

Original

Influencia del polimorfismo -866 G/A del gen de la UCP2 en población infantil obesa

R. Zurbano, M. C. Ochoa, M. J. Moreno-Aliaga, J. A. Martínez, miembros de GENOI y A. Marti

Departamento de Fisiología y Nutrición. Universidad de Navarra. Pamplona

Otros miembros de GENOI (Grupo de Estudio Navarro de la obesidad infantil) son Azcona C, Chueca M, Oyarzabal M, Patiño A y Pelach R. España.

Resumen

Objetivo: En el presente estudio se pretende evaluar la prevalencia de la mutación -866 G/A del gen de la UCP2 y conocer su influencia sobre el fenotipo de los niños (11-12 años) navarros obesos.

Antecedentes y ámbito del estudio: La obesidad es una enfermedad de origen multifactorial, que puede estar relacionada con la presencia de mutaciones y polimorfismos en diversos genes candidatos. El gen de la proteína desacoplante UCP2 es uno de los más estudiados en relación con la obesidad porque parece participar en el control de la composición corporal y de diversos procesos metabólicos. Se han descrito tres polimorfismos en este gen: una inserción/delección de 45 nucleótidos, un cambio del nucleótido guanina por adenina en la posición -866 y otro que origina un reemplazo de alanina por valina en el aminoácido 55. Según diferentes estudios, el alelo -866G está relacionado con un mayor riesgo de desarrollar obesidad, aunque en la literatura aparecen resultados contradictorios en cuanto a esta asociación.

Sujetos: El estudio se llevó a cabo en 125 niños (52% varones) obesos de 11-12 años de edad, seleccionados a través de los Servicios de Endocrinología Pediátrica de la Clínica Universitaria y del Hospital Virgen del Camino (Pamplona), obteniendo el consentimiento informado de acuerdo con la declaración de Helsinki.

Intervenciones: Tras verificar el cumplimiento de los criterios de inclusión se tomaron medidas antropométricas (peso, talla, IMC, pliegue tricipital y subescapular) y se determinó el porcentaje de masa grasa por medio de impedancia bioeléctrica. Además se midieron los niveles plasmáticos de colesterol total, glucosa, insulina y leptina.

Correspondencia: Profesor agregado Amelia Marti
Profesor Contratado Doctor
Dpto de Fisiología y Nutrición
C/Irunlarrea s/n
Universidad de Navarra
31080-Pamplona-Navarra (SPAIN)
E-mail: amarti@unav.es

Recibido: 10-V-2005.

Aceptado: 07-VI-2005.

INFLUENCE OF THE -866G/A POLYMORPHISM OF THE UCP2 GENE ON AN OBESE PEDIATRIC POPULATION

Abstract

Objective: In the present study, our objectives were to evaluate the prevalence of -866G/A mutation of UCP2 gene and to study its influence on the phenotype of obese children (11-12 years old) from Navarra.

Background and study setting: Obesity is a disease with a multifactorial origin that may related be to the presence of mutations and polymorphisms in several candidate genes. The gene of the uncoupling protein UCP2 is one of the most studied ones in relation to obesity because it seems to participate in body composition and several metabolic processes control. Three polymorphisms have been described for this gene: an insertion/deletion of 45 nucleotides, a nucleotide change of guanine for adenine in -866 position, an another change that replaces alanine for valine at amino acid position 55. According to several studies, the -866G allele is related to an increased risk of developing obesity, although the results are contradictory about this association in the literature.

Subjects: The study was carried out on 125 obese children (52% male), aged 11-12 years, selected through the Pediatric Endocrinology Departments of Clínica Universitaria and Hospital Virgen del Camino of Pamplona (Spain), the reported results on this association are contradictory.

Interventions: After checking the inclusion criteria, anthropometrical data (weight, height, BMI, tricipital and subscapular skinfolds) were taken, and the percentage of fat mass was measured by bioelectrical impedance. Besides, plasma levels of total cholesterol, glucose, insulin, and leptin were measured. DNA was extracted from white blood cells to determine the genotype by PCR technique followed by *Bst*UI digestion and further visualization in agarose gel with 2% ethidium bromide.

Results: The genetic analysis revealed a 0.404 frequency of the allele A, with a percentage of individuals

na. Se procedió también a la extracción del ADN de las células sanguíneas de la serie blanca para determinar el genotipo mediante la técnica de PCR seguida de una digestión con BstUI y posterior visualización en un gel de agarosa con un 2% de bromuro de etidio.

Resultados: El análisis genético reveló una frecuencia del alelo A de 0,404, con un porcentaje de individuos G/G, G/A, y A/A del 40,0%, 39,2% y 20,8%, respectivamente. Los portadores del alelo A presentaron un valor significativamente mayor de la suma de los pliegues tricípital y subescapular ($p=0,034$). No se observaron diferencias significativas entre los sujetos mutados y los no mutados en cuanto a las variables bioquímicas estudiadas.

Conclusiones: Los sujetos portadores del polimorfismo presentan valores más altos para los pliegues tricípital y subescapular frente a los no mutados lo que podría indicar una relación entre la presencia del alelo A en niños obesos y niveles mayores de grasa subcutánea.

(*Nutr Hosp.* 2006;21:52-6)

Palabras clave: *Obesidad. Polimorfismo -866 G/A, UCP2.*

Introducción

La obesidad es un trastorno metabólico crónico caracterizado por una excesiva acumulación de energía en forma de grasa en el organismo, que conlleva un aumento del peso corporal con respecto al valor esperado según sexo, talla y edad¹. Diversos estudios epidemiológicos revelan que existe una asociación entre obesidad y tasa de mortalidad², de tal manera que a medida que aumenta el índice de masa corporal (IMC) aumenta el riesgo de padecer otras patologías como diabetes, enfermedad cardiovascular, cáncer, etc.

La obesidad infantil además de compartir complicaciones con la obesidad en el adulto puede tener repercusiones específicas, tanto médicas como psicológicas (trastornos en el desarrollo puberal, problemas dermatológicos, repercusiones en la función pulmonar, repercusión en el desarrollo psicológico y adaptación social) debidas a la peculiar etapa de crecimiento y desarrollo en la que se encuentra el niño y el adolescente. Además, en algunos países la prevalencia de la obesidad se ha duplicado en adultos y niños y triplicado en adolescentes en las dos últimas décadas³.

Los factores que determinan el incremento del peso corporal y, por tanto, el riesgo de obesidad son tanto factores genéticos como los ambientales, relacionados con el estilo de vida^{4,7}. La parte más compleja del estudio de la obesidad se refiere a la investigación de los factores genéticos implicados, ya que resulta difícil separar la contribución genética de los factores ambientales⁸. La proteína desacoplante 2 (UCP2) es uno de los genes candidatos estudiados en relación a la obesidad. Pertenece a la familia de proteínas desacoplantes, que se localizan en la membrana mitocondrial interna. Esta proteína de 309 aminoácidos se encuen-

G/G, G/A, and A/A of 40.0%, 39.2%, and 20.8%, respectively. Carriers of the A allele had a significantly higher sum of tricípital and subscapular folds ($p = 0.034$). No significant differences between mutant and non-mutant subjects with regard to the studied biochemical variables were observed.

Conclusions: Subjects carrying the polymorphism present higher values of tricípital and subscapular skinfolds as compared to non-mutant subjects, which may indicate a relationship between the presence of the A allele in obese children and higher amounts of subcutaneous fat.

(*Nutr Hosp.* 2006;21:52-6)

Key words: *Obesity. -866G/A polymorphism. UCP2.*

tra ampliamente expresada en: tejido adiposo, músculo, y órganos linfoides. Se ha postulado una función termogénica para esta proteína, que pudiera actuar disipando el gradiente de protones de la cadena de transporte electrónico⁹ en forma de calor, aunque la función fisiológica de la UCP2 es todavía tema de debate e investigación¹⁰.

Diversos estudios sobre la UCP2 en sujetos obesos, controles o con síndromes metabólicos en poblaciones de diferentes orígenes: americanos, japoneses, indios Pima, etc, han permitido, hasta el momento, identificar una serie de variantes o mutaciones en la secuencia del gen de la UCP2. Las variantes genéticas más estudiadas son un cambio que origina el reemplazo de una alanina por una valina en el aminoácido 55 del exón 4 (Ala55Val) asociada en algunos estudios a un menor gasto energético y a un aumento del coeficiente respiratorio¹¹, la inserción/delección de 45 nucleótidos en el exón 8 asociada a un mayor riesgo de obesidad, según un estudio reciente¹² y el cambio del nucleótido guanina por adenina en la posición -866 de la región del promotor (-866 G/A). Existen diversos estudios¹³⁻¹⁹ que indican una asociación entre el polimorfismo -866 G/A, la diabetes tipo 2 y el IMC (tabla I). La existencia de resultados contradictorios entre los diferentes estudios indica la necesidad de nuevos trabajos. Este estudio tiene por objeto evaluar la prevalencia de la mutación -866 G/A del gen de la UCP2 y conocer su influencia sobre el fenotipo de niños obesos de Navarra.

Material y métodos

El estudio se llevó a cabo en 125 niños, de unos 11 años de edad y con un IMC superior al percentil 97 según las tablas de referencia de Sobradillo y cols.^{20,21},

Tabla I
Efecto del polimorfismo -866 G/A de la UCP2 en humanos (modificado de Ochoa MC et al, 2004)

Población	Efecto	Significación	Referencia
Caucásicos	Menor IMC	p < 0,05	13
Obesos no diabéticos	Diferencias en la función de células beta	p < 0,05	14
Italianos no diabéticos	Variación secreción insulina	p < 0,05	15
Mujeres	Diabetes tipo 2	p < 0,05	16
Italianos adultos	Obesidad	Sin asociación	17
Daneses obesos, control	Obesidad	Sin asociación	18
Caucásicos de Italia	Riesgo reducido de diabetes tipo 2	p < 0,05	19

seleccionados a través del Servicio de Endocrinología Pediátrica de la Clínica Universitaria y del Hospital Virgen del Camino (Pamplona). Se obtuvo el consentimiento informado de acuerdo con la declaración de Helsinki. Se tomaron medidas antropométricas (peso, talla, IMC, pliegue tricípital, subescapular, diámetro de perímetro cintura y cadera y perímetro braquial), además de medir el porcentaje de grasa corporal mediante impedancia bioeléctrica para poder caracterizarlos correctamente (TBF-410, TANITA®, Tokio, Japón). Se midieron los niveles plasmáticos de colesterol total, así como los niveles de glucosa, insulina y leptina. Se calcularon los índices QUICKI y HOMA, a partir de los niveles de insulina y glucosa basales, para valorar la tolerancia a glucosa (QUICKI) y resistencia a insulina (HOMA) de los sujetos.

El análisis de las muestras de ADN genómico obtenido de las células de la serie blanca de la sangre se realizó mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa seguido de una digestión con enzimas de restricción (PCR-RFLP) descrita en la literatura¹⁵. El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS

para Windows versión 11.0, utilizando los test de t-student y ANOVA para variables de distribución normal y U de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis para las de distribución no normal. Las diferencias de frecuencias se analizaron por medio del test de Chi-cuadrado.

Resultados

La muestra estudiada estaba formada por niños de 11 años (± 6 meses) y un IMC medio de $28,5 \pm 0,5$ kg/m² para los varones y $27,2 \pm 0,6$ kg/m² para las niñas (p = 0,120). Como era de esperar, las niñas presentaron mayor porcentaje de masa grasa (p = 0,003).

No se observaron, diferencias significativas entre ambos sexos en ninguno de los parámetros bioquímicos estudiados, aunque las diferencias en los niveles de leptina se acercaron a la significación estadística, siendo para las chicas de $41,6 \pm 2,9$ mU/ml y para los chicos de $35,0 \pm 2,2$ ng/mL.

El análisis genético para la mutación -866 G/A en el gen de la UCP2 en los sujetos estudiados, reveló una frecuencia del alelo A de 0,404, con un porcentaje

Tabla II
Parámetros antropométricos y bioquímicos de la población infantil obesa según la presencia del polimorfismo -866 G/A

	No Mutados (n=50)		Mutados (n=75)		p
	Media	SEM	Media	SEM	
Peso (kg)	62,82	3,48	68,31	2,28	0,215
Talla (m)	1,47	0,03	1,54	0,01	0,108
IMC (Kg/m ²)	27,57	0,74	28,41	0,55	0,804
% de masa grasa	36,47	1,01	35,86	0,93	0,684
Pliegue tricípital (PT, mm)	24,04	0,78	25,21	0,63	0,179
Pliegue subescapular (PS, mm)	23,79	1,24	27,05	0,91	0,056
Suma PT y PS (mm)	48,10	1,72	52,02	1,26	0,034
Glucosa (mg/dL)	88,17	0,07	89,74	0,05	0,695
Insulina (mU/mL)	17,34	9,76	17,26	7,74	0,773
Leptina (ng/mL)	36,57	2,90	39,26	2,35	0,469
Colesterol (mg/dL)	162,07	0,12	162,41	0,09	0,897
HOMA	3,77	0,35	3,84	0,29	0,801
QUICKI	0,323	0,00	0,322	0,00	0,825

HOMA= Índice de resistencia a insulina; QUICKI= Índice de tolerancia a glucosa

Tabla III
 Datos de la frecuencia del alelo A en la posición -866 G/A del gen de la UCP2 según la literatura

Tipo	Población	Número	Frecuencia alélica	Referencia
Varones daneses obesos		749	0,400	18
Italianos no diabéticos		301	0,322	15
Italianos obesos		122	0,282	17
Italianos obesos extremos		76	0,349	17
Italianos no obesos		374	0,290	17
Alemanes obesos y no diabéticos		39	0,333	14
Alemanes con diabetes tipo 2		201	0,413	14
Alemanes		791	0,375	13

de individuos G/G, G/A, y A/A del 40%, 39% y 21% respectivamente. La mutación se repartió de forma similar entre ambos sexos.

No se observaron diferencias significativas en ninguna de las medidas antropométricas entre individuos mutados y no mutados, aunque se pudo observar un aumento ligeramente significativo ($p = 0,056$) del pliegue subescapular en los sujetos mutados (tabla II). Además, la suma de los pliegues tricípital y subescapular dio un valor estadísticamente significativo ($p = 0,034$), siendo $48,1 \pm 1,7$ mm para los no mutados y $52,0 \pm 1,3$ mm para los mutados. El análisis bioquímico no reveló diferencias significativas entre individuos portadores de la mutación y no portadores (tabla II).

Discusión

En los últimos años se han realizado numerosos estudios sobre las variantes genéticas de la UCP2 y su contribución a la obesidad, aunque es mucho lo que falta por elucidar^{22,24}. Este proyecto es quizá el primer estudio que examina la prevalencia del polimorfismo -866 G/A de la UCP2 en niños obesos españoles.

La frecuencia del alelo A fue de 0,404 en los niños obesos. Esta prevalencia está en el rango de la señalada en otras poblaciones adultas europeas (tabla III). En concreto, los valores de frecuencia de este alelo se aproximan a los publicados para subpoblaciones alemanas y danesas 0,413, 0,375 y 0,400^{13,14,18}, siendo ligeramente superiores a los descritos en subpoblaciones italianas^{15,17}. Además, el porcentaje de individuos homocigóticos en nuestra muestra fue del 20%, similar al observado en una población danesa¹⁸, con un valor del 18%.

El análisis de los sujetos mutados indica que la distribución del polimorfismo fue similar en niños y en niñas. El estudio de los parámetros bioquímicos no reveló diferencias significativas con respecto al polimorfismo -866 G/A. En cuanto a los índices antropométricos, el estudio no mostró diferencias significativas según la presencia de la mutación -866 G/A (homocigotos, heterocigotos y no mutados). Los individuos homocigotos G/G son los que presentaron

un IMC ligeramente menor (datos no mostrados), a diferencia de lo observado en una subpoblación alemana¹³, en la que los sujetos homocigotos A/A presentaban el menor IMC.

Sin embargo, la suma de los pliegues tricípital y subescapular mostró una diferencia estadísticamente significativa entre los sujetos mutados y no mutados ($p = 0,034$). Este dato podría indicar que los niños portadores de la mutación poseen un mayor porcentaje de masa grasa subcutánea que los no mutados, ya que los pliegues sirven para predecir la grasa corporal y, en particular, la grasa subcutánea.

En conclusión, la mutación -866 G/A del gen UCP2 en la población infantil estudiada no parece estar relacionada con la obesidad considerada como un aumento de todos los depósitos grasos, aunque podría tener un papel en la distribución de la grasa corporal, favoreciendo el crecimiento de los depósitos grasos subcutáneos.

Agradecimiento

Los autores del trabajo desean agradecer al Gobierno de Navarra y a la Línea Especial de Nutrición y Obesidad de la Universidad de Navarra la financiación para este estudio.

Bibliografía

1. Pi-Sunyer FX: Obesity: criteria and classification. *Proc Nutr Soc* 2000;59:505-9.
2. Stevens J, Cai J, Pamuk ER, Williamsom DF, Thun MJ, Wood JL: The effect of age on the association between body-mass index and mortality. *N Engl J Med*. 1998;338:1-7.
3. Bassett MT, Perl S. Obesity: The Public Health Challenge of Our Time. *Am J Public Health*. 2004;94:477.
4. Perusse L, Rankinen T, Zuberi A, et al.: The human obesity gene map: the 2004 update. *Obes Res* 2005;13:381-490.
5. Schwartz MW, Baskin DG, Kaiyala KJ, Woods SC: Model for the regulation of energy balance and adiposity by the central nervous system. *Am J Clin Nutr* 1999;69:584-96.
6. Moreno-Aliaga MJ, Santos JL, Marti A, Martinez JA: Does weight loss prognosis depends on genetic make-up? *Obes Rev* 2005;6:155-168.
7. Alonso A, Marti A, Corbalán MS, Martínez-González MA, Martínez JA: Association of UCP3 gene 55C>T polymorphism and obesity in a Spanish population: a case-control study. *Ann Nutr Metab* 2005;49:183-8.

8. Internacional-Human-Genome-Consortium. Initial sequencing and análisis of the human genome. *Nature* 2001;409:860-922.
9. Nagy TR, Blaylock ML, Garvey WT: Role of UCP2 and UCP3 in nutrition and obesity. *Nutrition* 2004;20:139-144.
10. Le Fur S, Le Stunff C, Dos Santos C, Bougnères P: The common -866 G/A polymorphism in the promoter of uncoupling protein 2 is associated with increased carbohydrate and decreased lipid oxidation in juvenile obesity. *Diabetes* 2004;53:235-9.
11. Ukkola O, Tremblay A, Sun G, Chagnon YC, Bouchard C: Genetic variation at the uncoupling protein 1, 2 and 3 loci and the response to long-term overfeeding. *Eur J Clin Nutr* 2001;55:1008-15.
12. Marti A, Corbalán MS, Forga L, Martínez-González MA, Martínez JA: Higher obesity risk associated with the exon-8 insertion of the UCP2 gene in a Spanish case-control study. *Nutrition* 2004;20:498-501.
13. Esterbauer H, Schneitler C, Oberkofler H, et al.: A common polymorphism in the promoter of UCP2 is associated with decreased risk of obesity in middle-aged humans. *Nat Genet* 2001;28:178-83.
14. Krempler F, Esterbauer H, Weitgasser R, et al.: A functional polymorphism in the promoter of UCP2 enhances obesity risk but reduces type 2 diabetes risk in obese middle-aged humans. *Diabetes* 2002;51:3331-5.
15. Sesti G, Gardenilli M, Marini MA, et al.: A common polymorphism in the promoter of UCP2 contributes to the variation in insulin secretion in glucose-tolerant subjects. *Diabetes* 2003;52:1280-3.
16. D'Adamo M, Perego L, Cardellini M, et al.: The -866 A/A genotype in the promoter of the human uncoupling protein 2 gene is associated with insulin resistance and increased risk of type 2 diabetes. *Diabetes* 2004;53:1905-10.
17. Mancini FP, Sabatino L, Colantuoni V, et al.: Variants of uncoupling protein-2 gene and obesity: interaction with peroxisome proliferator-activated receptor γ 2. *Clin Endocrinol* 2003;59:817-22.
18. Dalgaard LT, Andersen G, Larsen LH, et al.: Mutational analysis of the UCP2 core promoter and relationships of variants with obesity. *Obes Res*. 2003;11: 1420-1427.
19. Bulotta A, Ludovico O, Coco A, et al.: The common -866 G/A polymorphism in the promoter region of the UCP-2 gene is associated with reduced risk of type 2 diabetes in Caucasians from Italy. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:1176-1180.
20. Sobradillo B, Aguirre A, Arsti U, Bilbao A, Fernández-Ramos C, Lizárraga A, Lorenzo H, et al.: 2004. Curvas y Tablas de crecimiento (estudios longitudinal y transversal). Instituto de Investigación sobre Crecimiento y Desarrollo. (Bilbao. Fundación Faustino Orbegozo Eizaguirre).
21. Ochoa MC, Marti A, Azcona C, Chueca M, Oyarzabal M, Pelach R, Patino A, Moreno-Aliaga MJ, Martínez-González MA, Martínez JA: Gene-gene interaction between PPAR γ 2 and ADR β 3 increases obesity risk in children and adolescents. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004, 28: S37-S41.
22. Ochoa MC, Marti A, Martínez JA: Estudios sobre la obesidad en genes candidatos. *Med Clin (Barc)* 2004;122:542-51.
23. Marti, A., Moreno-Aliaga, MJ, Hebebrand, J, Martínez, JA: Genes, lifestyles and obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004, 28: S29-S36.
24. Marti A, Moreno-Aliaga MJ, Zulet A, Martínez JA: Advances in molecular nutrition: nutrigenomics and/or nutrigenetics. *Nutr Hosp* 2005;20:157-64.