

Genes de obesidad y técnicas para estudiarlos

Mendieta Zerón Hugo, PhD
Centro de Investigación en Ciencias Médicas,
Universidad Autónoma del Estado de México.
E.mail: mezh_74@yahoo.com

RESUMEN

El problema de obesidad en el mundo está lejos de resolverse y dentro de las múltiples teorías para explicar su expansión se ha expuesto que existirían genes que predisponen a esta patología. Hasta ahora queda claro que, salvo algunas enfermedades claramente monogénicas que ocasionan obesidad, son relativamente pocos los genes candidatos con suficiente poder en los estudios publicados, que tendrían alguna implicación en el incremento en la prevalencia de la obesidad.

En este trabajo expongo algunos de los genes que muestran mayor asociación con la obesidad, así como las técnicas de biología molecular que se pueden emplear para su análisis y un modelo de estudio en ratas.

Palabras clave: alimentación neonatal, genes de obesidad, leptina, obesidad.

1. Introducción

El aumento en la prevalencia de obesidad entre los niños es particularmente alarmante debido a enfermedades que antes eran muy poco comunes en este grupo, incluyendo apnea del sueño, hígado graso no alcohólico (EHNA) con cirrosis resultante, diabetes mellitus tipo 2 (DM2), etc.(1;2;3;4) La gran mayoría de los factores genéticos que afectan el peso corporal lo suficiente para causar la obesidad, se expresan sólo con la coexistencia de condiciones ambientales específicas.(5)

Prácticamente todas las causas genéticas conocidas de obesidad tienden a aumentar la ingesta. Esto sucede en síndromes genéticos pleiotrópicos como en el síndrome de Prader-Willi (PWS), síndrome de Bardet-Biedl (BBS), osteodistrofia hereditaria tipo Albright (AHO) y pseudohipoparatiroidismo tipo 1a (PHP1A).(6)

Por otra parte, los genes que regulan la vía de señalización de la leptina son particularmente importantes para la homeostasis energética.(5) De hecho, uno de los mayores avances en la ciencia la obesidad en los últimos 15 años ha sido la dilucidación de la vía de señalización de la leptina, pues las mutaciones que afectan estos genes pueden ser responsables de tanto como el 3 o 4% de la obesidad severa, de inicio precoz.(5)

Las mutaciones en los genes de la leptina y el receptor de leptina (OB y el PP), las mutaciones en el gen propio melanocortina (POMC), en el receptor de melanocortina-4 (MC4R) y en la prohormona convertasa (PC1) afectan a la regulación del apetito y conducen a la obesidad severa de inicio temprano debido a hiperfagia.(7) En este sentido, las mutaciones de MC4R son las más comunes que ocasionan obesidad severa de inicio temprano.(8)

La proteína desacopladora tipo 2 (UCP-2), localizada en la membrana mitocondrial interna se expresa en una amplia variedad de tejidos, por ejemplo en el tejido adiposo, músculo esquelético e islotes pancreáticos. La función de la UCP-2 es tejido-dependiente, y sus posibles funciones incluyen la regulación del metabolismo de la grasa directa e indirectamente, por ejemplo, a través de efectos sobre la secreción de insulina.(9) La variación genética en el gen de la UCP-2 puede actuar como un modificador de los niveles de lípidos séricos y los índices de obesidad abdominal, y por lo tanto puede también contribuir a las alteraciones metabólicas observadas en la obesidad y la DM2.(9)

El tejido adiposo visceral expresa de manera abundante genes que codifican sustancias bioactivas como citoquinas, factores de crecimiento y complemento.(10) Unos genes con gran potencial de repercusión clínica serían los involucrados en la diferenciación adipocitaria, tales como: receptor gamma activado por la proliferación de los peroxisomas (PPAR), enhancer-binding protein alpha (Cebpa), Klf6, Egr2,

Genes de obesidad y técnicas

Gata2, etc.(11;12) Además, los polimorfismos de nucleótido único (SNPs) de varios genes y regiones cromosómicas se han asociado con el peso y composición corporal.(13;14)

2. Condicionamiento de genes de obesidad en la etapa prenatal

Datos epidemiológicos y estudios experimentales en animales sugieren que las adaptaciones nutricionales fetales y postnatales tempranas persisten y están presentes en adultos aún en ausencia del estímulo de estrés que las hayan iniciado.(15) Esto se explica, en parte, porque los períodos tempranos de la vida corresponden en gran parte al período de la diferenciación neuronal y de la maduración del sistema nervioso central (SNC) por lo que la nutrición perinatal tiene una influencia crítica en el desarrollo y la regulación de vías y redes involucradas en la regulación de la homeostasis energética.

La mayoría de los experimentos han estudiado los aspectos cuantitativos de la sobre nutrición a través de la manipulación del tamaño de camada(16) o la restricción del alimento.(17) Por ejemplo, se ha estudiado que las ratas que crecen en camadas pequeñas ganan más masa que las ratas que crecen en camadas normales y mantienen estos fenotipos en la edad adulta, por el contrario, las ratas que crecen en camadas grandes muestran retraso en el crecimiento y en masa.(18;19) fenotipos en la edad adulta, por el contrario, las ratas que crecen en camadas grandes muestran retraso en el crecimiento y en masa.(18;19)

3. Modelo de sobre nutrición neonatal

Se utilizan ratas de la raza Sprague-Dawley. Los animales, una vez que llegan al laboratorio, se estabulan a temperatura constante y son sometidos a un período de luz y oscuridad de 12 h (8:00 - 20:00); con libre acceso a comida y bebida.

En las primeras 48 h de vida, las crías de varias madres de ratas Sprague-Dawley son mezcladas al azar y divididas en dos grupos: 1) camadas pequeñas (SL, 4 crías, sobrealimentación neonatal) y 2) camadas normales (NL, 12 crías, tasa de ingesta normal).

Se separan a las crías de 24 días en grupos de alimentación con dieta de alto contenido graso [High Fat Diet (HF), 45 kcal % grasa, 35 kcal % carbohidratos y 20 kcal % proteínas; 4.73 kcal/g], y bajo contenido graso [Low Fat Diet (LF), 10 kcal % de grasa, 70 kcal % carbohidratos y 20 kcal % proteínas; 3.85 kcal/g] (Diet Research, N.Y., USA.), continuando su desarrollo hasta el día 90.

Al final del período de estudio, los animales se someten a eutanasia por decapitación. Los tejidos una vez extraídos se congelan en un recipiente aislante con nitrógeno líquido y los cerebros en hielo seco. Las muestras se almacenan a -80°C hasta su procesamiento.

3. ¿Cómo analizar la expresión de genes asociados a obesidad?

Algunas de las técnicas de biología molecular de mayor uso para el estudio de la expresión de genes son:

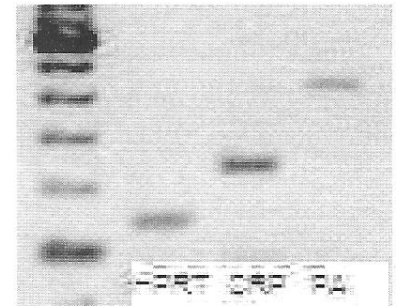
- *Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)
- *Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR)(20)
- *Microarray(21)
- *Genome-wide association (GWA)(22;23)

3.1. Reacción en cadena de polimerasa (PCR)

Una vez extraído el ácido ribonucleico (ARN) del tejido de interés, por medio de TRizol® LS (Invitrogen, Carlsbad, CA), se procede a la reversotranscripción (RT) en un termociclador. Una vez concluida la RT, se cuantifica la expresión de genes asociados a obesidad en con oligos diseñados en algún programa para este fin como "Primer 3" a partir de secuencias corroboradas en GenBank.

Por medio de electroforesis se puede verificar la expresión de los genes de interés (Figura 1).

Figura 1. Gel de electroforesis de expresión de genes en tejido adiposo visceral de rata.
HPRT: Hipoxantina fosforribosil transferasa (gen constitutivo).
CRP: proteína C reactiva
PAI: Inhibidor del activador del plasminógeno.



3.2. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR)

Existen diferentes modelos para RT-PCR, en el CICMED contamos con los modelos 1.5 LightCycler (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany), y el ABI740 de Applied. Con estos equipos podemos cuantificar la amplificación de genes de interés (Figura 2).

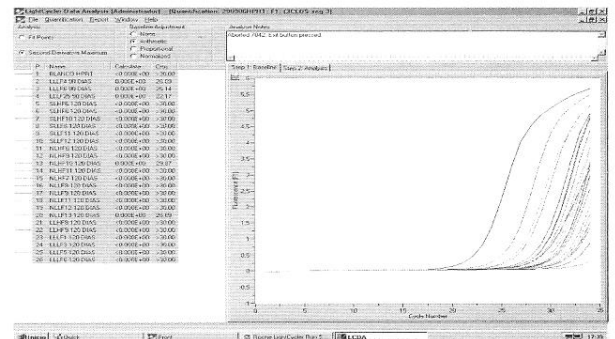


Figura 2. Gráfica de amplificación de genes en equipo de RT-PCR Light Cycler (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany).

Genes de obesidad y técnicas

3.3. Microarray

Se extrae ARNm por homogenización usando TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las muestras son purificadas usando el RNeasy Lipid Tissue Mini kit (Qiagen, Valencia, CA) y tratadas con DNase (RNase-free DNase Set, Qiagen) para eliminar cualquier traza de DNA genómico. La calidad del ARN es evaluada midiendo la tasa de absorbancia de 260:280 nm, con electroforesis de gel de agarosa y con el equipo "2100 Agilent Bioanalyzer" (Agilent Technologies, Palo Alto, CA).

El análisis de expresión génica en muestras del modelo de sobrealimentación neonatal que expongo se puede efectuar usando el "Agilent Whole Mouse Rat Genome array" (G4131F, Agilent Technologies), representando aproximadamente 44000 genes y transcritos de rata.

Brevemente, un microgramo de ARN total de cada muestra es marcado con aminoallyl y amplificado usando el "Amino Allyl MessageAmp II aRNA Amplification Kit" (Ambion, Austin, TX).

Alícuotas (1.2 µg) de ARN amplificado son marcados con fluorescencia usando Cy3/Cy5 (Amersham, Buckinghamshire, UK) y posteriormente apropiadamente combinados e hibridados sobre Aginet oligomicroarrays de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Las hibridaciones son hechas usando un diseño de referencia, donde las muestras de control son pools de ARN de muestras individuales.

Después de lavadas, las placas de microarrays son escaneadas y la cuantificación de las imágenes se efectúa con el software asociado GenePix Pro 6.0.

Los datos de expresión génica de todos los experimentos por replicado se analizan con GeneSpring GX software v 7.3.1 (Agilent Technologies).

El clustering es determinado con el Gene and Condition Tree algorithms. Además se usan el Gene Ontology groupings, GenMapp software y la página web KEGG en conjunto con GeneSpring para identificar vías y grupos funcionales de genes.

Al hacer el análisis de 44000 genes por microarray se encuentra una mayor expresión de genes involucrados en crecimiento celular, oncogénesis y metabolismo lipídico en las ratas SL alimentadas con HF.

Estos resultados indican que HF induce cambios notorios en NL que no se observan en SL, como si las ratas SL ya estuvieran programadas y no respondieran al estímulo de la dieta.

Leptina y el gen 1 expresado de macrófago fueron unos de los genes con claras diferencias entre SLHF y SLLF. Estos datos sugieren que el fenotipo obeso podría presentar alteraciones en genes proinflamatorios (Figura 3A y 3B).

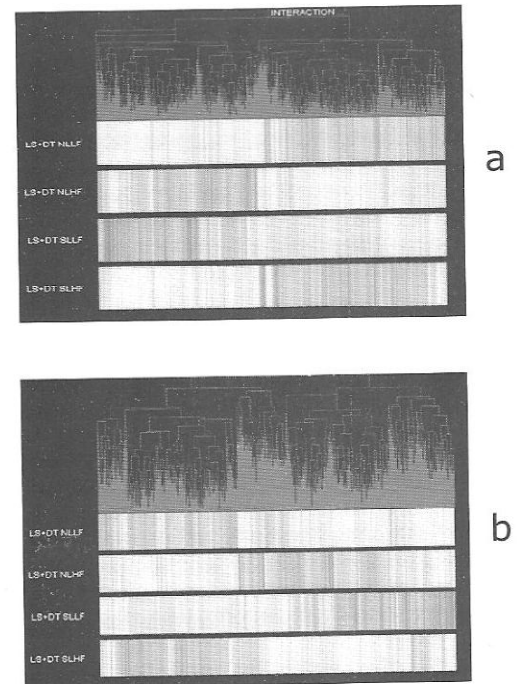


Figura 3. Análisis de expresión génica por microarray de ratas sometidas a programming y dieta. A) Efecto global de la dieta. B) Efecto del tamaño de la camada.

Bibliografía

1. Muzumdar H, Rao M. Pulmonary dysfunction and sleep apnea in morbid obesity. *En Pediatr. Endocrinol Rev* Vol. 3 Suppl 4 Núm. 2006, pp. 579-583.
2. Ogden CL, Yanovski SZ, Carroll MD, et al. The epidemiology of obesity. *En Gastroenterology* Vol. 132 Núm. 6, 2007, pp. 2087-2102.
3. Molleston JP, White F, Teckman J, et al. Obese children with steatohepatitis can develop cirrhosis in childhood. *En Am. J Gastroenterol.* Vol. 97 Núm. 9, 2002, pp. 2460-2462.
4. Dabelea D, Bell RA, D'Agostino RB, Jr., et al. Incidence of diabetes in youth in the United States. *En JAMA* Vol. 297 Núm. 24, 2007, pp. 2716-2724.
5. Crocker MK, Yanovski JA. Pediatric obesity: etiology and

- treatment. En *Endocrinol Metab Clin.North Am.* Vol. 38 Núm. 3, 2009, pp. 525-548.
- 6.Kousta E, Hadjiathanasiou CG, Tolis G, et al. Pleiotropic genetic syndromes with developmental abnormalities associated with obesity. En *J Pediatr.Endocrinol Metab* Vol. 22 Núm. 7, 2009, pp. 581-592.
- 7.Farooqi S , O'Rahilly S. Genetics of obesity in humans. En *Endocr.Rev* Vol. 27 Núm. 7, 2006, pp. 710-718.
- 8.Farooqi IS, Yeo GS, Keogh JM, et al. Dominant and recessive inheritance of morbid obesity associated with melanocortin 4 receptor deficiency. En *J Clin.Invest* Vol. 106 Núm. 2, 2000, pp. 271-279.
- 9.Salopuro T, Pulkkinen L, Lindstrom J, et al. Variation in the UCP2 and UCP3 genes associates with abdominal obesity and serum lipids: the Finnish Diabetes Prevention Study. En *BMC.Med Genet.* Vol. 10 Núm. 2009, pp. 94.
- 10.Matsuzawa Y. Establishment of a concept of visceral fat syndrome and discovery of adiponectin. En *Proc.Jpn.Acad.Ser.B Phys.Biol.Sci.* Vol. 86 Núm. 2, 2010, pp. 131-141.
- 11.Kim Y , Park T. DNA microarrays to define and search for genes associated with obesity. En *Biotechnol.J* Vol. 5 Núm. 1, 2010, pp. 99-112.
- 12.Prokesch A, Hackl H, Hakim-Weber R, et al. Novel insights into adipogenesis from omics data. En *Curr.Med Chem.* Vol. 16 Núm. 23, 2009, pp. 2952-2964.
- 13.Almen MS, Jacobsson JA, Shaik JH, et al. The obesity gene, TMEM18, is of ancient origin, found in majority of neuronal cells in all major brain regions and associated with obesity in severely obese children. En *BMC.Med Genet.* Vol. 11 Núm. 2010, pp. 58.
- 14.Joffe YT, van der ML, Carstens M, et al. Tumor necrosis factor-alpha gene -308 G/A polymorphism modulates the relationship between dietary fat intake, serum lipids, and obesity risk in black South African women. En *J Nutr* Vol. 140 Núm. 5, 2010, pp. 901-907.
- 15.Lucas A. Programming by early nutrition: an experimental approach. En *J Nutr* Vol. 128 Núm. 2 Suppl, 1998, pp. 401S-406S.
- 16.Plagemann A, Heidrich I, Gotz F, et al. Obesity and enhanced diabetes and cardiovascular risk in adult rats due to early postnatal overfeeding. En *Exp.Clin.Endocrinol* Vol. 99 Núm. 3, 1992, pp. 154-158.
- 17.Huizinga CT, Oudejans CB, Delemarre-van de Waal HA. Persistent changes in somatostatin and neuropeptide Y mRNA levels but not in growth hormone-releasing hormone mRNA levels in adult rats after intrauterine growth retardation.
- 18.Knittle JL , Hirsch J. Effect of early nutrition on the development of rat epididymal fat pads: cellularity and metabolism. En *J Clin.Invest* Vol. 47 Núm. 9, 1968, pp. 2091-2098.
- 19.Miller DS , Parsonage SR. The effect of litter size on subsequent energy utilization. En *Proc.Nutr Soc.* Vol. 31 Núm. 1, 1972, pp. 30A-31A.
- 20.Elam MB, Yellaturu C, Howell GE, et al. Dysregulation of sterol regulatory element binding protein-1c in livers of morbidly obese women is associated with altered suppressor of cytokine signaling-3 and signal transducer and activator of transcription-1 signaling.
- 21.MacLaren RE, Cui W, Lu H, et al. Association of adipocyte genes with ASP expression: a microarray analysis of subcutaneous and omental adipose tissue in morbidly obese subjects. En *BMC.Med Genomics* Vol. 3 Núm. 2010, pp. 3.
- 22.Cheung CY, Tso AW, Cheung BM, et al. Obesity susceptibility genetic variants identified from recent genome-wide association studies: implications in a chinese population. En *J Clin.Endocrinol Metab* Vol. 95 Núm. 3, 2010, pp. 1395-1403.
- 23.Ragvin A, Moro E, Fredman D, et al. Long-range gene regulation links genomic type 2 diabetes and obesity risk regions to HHEX, SOX4, and IRX3. En *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* Vol. 107 Núm. 2, 2010, pp. 775-780.