, la mayoría no hallan modificaciones en los niveles de glucemia, insulinemia ni en la sensibilidad a la insulina^{12,14}. Nosotros coincidimos con estos últimos aunque, dado que excluimos a los diabéticos que estaban en tratamiento farmacológico -para no alterar la determinación de insulina- hemos introducido un sesgo que probablemente justifica la ausencia de relación entre la mutación y los parámetros de tolerancia hidrocarbónica. Por otra parte, a través de estudios en ratones transgénicos¹⁵, se ha observado que la inducción de la expresión de la UCP1 conlleva mayor sensibilidad a la insulina con menores niveles de glucosa e insulina, por lo que, en conjunto, su relación con la diabetes mellitus sigue estando en entredicho.

Mayor acuerdo existe con respecto a la asociación entre el polimorfismo -3826 A/G y la TA, puesto que nuestros resultados consistentes en unas cifras superiores de TA tanto sistólica como diastólica, son acordes con los hallados en el estudio de ratones transgénicos mencionado anteriormente¹⁵ y en el que se obtenía que los ratones que expresaban correctamente UCP1 tenían menor TA.

En cuanto a la dislipemia, no hemos encontrado diferencias en el perfil lipídico entre obesos que presentaban la mutación y aquellos que no la presentaban. Con ello coincidimos con los datos de Urhammer en daneses¹² y diferimos de Kiec-Wilk et al¹⁴ que hallan mayores niveles de triglicéridos y menores de HDL-colesterol en individuos polacos homocigotos para la mutación (G/G) y de Proenza et al¹⁶ que, también en sujetos homocigotos observan incremento

en los niveles de colesterol a medida que aumenta el IMC. Probablemente el carácter homocigoto de sus pacientes frente al mayoritariamente heterocigoto de los nuestros explica las diferencias en los resultados. Curiosamente, en el estudio de ratones transgénicos mencionado anteriormente¹⁵, también se observaban menores niveles de triglicéridos y colesterol total en los ratones con expresión de UCP1.

Es sabido que la obesidad es una enfermedad multifactorial en la que se entremezclan factores genéticos y adquiridos. A su vez, las alteraciones monogénicas que justifican el exceso de peso son raras, por lo que a menudo se estudian asociaciones de polimorfismos que potencien la ganancia ponderal, la dificultad para perder peso o ambas cosas a la vez. En este sentido, desde 1996 se viene hablando de un efecto aditivo del polimorfismo Trp64Arg en el gen del receptor adrenérgico beta-3 y la variante de la región promotora (A/G) del gen UCP1^{8,11,12}. En nuestra serie, sólo 10 pacientes obesos presentaban ambos polimorfismos a la vez y el estudio estadístico practicado no mostraba diferencias, por lo que no hemos incluido los datos del polimorfismo de beta-3 en esta publicación, aunque sí en otra¹⁷.

En conclusión, nuestros resultados indican que el factor fundamental que influye sobre los componentes del síndrome de resistencia insulínica parece estar ligado al propio estado de obesidad. No obstante, el polimorfismo -3826 A/G del gen de la UCP1 también se asocia con la magnitud de alguno de los componentes del síndrome, en concreto, mayor IMC, mayor % de grasa corporal y cifras más elevadas de TA tanto sistólica como diastólica.

BIBLIOGRAFÍA

- MARTÍNEZ JA, MORENO MJ, MARQUES I, MARTI A. Causas de obesidad. An Sist San Navarra 2002; 25, Supl 1: 17-27.
- ARGYROPOULOS G, HARPER ME. Uncoupling proteins and thermoregulation. J Appl Physiol 2002; 92: 2187-2198.
- ARGILES JM, BUSQUETS S, LÓPEZ-SORIANO FJ. The role of uncoupling proteins in

- pathophysiological states. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 293: 1145-1152.
4. KLEIN J, FASSHAUER M, KLEIN HH, BENITO M, KAHN CR. Bioessays news and reviews in molecular, cellular and developmental biology. *Bioessays* 2002; 24: 382-388.
 5. CASSARD-DOULCIER AM, BOUILLAUD F, CHAGNON M, GELLY C, DIONNE FT, OPPERT JM et al. The Bcl I polymorphism of the human uncoupling protein (UCP) gene is due to a point mutation in the 5'-flanking region. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1996; 20: 278-279.
 6. OPPERT JM, VOHL MC, CHAGNON M, DIONNE FT, CASSARD-DOULCIER AM, RICQUIER D et al. DNA polymorphism in the uncoupling protein (UCP) gene and human body fat. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1994; 18: 526-531.
 7. ZIETZ B, WATZLAWEK E, PALITZSCH KD, SCHOLMERICH J, SCHAFFLER A. GG-genotype in the promotor region of uncoupling-protein-1 gene is associated with lower level of dehydroepiandrosterone in type 2 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2001; 109: 102-106.
 8. VALVE R, HEIKKINEN S, RISSANEN A, LAAKSO M, UUSITUPA M. Synergistic effect of polymorphisms in uncoupling protein 1 and beta 3-adrenergic receptor genes on basal metabolic rate in obese Finns. *Diabetologia* 1998; 41: 357-361.
 9. Executive summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001; 285: 2486-2497.
 10. GONZÁLEZ-BARROSO MM, RICQUIER D, CASSARD-DOULCIER AM. The human uncoupling protein-1 gene (UCP1): present status and perspectives in obesity research. *Obes Rev* 2000; 1: 61-72
 11. CLEMENT K, RUIZ J, CASSARD-DOULCIER AM, BOUILLAUD F, RICQUIER D, BASDEVANT A et al. Additive effect of A/G (-3826) variant of the uncoupling protein gene and the trp64arg mutation of the beta-3-adrenergic receptor gene on weight-gain in morbid-obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1996; 20: 1062-1066.
 12. URHAMMER SA, HANSEN T, BORCH-JOHNSEN K, PEDERSEN O. Studies of the synergistic effect of the Trp/Arg64 polymorphism of the b3-adrenergic receptor gene and the -3826 A/G variant of the uncoupling protein-1 gene on features of obesity and insulin resistance in a population-based sample of 379 young Danish subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 3151-3154.
 13. VAN ROSSUM CT, HOEBEE B, SEIDELL JC, BOUCHARD C, VAN BAAK MA, DE GROOT CP et al. Genetic factors as predictors of weight gain in young adult Dutch men and women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002; 26: 517-528.
 14. KIEC-WILK B, WYBRAUSKA I, MALCZEWSKA-MALEC M, LESZCZYUSKA-GOLABEK L, PARTYKA L, NIEDBAL S et al. Correlation of the -3826 A/G polymorphism in the promoter of the uncoupling protein 1 gene with obesity and metabolic disorders in obese families from southern Poland. *J Physiol Pharmacol* 2002; 53: 477-490.
 15. BERNAL-MIZRACHI C, WENG S, LI B, NOLTE LA, FENG C, COLEMAN T et al. Respiratory uncoupling lowers blood pressure through a leptin-dependent mechanism in genetically obese mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 881-883.
 16. PROENZA AM, POISSONET CM, OZATA M, OZEN S, GURAN S, PALOU A et al. Association of sets of alleles of genes encoding beta-3-adrenoreceptor, uncoupling protein 1 and lipoprotein lipase with increased risk of metabolic complications in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; 24: 93-100.
 17. CORBALAN MS, MARTI A, FORGA L, MARTÍNEZ-GONZÁLEZ MA, MARTÍNEZ JA. The risk of obesity and the TRP64ARG polymorphism of the b3-Adrenergic Receptor: Effect modification by age. *Ann Nutr Metab* 2002; 46 (3-4): 152-158.