

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II



**GENÉTICA DEL SÍNDROME METABÓLICO**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

José Luis González Sánchez

Bajo la dirección del Doctor:

Manuel Serrano Ríos

**Madrid, 2003**

**ISBN: 84-669-2048-X**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE FARMACIA  
Dpto. de BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR II



## GENÉTICA DEL SÍNDROME METABÓLICO



TESIS DOCTORAL  
JOSÉ LUIS GONZALEZ SÁNCHEZ  
Madrid, 2003



*“La mayor recompensa al esfuerzo es seguir  
teniendo sueños bastante grandes para no  
perderlos de vista mientras se persiguen.”*

GENÉTICA DEL SÍNDROME METABÓLICO

JOSÉ LUIS GONZÁLEZ SÁNCHEZ

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR II**

**GENÉTICA DEL SÍNDROME METABÓLICO**

**AUTOR: JOSÉ LUIS GONZÁLEZ SÁNCHEZ**

**DIRECTOR: PROF. MANUEL SERRANO RÍOS**

**MADRID, 2003**

*A MIS PADRES*

*Que me han apoyado en todo momento  
y que me siguen animando día a día  
y en quienes he tenido un ejemplo  
de responsabilidad y generosidad.*



## **AGRADECIMIENTOS:**

Al Profesor Manuel Serrano-Ríos, director de esta Tesis Doctoral, por su continua enseñanza y estímulo en mi formación. Todo un ejemplo de entusiasmo hacia el trabajo científico.

A mis compañeros de Laboratorio: María Teresa, Roberto, Milagros, Angeles y Encarna, por su ayuda y amistad desde que llegué al laboratorio y a lo largo de estos años.

A M<sup>a</sup> José y Carina por su confianza, amistad y ayuda en la elaboración de tablas y gráficos. A Silvia por su apoyo.

A la Dra Cristina Fernández por su inestimable ayuda en el análisis estadístico.

Al Profesor Markku Laakso y su grupo de investigación de la Universidad de Kuopio, por haberme abierto su laboratorio de investigación.

A las personas que han constituido la población estudiada, por su ayuda anónima.

A mis Amigos: Inés por sus palabras de aliento, ánimo y ayuda en la impresión final de este trabajo. A Salvador por su amistad y apoyo. Sin ellos el camino sería mucho más duro.

A Carmen y Libo por su compañía y cariño.

A mis hermanos por ser los mejores hermanos que puedo tener.

*A CARLOS, MACARENA Y OLIVIA*

*Por regalarme una sonrisa cada día.*

# ÍNDICE

1. INTRODUCCION	1
1.1 EPIDEMIOLOGÍA GENÉTICA	1
1.2 CONCEPTO DE RESISTENCIA A LA INSULINA	1
1.3 SÍNDROME DE RESISTENCIA A LA INSULINA O SÍNDROME METABÓLICO	2
1.4 EPIDEMIOLOGÍA DEL SÍNDROME METABÓLICO	4
1.5 GENÉTICA DEL SM	5
1.5.1 Herencia del SM. Genes y Ambiente	5
1.5.2 Estrategias para el estudio de la genética del SM	7
1.5.2.1 Aspectos Generales	7
1.5.2.2 Estudio de genes candidatos	8
1.5.2.3 Prospección o barrido genómico inespecífico	9
1.6 GENES CANDIDATOS PARA EL SÍNDROME METABÓLICO	10
1.6.1 Genes relacionados con Obesidad	10
1.6.1.1 Leptina y Receptor de Leptina	11
1.6.1.2 Proteínas Desacoplantes de la Termogénesis (UCPs)	12
1.6.1.3 Genes Adrenoreceptores	13
1.6.1.4 Factor de Necrosis Tumoral $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )	14
1.6.1.5 Gen de Adiponectina	15
1.6.1.6 Otros genes relacionados con Obesidad	16
1.6.2 Genes relacionados con la Insulina	17
1.6.2.1 Gen del Sustrato del Receptor de Insulina (IRS-1)	17
1.6.3 Genes de Enzimas Claves en el Metabolismo de la Glucosa	18
1.6.4 Genes relacionados con la Sensibilidad/Resistencia a la Insulina	18
1.6.4.1 Familia de los PPAR $\gamma$	18
1.6.4.2 Glicoproteína de membrana (PC-1)	20
1.6.5 Genes relacionados con el Metabolismo Lipídico	21
2. OBJETIVOS	22
3. MATERIAL Y MÉTODOS	23
3.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO	23
3.1.1 Estudio I: Análisis del polimorfismo Gln27Glu del gen receptor $\beta_2$ -adrenérgico	23
3.1.2 Estudio II: Análisis de los polimorfismos Trp64Arg del gen del receptor $\beta_3$ -adrenérgico y del polimorfismo -3826A→G de la proteína desacoplante UCP1	24

---

3.1.3 Estudio III: Análisis del polimorfismo Pro12Ala del gen del receptor activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR $\gamma$ )	24
3.1.4 Estudio IV: Análisis del polimorfismo K121Q del gen de la Glicoproteína de membrana (PC-1)	24
<b>3.2 VARIABLES DE ESTUDIO</b>	24
3.2.1 Presiones Arteriales	24
3.2.2 Medidas e Índices Antropométricos	24
3.2.3 Determinaciones Biológicas	24
<b>3.3 ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS</b>	27
3.3.1 Extracción del ADN genómico humano	27
3.3.2 Análisis del polimorfismo -3826A→G de la proteína desacoplante UCP1	27
3.3.3 Análisis del polimorfismo Trp64Arg del gen del receptor $\beta_3$ -adrenérgico	28
3.3.4 Análisis del polimorfismo Gln27Glu del gen del receptor $\beta_2$ -adrenérgico	30
3.3.5 Análisis del polimorfismo Pro12Ala del gen del receptor activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR $\gamma$ )	31
3.3.6 Análisis del polimorfismo K121Q del gen de la Glicoproteína de membrana (PC-1)	32
<b>3.4 CONSIDERACIONES ÉTICAS</b>	33
<b>3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>	33
<b>4. RESULTADOS</b>	35
4.1 Estudio I: Polimorfismo Gln27Glu del gen receptor $\beta_2$ -adrenérgico	35
4.2 Estudio II: Polimorfismos Trp64Arg del gen del receptor $\beta_3$ -adrenérgico y del polimorfismo -3826A→G de la proteína desacoplante UCP1	41
4.3 Estudio III: Polimorfismo Pro12Ala del gen del receptor activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR $\gamma$ )	47
4.4 Estudio IV: Polimorfismo K121Q del gen de la Glicoproteína PC-1	50
<b>5. DISCUSIÓN</b>	54
<b>6. CONCLUSIONES</b>	62
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b>	63
<b>8. ANEXO</b>	78
<b>9. ABREVIATURAS</b>	90

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 EPIDEMIOLOGÍA GENÉTICA**

En los años 80 la epidemiología genética se estableció como una entidad aparte de la epidemiología y de la genética (Morton, 1982).

Para el concepto de Epidemiología genética existen numerosas definiciones. Morton (1992) la definió como “el estudio de la etiología de la enfermedad entre grupos de parientes, con el fin de aclarar las causas de la semejanza familiar y el estudio de las causas heredadas de la enfermedad en las poblaciones”. Otra definición que se adapta más al estudio objeto de esta tesis: “la epidemiología genética es el estudio del papel de los factores genéticos y su interacción con los factores ambientales en la ocurrencia de la enfermedad en poblaciones humanas”. Ésto es importante dado que la mayoría de las enfermedades no tienen una etiología puramente genética o ambiental, sino que dependen de la interacción entre ambos factores.

La epidemiología genética trata de conseguir comprender el papel que juegan los factores genéticos en la etiología de la enfermedad, con el objetivo final de controlar y prevenir las enfermedades.

### **1.2 CONCEPTO DE RESISTENCIA A LA INSULINA**

Según el “Consenso del Grupo de Trabajo Resistencia a la Insulina de la Sociedad Española de Diabetes” (2002), la resistencia a la insulina (RI) se define como la disminución de la capacidad de la insulina para ejercer sus acciones biológicas en tejidos diana típicos, como el músculo esquelético, el hígado o el tejido adiposo. Esta definición está ampliamente demostrada en lo referente al transporte transcelular, a las vías metabólicas de la glucosa y al metabolismo de lípidos. Es posible que el concepto de resistencia a la insulina pueda extenderse a las demás acciones (precoces o tardías) de esta hormona, como la captación y transporte transcelular de aminoácidos, la síntesis de proteínas, la regulación de la función endotelial, la estimulación del crecimiento y la proliferación celular o la expresión de numerosos genes reguladores de estas diferentes funciones (“Consenso del Grupo de Trabajo Resistencia a la Insulina de la Sociedad Española de Diabetes”, 2002). La resistencia a la insulina y su surrogada hipeinsulinemia compensadora se han vinculado al mayor riesgo de aterogénesis y enfermedad macrovascular en el SM (o de RI) pero no existe unanimidad sobre



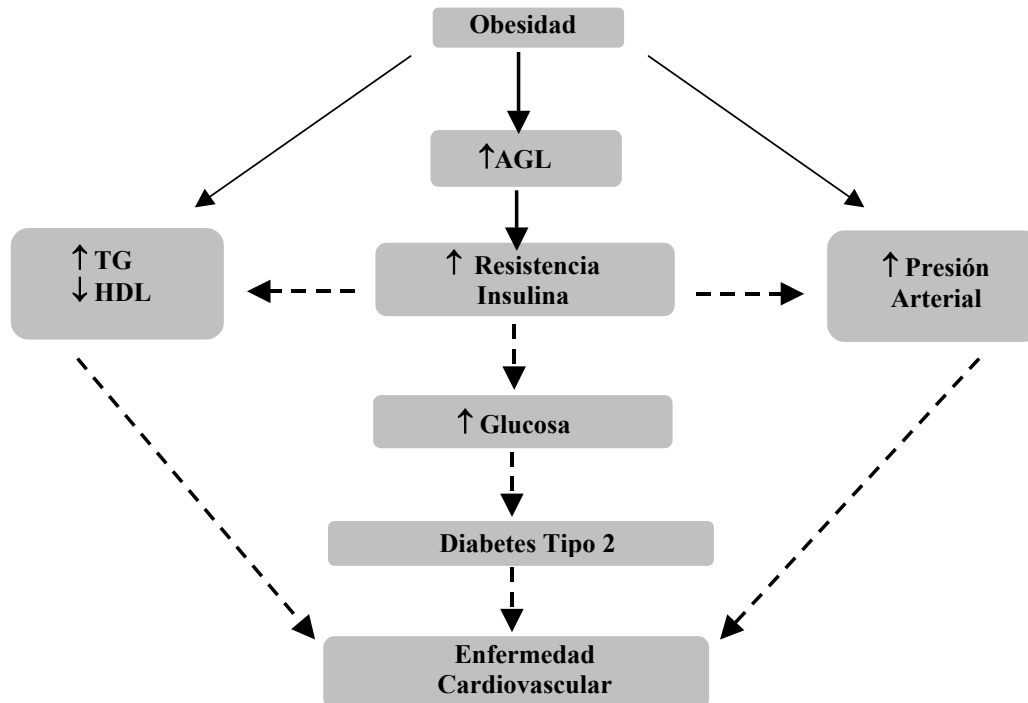
su papel patogénico o como simple “marcador de riesgo” (Ferrara, 1994; Deprés, 1996; Haffner, 1999; Ginsberg, 2000).

Hoy en día se considera que la RI crónica o mantenida es el rasgo común de numerosas enfermedades metabólicas y no metabólicas, como la diabetes mellitus (DM) tipo 2, la obesidad, la hipertensión arterial (HTA), las dislipemias o la enfermedad cardiovascular (Ferrannini y col., 1998).

### 1.3 SÍNDROME DE RESISTENCIA A LA INSULINA O SÍNDROME METABÓLICO

El Síndrome Metabólico (SM) también conocido como Síndrome Plurimetabólico, Dismetabólico, de Reaven o Síndrome X, caracterizado por la presencia de RI además de: hiperinsulinemia compensadora, la intolerancia hidrocabonada o la DM tipo 2, dislipemia aterogénica (aumento de triglicéridos, disminución del colesterol HDL (cHDL)), obesidad central, HTA, hiperuricemia, alteraciones hemorreológicas y de la fibrinólisis, y disfunción endotelial. Todas estas alteraciones que, de manera secuencial o simultánea, pueden acumularse en el síndrome metabólico (SM), potencialmente aceleran el desarrollo de la enfermedad cardiovascular aterosclerótica (De Fronzo y Ferrannini, 1991; Stern, 1997). Este SM confiere una alta morbi y mortalidad (Isomma y col., 2001).

*Figura 1. Síndrome Metabólico: Papel de la Obesidad.*



En la actualidad no se dispone de una definición universalmente aceptada. Tanto la Organización Mundial de la Salud (OMS) como el Grupo Europeo para el Estudio de la Resistencia a la Insulina (EGIR) han desarrollado sus respectivas propuestas para definir el SM:

- a) Criterios de la OMS (WHO, 1999). Se considera que existe un SM si se dan estos criterios: intolerancia a la glucosa o DM tipo 2 (tabla 1), o resistencia a la insulina junto a 2 o más de las siguientes alteraciones:
  - HTA  $\geq 140/90$  mmHg.
  - Dislipemia: hipertrigliceridemia  $\geq 150$  mg/dl o descenso de cHDL (varones: 35mg/dl; mujeres 39 mg/dl).
  - Obesidad central o visceral.
  - Microalbuminuria (excreción urinaria de albúmina  $\geq 20$   $\mu$ g/min o cociente albúmina/creatinina  $> 30$  mg/g)
- b) Criterios del grupo EGIR (EGIR, 2002). Presencia de RI o hiperinsulinemia en ayunas superior al percentil 75 y dos o más de las siguientes alteraciones:
  - Hiperglucemia (glucemia en ayunas  $\geq 110$  mg/dl, pero no en el rango diabético).
  - HTA  $\geq 140/90$  mmHg o estar recibiendo tratamiento para la hipertensión.
  - Dislipemia (triglicéridos  $\geq 180$  mg/dl o cHDL  $< 40$  mg/dl).
  - Obesidad central (cociente cintura/cadera en varones  $\geq 94$  cm y en mujeres  $\geq 80$  cm o IMC  $> 30$  kg/m<sup>2</sup>).
- c) Otros criterios. Además de estas dos definiciones existen otras, entre las que destaca la publicada por The Third Report National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (ATP III) en 2002 (Ford y col., 2002; Pereira y col., 2002). Se considera que existe un SM si se dan 3 o más de los siguientes criterios:
  - Obesidad abdominal: diámetro de la cintura  $> 102$  cm en varones y  $> 88$  cm en mujeres.
  - Hipertrigliceridemia  $\geq 150$  mg/dl.
  - cHDL  $< 40$  mg/dl en varones o  $< 50$  mg/dl en mujeres.
  - Presión arterial  $\geq 130/85$  mmHg.
  - Glucosa basal  $\geq 110$  mg/dl.

**Tabla 1 Concentración de glucosa (mg/dl)**

	Sangre venosa	Sangre capilar	Plasma venoso
<b>Diabetes Mellitus</b>			
Ayunas	≥ 110	≥ 110	≥ 126
A las 2 h tras sobrecarga de glucosa	≥ 180	≥ 200	≥ 200
<b>Intolerancia a la glucosa</b>			
Ayunas	< 110	< 110	< 126
A las 2 h tras sobrecarga de glucosa	≥ 120 y < 180	≥ 140 y < 200	≥ 140 y < 200
<b>Alteraciones de la glucemia en ayunas</b>			
Ayunas	≥ 100 y < 110	≥ 100 y < 110	≥ 110 y < 126
A las 2 h tras sobrecarga de glucosa	< 120	< 140	< 140

*“Consenso del Grupo de Trabajo Resistencia a la Insulina de la Sociedad Española de Diabetes” (2002)*

A diferencia de las anteriores, esta propuesta no incluye como criterio para la definición de SM la presencia de RI, y exige su homologación clínico-epidemiológica antes de adoptarla definitivamente.

#### 1.4 EPIDEMIOLOGÍA DEL SÍNDROME METABÓLICO

La prevalencia del SM y de la RI en la población varía ampliamente en función de la definición empleada, del grupo étnico de la población estudiada, del sexo y de la distribución de su edad. Es difícil estimar de forma precisa su prevalencia, debido al reflejo de la inconsistencia de su definición, condicionada a su vez por la diversidad de términos asociados con este síndrome.

El grupo EGIR ha calculado la frecuencia tanto del SM (definición de la OMS) como de la RI (definición del grupo EGIR) en la población no diabética y ha añadido los datos de 8 estudios epidemiológicos europeos (EGIR, 2002). En Europa, la prevalencia global del SM (definición de la OMS, pero excluyendo diabéticos) fue del 23 % en varones y del 12 % en mujeres, oscilando entre el 7 y el 36 % para varones según la edad y entre el 5 y 22 % para mujeres entre 40 y 55 años. El síndrome de RI (definición EGIR, también en no diabéticos) fue menos frecuente que el SM (definición OMS): 16 % en varones y 9.7 % en mujeres. En España, el estudio VIVA (Variability of Insulin with Visceral Adiposity), incluido en las estimaciones europeas del EGIR, ha detectado una prevalencia para el SM (OMS) del 19.3% y para la RI del 15.5% (Tabla 2).

Estos datos muestran que tanto el SM como la RI, independientemente de la definición empleada, son altamente prevalentes tanto en población europea como española, lo que tiene importantes implicaciones para la asistencia sanitaria. Es de destacar la mayor prevalencia del trastorno en las mujeres españolas respecto a las europeas.

**Tabla 2 Prevalencia del síndrome metabólico y de resistencia a la insulina según criterios OMS y EGIR en población no diabética europea y española (%).**

	España		Europa	
	EGIR SM	OMS RI	EGIR SM	OMS RI
Varones < 40 años	12.7	19.6	10.0	14.0
Varones 40 - 55 años	15.7	20.7	10.0	20.0
Varones >55 años	17.5	26.3	22.0	31.0
<b>Total Varones</b>	15.6	22.1	16.0	23.0
Mujeres < 40 años	5.8	7.9	3.0	4.0
Mujeres 40 – 55 años	14.1	13.9	7.0	10.0
Mujeres > 55 años	23.9	28.8	16.0	20.0
<b>Total Mujeres</b>	15.4	17.1	9.7	12.0
<b>TOTAL</b>	15.5	19.3	13.0	17.0

*“Consenso del Grupo de Trabajo Resistencia a la Insulina de la Sociedad Española de Diabetes” (2002)*

## 1.5 GENÉTICA DEL SM

### 1.5.1 Herencia del SM. Genes y Ambiente

El SM es una entidad poligénica y multifactorial (Groop, 2000; Martínez-Larrad y col., 2002). Los datos disponibles de estudios de familia y poblacionales, muestran que el SM está influenciado por un fuerte componente genético, con una gran variabilidad entre diferentes grupos étnicos. De hecho, se ha demostrado que el 45% de los familiares de primer grado de pacientes con diabetes tipo 2, incluso con niveles de glucosa normales, presentan RI (Beck-Nielsen y col., 1994; Groop y col., 1996). El impacto genético en la variación del índice de masa corporal es de entre un 40 y 70% con diferencias entre individuos y grupos étnicos. Esta situación es incluso más importante en la obesidad visceral (Bouchard y col., 1996; Desprès y col., 1999), una condición clave en la patogénesis del SM, en el que el 60% de la variación de

los depósitos de grasa abdominal se debe probablemente a factores genéticos. Dicha sospecha está sostenida por los hallazgos de Groop y col. (1996) en familiares de pacientes con DM2.

Todo este componente genético (Stern, 1997; Groop, 2000) está fuertemente modulado por factores ambientales relacionados con los hábitos/estilos de vida como el exceso en la ingesta calórica, baja actividad física, exceso de grasas saturadas, dieta con bajo contenido en fibra, excesivo consumo de alcohol y tabaquismo. Se ha demostrado recientemente (Stephens y Humphries, 2003), que el efecto de la interacción entre factores genéticos y ambientales es mayor que el de estos dos componentes aisladamente. Sin embargo, no se dispone de evidencias científicas suficientes para definir nitidamente las características de la compleja interacción genes-ambiente. Ciertos estudios (Mayer y col., 1993a) han mostrado que los niveles circulantes de insulina están directamente asociados a la ingesta de grasa dietética e inversamente al grado de actividad física (Regensteiner y col., 1991; Mayer y col., 1998) y al consumo (moderado) de alcohol (Mayer y col., 1993b). Por otra parte existen datos sólidos que muestran el efecto beneficioso del ejercicio físico en la prevención de la DM 2 desde el estadio de intolerancia a la glucosa (Tuomilehto y col., 2001).

La búsqueda de los efectos de interacciones genes-ambiente en estudios epidemiológicos es esencial para comprender las variaciones individuales étnicas y poblacionales de prevalencia/incidencia del SM, pero su interpretación requiere un planteamiento adecuado sobre las bases de un apropiado tamaño muestral y de una metodología bien definida (Luan y col., 2001a).

Por tanto, parece ser que tras el SM existe un genotipo ahorrador. Según esta hipótesis de los genes ahorradores, (Neel, 1962) las personas que viven en un medio con un aporte alimentario inestable podrían incrementar al máximo su probabilidad de supervivencia si pudiesen potenciar el almacenamiento del excedente de energía, como por ejemplo la grasa abdominal. Cuando este genotipo almacenador de energía se expone a la abundancia de alimentos típica de las sociedades occidentalizadas, se convierte en perjudicial y origina la resistencia a la insulina y la diabetes tipo 2 (Groop y col., 1997). Este genotipo ahorrador emerge en diferentes grupos étnicos cuando se comparan sus estilos de vida (rural sobre urbano) (Zimmet y col., 1983; Ravussin y col., 1994; Mekeigue 1999). Los indios Pima que viven Arizona (USA) siguen unos estilos de vida típicos de los países occidentalizados como una alta ingesta calórica, principalmente de grasas saturadas, alto consumo de alcohol y una baja actividad física, presentando una alta prevalencia de obesidad, DM 2 y RI. Por el contrario, en los indios Pima genéticamente idénticos, que viven en Méjico y que han mantenido sus estilos de vida tradicionales del medio rural (alta actividad física, baja ingesta

calórica con bajo contenido en grasas, dieta rica en fibra) la obesidad y otras alteraciones del SM son poco frecuentes. Observaciones similares se han descrito en poblaciones indígenas de las islas de Nauru y Mauricio del Océano Pacífico e Indico (Zimmet y col., 1983) así como en Mexicanos Americanos (Mekeigue, 1999) en las cuales se ha analizado la prevalencia de obesidad, DM 2 y otras alteraciones del SM comparando estilos de vida en el medio rural y en el medio urbano.

Por todo ésto, parece que las bases de la emergencia del SM en cada individuo y en poblaciones particulares están en las complejas interacciones genes-factores ambientales (estilos de vida).

### **Polimorfismos genéticos**

El término polimorfismo se refiere a la presencia de dos o más formas de un gen en una población, con una frecuencia igual o superior al 1 %. La variación genética da lugar a diferentes alelos que son las posibles formas alternativas de un gen. Un polimorfismo puede determinar o no diferencias fenotípicas, además de constituir en ocasiones marcadores moleculares de utilidad clínica. Los cambios en la secuencia de ADN pueden producirse en las regiones codificantes (exones) o no codificantes (intrones, regiones reguladoras, etc).

### **1.5.2. Estrategias para el estudio de la genética del Síndrome Metabólico**

#### *1.5.2.1 Aspectos Generales*

La selección de los sujetos de estudio, afectados y no afectados, es de gran importancia en los estudios genéticos. Los sujetos del estudio deben tener un origen étnico similar para evitar resultados de falsos positivos debido a la heterogeneidad genética entre diferentes poblaciones. Los individuos afectados deben ser incluidos en el estudio de acuerdo a un criterio de selección bien definido respecto a las características clínicas de la patología estudiada. Esto podría constituir un problema, dado que un criterio estricto limita el número de sujetos del estudio y disminuye el poder del mismo, pero un criterio menos estricto podría conducir a una dilución de los resultados. En algunos casos el poder del análisis estadístico podría ser incrementado con la inclusión de familiares que no cumplen los criterios de selección para individuos afectados pero manifiestan síntomas de la enfermedad. Esto sólo debería ser aceptado cuando estos individuos tienen familiares que cumplen el criterio original de inclusión, sugiriendo un efecto genético similar.



Las bases genéticas de la enfermedad pueden ser investigadas aplicando varias estrategias como son el estudio de “genes candidatos” y la “prospección o barrido genómico inespecífico.

#### 1.5.2.2. *Estudio de genes candidatos.*

Los genes candidatos son aquellos genes identificados según la patología que su alteración causa en animales, o de los que se sospecha su relación con algún proceso fisiológico del que dependa esa patología, como son los genes implicados en la regulación de la homeostasis de la glucosa, metabolismo lipídico, coagulación y fibrinólisis, secreción y acción de la insulina, así como todos aquellos que se piensa que pueden ser relevantes en la patogénesis de la diabetes tipo 2, obesidad central y otros componentes del SM. El conocimiento inadecuado de estos mecanismos restringe el uso de la búsqueda de estos genes candidatos en el estudio de enfermedades multifactoriales como el SM. Existe una gran cantidad de genes que son expresados en células de las distintas patologías que constituyen el SM, pero actualmente sólo se conoce la función de una pequeña fracción de posibles genes candidatos relacionados en la patogénesis del SM. Varias técnicas pueden ser aplicadas para explorar variantes en los genes candidatos, como por ejemplo: el análisis de “*single-strand conformation polymorphism*” (SSCP) y secuenciación directa para la búsqueda de nuevas variantes en genes candidatos, el análisis de polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) o los marcadores de microsatélites usados para estudiar variantes conocidas que están dentro o próximas a los genes candidatos de interés.

##### 1.5.2.2.1 *Estudios de asociación*

En los estudios de asociación la frecuencia de las variantes de genes candidatos de importancia biológica en la patogénesis de la enfermedad es comparada en los casos y controles cuidadosamente seleccionados para que sean representativos de la población original. Una variante en el gen candidato está asociada con el rasgo de la enfermedad si existe una diferencia significativa en la frecuencia de los casos comparados con los controles (Lander y col., 1994). Una asociación de un polimorfismo con la enfermedad puede indicar una verdadera relación causal mutación-enfermedad. En los estudios de asociación se debe prestar especial atención en la selección de los sujetos controles para evitar resultados falsos positivos que pueden resultar de una inadecuada elección de casos y controles. El objetivo de estos estudios es elucidar una posible asociación de un marcador con la enfermedad. Un polimorfismo puede también estar en desequilibrio de unión con una variación de un gen

cercano que es el verdaderamente causante sugiriendo que éste es solamente un marcador para la verdadera causa de la enfermedad. Un resultado negativo en un estudio de asociación indica que no hay evidencias de causalidad entre la variante y la enfermedad. Además una muestra de sujetos inadecuada podría conducir a una pérdida de asociación.

#### 1.5.2.2.2 *Análisis de Ligamiento.*

El análisis de un marcador localizado en un gen candidato o en sus proximidades podría revelar la existencia de variantes que juegan un papel importante en la etiología de la enfermedad. Para análisis de ligamiento son necesarios grandes “árboles familiares” de varias generaciones consecutivas de una misma población homogénea con muchos individuos afectados y no afectados. En estos análisis se prueban diferentes modelos de herencia (dominante o recesiva) para encontrar el mejor modelo que pudiese explicar la unión entre un rasgo de la enfermedad y un gen causante. Este método es de elección para enfermedades monogénicas que siguen un modelo de herencia Mendeliana, pero no es muy útil para enfermedades multifactoriales o complejas como el SM, donde el modelo de herencia no está claro. Además el uso de un modelo erróneo podría pasar por alto ligamientos verdaderos o reconocer como verdaderos falsos ligamientos (Lander y col., 1994).

#### 1.5.2.3 *Prospección o barrido genómico inespecífico*

Otra estrategia consiste en la prospección o barrido genómico inespecífico, análisis en el que se investiga la asociación genotípica de un número elevado de polimorfismos situados a intervalos más o menos regulares en el genoma, pero sin que se tengan sospechas previas de su posible relación con la enfermedad. Los resultados de la prospección permiten identificar regiones cromosómicas implicadas y/o, en algunos casos, genes posicionales candidatos. También aquí son necesarios grandes “árboles familiares”; pero en cambio, éste tipo de análisis es una herramienta más eficiente para la investigación de enfermedades multifactoriales o complejas. Esta es la estrategia utilizada para la identificación de genes candidatos desde que se ha secuenciado el genoma humano completo, mientras que la estrategia de búsqueda de potenciales genes candidatos anteriormente citada únicamente permite estudiar genes aislados. En este barrido genómico se genotipa la totalidad del genoma con marcadores polimórficos localizados preferentemente a intervalos a lo largo del mismo (Brown, 1994).

## 1.6 GENES CANDIDATOS PARA EL SÍNDROME METABÓLICO

Los genes candidatos investigados en el presente estudio son los receptores beta adrenérgicos ( $\beta_2$  y  $\beta_3$ ), el receptor activado por los proliferadores de peroxisomas (PPAR $\gamma$ ), el gen de la proteína desacoplante de la termogénesis (UCP1), y el de la glicoproteína plasmática (PC-1). Además de una descripción detallada de estos genes, también se discuten otros genes relacionados con el SM.

### 1.6.1 Genes relacionados con Obesidad

A pesar de que hace ya tiempo que existen numerosas evidencias de las bases genéticas de la obesidad, su aceptación es un avance relativamente reciente, al que han contribuido especialmente los estudios en familias y los estudios de obesidad monogénica en modelos animales que han permitido identificar, clonar y caracterizar varios genes, cuya mutación podría causar obesidad. Pero estos genes simples no son causantes (excepto casos muy aislados) de los casos más comunes de obesidad en humanos, en los que la situación es mucho más compleja. Algunos de estos genes podrían promover la obesidad mediante interacciones gen-gen o genes-ambiente. Sin embargo se han ido identificando otros genes, también relacionados con el control del peso corporal en humanos (Palou y col., 2000; Arner, 2000).

El tejido adiposo se acepta actualmente como un órgano endocrino-metabólico extremadamente activo con múltiples funciones que superan la concepción tradicional de “mero órgano pasivo de depósito de grasa protectora y termoreguladora” (Ahima y Flier, 2000a). Una activa investigación en los últimos años ha identificado numerosos péptidos sintetizados/expresados en el tejido adiposo y liberados al torrente circulatorio de modo que ejerzan acciones autocrinas/paracrinas y endocrinas en otros tejidos. Entre estos péptidos son de importancia fundamental la leptina (reguladora del apetito y de otras funciones fisiológicas como es la secreción/acción de la insulina, etc...) (Zhang y col., 1994; Leyva y col., 1998), la resistina (Steppan, 2001), adiponectina (Maeda y col., 1996), TNF- $\alpha$  y otros (Matsuzawa y col., 1999).

**Tabla 3.** Genes candidatos para obesidad y/o diabetes tipo 2.  
(Estudios de asociación más relevantes).

GENES CANDIDATOS	ASOCIACIÓN	
	SÍ	NO
<b>ÁCIDOS GRASOS LIBRES Y METABOLISMO LIPÍDICO</b>		
Receptor adrenérgico $\beta 2$	(Ishiyama y col., 1999) (Meirhaeghe y col., 2000a)	(Oberkofler y col., 2000) (Hayakawa y col., 2000)
Hormona lipasa sensible	(Magre y col., 1998) (Lavebratt y col., 2002)	(Shimada y col., 1996) (Stumvoll y col., 2001a)
<b>METABOLISMO DEL TEJIDO ADIPOSO</b>		
PPAR $\gamma 2$	(Deeb y col., 1998) (Altshuler y col., 2000) (González-Sánchez y col., 2002)	(Mancini y col., 1999) (Sramkova y col., 2002)
<b>PRODUCCIÓN DE CALOR</b>		
Receptor $\beta 3$ adrenérgico	(Hoffstedt y col., 1999) (Oizumi y col., 2001)	(Oeveren y col., 2001) (Santos y col., 2002)
Proteína desacoplante- 1 (UCP-1)	(Heilbronn y col., 2000)	(Schäffler y col., 1999)

### 1.6.1.1. Leptina y Receptor de Leptina

El gen “obeso” (*ob*) expresado por el adipocito, codifica para la hormona leptina que el tejido adiposo libera a la circulación y que al llegar al cerebro, al actuar sobre los receptores de leptina (gen *db*), informa del nivel de reservas grasas, produciendo cambios en el comportamiento alimentario, con una supresión del apetito, así como un incremento de la actividad metabólica (Auwerx y Staels, 1998; Mantzoros, 1999).

Se ha demostrado que los niveles plasmáticos de leptina están incrementados en individuos con obesidad, RI y dislipidemias (Mantzoros, 1999; Matsubara y col., 2000). Además la leptina puede contribuir a la aterosclerosis al inducir estrés oxidativo en las células endoteliales con un efecto calcificante a nivel vascular (Bouloumie y col., 1999; Parhami y col., 2001).

El descubrimiento este gen “obeso” de la leptina creó grandes expectativas sobre su impacto en la patogénesis de la obesidad basadas en resultados obtenidos en ciertos modelos animales (ratones ob/ob) mostrando que una mutación en el gen de la leptina (cromosoma 7q31.3) era la causa de su obesidad, y que ésta era reversible con la administración de leptina en otros animales de experimentación (ratas obesas) (Zhang y col., 1994). Sin embargo, ninguna mutación en la molécula de leptina ni en su receptor se han demostrado causantes de algunas de las formas comunes de obesidad en humanos, salvo en muy raros casos de obesidad familiar infantil con hipogonadismo (Montague y col., 1997; Strobel y col., 1998).

### 1.6.1.2 Proteínas Desacoplantes de la Termogénesis (UCPs)

Los tres miembros de esta familia de proteínas (UCP1, UCP2, UCP3) están localizadas en la membrana interna de la mitocondria y juegan un papel muy importante en la regulación de la termogénesis a través del desacoplamiento energético de la fosforilación oxidativa en la cadena respiratoria mitocondrial (Schrauwen y col., 1999; Ukkola y col., 2001a). Dicho desacoplamiento hace que la energía obtenida de los nutrientes se disipe como calor de forma regulable a través de las UCPs, en vez de utilizarse para la síntesis de ATP. Cada una de estas UCPs se expresa preferentemente en determinados tejidos. La UCP1 está presente exclusivamente en el tejido adiposo marrón, la UCP2 en varios tejidos incluyendo el tejido adiposo y la UCP3 en el músculo esquelético. Debido a su presumible función reguladora en el gasto energético, los genes de estas proteínas desacoplantes fueron considerados, en principio, los genes candidatos más implicados en la herencia de la obesidad, pero estudios realizados *in vitro* e *in vivo* en los últimos años han lanzado dudas sobre estas presunciones (Warden 1999; Groop 2000).

El gen de la UCP1 se encuentra localizado en el cromosoma 4 (4q28-q31). El papel de la termogénesis mediada por la UCP1 en la obesidad en humanos no está claro (Himms-Hagen, 2001), pero la presencia de la variante -3826 A→G en la región del promotor del gen de la UCP1 (Oppert y col., 1994) ha sido asociada con una reducción en la expresión del ARN mensajero de la UCP1 (Esterbauer y col., 1998), una menor pérdida de peso en sujetos sometidos a una dieta hipocalórica (Fumeron y col., 1996) y con otras alteraciones metabólicas del fenotipo obeso (Proenza y col., 2000). Sin embargo estas asociaciones no se han encontrado en otras poblaciones Caucasoides (Gagnon y col., 1998). Por otro lado, se ha descrito una interacción entre el gen del receptor  $\beta$ 3-adrenérgico y el gen de la UCP1 con respecto a la tasa metabólica basal, ganancia y pérdida de peso en sujetos obesos de población

Finlandesa y Francesa (Clement y col., 1996; Sivenius y col., 2000). Sin embargo, en conjunto, hay datos que no apoyan una importante contribución de genes involucrados en la expresión de las moléculas de las proteínas desacoplantes en la predisposición genética para la obesidad y/o en la patogénesis del SM (Vidal-Puig, 2000; Arner, 2000).

### 1.6.1.3 Genes Adrenoreceptores

Esta familia de proteínas catecolamina-sensibles ( $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ) estimulan la lipólisis a nivel de la grasa visceral. Los genes que controlan su expresión se han postulado como potenciales genes candidatos para explicar la predisposición de formas comunes de obesidad en humanos, y más específicamente en favorecer los depósitos de grasa abdominal (Arner y col., 1999).

#### Receptor $\beta_3$ -Adrenérgico.

Este gen, localizado en el cromosoma 8 (8p12-p11.2), ha sido estudiado extensamente en muchas poblaciones. Allison y colaboradores (1998) han publicado un análisis crítico de varios estudios con resultados divergentes en cuanto al papel de este receptor en la obesidad humana. El receptor  $\beta_3$  adrenérgico, seguramente juega un papel importante en el gasto energético a través de la estimulación de la termogénesis, mediada por la proteína desacoplante de la termogénesis (UCP1), en el tejido adiposo marrón de roedores (Giacobino, 2002) y la lipólisis en el tejido adiposo blanco tanto de roedores como de humanos (Large y col., 1998). Este receptor  $\beta_3$  se expresa en el tejido adiposo marrón en roedores y también en la grasa visceral en humanos. Los agonistas del receptor  $\beta_3$  activan la termogénesis *in vivo* así como en experimentos *in vitro*. Tres estudios realizados en tres poblaciones diferentes en el mismo año (1995) han descrito una mutación localizada en el codón 64 del dominio intracelular de este receptor dando lugar a una sustitución de triptofano por arginina en esa posición 64 (Trp64Arg). En estos estudios se encontró una asociación entre este polimorfismo Trp64Arg, obesidad visceral y otras alteraciones del SM (Strosberg, 1997; Arner y Hoffstedt, 1999). Este polimorfismo también ha sido asociado con alteraciones de su función lipolítica (Hoffstedt y col., 1999; Umekawa y col., 1999), una menor tasa metabólica basal (Walston y col., 1995) y una tendencia a una mayor ganancia de peso en individuos obesos (Clement y col., 1995), sin embargo en otros estudios no se han observado estas asociaciones (Rissanen y col., 1997a; Buettner y col., 1998). A pesar de todas estas discrepancias, el gen del receptor  $\beta_3$ -adrenérgico todavía permanece como un posible gen candidato en sujetos obesos, debido



a que esta mutación funcional altera la lipólisis estimulada por catecolaminas en las células grasas de humanos causando una disminución en la tasa metabólica basal. Además se ha descrito un efecto aditivo de este polimorfismo (Trp64Arg) junto con el -3826A→G de la UCP1 en el desarrollo de obesidad (Clement, 1996; Evans y col., 2000a).

### **Receptor $\beta$ 2-Adrenérgico.**

El receptor  $\beta$ 2-adrenérgico es el principal receptor lipolítico en el tejido adiposo blanco (Arner y Hoffsted, 1999). Varios polimorfismos en este gen, localizado en el cromosoma 5 (5p31-q32), han sido relacionados con alteraciones en la función de este receptor (Green y col., 1994; Liggett, 1997). Específicamente el polimorfismo Gln27Glu, que implica la sustitución de un residuo de glutamina por otro de ácido glutámico en el codon 27, se ha postulado como uno de los más probables candidatos en las formas comunes de obesidad en humanos (Large y col., 1997). Sin embargo, los datos disponibles publicados no han sido concordantes. Varios estudios han mostrado que el alelo Glu27 está asociado con obesidad, diabetes mellitus tipo 2 e hipertrigliceridemia (Large y col., 1997; Ishiyama-Shigemoto y col., 1999; Meirhaeghe y col., 2000a) con notables diferencias entre grupos étnicos en cuanto a la fortaleza de esta asociación. También se han descrito diferencias en cuanto al sexo relacionadas con el efecto del impacto del alelo Glu27 en el grado de obesidad (Hellstrom y col., 1999) con posible influencia de la cantidad/calidad de la dieta (Ukkola y col., 2001b). Algunos estudios no han encontrado asociación entre este polimorfismo y obesidad (Echwald y col., 1998; Kortner y col., 1999; Oberkofler y col., 2000; Hayakawa y col., 2000; Ukkola y col., 2000).

En resumen, a pesar de las discrepancias encontradas, es posible que este polimorfismo en el gen del receptor  $\beta$ 2-adrenérgico juegue un papel importante en el fenotipo de algunas alteraciones del SM, como obesidad y DM2.

#### **1.6.1.4 Factor de Necrosis Tumoral $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )**

Este péptido es una citoquina con un papel bien conocido como mediador en la respuesta inflamatoria en adipocitos normales y en el músculo esquelético en sujetos no obesos, y se encuentra sobreexpresado en el tejido adiposo de sujetos obesos (Hotamisligil y col., 1994a). Se ha demostrado que el TNF- $\alpha$  puede producir RI al inhibir la autofosforilación de los residuos de tirosina en la subunidad  $\beta$  del receptor de insulina, una primera etapa en la acción de la insulina después de que la hormona se une a este receptor en la superficie de las

células de los tejidos diana (Hotamisligil y col., 1994b; Liu y col., 1998). Además el TNF- $\alpha$  induce apoptosis de las células del tejido graso donde estimula la lipólisis (Prins y col., 1997). No existen actualmente muchos estudios analíticos del gen del TNF- $\alpha$  (localizado en el cromosoma 6p21.3) que muestren su relación con el desarrollo de obesidad y RI, y los resultados disponibles de la mayoría de estos estudios son poco convincentes. Así el polimorfismo -308 G/A en la región del promotor de este gen se ha asociado a obesidad y a resistencia a la insulina en algunos estudios (Fernández Real y col., 1997) pero no en todos (Walston y col., 1999; Lee y col., 2000; Koch y col., 2000; Rasmussen y col., 2000a). Además en estudios recientes en individuos sanos, familiares de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (Koch y col., 2000; Rasmussen y col., 2000a), no se ha encontrado asociación alguna entre sensibilidad a la insulina y el alelo A (mutado). También en mujeres de la población Sueca se observó una asociación del genotipo homocigoto AA, con un aumento en la acumulación de grasa (Hoffstedt y col., 2000), y otro estudio realizado en sujetos con obesidad también ha demostrado una asociación este polimorfismo y RI (Dalziel y col., 2002).

En resumen, el papel del gen del TNF- $\alpha$  como uno de los genes candidatos en el genotipo de obesidad y del SM es probable pero todavía no ha sido demostrado, requiriendo por tanto muchos más estudios de asociación y ligamiento.

#### **1.6.1.5. Gen de Adiponectina**

La adiponectina es una proteína específica del tejido adiposo presente en el plasma circulante cuyos niveles plasmáticos están inversamente correlacionados con la RI (Ouchi y col 1999; Hotta y col., 2000; Weyer y col., 2001) y su expresión está reducida en presencia de obesidad (Arita y col 1999; Yang y col., 2001). Aunque las funciones de esta proteína no están totalmente conocidas, recientemente varios grupos han demostrado que modelos animales de obesidad y diabetes la administración de adiponectina incrementa la oxidación de ácidos grasos en el músculo, disminuye la producción hepática de glucosa y promueve la pérdida de peso, mejorando la sensibilidad a la insulina y la tolerancia a la glucosa (Fruebis y col., 2001; Yamauchi y col., 2001; Berg y col., 2001; Combs y col., 2001).

Por otro lado, dos grupos independientemente han descrito un locus localizado en el cromosoma 3q27, en el que se encuentra el gen de la adiponectina, implicado en la resistencia a la insulina, SM (Kissebah y col., 2000) y DM2 (Vionnet y col., 2000).

En este gen de la adiponectina se han estudiado diferentes “polimorfismos simples de nucleótidos” (SNPs). Uno de ellos corresponde a la sustitución de timina por guanina en el exón 2 (45T→G) y otro a la sustitución de guanina por timina en el intrón 2 (276G→T) que han sido asociados con un aumento en el riesgo para diabetes tipo 2 así como con una mayor RI en sujetos portadores de los genotipos G/G en las posiciones 45 y 276 de la población (Hara y col., 2002). En este mismo estudio el alelo G en la posición 276 estuvo linealmente asociado con menores niveles plasmáticos de adiponectina. De igual modo, en otro estudio llevado a cabo en población Caucasoide, estos 2 SNPs estuvieron también asociados con alteraciones del SM (Menzaghi y col., 2002).

Dado que los bajos niveles de adiponectina en plasma han sido asociados con un incremento en la adiposidad y RI, se sugiere que la hipoadiponectinemia puede ser un defecto determinado genéticamente que contribuye a las alteraciones del SM.

#### **1.6.1.6 Otros genes relacionados con Obesidad**

Datos sobre mutaciones presentes en genes que controlan la expresión de péptidos implicados en la ingesta y de otros relacionados con los mecanismos del apetito-saciedad en el sistema nervioso central permanecen aún sin estudiar en profundidad. Entre los componentes orexigénicos, el neuropéptido Y (NPY) y otros relacionados con la proteína Agouti son de especial interés. En el núcleo arqueado del hipotálamo se originan señales orexigénicas que se proyectan al núcleo paraventricular, de las que se originan vías eferentes hipofisarias y las del sistema nervioso simpático. Tanto el núcleo paraventricular como el núcleo arqueado disponen de receptores de leptina. El NPY es bien conocido por ser un potente estimulador de la ingesta. La inyección central de NPY demuestra que el núcleo paraventricular y el área perifórmica adyacente son las regiones más sensibles y reproduce, en gran medida, los efectos de la deficiencia de leptina, incluyendo la hiperfagia, la hiperinsulinemia con RI, y la disminución de la termogénesis en el tejido adiposo marrón (Erickson y col., 1996a; Erickson y col., 1996b). El NPY ejerce su acción a través de distintos receptores (Y1 a Y5), siendo los Y5 los más selectivos para estimular la ingesta. La existencia de estos receptores Y5, cuyo gen se encuentra en el cromosoma 4 (4q31-q32), junto con la observación de que la deficiencia en NPY (NPY<sup>-/-</sup>) reducía el grado de obesidad en ratones obesos ob/ob, son las evidencias más recientes del importante papel regulador del NPY en la ingesta de alimentos, mediada por leptina (Stanley, 1993). Actualmente no existen

muchos datos disponibles en humanos, ni sobre genes relacionados con la proteína Agouti.

Recientemente se ha identificado una nueva hormona llamada resistina (Steppan y col., 2001). Esta hormona es expresada y segregada específicamente por el tejido adiposo y se ha postulado como un nexo de unión entre obesidad y diabetes mellitus tipo 2. La expresión del gen de resistina (localizado en el cromosoma 19p13) y su secreción por el tejido adiposo está regulada por las tiazolidinodionas (fármacos antidiabéticos orales), que son ligandos específicos de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR $\gamma$ ), lo que podría explicar el efecto beneficioso de estos agonistas del PPAR $\gamma$  sobre el estado de RI (Steppan y col., 2001). Se ha observado que los niveles de resistina en sangre de roedores disminuyen tras 48 horas de ayuno y se normalizan tras la ingesta. Los datos disponibles de estudios experimentales en ratones indican que la resistina es una molécula “señal”, segregada por los adipocitos con un impacto significativo sobre la sensibilidad de la insulina y la homeostasis de la glucosa. Así se ha demostrado que la administración de resistina en ratones produce hiperglucemia y RI, si bien los tejidos “diana” específicos de la resistina no han sido todavía confirmados. No obstante puede aceptarse que los tejidos preferentes son: el tejido adiposo, el músculo esquelético y quizás hígado y cerebro. En humanos los resultados son escasos y nada concluyentes (Vidal-Puig y O’Rahilly, 2001).

Way y colaboradores (2001) han encontrado que en modelos obesos animales los niveles de ARNm de resistina en el tejido adiposo blanco estaban disminuidos. A pesar de estas discrepancias y de los resultados también conflictivos en modelos animales, es especulativo que la resistina juegue un papel importante en la patogénesis del SM y su gen es otro de los posibles candidatos todavía no investigados en profundidad.

## **1.6.2. Genes Relacionados con la acción de la Insulina**

### **1.6.2.1. Gen del Sustrato del Receptor de Insulina (IRS-1)**

Entre otros de los muchos genes candidatos está el que codifica para el sustrato del receptor de insulina (IRS-1) (Pedersen, 1999), localizado en el cromosoma 2 (2q36). Este IRS-1 es miembro de una familia de proteínas que unen la fosforilación de la subunidad  $\beta$  del receptor de insulina activado con una cascada de señales, que conducen finalmente a los múltiples efectos metabólicos y no metabólicos de la hormona (Virkamäki y col., 1999). Se han identificado múltiples polimorfismos (Ura y col., 1996), uno de ellos Gly972Arg ha sido asociado a RI (Hribal y col., 2000) y a un mayor riesgo de desarrollar diabetes tipo 2, incrementándose en el caso de sujetos obesos (Sigal y col., 1996). Además este polimorfismo

también se ha asociado a enfermedad cardiovascular en algunos estudios (Baroni y col., 1999). Junto con los resultados de otros estudios se ha sugerido que este polimorfismo Gly972Arg podría ser relevante en la prevalencia de RI en la población general y quizás mostrar algún impacto en el riesgo del desarrollo de RI en sujetos con una predisposición hacia diabetes mellitus tipo 2.

Los trabajos de genes que expresan otros miembros (IRS-2, IRS-3, IRS-4) (Pedersen, 1999) de la familia del sustrato de receptor de la insulina y otras moléculas de la cascada de señales de la insulina no son todavía muy concluyentes.

### **1.6.3. Genes de Enzimas Claves en el Metabolismo de la Glucosa**

El gen de la glucógeno sintasa ha sido estudiado debido a su papel en el proceso de la síntesis de glucógeno, y debido a que en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 e incluso en individuos no diabéticos parientes de sujetos con RI, presentan una deposición anómala de glucosa en forma de glucógeno en el músculo esquelético (Schalin-Jääntti y col., 1992). Varios polimorfismos en el gen de la glucógeno sintasa (Orho y col., 1995) han propuesto a este gen como otro de los posibles genes asociados a diabetes mellitus tipo 2 y otros componentes del SM (Groop y col., 1993; Orho y col., 1999; Fenger y col., 2000), aunque esto no ha podido ser confirmado en otros estudios (Rissanen y col., 1997b).

### **1.6.4. Genes relacionados con la Sensibilidad/Resistencia a la Insulina**

#### **1.6.4.1 Familia de los PPAR $\gamma$ .**

Los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs) son receptores nucleares pertenecientes a la familia de factores de transcripción activados por ligandos (Fajas y col., 1997; Auwerx, 1999). Los PPARs regulan la expresión de diversos genes implicados en el metabolismo de los lípidos y de la glucosa (Auwerx, 1999). Se han descrito tres subtipos de PPARs ( $\alpha, \beta, \gamma$ ), expresándose en diversos tejidos (Braissant y col., 1996). El gen de estos receptores PPAR $\gamma$  se encuentra localizado en el cromosoma 3 (3p25). Los PPAR $\gamma$  se expresan predominantemente en el tejido adiposo. Se han identificado ligandos específicos para cada una de las isoformas. El receptor PPAR $\gamma$  juega un papel muy importante en la diferenciación de los adipocitos y en la expresión de diversos genes (Spiegelman, 1998). Se han identificado dos isoformas diferentes del PPAR $\gamma$ : PPAR $\gamma$ -1 y PPAR $\gamma$ -2 (Zhu y col., 1995; Fajas y col., 1997). PPAR $\gamma$ -2 difiere de PPAR $\gamma$ -1 en un residuo adicional de 28 aminoácidos en su región NH<sub>2</sub>-terminal, codificada por el exon B (Zhu y col., 1995). PPAR $\gamma$ -1 se expresa en diversos

tejidos incluyendo el tejido adiposo, músculo esquelético, corazón e hígado, mientras que PPAR $\gamma$ -2 es expresada casi exclusivamente en el tejido adiposo (Braissant y col., 1996; Vidal-Puig y col., 1996). El receptor PPAR $\gamma$  es activado por ligandos naturales (ácidos grasos y prostanoides) y por ligandos de síntesis como las tiazolidinodionas (fármacos antidiabéticos orales) que se unen con una alta afinidad a este PPAR $\gamma$  estimulando la diferenciación de los adipocitos, y mejorando la sensibilidad a la insulina *in vitro* (Berger y col., 1996a; Berger y col., 1996b; Sandouk y col., 1993). En estudios de expresión en fibroblastos se ha observado que el PPAR $\gamma$  es el receptor predominante en la regulación de la adipogénesis (Brun y col., 1996). Estudios en humanos han demostrado que las tiazolidinodionas disminuyen la resistencia a la insulina y la hipertrigliceridemia a través de su interacción con el receptor PPAR $\gamma$  (Iwamoto y col., 1996; Antonucci y col., 1997). Todos estos datos sugieren al gen PPAR $\gamma$  como uno de los candidatos potenciales que podrían predisponer a obesidad, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia, bajos niveles de colesterol-HDL y en consecuencia al desarrollo del SM. Luan y colaboradores (2001b) han descrito una interacción entre este gen y la ingesta de ácidos grasos de la dieta, demostrando que cuando el cociente ácidos grasos poliinsaturados/saturados, procedentes de la dieta, es bajo, la media del IMC en los portadores de la mutación es mayor que en los individuos con genotipo normal, mediando un posible efecto modulador de la dieta.

Se han descrito varias mutaciones en el gen del PPAR $\gamma$ , algunas de las cuales están unidas a diabetes, obesidad y dislipemias (Ristow y col., 1998; Deeb y col., 1998; Stumvoll y col., 2002). Estudios epidemiológicos han sugerido la existencia de una asociación entre el polimorfismo Pro12Ala en el exon B del receptor PPAR $\gamma$ , obesidad y otras alteraciones metabólicas relacionadas con el SM (Beamer y col., 1998; Frederiksen y col., 2002) pero los resultados no han sido siempre concordantes.



**Tabla 4.** Genes candidatos para resistencia a la insulina y diabetes tipo 2.  
(Estudios de asociación más relevantes)

GENES CANDIDATOS	ASOCIACIÓN	
	SÍ	NO
<b>VÍA DE SEÑALES DE INSULINA</b>		
Sustrato de receptor de insulina 1 (IRS-1)	(Hribal y col., 2000) (Sigal y col., 1996)	(Armstrong y col., 1996)
Sustrato de receptor de insulina 2 (IRS-2)	(Mammarella y col., 2000)	(D'Alfonso y col., 2003) (Bernal y col., 1998)
Sustrato de receptor de insulina 4 (IRS-4)		(Almind y col., 1998)
<b>METABOLISMO LIPÍDICO Y MEDIADORES DE INSULINO RESISTENCIA</b>		
TNF $\alpha$	(Dalziel y col., 2002) (Fernández-Real y col., 1997)	(Koch y col., 2000); (Rasmussen y col., 2000a)
PC-1	(Gu y col., 2000) (Kubaszek y col., 2003)	(Rasmussen y col., 2000b) (Hegele y col., 2001)

#### 1.6.4.2 Glicoproteína de membrana (PC-1)

La glicoproteína de membrana PC-1 es una proteína transmembrana con múltiples funciones bioquímicas y está presente en la mayoría de las células (Szanto y col., 2000). Esta PC-1 inhibe la actividad tirosin-quinasa del receptor de insulina y se ha observado que cuando está sobreexpresada podría jugar un papel en la RI (Maddux y col., 1995; Frittitta y col., 1996; Youngren y col., 1996; Goldfine y col., 1998).

El gen de glicoproteína de membrana PC-1 está organizado en 25 exones en el cromosoma humano 6q22-q23, en cuyo cromosoma también se han encontrado otros genes relacionados con diabetes (Duggirala y col., 2001). La variante polimórfica K121Q (sustitución de lisina por glutamina en el codón 121) recientemente identificada, en el exón 4 del gen de la PC-1 ha sido asociada con RI en algunas poblaciones Caucásicas (Pizzuti y col., 1999; Gu y col., 2000) pero no en otras (Rasmussen y col., 2000b). Estudios realizados con fibroblastos han demostrado que en los portadores del genotipo Q121K la actividad tirosin-quinasa del receptor de insulina estaba reducida (Pizzuti y col., 1999). La PC-1 inhibe las señales del receptor de insulina interactuando directamente con el dominio de la subunidad  $\alpha$  de dicho receptor (Maddux y Goldfine, 2000).

### 1.6.5 Genes relacionados con el Metabolismo Lipídico

#### Lipasas

Entre los muchos genes, tres lipasa son de especial importancia en regulación de los niveles plasmáticos de lípidos: la hormona lipasa sensible, expresada en el tejido adiposo, la lipoproteína lipasa endotelial y la lipasa hepática. Estos genes han sido estudiados como contribuyentes potenciales al componente genético del SM y obesidad de tipo visceral.

La lipoproteína lipasa (LPL) es una enzima lipolítica del endotelio capilar del músculo y del tejido adiposo. Defectos moleculares en el gen de la LPL producen disminución de los niveles de colesterol-HDL y un aumento en los niveles de triglicéridos. Se han descrito varias mutaciones en el gen de la LPL como responsables de una pérdida completa o casi completa de la función catalítica de esta enzima (Murthy y col., 1996; Ukkola y col., 2002). El polimorfismo Asn291Ser en el gen de la LPL se ha asociado con niveles elevados de triglicéridos, bajos niveles de colesterol-HDL y un aumento del riesgo cardiovascular (aterosclerosis prematura) (Wittrup y col., 1999).

La lipasa hepática (LH) puede hidrolizar triglicéridos y fosfolípidos en todas las lipoproteínas. Mutaciones en la región del promotor del gen de la LH producen deficiencias de LH, caracterizadas por triglicéridos anormales ricos en LDL y HDL. Los individuos con deficiencias de LH presentaron un mayor riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular prematura, a pesar del aumento en los niveles de HDL (Dammerman y Breslow, 1995). También se han descritos varios polimorfismos en el gen de la LH afectando al perfil lipídico y al riesgo cardiovascular (Pihlajamäki y col., 2000; Ji y col., 2002). La sustitución G-250A en el promotor de este gen, ha sido asociado con dislipidemias y RI en sujetos sanos y en miembros de familias con hiperlipemia familiar combinada (Pihlajamäki y col., 2000).

Finalmente, también es de interés el gen FABP2, que codifica para la proteína intestinal de unión a ácidos grasos (IFABP), expresada específicamente en las células epiteliales del intestino delgado (Sweetser y col., 1987). Esta proteína se une con una alta afinidad a ácidos grasos saturados e insaturados de cadena larga, tomando parte en la absorción y el transporte intracelular de los ácidos grasos. Defectos en este gen podrían afectar a la capacidad de unión de la proteína, incrementándose la absorción de ácidos grasos y la oxidación de los mismos. De este modo, el polimorfismo Ala54Thr del gen FABP2 se ha asociado con un incremento en la oxidación de ácidos grasos y RI en Indios Pima (Baier y col., 1995) y en población Japonesa (Yamada y col., 1997). Sin embargo, esta variante polimórfica parece no estar asociada con RI ni con diabetes mellitus tipo 2 en poblaciones Caucásicas (Tahvanainen y col., 2000; Erkkila y col., 2002).

## 2. OBJETIVOS

Este estudio fue llevado a cabo con el objeto de estudiar las bases genéticas del Síndrome Metabólico usando polimorfismos en genes candidatos en individuos de la población española. Las bases genéticas del SM son poco conocidas pero los genes que regulan la acción de la insulina, la resistencia a la insulina y la obesidad podrían jugar un papel muy importante en la etiología de la enfermedad.

Los objetivos concretos de esta tesis fueron:

1. Determinar en la población general Española las frecuencias de los polimorfismos de genes de componentes del SM:
  - Gen del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico: Gln27Glu
  - Gen del receptor  $\beta_3$ -adrenérgico: Trp64Arg
  - Gen de la UCP1: -3826A→G
  - Gen del receptor PPAR $\gamma$ : Pro12Ala
  - Gen de la PC-1: K121Q
2. Estudiar su asociación con los componentes del SM y compararlas con otras poblaciones.
3. Analizar la relación de los diferentes polimorfismos con parámetros antropométricos y bioquímicos relacionados con obesidad y otras alteraciones metabólicas asociadas.
4. Analizar la relación de los diferentes polimorfismos con Resistencia a la Insulina.
5. Analizar el efecto aditivo de los polimorfismos Trp64Arg y -3826A→G de los genes del receptor  $\beta_3$ -adrenérgico y de la UCP1.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO

La población analizada en este estudio es población general, que se ha extraído de un estudio multicéntrico del Estado Español de diseño transversal. Dicho estudio fue llevado a cabo para analizar las prevalencias en población no conocida de Intolerancia a la glucosa en ayunas (IGA), Tolerancia Anormal a la Glucosa a las 2hs (post sobrecarga) (TAG), y Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM Tipo 2), y su relación con factores de riesgo cardiovascular. Este estudio epidemiológico se llevó a cabo por el grupo de investigación de Diabetes y Lípidos del Hospital Clínico San Carlos, bajo la dirección del Profesor Dr. D. Manuel Serrano Ríos y que ha sido objeto de una tesis doctoral (Martínez-Larrad, 2001).

El diseño, los objetivos, el reclutamiento y las características de la población analizada en ese estudio, se recogen en el Anexo I.

La población analizada en el presente estudio se identificó mediante muestreo aleatorio estratificado del estudio poblacional previo y está compuesta de individuos de ambos sexos con edades comprendidas entre los 35 y 64 años.

A continuación se describe la población analizada para el estudio de los diferentes polimorfismos genéticos objeto de esta tesis doctoral.

##### 3.1.1. Estudio I: Análisis del polimorfismo Gln27Glu del gen del receptor $\beta_2$ -adrenérgico

Se estudiaron 666 varones (n=319, 47.9%) y mujeres (n=347, 52.1%), de 35-64 años, reclutados del estudio multicéntrico del Estado Español de diseño transversal citado anteriormente, mediante aleatorización. De acuerdo al criterio del comité de expertos en el diagnóstico y clasificación de diabetes mellitus (ADA 1997), los sujetos fueron clasificados como normoglucémicos (NG), con intolerancia a la glucosa en ayunas (IGA) (n=39), con tolerancia anormal a la glucosa a las 2 horas (TAG) (n=50), y diabéticos (DM) (n=26).

### **3.1.2. Estudio II: Análisis de los polimorfismos Trp64Arg del gen del receptor $\beta_3$ -adrenérgico y del polimorfismo -3826A→G de la proteína desacoplante UCP1**

332 sujetos participaron en el estudio; 160 varones (48.2%) y 172 mujeres (51.8%) con edades comprendidas entre los 35 y 65 años, aleatorizados de la población general anteriormente citada. Los participantes en el estudio fueron clasificados como obesos (IMC  $\geq$  30) (n=93, 38 varones y 55 mujeres) y de acuerdo al grado de tolerancia a la glucosa como normoglucémicos (NG) (n=217); con tolerancia anormal a la glucosa a las 2 horas (TAG) (n=17); y con diabetes tipo 2 (DM) (n=19).

### **3.1.3. Estudio III: Análisis del polimorfismo Pro12Ala del gen del receptor activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR $\gamma$ )**

Se analizó el ADN de 464 individuos; 210 varones (45.3%) y 254 mujeres (54.7%) aleatorizados de la población general. 354 sujetos NG (81.8%); 35 con IGA (8.1%); 36 con TAG (8.3%) y 8 individuos con DM tipo 2 (1.8%), 4 de los cuales eran obesos.

### **3.1.4. Estudio IV: Análisis del polimorfismo K121Q del gen de la Glicoproteína de membrana (PC-1)**

Se analizó el ADN de 293 individuos; 131 varones (44.7%) y 162 mujeres, aleatorizados de la población global. De estos sujetos 21 presentaron IGA (7.4%), 16 TAG (5.7%), y 18 DM tipo 2 (6.4%).

## **3.2. VARIABLES DE ESTUDIO**

### **3.2.1 PRESIONES ARTERIALES**

- Presión arterial sistólica y diastólica.

### **3.2.2 MEDIDAS E ÍNDICES ANTROPOMÉTRICOS**

- Peso (Kg), Talla (m), Índice de masa corporal (IMC):  $\text{Peso (Kg)}/\text{Talla}^2$  (m), Circunferencia y cociente cintura/cadera (Ci/Ca), Diámetro sagital abdominal (DSA).

### **3.2.3 DETERMINACIONES BIOLÓGICAS (EN SANGRE VENOSA Y TRAS 12 HORAS DE AYUNO):**

- Tolerancia oral a la glucosa (75 gr. de glucosa, basal y 2 horas) según los criterios OMS (*Expert Committee on Diabetes Mellitus, WHO Technical report series report series 646.pp1-80 Geneva 1980*), Insulina, Insulina a las 2 horas, Proinsulina, Proinsulina a las 2

horas, Leptina, Leptina a las 2 horas, Perfil Lipídico: Colesterol Total (CT), Triglicéridos (TG), Colesterol-HDL (c- HDL), Colesterol-LDL (c-LDL).

**Intolerancia a la glucosa:** El grado de Tolerancia oral a la glucosa se clasificó de acuerdo a los criterios ADA 1997 (Report of the Expert Committee on the Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care, vol 21, Suppl 1, January, 1998):

Normo-glucémicos (**NG**):

Valores basales de glucosa < 110 mg/dl (6.1mmol/l).

Intolerancia a la glucosa en ayunas (**IGA**):

Valores basales de glucemia  $\geq 110$  mg/dl (6,1 mmol/l) y <126 mg/dl (7,0 mmol/l).

Tolerancia anormal a la glucosa a las 2 horas (**TAG**):

Valores de glucemia  $\geq 140$  mg/dl (7,8 mmol/l) y <200 mg/dl (11,1 mmol/l), a las 2 horas tras una sobrecarga oral de glucosa (TTOG).

**Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM Tipo 2):** Se consideran criterios diagnósticos de diabetes:

1. Síntomas de diabetes (poliuria, polidipsia y pérdida inexplicable de peso) más glucemia  $\geq 200$  mg/dl (11,1 mmol/l), realizada en cualquier momento del día sin tener en cuenta el momento de la última ingesta.
2. Valores basales de glucemia  $\geq 126$  mg/dl (7,0 mmol/l). Se considera basal, la no ingesta calórica en las últimas 8 horas.
3. Valores de glucemia  $\geq 200$  mg/dl (11,1 mmol/l), a las 2 horas tras una sobrecarga oral de glucosa (TTOG).

**Resistencia a la Insulina:** En este estudio fue determinada por el método HOMA-IR (*Homeostasis model assessment of insulin resistance*) utilizando las concentraciones de glucosa e insulina basal, de acuerdo a la fórmula:

Insulina ( $\mu\text{U/mL}$ ) x Glucosa (mmol/L)/22.5 (Matthews y col., 1985).

## - LABORATORIO

### Determinaciones biológicas (en sangre venosa y tras 12 horas de ayuno):

Las determinaciones realizadas en el laboratorio son las siguientes:

- Tolerancia oral a la glucosa (Anexo I).

- Insulina

La determinación de insulina en suero se realizó por el método de doble anticuerpo por radioinmunoensayo (RIA) (Insulina humana-específica RIA, método LINCO, St. Louise; MO). Valor de referencia: 5 - 15  $\mu$ U/ml.

**- Proinsulina**

La determinación se realizó por el método de anticuerpos policlonales por radioinmunoensayo (RIA) (método de LINCO, St. Louise, MO). Valor de referencia:  $7.94 \pm 1.5$  pmol.

**- Leptina.**

Se realizó por radioinmunoensayo (método de LINCO, St. Louise, MO), Valores de referencia: en varones  $3.8 \pm 1.8$ .ng/ml, en mujeres  $7.4 \pm 3.7$  ng/ml .

**- Sistemático de sangre**

Se realizó en un sistema automatizado (Hitachi 704, Boehringer Mannheim, Alemania)..

**- Perfil básico**

Creatinina, urea, proteínas, albúmina, calcio, ácido úrico, alanina aminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina, glucosa.

**- Perfil lipídico**

**Colesterol total (CT)**

Se realizaron mediante determinación enzimática (colesterol oxidada, peroxidasa) (CHOD-PAP, Boehringer Mannheim). Valor de referencia  $\leq 200$  mg/dl (5.2 mmol/l).

**Triglicéridos (TG)**

Determinación mediante hidrólisis enzimática de los triglicéridos y valoración enzimática del producto (GPO-PAP Boehringer Mannheim). Valor de referencia  $\leq 200$  mg/dl (2.3mmol/l).

**Colesterol-HDL (c-HDL)**

Método: Enzimático colorimétrico. Se determinó en el sobrenadante previa precipitación de las VLDL, LDL y quilomicrones ácido fosfotungstico y determinación enzimática en el sobrenadante del colesterol (HDL, Boehringer Mannheim). Intervalo de referencia de 35 - 120 mg/dl .[  $> 35$  mg/dl (0.9 mmol/l)].

**Colesterol-LDL (c-LDL)**

Se estimó mediante la fórmula de Friedewald, excepto cuando los triglicéridos excedían de 400 mg/dl.

### 3.3. ANALISIS DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS

La puesta a punto de la mayor parte de las técnicas de biología molecular así como los análisis de muestras descritos a continuación, se realizaron en el Laboratorio de Diabetes y Lípidos del Hospital Clínico San Carlos de Madrid, dirigido por el Profesor Manuel Serrano Ríos.

#### 3.3.1 Extracción del ADN genómico humano

El ADN fue extraído de leucocitos mediante digestión con proteinasa K seguido de extracción con fenol/cloroformo (Sambrook y col., 1989) o alternativamente con un Kit comercial de extracción de ADN (Quiagen GmbH, Germany). Finalmente el ADN purificado se disolvió en tampón TE (Tris-HCL 10 mM pH 8.0; EDTA 1mM pH 8.0) o en agua destilada.

#### 3.3.2. Análisis del polimorfismo –3826A→G de la proteína desacoplante UCP1

Las condiciones para la amplificación de la región que contiene el fragmento de 470 pb del gen de UCP1 fueron llevadas a cabo partiendo de 200-400 ng de ADN, en un volumen de 26  $\mu$ l, conteniendo 0.38 mM de cada dNTP, 10 % buffer (100mM Tris-HCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM KCl, pH 8.3), 1.0  $\mu$ M de cada cebador, y entre 0.3 y 0.63 U de Taq DNA polimerasa (Biotools, Spain). Los cebadores utilizados fueron: cebador A (sentido) 5'-CTTGGGTAGTGACAAAGTAT-3' y cebador B (antisentido) 5'-CCAAAGGGTCAGATTTCTAC-3'. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador modelo 9700 de Applied Biosystems, usando el siguiente programa:

95° C (desnaturalización inicial), 5 min.	
95° C (desnaturalización), 30 seg.	} 29 ciclos
58° C (hibridación), 30 seg.	
72° C (síntesis), 40 seg.	
72° C (síntesis final), 7 min	

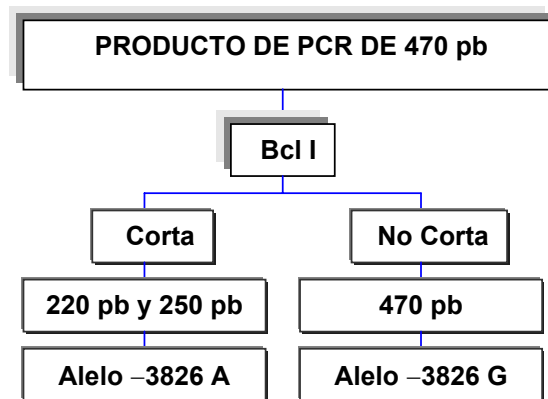


El producto amplificado (470 pb) fue visualizado mediante electroforesis en geles de agarosa al 2 %, con bromuro de etidio. El ADN fue visualizado en un transiluminador de luz ultravioleta.

Este producto de PCR fue digerido a 55° C durante 3 horas con 5 U del enzima de restricción Bcl I (Boehringer Mannheim Gmb, Germany), dando como resultado fragmentos de 220 y 250 pb para -3826A homocigotos; de 220, 250 y 470 pb para -3826A→G heterocigotos; y de 470 pb (sin cortar) para -3826G homocigotos.

Los fragmentos de ADN digeridos fueron visualizados mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa al 3%, y tinción con bromuro de etidio.

**Figura 2.** Esquema de la detección del polimorfismo -3826A→G del gen de la proteína desacoplante UCPI.



### 3.3.3. Análisis del polimorfismo Trp64Arg del gen del receptor $\beta_3$ -adrenérgico

Partiendo de 300 ng de ADN, se amplificó el segmento de 248 pb que contiene el codon 64 del receptor  $\beta_3$ -adrenérgico en un volumen de 26  $\mu$ l, conteniendo 0.38 mM de cada dNTP, 10 % buffer (100mM Tris-HCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM KCl, pH 8.3), 10 % DMSO, 20 pmol de cada cebador, y entre 0.5 y 0.9 U de Taq DNA polimerasa (Biotools, Spain). La secuencia de cebadores utilizadas fueron las descritas por Walston y col. (1995). Cebador A (sentido): 5'-CCAGTGGGCTGCCAGGGG-3' y cebador B (antisentido): 5'-GCCAGTGGCGCCCAACGG-3'.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo usando el siguiente programa

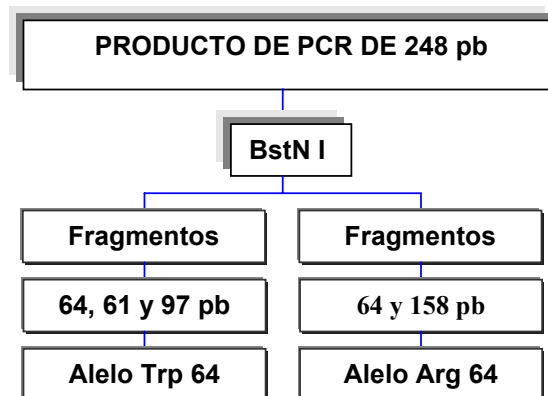
95° C (desnaturalización inicial), 5 min.	
95° C (desnaturalización), 30 seg.	} 29 ciclos
66° C (hibridación), 30 seg.	
72° C (síntesis), 40 seg.	
72° C (síntesis final), 7 min	

El producto amplificado de 248 pb fue visualizado mediante electroforesis en geles de agarosa al 2 %, con bromuro de etidio en un transiluminador de luz ultravioleta.

Este producto de PCR fue digerido a 60° C durante 3 horas con 5 U del enzima de restricción Bst N I (Boehringer Mannheim GmbH, Germany), dando como resultado fragmentos de 61, 64 y 97 pb para homocigotos Trp64; de 61, 64, 97 y 158 pb heterocigotos Trp64Arg; y de 64 y 158 pb para homocigotos Arg64Arg.

La visualización de los fragmentos de ADN digeridos se realizó mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa al 4 %, y tinción con bromuro de etidio.

**Figura 3.** Esquema de la detección del polimorfismo Trp64Arg del gen del receptor  $\beta_3$ -adrenérgico.



### 3.3.4. Análisis del polimorfismo Gln27Glu del gen del receptor $\beta_2$ -adrenérgico

Las condiciones de la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) para la amplificación del fragmento de 353 pares de bases que contiene el codon 27 del gen del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico fueron llevadas a cabo partiendo de 300-500 ng de ADN en un volumen de 26  $\mu$ l, conteniendo 0.38 mM de cada dNTP, 10 % buffer (100mM Tris-HCl, 15 mM  $MgCl_2$ , 500 mM KCl, pH 8.3), 10 % DMSO, 20 pmol de cada cebador, y entre 0.3 y 0.63 U de Taq DNA polimerasa (Biotools, Spain). Los cebadores utilizados fueron los descritos por Large y col. (1997). Las secuencias de estos cebadores son las siguientes: cebador A (sentido) 5'-GGCCCATGACCAGATCAGCA-3'; cebador B (antisentido) 5'-GAATGAGGCTTCAGGCGTC-3'.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador modelo 9700 de Applied Biosystems, usando el siguiente programa:

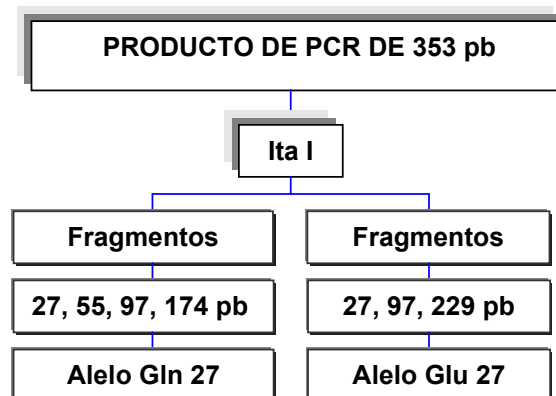
94° C (desnaturalización inicial), 4 min.	
94° C (desnaturalización), 1 min.	} 30 ciclos
63° C (hibridación), 1 min.	
72° C (síntesis), 1 min.	
72° C (síntesis final), 10 min	

El producto amplificado (353 pb) fue visualizado mediante electroforesis en geles de agarosa al 2 %, con bromuro de etidio. El ADN fue visualizado en un transiluminador de luz ultravioleta.

Este producto de PCR fue digerido toda una noche a 37 °C con 1.5 U del enzima de restricción *ItaI* (Boehringer Mannheim Gmb, Germany), dando como resultado fragmentos de 27, 55, 97 y 174 pb para homocigotos Gln27; de 27, 55, 97, 174 y 229 pb para heterocigotos Gln27Glu27; y de 27, 97 y 229 pb en homocigotos Glu27.

La visualización de los fragmentos de ADN digeridos se realizó mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa al 4 %, y tinción con bromuro de etidio.

**Figura 4.** Esquema de la detección del polimorfismo Gln27Glu del gen del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico.



### 3.3.5. Análisis del polimorfismo Pro12Ala del gen del receptor activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR $\gamma$ )

Para la amplificación del exón B del gen PPARgamma se usaron los siguientes cebadores; Cebador A: 5'- GAC AAA ATA TCA GTG TGA ATT ACA GC-3' Y cebador B: 5'-CCC AAT AGC CGT ATC TGG AAG G-3' (Valve y col., 1999). Las condiciones de PCR para el fragmento de 267 pb, fueron desarrolladas en un volumen de 6  $\mu$ l, conteniendo 100 ng de ADN, 3 pmoles de cada cebador, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.8), 50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.1 % Triton X-100, 100  $\mu$ mol/L deoxy dNTP, 0.25 U de Taq DNA polimerasa (Finnzymes, Espoo, Finlanda) y 0.55  $\mu$ Ci [<sup>32</sup>P] dCTP.

94° C (desnaturalización inicial), 4 min.	}	35 ciclos
94° C (desnaturalización), 30 seg.		
66° C (hibridación), 1 min.		
72° C (síntesis), 40 seg.		
72° C (síntesis final), 6 min		

Las variantes fueron detectadas mediante *single strand conformation analysis* (SSCP) en geles de poliacrilamida al 6 % según las condiciones descritas por Valve y colaboradores (1999).

### 3.3.6. Análisis del polimorfismo K121Q del gen de la Glicoproteína de membrana (PC-1)

Las condiciones para la amplificación de la región que contiene el fragmento de 238 pb del gen de PC-1 fueron llevadas a cabo partiendo de 100-200 ng de ADN, en un volumen de 20  $\mu$ l, conteniendo 0.38 mM de cada dNTP, 10 % buffer (100mM Tris-HCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM KCl, pH 8.3), 1.0  $\mu$ M de cada cebador, y entre 0.3 y 0.63 U de Taq DNA polimerasa (Finnzymes, Espoo, Finland). Los cebadores utilizados fueron los descritos por Rasmussen y colaboradores (2000b). Cebador A (sentido): 5'-CTGTGTTCACTT TGGACATGTTG-3' y cebador B (antisentido): 5'-GACGTTGGAAGATACCAGGTTG-3'.

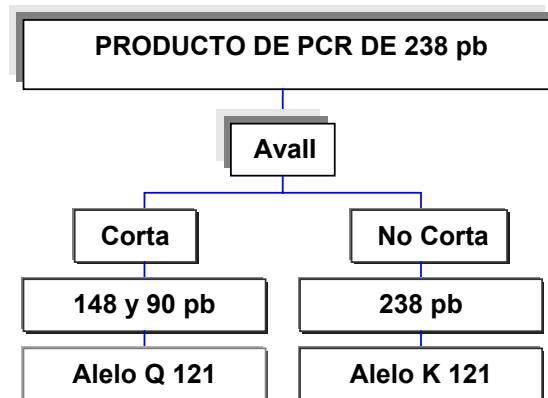
Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador (modelo 9700 de Applied Biosystems) usando el siguiente programa:

94° C (desnaturalización inicial), 4 min.	}	35 ciclos
94° C (desnaturalización), 40 seg.		
62° C (hibridación), 40 seg.		
72° C (síntesis), 40 seg.		
72° C (síntesis final), 4 min		

El producto amplificado (238 pb) fue visualizado mediante electroforesis en geles de agarosa al 2 %, con bromuro de etidio. El ADN fue visualizado en un transiluminador de luz ultravioleta.

Este producto de PCR fue digerido durante 4 horas a 37 °C con 2 U del enzima de restricción Ava II (New England Biolabs), dando como resultado fragmentos de 238 pb para homocigotos K121K; de 238, 148 y 90 pb para heterocigotos K121Q; y de 148 y 90 pb en homocigotos Q121Q. La visualización de los fragmentos de ADN digeridos se realizó mediante electroforesis en geles verticales de poliacrilamida al 6 %, y tinción con bromuro de etidio.

**Figura 5.** Esquema de la detección del polimorfismo K121Q del gen de la Glicoproteína de membrana (PC-1).



### 3.4. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Se pidió consentimiento informado previo a la realización del estudio transversal, respetando las normas de la declaración de Helsinki. Se mantuvo la confidencialidad de los datos de acuerdo a la ley de protección de datos (LEY ORGANICA 5/92 DE 29 DE OCTUBRE sobre la regulación del tratamiento automatizado de los datos de carácter personal, BOE 30 de Octubre de 1992).

### 3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables cualitativas se presentan con su distribución de frecuencias. Las variables cuantitativas se resumen en su media, desviación estándar (DE), e intervalo de confianza al 95 %.

Se evaluó la asociación entre variables cualitativas con el test de  $\chi^2$  o prueba exacta de Fisher. Se estimó el *odds ratio* (razón de ventajas) junto a su intervalo de confianza al 95% según el método de Cornfield.

Se ajustó un modelo de regresión logística, con el objeto de evaluar la asociación de aquellas variables en las que en análisis crudo el resultado de la p del contraste era inferior a 0.15. Se evaluó la existencia de interacciones. Se presentan los “*odds ratios*” ajustados junto a sus intervalos de confianza al 95%.

Se analizó el comportamiento de las variables cuantitativas por cada una de las variables independientes categorizadas mediante el test de la t de Student (en comparaciones de una variable con dos categorías) y/o el análisis de la varianzas (ANOVA). En todos los casos se comprobó la distribución de la variable frente a los modelos teóricos y se contrastó la hipótesis de homogeneidad de varianzas.

Para el análisis entre pares de variables cuantitativas se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson. Cuando la relación era lineal, se ajustó un modelo de regresión múltiple. La estimación de parámetros se calculó mediante el método de mínimos cuadrados.

El estudio comparativo de las variables bioquímicas en los diferentes genotipos se realizó mediante análisis de las varianzas. La distribución de los diferentes genotipos en cada uno de los grupos se analizó mediante la prueba de  $\chi^2$ . Las frecuencias alélicas de los diferentes polimorfismos se analizaron mediante tablas de 2x2.

En todos los contrastes de hipótesis se rechazó la hipótesis nula cuando el valor del error de tipo I o error  $\alpha$  era menor a 0.05.

El paquete informático que se utilizó para el análisis fue SAS v 6.12 y SPSS v 10 para Windows.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 ESTUDIO I. POLIMORFISMO Gln27Glu DEL GEN DEL RECEPTOR BETA2

De los 666 sujetos participantes en este estudio, 186 (79 varones y 107 mujeres) presentaron obesidad — definida como un IMC  $\geq 30$ . Estos individuos fueron clasificados según su grado de tolerancia a la glucosa como normoglucémicos (n=551, 82.7 %), con IGA (n=39, 5.9 %), con TAG (n=50, 7.5 %) y con Diabetes Mellitus tipo 2 (n=26, 3.9%); 12 de los cuales presentaban obesidad y 14 fueron considerados como no obesos. La distribución del polimorfismo Gln27Glu  $\beta_2$ -AR en la población estudiada (n=666) fue 39.4% (n=262), 46.8% (n=312) y 13.8% (n=92) para Gln27Gln27, Gln27Glu27 y Glu27Glu27 respectivamente (frecuencia del alelo Glu27: 0.372). Las frecuencias alélicas y genotípicas (tablas 5, 6, 7 y 8) en nuestra población de estudio están en equilibrio según la ley de Hardy-Weinberg.

Observamos una mayor prevalencia de homocigosis para el alelo Glu27 en mujeres (tabla 5), aunque estas diferencias no alcanzaron el nivel estadístico de significación (p=0.075).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la distribución del genotipo respecto al IMC (tabla 5).

**Tabla 5.** Frecuencias genotípicas del polimorfismo Gln27Glu de receptor  $\beta_2$ -adrenérgico en la población estudiada.

Genotipo	TODOS LOS SUJETOS		TODOS LOS SUJETOS	
	VARONES (n=319)	MUJERES (n=347)	OBESOS (n=186)	NO OBESOS (n=477)
<b>Gln27Gln27</b>	130 (40.8%)	132 (38.0%)	68 (36.6%)	191 (40%)
<b>Gln27Glu27</b>	155 (48.5%)	157 (45.3%)	88 (47.3%)	224 (47%)
<b>Glu27Glu27</b>	34 (10.7%)	58 (16.7%)	30 (16.1%)	62 (13%)

Datos expresados como n (%). Valores comparados mediante  $\chi^2$ . No existen diferencias significativas.



**Tabla 6.** Frecuencias genotípicas del polimorfismo Gln27Glu del receptor  $\beta$ 2-adrenérgico estratificadas por sexo e IMC.

Genotipo	VARONES		MUJERES	
	OBESOS (n=79)	NO OBESOS (n=240)	OBESAS (n=107)	NO OBESAS (n=237)
<b>Gln27Gln27</b>	26 (32.9%)	104 (43.3%)	42 (39.3%)	87 (36.7%)
<b>Gln27Glu27</b>	43 (54.4%)	112 (46.7%)	45 (42.0%)	112 (47.3%)
<b>Glu27Glu27</b>	10 (12.7%)	24 (10%)	20 (18.7)	38 (16%)

Datos expresados como n (%). Valores comparados mediante  $\chi^2$ . No existen diferencias significativas.

**Tabla 7.** Frecuencias alélicas del polimorfismo Gln27Glu del receptor  $\beta$ 2-adrenérgico en la población estudiada.

Frecuencias alélicas	TODOS LOS SUJETOS		TODOS LOS SUJETOS	
	VARONES (n=319)	MUJERES (n=347)	OBESOS (n=186)	NO OBESOS (n=477)
<b>Gln27</b>	415 (0.65)	421 (0.61)	224 (0.60)	606 (0.64)
<b>Glu27</b>	223 (0.35)	273 (0.39)	148 (0.40)	348 (0.36)

Datos expresados como n (frecuencia). Valores comparados mediante  $\chi^2$ . No existen diferencias significativas.

La estratificación por sexo mostró que la frecuencia del alelo Glu27 fue mayor en los varones obesos que en los no obesos (0.40 vs 0.33,  $p=0.13$ ) aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (tabla 8). En los varones, el porcentaje de sujetos obesos dentro del mismo genotipo aumenta en paralelo a la presencia del alelo Glu27 — Gln27Gln27 (20%), Gln27Glu27 (27.7%), Glu27Glu27 (29%), mientras que en mujeres no observamos esta tendencia — Gln27Gln27 (32.6%), Gln27Glu27 (28.6%) y Glu27Glu27 (34.5%).

**Tabla 8.** Frecuencias alélicas del polimorfismo Gln27Glu del receptor  $\beta$ 2-adrenérgico estratificadas por sexo e IMC.

Frecuencias alélicas	VARONES		MUJERES	
	OBESOS (n=79)	NO OBESOS (n=240)	OBESAS (n=107)	NO OBESAS (n=237)
<b>Pro12</b>	95 (0.60)	320 (0.67)	129 (0.61)	286 (0.60)
<b>Ala12</b>	63 (0.40)	160 (0.33)	85 (0.39)	188 (0.40)

Datos expresados como n (frecuencia). Valores comparados mediante  $\chi^2$ . No existen diferencias significativas.

La Tabla 9 muestra que los varones obesos homocigotos para el alelo Glu27 presentaron valores en media significativamente más elevados de IMC ( $p=0.013$ ) y de DSA ( $p=0.036$ ) que los heterocigotos y homocigotos para el alelo Gln27. Estas diferencias no fueron observadas en las mujeres.

**Tabla 9.** Parámetros antropométricos para los genotipos del polimorfismo Gln27Glu del receptor  $\beta$ 2-adrenérgico en los individuos obesos.

		SUJETOS OBESOS		
		Gln27Gln27	Gln27Glu27	Glu27Glu27
<b>Edad, años</b>	<b>varones</b>	51.9 $\pm$ 7.9 (26)	50.6 $\pm$ 9.5 (46)	48.4 $\pm$ 8.6 (10)
	<b>mujeres</b>	54.2 $\pm$ 8.0 (40)	49.9 $\pm$ 9.2 (43)	51.1 $\pm$ 8.2 (18)
<b>IMC, kg/m<sup>2</sup></b>	<b>varones</b>	32.0 $\pm$ 2.0 (26)	31.9 $\pm$ 1.8 (46)	34.1 $\pm$ 3.1 (10)*
	<b>mujeres</b>	34.0 $\pm$ 3.9 (40)	33.5 $\pm$ 3.9 (43)	32.4 $\pm$ 2.1 (18)
<b>Ci/Ca</b>	<b>varones</b>	0.99 $\pm$ 0.04 (26)	1.03 $\pm$ 0.14 (46)	1.01 $\pm$ 0.04 (10)
	<b>mujeres</b>	0.96 $\pm$ 0.09 (40)	0.96 $\pm$ 0.05 (43)	0.98 $\pm$ 0.07 (18)
<b>DSA, cm</b>	<b>varones</b>	24.9 $\pm$ 2.9 (26)	24.9 $\pm$ 3.2 (46)	27.8 $\pm$ 3.7 (10) <sup>†</sup>
	<b>mujeres</b>	25.4 $\pm$ 3.1 (40)	24.5 $\pm$ 3.4 (43)	24.4 $\pm$ 2.6 (18)
<b>PAS(mmHg)</b>	<b>varones</b>	136 $\pm$ 20 (26)	134 $\pm$ 19 (43)	138 $\pm$ 18 (10)
	<b>mujeres</b>	141 $\pm$ 22 (42)	133 $\pm$ 21 (45)	134 $\pm$ 17 (20)
<b>PAD(mmHg)</b>	<b>varones</b>	88 $\pm$ 15 (26)	83 $\pm$ 11 (43)	86 $\pm$ 11 (10)
	<b>mujeres</b>	88 $\pm$ 12 (42)	85 $\pm$ 12 (45)	83 $\pm$ 11 (20)

PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica. Valores expresados como media  $\pm$  D.S. (n). \* ( $p < 0.05$ ). <sup>†</sup> $p=0.013$ ;  $p=0.036$ .

Con respecto a los parámetros bioquímicos estudiados (Tabla 10), observamos que las concentraciones plasmáticas de glucosa a las 2 horas fueron más elevadas en los sujetos homocigotos para el Glu27 que en los homocigotos para el alelo Gln27 (6.41 vs 5.53 mM,  $p=0.022$ ) en la población global.

Cuando realizamos la estratificación por sexos sólo los varones mostraron estas diferencias (5.5, 5.9 y 6.9 mM para los sujetos con genotipos Gln27Gln27, Gln27Glu27 y Glu27Glu27 respectivamente,  $p=0.018$ ). De hecho, observamos que los varones con genotipo Glu27Glu presentaron una mayor prevalencia de diabetes mellitus que los varones con genotipo Gln27Gln27 (12.5% vs 1.7 %,  $p=0.010$ ).

No detectamos diferencias significativas entre los genotipos con respecto a los valores de HOMA, insulina, proinsulina y leptina. Respecto al perfil lipídico, los valores de colesterol total y colesterol LDL estaban incrementados en varones portadores del alelo Glu27 (colesterol total  $5.61\pm 0.98$ ,  $5.95\pm 0.98$  y  $5.90\pm 1.06$  para los sujetos con genotipos Gln27Gln27, Gln27Glu27 y Glu27Glu27 respectivamente,  $p=0.018$ ; colesterol-LDL  $3.70\pm 0.88$ ,  $4.01\pm 0.85$  y  $3.90\pm 0.88$  para sujetos con genotipos Gln27Gln27, Gln27Glu27 y Glu27Glu27 respectivamente,  $p=0.026$ ). Ésto se confirmó después de estratificar la población en función del grado de obesidad. En el caso de las mujeres sólo aquellas que presentaban obesidad y eran portadoras del genotipo Glu27Glu27 tenían niveles elevados de colesterol total (tablas 11 y 12).

La Tabla 13 muestra el análisis de regresión logística multivariado, en la cual se observa que el sexo, el grupo de edad, el grado de tolerancia a la glucosa y el diámetro sagital abdominal, fueron todos factores asociados con la homocigosis del alelo Glu27, mientras que la heterocigosis para este alelo no estuvo asociada con esas variables. De este modo, observamos que la prevalencia de la homocigosis (Glu27Glu27) fue mayor en mujeres (ORaj: 1.86, IC 95% 1.10-3.17,  $p=0.02$ ), en el grupo de edad de 35-44 años comparado con los de mediana y de mayor edad (ORaj: 1.99, IC 95% 1.06-3.75,  $p=0.03$  y ORaj: 2.41, IC 95% 1.20-4.82,  $p=0.01$ , respectivamente) y en los sujetos que presentaban diabetes mellitus tipo 2 cuando se compararon con los normoglucémicos (ORaj: 3.86, IC95% 1.18-12.59,  $p=0.03$ ). También la obesidad visceral, determinada por el DSA, predominó en los homocigotos para el alelo Glu27 (ORaj: 1.09, IC 95% 1.08-1.18,  $p=0.03$ ).

**Tabla 10.** Parámetros bioquímicos para los genotipos del polimorfismo Gln27Glu del receptor  $\beta$ 2-adrenérgico en los individuos obesos.

		SUJETOS OBESOS		
		Gln27Gln27	Gln27Glu27	Glu27Glu27
Glucosa basal (mmol/l)	varones	5.6±1.3 (25)	5.8±1.2 (40)	5.5±1.0 (10)
	mujeres	5.5 ±1.4 (39)	5.3±1.0 (41)	5.4±0.8 (17)
Glucosa 2h (mmol/l)	varones	5.6±2.6 (17)	6.5±3.0 (30)	7.2±3.4 (10)
	mujeres	5.5±2.0 (33)	6.3±2.7 (36)	5.6±1.5 (15)
Insulina basal ( $\mu$ U/ml)	varones	14.7±7.8 (26)	15.1±16.3 (43)	14.7±9.4 (10)
	mujeres	13.3±6.6 (40)	12.9±5.6 (43)	13.2±5.7 (18)
Insulina 2h ( $\mu$ U/ml)	varones	25.2±18.7 (12)	41.2±31.7 (22)	37.7±34.4 (5)
	mujeres	35.6±33.4 (25)	62.5±55.2 (25)	42.6±30.6 (8)
Proinsulina basal pmol/l	varones	16.7±15.5 (5)	20.6±19.7 (18)	11.6±9.5 (2)
	mujeres	15.6±12.6 (19)	18.1±16.5 (16)	18.2±15.4 (6)
Leptina basal ( $\mu$ g/l)	varones	8.1±5.2 (16)	8.2±5.3 (25)	10.9±3.3 (7)
	mujeres	31.7±15.9 (23)	25.8±10.6 (32)	24.1±10.3 (8)

Resultados expresados como media  $\pm$  D.S. (n). Analizados mediante  $\chi^2$ . No existen diferencias significativas

**Tabla 11.** Perfil lipídico para cada genotipo del polimorfismo Gln27Glu del receptor  $\beta$ 2-adrenérgico en los individuos obesos.

		SUJETOS OBESOS		
		Gln27Gln27	Gln27Glu27	Glu27Glu27
Triglicéridos, mmol/l	varones	1.53±0.84 (25)	1.82±1.33 (41)	1.97±0.69 (10)
	mujeres	1.21 ±0.63 (39)	1.19±0.44 (40)	1.58±1.07 (17)
Colesterol total,mmol/l	varones	5.77±0.98 (25)	6.00±1.01 (41)	6.03±1.03 (10)
	mujeres	5.77±1.11 (39)	5.51±1.09 (40)	6.31±0.88 (17)*
Colesterol-HDL,mmol/l	varones	1.17±0.25 (25)	1.17±0.28 (41)	1.08±0.15 (10)
	mujeres	1.39±0.29 (39)	1.36±0.26 (40)	1.33±0.24 (17)
Colesterol-LDL, mmol/l	varones	3.91±0.85 (25)	4.01±0.98 (41)	4.06±0.96 (10)
	mujeres	3.85±0.98 (41)	3.65±0.98 (42)	4.16±0.78 (19)

Resultados expresados como media  $\pm$  D.S. (n). Analizados mediante  $\chi^2$ . \* ( $p < 0.05$ ).

**Tabla 12.** Perfil lipídico para cada genotipo del polimorfismo Gln27Glu del receptor  $\beta$ 2-adrenérgico en los individuos no obesos.

		SUJETOS NO OBESOS		
		Gln27Gln27	Gln27Glu27	Glu27Glu27
Triglicéridos, mmol/l	varones	1.48±1.22 (102)	1.46±0.93 (106)	1.59±1.62 (23)
	mujeres	1.05 ±0.50 (84)	1.02±0.55 (112)	1.04±0.55 (37)
Colesterol total, mmol/l	varones	5.56±0.98 (102)	5.92±0.96 (106)	5.82±1.09 (23)*
	mujeres	5.74±0.98 (85)	5.77±0.93 (112)	5.43±1.22 (37)
Colesterol-HDL, mmol/l	varones	1.23±0.31 (102)	1.26±0.34 (106)	1.25±0.31 (23)
	mujeres	1.58±0.36 (84)	1.56±0.31 (112)	1.44±0.36 (37)
Colesterol-LDL, mmol/l	varones	3.67±0.88 (102)	4.01±0.83 (106)	3.85±0.88 (23)*
	mujeres	3.70±0.88 (84)	3.75±0.85 (112)	3.52±1.03 (23)

Resultados expresados como media  $\pm$ D.S. (n). Analizados mediante  $\chi^2$ . \* ( $p = 0.036$ , 1 VS 2); + ( $p = 0.016$ , 1 vs 2).

**Tabla 13.** Análisis de regresión logística multivariado para el polimorfismo Gln27Glu del receptor  $\beta$ 2-adrenérgico: homocigotos vs genotipo silvestre.

		ORaj	IC (95%)	p
Sexo	varones	1		
	mujeres	1.86	(1.10 – 3.17)	0.02
Edad (años)	34-44	1		
	45-54	0.50	(0.27 – 0.95)	0.03
	55-64	0.42	(0.21 – 0.83)	0.01
Tolerancia a la glucosa	NG	1		
	IGA	0.42	(0.11 – 1.50)	0.18
	TAG	2.10	(0.87 – 4.99)	0.10
	DM	3.86	(1.18 – 12.6)	0.03
DSA, cm		1.09	(1.08 – 1.18)	0.03

DSA: diámetro sagital abdominal; IGA: intolerancia a la glucosa en ayunas; TAG: tolerancia anormal a la glucosa; DM: diabetes mellitus.

#### 4.2 ESTUDIO II. POLIMORFISMOS Trp64Arg y -3826A→G DEL GEN DEL RECEPTOR BETA3 Y DE LA PROTEINA DESACOPLANTE UCPI

Se estudiaron 332 individuos que fueron clasificados según su IMC y según su grado de tolerancia a la glucosa. Se detectaron 93 sujetos obesos, que presentaron un  $IMC \geq 30$ , 38 varones y 55 mujeres. 217 presentaron niveles normales de glucemia, 17 presentaron intolerancia a la glucosa y 19 diabetes mellitus tipo 2.

Las frecuencias alélicas y las distribuciones de los genotipos en nuestra población se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg y se muestran en las tablas 14, 15, 16, 17 y 18. En las tablas 15 y 16 se observan diferencias significativas en la distribución del genotipo del polimorfismo -3826A→G cuando se compararon varones frente a mujeres ( $p=0.049$ ) y entre mujeres obesas y no obesas ( $p=0.002$ ). La frecuencia del alelo -3826G fue mayor en varones que en mujeres (tabla 17: 0.31 vs 0.22,  $p=0.015$ ) y en mujeres obesas frente a mujeres no obesas (tabla 18: 0.31 vs 0.17,  $p=0.008$ ).

**Tabla 14.** Frecuencias genotípicas del polimorfismo Trp64Arg del receptor  $\beta$ 3-adrenérgico en la población estudiada.

Genotipo	TODOS LOS SUJETOS		TODOS LOS SUJETOS	
	VARONES (n=160)	MUJERES (n=172)	OBESOS (n=93)	NO OBESOS (n=239)
<b><math>\beta</math>3-AR Trp64Arg</b>				
<b>Trp64Trp64</b>	139 (86.8%)	155 (90.1%)	81 (87.1%)	213 (89.1%)
<b>Trp64Arg64</b>	20 (12.6%)	17 (9.9%)	12 (12.9%)	25 (10.5%)
<b>Arg64Arg64</b>	1 (0.6%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (0.4%)

Datos expresados como n (%). Valores comparados mediante  $\chi^2$ . No existen diferencias significativas.

**Tabla 15.** Frecuencias genotípicas del polimorfismo -3826A→G de UCP1 en la población estudiada.

Genotipo	TODOS LOS SUJETOS		TODOS LOS SUJETOS	
	VARONES (n=160)	MUJERES (n=172)	OBESOS (n=93)	NO OBESOS (n=239)
<b>UCP1 -3826A→G</b>				
<b>AA</b>	55 (48.7%)	85 (61.2%)	41 (50%)	99 (58.2%)
<b>AG</b>	46 (40.7%)	48 (34.5%)	33 (40.2%)	61 (35.9%)
<b>GG</b>	12 (10.6%)	6* (4.3%)	8 (9.8%)	10 (5.9%)

Datos expresados como n (%). Valores comparados mediante  $\chi^2$ . \* ( $P < 0.05$ )

Con respecto al genotipo Trp64Arg del receptor  $\beta_3$  adrenérgico, no encontramos diferencias significativas entre la distribución de genotipos ni en las frecuencias alélicas.

**Tabla 16.** Frecuencias genotípicas del polimorfismo -3826A→G de UCP1 estratificadas por sexo e IMC.

Genotipo	VARONES		MUJERES	
	OBESOS (n=38)	NO OBESOS (n=122)	OBESAS (n=55)	NO OBESAS (n=117)
<b>AA</b>	20 (51.3%)	35 (47.3%)	21 (48.8%)	64 (66.7%)
<b>AG</b>	16 (41%)	30 (40.5%)	17 (39.6%)	31 (32.3%)
<b>GG</b>	3 (7.7%)	9 (12.2%)	5 (11.6%)	1** (1%)

Datos expresados como n (%). Valores comparados mediante  $\chi^2$ . \*\* ( $p < 0.01$ ).

**Tabla 17.** Frecuencias alélicas de los polimorfismos Trp64Arg del Receptor  $\beta$ 3-adrenérgico y -3826A→G de UCPI en la población estudiada.

Frecuencias alélicas	TODOS LOS SUJETOS		TODOS LOS SUJETOS	
	VARONES (n=160)	MUJERES (n=172)	OBESOS (n=93)	NO OBESOS (n=239)
<b>Arg64</b>	0.93	0.95	0.94	0.94
<b>Trp64</b>	0.07	0.05	0.06	0.06
<b>A</b>	0.69	0.78	0.70	0.76
<b>G</b>	0.31	0.22*	0.30	0.24

Datos expresados como frecuencia. Valores comparados mediante  $X^2$ . \* ( $p < 0.05$ )

**Tabla 18.** Frecuencias alélicas de los polimorfismos Trp64Arg del receptor  $\beta$ 3-adrenérgico y -3826A→G de UCPI estratificadas por sexo e IMC.

Frecuencias alélicas	VARONES		MUJERES	
	OBESOS	NO OBESOS	OBESAS	NO OBESAS
	(n=38)	(n=122)	(n=55)	(n=117)
<b>Arg64</b>	0.94	0.94	0.94	0.96
<b>Trp64</b>	0.06	0.06	0.06	0.04
<b>A</b>	0.72	0.68	0.69	0.83
<b>G</b>	0.28	0.32	0.31	0.17 **

Datos expresados como frecuencia. Valores comparados mediante  $X^2$ . \*\* ( $p < 0.01$ )

**Tabla 19.** Parámetros antropométricos para cada genotipo del polimorfismo -3826A→G de UCPI en la población estudiada.

		POBLACIÓN TOTAL		
		-3826A/-3826A	-3826G/	p
<b>Edad, años</b>	<b>varones</b>	51.3±9.4 (55)	48.8±9.2 (58)	NS
	<b>mujeres</b>	48.2±8.7 (85)	48.8±9.4 (53)	NS
<b>IMC, kg/m<sup>2</sup></b>	<b>varones</b>	28.5±4.2 (55)	27.6±4.0 (58)	NS
	<b>mujeres</b>	27.7±4.7 (85)	29.2±4.5 (54)	0.058
<b>Ci/Ca</b>	<b>varones</b>	0.99±0.06 (55)	0.98±0.04 (58)	NS
	<b>mujeres</b>	0.92±0.07 (85)	0.95±0.09 (54)	NS

Valores expresados como media ± D.S. (n).



La figura 6 muestra la distribución de los genotipos de UCP1 de acuerdo al perfil lipídico, siendo los niveles de colesterol-HDL menores en los portadores del alelo -3826G del gen de la UCP1. El resto de los parámetros que constituyen el perfil lipídico fueron similares para ambos polimorfismos.

Las figuras 7 y 8 muestran que los niveles de leptina fueron más elevados en mujeres obesas portadoras del alelo Arg64 del gen del receptor  $\beta_3$  adrenérgico con respecto a las no portadoras del alelo. También observamos que estos niveles de leptina estaban incrementados en las mujeres portadoras del alelo -3826G. Sin embargo, estas diferencias en los niveles de leptina no fueron encontradas en varones.

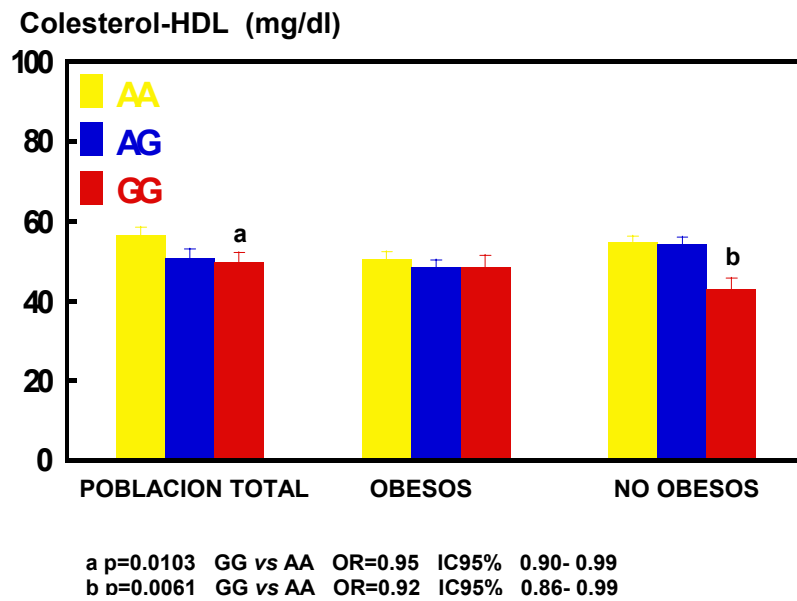
Cuando analizamos el efecto combinado de ambos polimorfismos sobre los niveles de leptina (tabla 20), el análisis de regresión lineal múltiple mostró que el sexo, la edad, el grado de obesidad, el cociente cintura/cadera y el grupo de genotipo Arg64/- y -3826A/ -3826A (portadores del alelo Arg, pero con genotipo normal para el gen UCP1) (figura 9) fueron los factores asociados con un aumento en los niveles de leptina. Observamos que estos niveles fueron mayores en mujeres, en los sujetos de mayor edad, en individuos con obesidad y en los portadores del alelo Arg del gen del receptor  $\beta_3$  adrenérgico, pero no en los portadores del alelo -3826G del gen de la UCP1.

**Tabla 20.** Análisis de regresión lineal multivariado para los niveles de leptina.

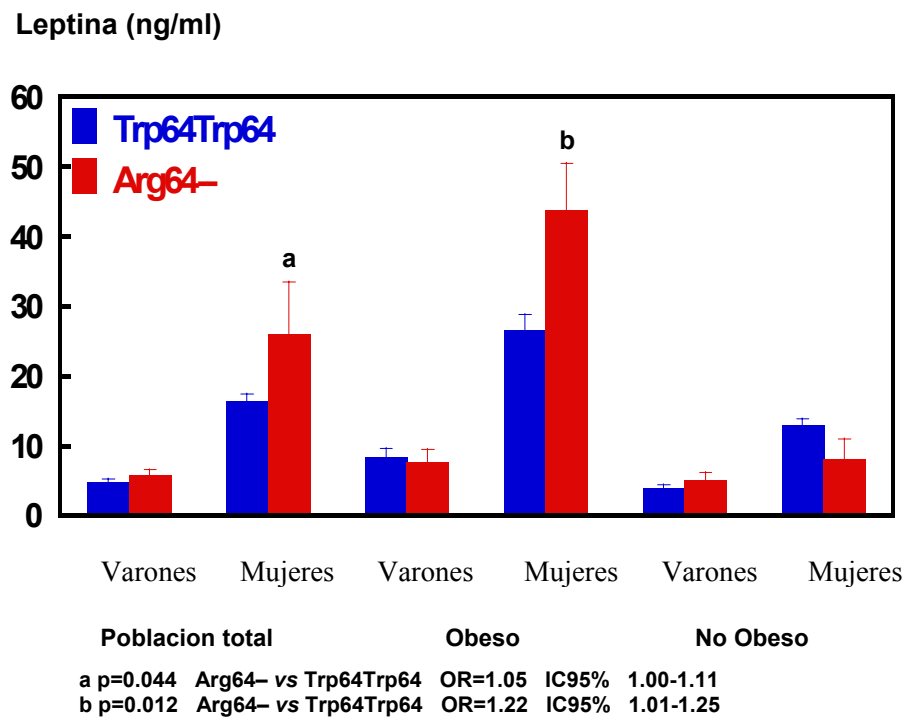
	ORaj	IC (95%)	p
<b>Sexo (mujer/varón)</b>	1.81	1.61-2.08	0.000
<b>Obesidad (Sí/No)</b>	1.36	1.21-1.53	0.000
<b>Edad (&gt;45años/&lt;45años)</b>	1.09	0.98-1.20	0.097
<b>Ci/Ca</b>	1.13	1.02-1.26	0.026
<b>Genotipos Arg64/- y -3826 A/-3826A <sup>a</sup></b>	1.28	1.01-1.62	0.043

<sup>a</sup> Portadores del alelo Arg64 y no portadores del alelo -3826G vs no portadores de ninguno de los dos alelos

**Figura 6.** Distribución del Polimorfismo  $-3826A \rightarrow G$  de UCP1 de acuerdo a los niveles de colesterol-HDL.

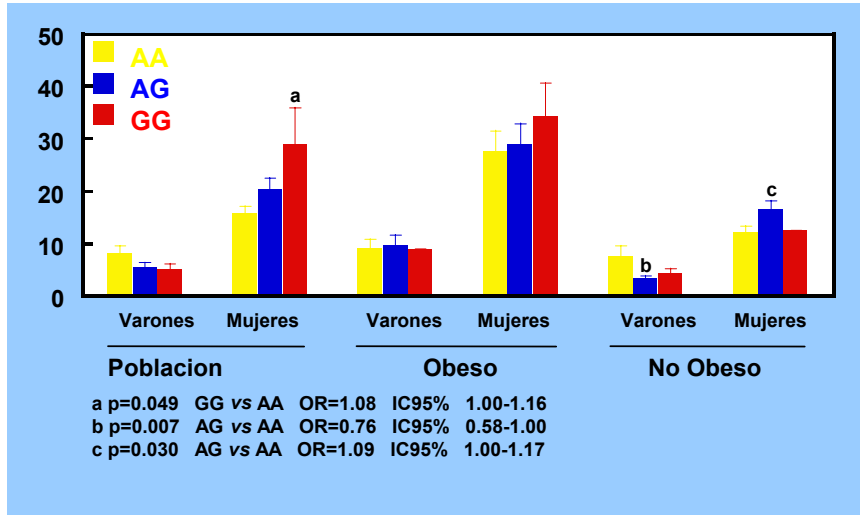


**Figura 7.** Distribución del Polimorfismo Trp64Arg del  $\beta 3AR$  de acuerdo a los niveles de Leptina

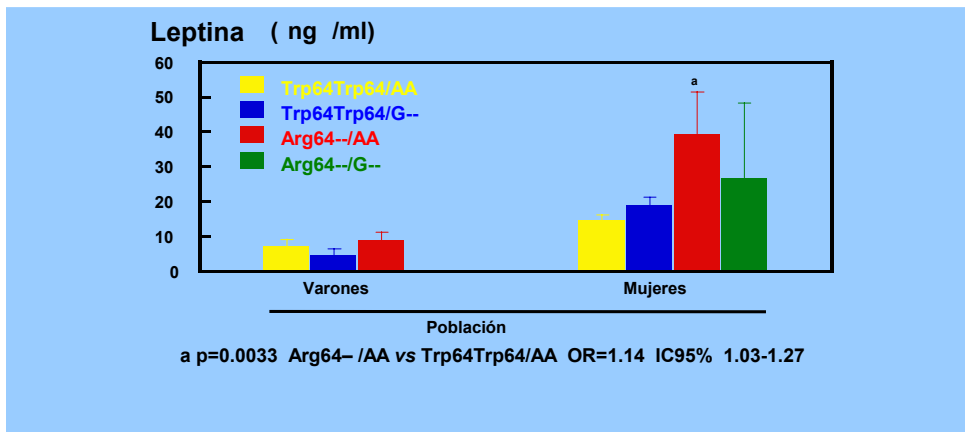


**Figura 8.** Distribución del Polimorfismo  $-3826A \rightarrow G$  de UCP1 de acuerdo a los niveles de Leptina

**Leptina (ng/ml)**



**Figura 9.** Efecto aditivo de los polimorfismos de UCP1 y Trp64Arg del  $\beta 3AR$



### 4.3 ESTUDIO III. POLIMORFISMO Pro12Ala DEL GEN DEL RECEPTOR ACTIVADO POR LOS PROLIFERADORES DE PEROXISOMAS (PPAR $\gamma$ ).

Se estudiaron 464 individuos que fueron clasificados según su IMC y según su grado de tolerancia a la glucosa. Se detectaron 145 sujetos obesos, que presentaron un IMC  $\geq 30$ , 51 varones y 94 mujeres. 354 presentaron niveles normales de glucemia, 35 IGA, 36 TAG y 8 diabetes mellitus tipo 2, 4 de los cuales eran obesos.

La distribución de los genotipos en nuestra población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg y se muestra en la tabla 21. Debido a que sólo se detectaron 4 individuos homocigotos Ala12Ala, estos fueron combinados con los heterocigotos Pro12Ala y fueron comparados con los sujetos con genotipo Pro12Pro en todo el estudio.

La distribución genotípica en la población general fue similar en ambos sexos. Sin embargo, cuando se analizó exclusivamente el grupo de individuos obesos se detectaron diferencias entre ambos sexos (tabla 22). En dicha tabla se comprueba que los varones obesos presentaron una frecuencia del alelo Ala12 más elevada que los no obesos (0.15 vs 0.08,  $p = 0.03$ ), mientras que en mujeres no se detectaron estas diferencias (0.06 vs 0.10,  $p = 0.15$ ). La distribución genotípica de acuerdo al IMC y al sexo puso de manifiesto que la prevalencia de obesidad era mayor en varones portadores del alelo Ala12 que en los no portadores (38.9 vs 21.3%; ORaj: 2.36; IC 95%: 1.10 – 5.05,  $p = 0.03$ ).

La distribución genotípica en la población general no se vió afectada por el grado de tolerancia a la glucosa.

**Tabla 21.** Frecuencias genotípicas del polimorfismo Pro12Ala de PPAR $\gamma$ -2 en la población estudiada.

Genotipo	VARONES	MUJERES	OBESOS	NO OBESOS
	(n=210)	(n=254)	(n=145)	(n=317)
<b>Pro12Pro12</b>	174 (82.9%)	211 (83.1%)	119 (82.1%)	264 (83.3%)
<b>Pro12Ala12</b>	33 (15.7%)	42 (16.5%)	25 (17.2%)	50 (15.8%)
<b>Ala12Ala12</b>	3 (1.4%)	1 (0.4%)	1 (0.7%)	3 (0.9%)

Datos expresados como n (%). Valores comparados mediante  $\chi^2$ . No existen diferencias significativas.

**Tabla 22.** Frecuencias alélicas del polimorfismo Pro12Ala de PPAR $\gamma$ -2 estratificadas por sexo e IMC.

Frecuencias alélicas	VARONES		MUJERES	
	OBESOS	NO OBESOS	OBESAS	NO OBESAS
	(n=51)	(n=159)	(n=94)	(n=158)
<b>Pro12</b>	87 (0.85)	294 (0.92)	176 (0.94)	284 (0.90)
<b>Ala12</b>	15 (0.15)	24 (0.08)*	12 (0.06)	32 (0.10)

Datos expresados como n (frecuencia). Valores comparados mediante  $\chi^2$ . \* ( $p < 0.05$ )

En la tabla 23 se recogen los resultados de las variables antropométricas en función de los genotipos. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante ANOVA. El análisis no mostró diferencias significativas en las variables antropométricas entre los diferentes genotipos cuando se analizó en conjunto la población estudiada.

**Tabla 23.** Parámetros antropométricos para cada genotipo del polimorfismo Pro12Ala de PPAR $\gamma$ -2 en los individuos obesos.

		SUJETOS OBESOS		
		Pro12Pro12	Ala12/X	p*
<b>Edad, años</b>	<b>varones</b>	51.6±8.9 (37)	52.9±8.4 (14)	0.62
	<b>mujeres</b>	52.1±8.4 (82)	51.6±8.4 (12)	0.83
<b>IMC, kg/m<sup>2</sup></b>	<b>varones</b>	32.8±2.5 (37)	31.8±1.6 (14)	0.18
	<b>mujeres</b>	33.5±3.5 (82)	33.6±4.1 (12)	0.91
<b>Ci/Ca</b>	<b>varones</b>	1.01±0.04 (37)	1.03±0.04 (14)	0.15
	<b>mujeres</b>	0.96±0.06 (82)	0.96±0.07 (12)	0.93
<b>DSA, cm</b>	<b>varones</b>	26.3±2.5 (37)	24.1±3.2 (14)	<u>0.01*</u>
	<b>mujeres</b>	24.8±3.3 (82)	24.5±4.1 (12)	0.80
<b>PAS(mmHg)</b>	<b>varones</b>	135±22 (37)	133±18 (14)	0.64
	<b>mujeres</b>	137±20 (82)	132±12 (12)	0.43
<b>PAD(mmHg)</b>	<b>varones</b>	87±15 (37)	82±11 (14)	0.24
	<b>mujeres</b>	86±12 (82)	85±10 (12)	0.92

PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica. Valores expresados como media  $\pm$  D.S. (n). \* ( $p < 0.05$ ).

Los resultados de los parámetros bioquímicos y lipídicos se recogen en las tablas 24 y 25. Pudimos comprobar que los portadores del alelo Ala12 presentaban niveles de insulina en ayunas más bajos que los individuos no portadores ( $67.8 \pm 28.2$  vs  $79.2 \pm 68.4$  pmol/l,  $p = 0.079$ ), así como de triglicéridos ( $1.13 \pm 0.56$  vs  $1.38 \pm 0.96$  mmol/l,  $p = 0.028$ ). Todas las mujeres portadoras del alelo Ala12 presentaban niveles significativamente más bajos de triglicéridos, insulina en ayunas, y mayor sensibilidad a la insulina determinada por el método HOMA. No encontramos diferencias significativas en los niveles de glucosa en ayunas, glucosa a las 2 horas, proinsulina, leptina, ni en las medidas de presión arterial entre los diferentes genotipos (tablas 24 y 25).

Por otro lado, todos los individuos obesos portadores del alelo Ala12, independientemente del sexo, tendían a tener niveles de insulina en ayunas más bajos que los homocigotos Pro12Pro ( $68.4 \pm 27.6$  vs  $94.8 \pm 67.8$  pmol/l,  $p = 0.057$ ), así como una mejor sensibilidad a la insulina ( $2.8 \pm 1.4$  vs  $3.8 \pm 2.5$ ,  $p = 0.07$ ). Además en todos los individuos con  $IMC < 30$ , el alelo Ala12 estaba asociado con niveles de triglicéridos más bajos ( $1.02 \pm 0.49$  vs  $1.32 \pm 0.9$  mmol/l,  $p = 0.020$ ). Después de ajustar por sexo, edad, IMC y Ci/Ca, los portadores del alelo Ala12 continuaron presentando niveles más bajos de insulina en ayunas que los homocigotos para el alelo Pro12 (ORaj: 0.14, IC 95%: 0.05 – 0.38,  $p = 0.05$ ).

**Tabla 24.** Parámetros bioquímicos para cada genotipo del polimorfismo Pro12Ala de PPAR $\gamma$ -2 en la población estudiada.

		TODOS LOS SUJETOS	
		Pro12Pro	Ala12/X
Glucosa en ayunas (mmol/l)	varones	5.4±0.9 (170)	5.7±1.8 (33)
	mujeres	5.2±1.1(205)	5.1±0.6 (42)
Glucosa 2h (mmol/l)	varones	5.7±2.2 (142)	5.8±1.9 (29)
	mujeres	5.6±2.1 (174)	5.6±2.1 (36)
Insulina en ayunas (pmol/l)	varones	79.2±69.6 (173)	69.0±31.8 (36)
	mujeres	78.6±36.6 (203)	67.2±24.6 (42)*
Insulina 2h (pmol/l)	varones	154.8±177 (90)	140.4±97.2 (17)
	mujeres	160.2±174 (105)	165.6±203 (20)
HOMA IR	varones	3.1±2.4 (169)	2.9±1.4 (33)
	mujeres	3.1±1.8 (203)	2.6±1.0 (42)*
Leptina en ayunas ( $\mu$ g/l)	varones	5.8±6.4 (110)	4.9±3.4 (21)
	mujeres	18.2±11.7 (124)	17.2±9.8 (27)
Proinsulina basal (pmol/l)	varones	14.4±26.6 (49)	12.3±17.0 (9)
	mujeres	11.9±11.4 (55)	10.1±4.8 (7)

Valores expresados como media  $\pm$  D.S. (n). Datos analizados mediante X<sup>2</sup>. \* ( $p < 0.05$ ).

**Tabla 25.** Perfil lipídico para cada genotipo del polimorfismo Pro12Ala de PPAR $\gamma$ -2 en la población estudiada.

		TODOS LOS SUJETOS	
		Pro12Pro	Ala12/X
Triglicéridos (mmol/l)	varones	1.64±1.24 (169)	1.39±0.64 (34)
	mujeres	1.17±0.57 (204)	0.91±0.36 (41)*
Colesterol total (mmol/l)	varones	5.77±0.99 (169)	5.73±1.10 (34)
	mujeres	5.75±1.05 (205)	5.56±1.01 (40)
Colesterol- HDL (mmol/l)	varones	1.21±0.33 (169)	1.19±0.22 (34)
	mujeres	1.47±0.33 (204)	1.53±0.36 (41)
Colesterol- LDL (mmol/l)	varones	3.85±0.87 (164)	3.91±1.04 (34)
	mujeres	3.76±0.98 (204)	3.62±0.88 (40)

Valores expresados como media  $\pm$  D.S. (n). Datos analizados mediante  $\chi^2$ . \* ( $p < 0.05$ ).

Cuando estratificamos por sexo y grado de obesidad, pudimos comprobar que los varones obesos portadores del alelo Ala12 también tenían un diámetro sagital abdominal significativamente menor ( $24.1 \pm 3.2$  vs  $26.3 \pm 2.5$  cm,  $p = 0.013$ ) (tabla 23), y tendían a presentar niveles de insulina en ayunas menores que los que presentaban los individuos homocigotos Pro12Pro12 ( $65.4 \pm 27$  vs  $114 \pm 94$ ). Respecto a las mujeres no obesas, los niveles de triglicéridos fueron menores en las portadoras del alelo Ala12 que en las homocigotas para el alelo Pro12 ( $p = 0.027$ ). No se detectaron diferencias entre los diferentes genotipos en mujeres obesas y en varones no obesos.

#### 4.4 ESTUDIO IV. POLIMORFISMO K121Q DEL GEN DE LA GLICOPROTEINA PC-1.

De los 293 sujetos (131 varones y 162 mujeres) participantes en este estudio, 91 (35 varones y 56 mujeres) presentaron obesidad — definida como un IMC  $\geq 30$ . Estos individuos fueron clasificados según su grado de tolerancia a la glucosa como normoglucémicos ( $n=238$ ), con IGA ( $n=21$ ), con TAG ( $n=16$ ) y con Diabetes Mellitus tipo 2 ( $n=18$ ).

En las tablas 26 y 27 se recogen las frecuencias genotípicas y alélicas. La frecuencia del alelo Q121 del gen PC-1 en la población estudiada fue 0.14, siendo similar en sujetos

obesos (0.15) y no obesos (0.13). No encontramos sujetos con el genotipo homocigoto Q121Q. La distribución del genotipo no difirió entre sujetos con NG, IGA, TAG o DM tipo 2.

**Tabla 26.** Frecuencias genotípicas del polimorfismo K121Q del gen de PCI en la población estudiada.

Genotipo	TODOS LOS SUJETOS		TODOS LOS SUJETOS	
	VARONES	MUJERES	OBESOS	NO OBESOS
	(n=131)	(n=162)	(n=91)	(n=202)
<b>K121K</b>	102 (77.9%)	119 (73.5%)	67 (73.6%)	154 (76.2%)
<b>K121Q</b>	29 (22.1%)	43 (26.5%)	24 (26.4%)	48 (23.8%)

Datos expresados como n (%). Valores comparados mediante  $\chi^2$ . No existen diferencias significativas.

**Tabla 27.** Frecuencias alélicas del polimorfismo K121Q de PCI en la población estudiada.

Frecuencias alélicas	TODOS LOS SUJETOS		TODOS LOS SUJETOS	
	VARONES	MUJERES	OBESOS	NO OBESOS
	(n=131)	(n=162)	(n=91)	(n=202)
<b>K121</b>	233 (0.88)	281 (0.85)	158 (0.85)	356 (0.87)
<b>Q121</b>	29 (0.12)	43 (0.15)	24 (0.15)	48 (0.13)

Datos expresados como n (frecuencia). Valores comparados mediante  $\chi^2$ . No existen diferencias significativas.

Las tablas 28 y 29 muestran los resultados de las variables antropométricas y bioquímicas estudiadas de acuerdo a los genotipos.



**Tabla 28 .** Parámetros antropométricos en la población total de acuerdo al polimorfismo K121Q del gen de PCI.

	K121K	K121Q
<b>Sexo (V/M)</b>	102/119	29/43
<b>Edad (años)</b>	49±8(221)	46±8(72)*
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	27.5±4.6(221)	27.9±4.6(72)
<b>Ci/Ca</b>	0.96±0.1(221)	0.95±0.1(71)
<b>PAS (mmHg)</b>	126±22 (221)	122±21(72)
<b>PAD (mmHg)</b>	79±13 (221)	78±13 (72)
<b>DSA (cm)</b>	21.5±3.6(221)	21.6±3.5(72)

PAD: Presión arterial diastólica; PAS: Presión arterial sistólica; DSA: diámetro sagital abdominal. Resultados expresados como media ± D.S. (n). Valores analizados mediante  $\chi^2$ . \* ( $p < 0.05$ ).

**Tabla 29.** Parámetros bioquímicos en la población total de acuerdo al polimorfismo K121Q del gen de PCI.

	K121K	K121Q
<b>Glucosa en ayunas (mmol/l)</b>	5.4±0.9 (212)	5.4±1.6(70)
<b>Glucosa 2h (mmol/l)</b>	5.4±1.7(184)	5.3±1.5(63)
<b>Insulina en ayunas (uU/ml)</b>	12.9±1.1(217)	11.9±0.7(70)
<b>Insulina 2h (uU/ml)</b>	25.7±2.2 (162)	24.8±3.7(50)
<b>HOMA IR</b>	3.2±0.2(210)	2.9±0.2(68)
<b>Leptina en ayunas (µg/l)</b>	10.7±9.7(183)	14.7±12.5(61)*
<b>Triglicéridos en ayunas (mg/dl)</b>	106±68 (211)	126±96 (70)
<b>Proinsulina en ayunas (pmol/l)</b>	14.6±24.6(74)	14.8±14.5(21)

Resultados expresados como media ± D.S. (n). Valores analizados mediante  $\chi^2$ . \* ( $p < 0.05$ ).

El análisis estadístico no mostró diferencias significativas en las variables antropométricas entre los genotipos. Tampoco entre los niveles de colesterol-HDL, LDL y colesterol total.

Sin embargo, la presencia del alelo Q121 estuvo asociada con mayores niveles de leptina (14.7±1.6 vs 10.6±0.7 µg/l,  $p=0.01$ ) y de triglicéridos (126±11.6 vs 106±4.7 mg/dl,  $p=0.06$ ) cuando se comparó con los individuos con genotipo normal. Ambos resultados

permanecieron significativos después de ajustar por sexo, edad, IMC y grado de tolerancia a la glucosa ( $p=0.02$  y  $p=0.01$ , respectivamente).

No encontramos diferencias significativas entre los portadores y no portadores del alelo Q121 con respecto a los niveles de insulina, proinsulina y niveles de glucosa en ayunas y a las 2 horas. La resistencia a la insulina estimada por el método HOMA-IR fue similar entre ambos genotipos.

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1 ESTUDIO I. POLIMORFISMO Gln27Glu DEL GEN DEL RECEPTOR BETA2.

En nuestra población de estudio la prevalencia de obesidad difiere entre varones y mujeres de acuerdo al polimorfismo Gln27Glu del receptor  $\beta_2$  adrenérgico. Así en mujeres el porcentaje de individuos obesos dentro de cada genotipo está alrededor del 30%. El hecho de que en varones la prevalencia de obesidad incremente y alcance el valor máximo en los homocigotos para el alelo Glu27 sugiere que este alelo podría estar asociado con obesidad en varones pero no en mujeres, en concordancia con las hipótesis previas que señalan que el impacto genético sobre la obesidad podría ser diferente en varones que en mujeres (Hellstrom y col., 1999). Además, en este estudio hemos encontrado valores en medias significativamente más elevados del IMC y de DSA en varones obesos con genotipo Glu27Glu27 comparados con los de genotipo Gln27Glu27 y Gln27Gln27, efecto que desaparece en ausencia de obesidad.

Otros estudios también han mostrado una asociación entre el polimorfismo Gln27Glu y parámetros del fenotipo obeso en varones como una mayor ganancia de peso (Ukkola y col., 2001b), mayores valores de IMC (Ehrenborg y col., 2000; Meirhaeghe y col., 2000a) y acumulación de grasa subcutánea (Ukkola y col., 2001b). Por otro lado, este polimorfismo apareció asociado con obesidad en población Japonesa de ambos sexos (Ishiyama-Shigemoto y col., 1999), indicando que diferencias étnicas podrían modificar el impacto de este polimorfismo sobre el fenotipo obeso en cada sexo. Los resultados de un modelo de regresión logística univariado en nuestra población mostraron una asociación entre la homocigosis del alelo Glu27, intolerancia a la glucosa (ORaj: 3.81, IC 95% 1.27-11.4,  $p=0.02$ ) y diabetes mellitus tipo 2 (ORaj: 9.80, IC 95% 1.68-57.2,  $p=0.01$ ) en varones pero no en mujeres, sugiriendo también un efecto específico del sexo.

El análisis de regresión logística multivariado mostró que el grado de tolerancia a la glucosa es probablemente el factor más importante en la asociación con la homocigosis para el alelo Glu27, por lo que este genotipo (Glu27Glu27) podría influir también en el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2. Por otro lado, debido a que el IMC no es retenido en el modelo, la relación entre el alelo Glu27 y la cantidad de grasa abdominal parece ser independiente de la cantidad total de masa corporal medida por el IMC.

De hecho, la consideración de la tolerancia a la glucosa como variable dependiente en

un modelo de regresión logística multivariado adicional, confirmó la asociación de la homocigosis para el alelo Glu27 (ORaj: 3.17, IC 95% 1.02-9.84,  $p=0.048$ ) con diabetes mellitus tipo 2, y que la prevalencia de diabetes mellitus tipo 2 estuvo asociada con mayores valores del DSA, aunque no alcanzó el nivel de significancia estadística (ORaj: 1.14, IC 95% 0.98-1.32,  $p=0.084$ ).

Estas asociaciones entre este polimorfismo Gln27Glu y alteraciones de la tolerancia a la glucosa ya han sido descritas en diferentes poblaciones (Ishiyama-Shigemoto y col., 1999; Carlsson y col., 2001; Kawamura y col., 2001) aunque hasta ahora no se habían descrito los efectos relacionados con el sexo.

## **5.2 ESTUDIO II. POLIMORFISMOS Trp64Arg y -3826A→G DEL GEN DEL RECEPTOR BETA3 Y DE LA PROTEINA DESACOPLANTE UCP1.**

Este estudio nos proporciona evidencias de la implicación del polimorfismo Trp64Arg del gen del receptor  $\beta_3$  adrenérgico en las alteraciones de los mecanismos que regulan los niveles plasmáticos de leptina.

Nuestros resultados están en concordancia con los descritos anteriormente sobre los efectos del alelo -3826G del gen de la UCP1 relacionados con el sexo en obesidad en poblaciones Australiana y Japonesa (Hayakawa y col., 1999; Heilbronn y col., 2000).

Hemos encontrado una asociación entre el polimorfismo -3826A→G del gen de la UCP1 y obesidad en mujeres pero no en varones. Los valores de la media del IMC en mujeres aumentan de acuerdo al genotipo de UCP1, siguiendo una tendencia lineal significativa ( $27.7\pm 0.5$ ,  $28.9\pm 0.7$  y  $32.2\pm 1.5$ ,  $p=0.019$ ). Las frecuencias del alelo -3826G que encontramos en la población global (0.22 en mujeres y 0.31 en varones) fue similar a la descrita en otras poblaciones Caucásicas (Oppert y col., 1994; Esterbauer y col., 1998; Proenza y col., 2000; Gagnon y col., 1998), así como las del alelo Arg64 del receptor  $\beta_3$  adrenérgico (Gagnon y col., 1996; Clement y col., 1997; Rissanen y col., 1997a; Buettner y col., 1998; Janssen y col., 1998).

En nuestro estudio las mujeres portadoras del alelo -3826G presentaron mayores niveles de leptina cuando se compararon con las no portadoras del alelo. Estos cambios en los niveles de leptina observados en ambos grupos podrían estar reflejando cambios en los valores en media del IMC de acuerdo al genotipo.

El alelo Arg64 del receptor  $\beta_3$  adrenérgico en nuestro estudio está asociado con mayores niveles de leptina también en mujeres, específicamente cuando el IMC está por encima de  $30 \text{ kg/m}^2$ . Dado que este polimorfismo ha estado asociado con una alteración de las señales del receptor  $\beta_3$  adrenérgico (Pietri-Rouxel y col., 1997), nosotros consideramos que esta asociación podría ser una consecuencia de la alteración de la capacidad inhibitoria adrenérgica sobre la secreción de leptina (Trayhurn y col., 1999), conduciendo a un incremento en los niveles de leptina. El hecho de que no encontremos estas diferencias en varones podría ser explicado en el contexto de las diferencias en cuanto al sexo en la producción de leptina (Ahima y Flier, 2000b). Nuestros resultados están en concordancia con los obtenidos en un estudio en mujeres de China, en el que los niveles de leptina estaban incrementados en el grupo de obesas (Lin y col., 1999), pero nuestro estudio es el primero en mostrar estas asociaciones en poblaciones Caucasoides. La falta de concordancia con los resultados de otros estudios en Caucosoides donde no encontraron esta relación con los niveles de leptina (Janssen y col., 1998; Vendrell y col., 1998; Stangl y col., 2000) podría ser debido a la no estratificación por sexo (Janssen y col., 1998) o a las condiciones patológicas de las poblaciones estudiadas que fueron preseleccionadas como es la presencia de diabetes mellitus tipo 2 o la enfermedad arterial coronaria (Vendrell y col., 1998; Stangl y col., 2000).

Nuestros datos muestran además una asociación entre el alelo Arg64 del receptor  $\beta_3$  adrenérgico y un incremento en los niveles de leptina incluso después de ajustar por sexo, edad, grado de obesidad, y por el cociente cintura/cadera.

Por tanto, mientras que el efecto del alelo  $-3826\text{G}$  del gen de la UCP1 sobre los niveles de leptina no podría ser considerado aparte de su asociación con obesidad, el impacto del alelo Arg64 del receptor  $\beta_3$  adrenérgico sobre los niveles de leptina muestra un efecto independiente de la obesidad.

Los resultados de un modelo multivariado identificaron el genotipo combinado Arg64/- y  $-3826\text{A}/-3826\text{A}$  de ambos genes (portadores del alelo Arg64 pero no del  $-3826\text{G}$ ) como el que mostró una asociación significativa con los niveles de leptina después de ajustar por sexo, edad, IMC y cociente cintura/cadera.

Dado que tanto el grado de obesidad como la edad están incluidos en el modelo, nuestros resultados también sugieren que el efecto de la edad sobre los niveles de leptina podrían ser parcialmente explicados por los cambios en la grasa corporal. Ha sido descrito que los niveles de leptina muestran un aumento en mujeres de mediana edad seguido de una

disminución a partir de los 65 años (Perry y col., 1997), lo cual está en concordancia con nuestros resultados dado que el rango de edad de nuestra población está entre los 35 y 65 años.

Otro factor que contribuyó al incremento en los niveles de leptina en nuestra población estudiada fue el cociente cintura/cadera. Estudios previos mostraron una relación inversa entre los niveles plasmáticos de leptina y el cociente cintura/cadera (Lonnqvist y col., 1997; Minocci y col., 2000), mientras que en nuestro estudio encontramos una correlación positiva entre ambos parámetros ( $r=0.342$ ,  $p<0.01$  y  $r=0.356$ ,  $p<0.01$  para varones y mujeres respectivamente). Estas diferencias podrían ser debidas a que nuestro estudio incluyó tanto sujetos controles como sujetos obesos, mientras que en esos otros estudios los sujetos eran obesos y obesos mórbidos (Lonnqvist y col., 1997; Minocci y col., 2000). De hecho, el cociente cintura/cadera y los niveles de leptina aparecen negativamente correlacionados en nuestra población cuando los sujetos con un IMC menor de  $30 \text{ kg/m}^2$  son excluidos y varones y mujeres son analizados juntos ( $r= - 0.350$ ,  $p=0.013$ ).

### **5.3 ESTUDIO III. POLIMORFISMO Pro12Ala DEL GEN DEL RECEPTOR ACTIVADO POR LOS PROLIFERADORES DE PEROXISOMAS (PPAR $\gamma$ ).**

Algunos estudios epidemiológicos sugieren la existencia de asociación entre el polimorfismo Pro12Ala del gen que codifica para PPAR $\gamma$ , obesidad y otras alteraciones metabólicas, pero los resultados obtenidos a este respecto no son siempre concordantes. La frecuencia del alelo Ala12 en nuestra población fue similar a la descrita en otras poblaciones Caucasoides (Beamer y col., 1998; Mancini y col., 1999; Meirhaeghe y col., 2000b) como en la población Italiana (Mancini y col., 1999), pero ligeramente inferior a la descrita en poblaciones de Finlandia (Deeb y col., 1998; Valve y col., 1999), Dinamarca (Ek y col., 1999) y Alemania (Evans y col., 2000b), y mayor a la descrita en poblaciones japonesas (Mori y col., 1998) y coreanas (Oh y col., 2000). Al igual que en otros estudios realizados, (Deeb y col., 1998; Stumvoll y col., 2001b) nosotros hemos encontrado que existe una asociación entre la presencia del alelo Ala12, niveles más bajos de triglicéridos y una mayor sensibilidad a la insulina determinada por el método HOMA IR, con diferencias en cuanto al sexo, dado que estos resultados fueron encontrados sólo en mujeres. Ek y col., (2001) también han descrito recientemente una asociación entre el alelo Ala12 y una mejora en la sensibilidad a la insulina en varones suecos con tolerancia normal a la glucosa. Los portadores del alelo Ala12 de nuestro grupo de sujetos obesos también presentaban, mayor sensibilidad a la insulina, aunque

ésta no alcanzó el nivel de significación estadística ( $p = 0.07$ ). De forma similar, Koch y col., (1999) describieron en individuos obesos la existencia de asociación del polimorfismo Pro12Ala con un aumento de la sensibilidad a la insulina estimada mediante *clamp* euglucémico-hiperinsulinémico. También en sujetos japoneses no diabéticos obesos o con sobrepeso Hara y col., (2000) comprobaron que los portadores del alelo Ala12 presentaban niveles inferiores de insulina plasmática en ayunas, y una mayor sensibilidad a la insulina determinada mediante el método HOMA-IR, cuando se compararon con los individuos que no portaban dicho alelo.

También se han descrito diferencias étnicas en cuanto a la fuerza de estas asociaciones. Deeb y col., (1998) realizaron un estudio randomizado en 333 individuos finlandeses de mediana edad no diabéticos en el que los resultados obtenidos sugerían que los portadores del alelo Ala12 tenían un menor IMC, menores niveles de insulina en ayunas y una mayor sensibilidad a la insulina. Por otro lado, en otro estudio realizado en mujeres obesas finlandesas (Valve y col.,1999) ( $n = 141$ ) el genotipo Ala12Ala estuvo asociado con un incremento del IMC, mayor grasa corporal y del cociente cintura/cadera comparado con los valores que presentaban las mujeres con genotipo Pro12Ala o Pro12Pro. Las diferencias entre los sujetos controles y los sujetos obesos podrían indicar una interacción variable del alelo Ala12 con otros factores genéticos y/o ambientales (Luan y col., 2001b). En otras dos poblaciones Caucasoides de Estados Unidos, el alelo Ala12 también estuvo asociado con un incremento del peso corporal y del IMC (Beamer y col., 1998). Del mismo modo, en tres poblaciones japonesas la frecuencia del alelo Ala12 fue significativamente menor en individuos con diabetes mellitus tipo 2 que en sujetos con glucemia normal (Deeb y col., 1998; Koch y col., 1999; Mori y col., 2001). Altshuler y col., (2000) también encontraron, en una población Caucasoide, una disminución significativa del riesgo de diabetes asociada al alelo Ala12. Mori y col., (2001), en población japonesa (2201 individuos con diabetes tipo 2 y 1212 sujetos controles), observaron que entre los sujetos diabéticos los portadores del alelo Ala12 presentaban mayores concentraciones de colesterol total que los que no portaban dicho alelo. La variante Ala12 del gen que codifica para PPAR $\gamma$ -2 también se ha asociado con protección frente a diabetes tipo 2 en individuos de Finlandia (Douglas y col., 2001). En sujetos diabéticos ( $n = 522$ ) la presencia de dicha variante fue asociada con una mayor tasa de variación de peso y con menores niveles de triglicéridos. En alguno de los escasos estudios prospectivos realizados (Ek y col., 1999; Lindi y col., 2001) el alelo Ala12 se asoció con una

mayor tendencia a ganancia de peso. Lindi y col., (2001) también encontraron una mayor sensibilidad a la insulina en sujetos con el genotipo Ala12Ala12.

Este estudio es el primero de estas características realizado en España y uno de los pocos realizados en poblaciones del sur de Europa (Mancini y col., 1999; Meirhaeghe y col., 2000b). En un estudio realizado en población francesa (n = 839) el alelo Ala12 estuvo asociado con un aumento del peso corporal, niveles más elevados de IMC y de la circunferencia de la cintura, así como con un perfil lipídico aterogénico (Meirhaeghe y col., 2000b). En el estudio de población italiana no se encontraron asociaciones entre este polimorfismo y parámetros antropométricos y bioquímicos al comparar individuos diabéticos y normoglucémicos (Mancini y col., 1999). Las razones de estas discrepancias en estudios de asociación podrían estar relacionadas con diferencias étnicas, con el diseño del estudio y los efectos del sexo y del IMC. Vidal H (2001) ha descrito que existen diferencias en la expresión del PPAR $\gamma$  entre la grasa subcutánea y la grasa visceral. La explicación a las diferencias encontradas en nuestro estudio sobre el impacto del alelo Ala12 entre varones y mujeres podría ser debido a la diferente distribución de grasa que presentan las mujeres y al incremento en la expresión del ARNm del PPAR $\gamma$ -2 en el tejido adiposo subcutáneo (Vidal-Puig y col., 1997).

Nuestros resultados sugieren que el polimorfismo Pro12Ala del gen que codifica para PPAR $\gamma$ -2 puede promover la deposición periférica de tejido adiposo y la sensibilidad a la insulina y potencialmente podría modificar la respuesta a agonistas del PPAR $\gamma$  como las tiazolidinodionas, utilizadas con fines terapéuticos. De hecho la activación de los receptores PPAR $\gamma$  por tiazolidinodionas promueve la diferenciación de adipocitos y la regulación de un número importante de genes que regulan el metabolismo lipídico. Estos mecanismos podrían incrementar la deposición de grasa en el tejido adiposo debido a un aumento de la sensibilidad a la insulina. Este efecto de las tiazolidinodionas sobre la sensibilidad a la insulina a través de su acción sobre los mecanismos del PPAR $\gamma$  es menos marcado en el tejido graso intra-abdominal que en otros tejidos sensibles a la insulina (Kelly y col., 1999), además los preadipocitos subcutáneos son más sensibles al efecto de diferenciación que promueven las tiazolidinodionas a través del PPAR $\gamma$  que las células intraabdominales (Adams y col., 1997).

Dado que el PPAR $\gamma$  está presente en las células  $\beta$  (Dubois y col., 2000) los agonistas del receptor PPAR $\gamma$  es posible que tengan un efecto directo sobre el páncreas y estudios preclínicos con estos agonistas como la rosiglitazona han demostrado que este fármaco incrementa el área de los islotes pancreáticos, su densidad y el contenido en insulina (Smith y



col., 1998). Estos efectos de rosiglitazona podrían ser mediados por la disponibilidad de estos agentes para reducir la muerte en la red de la célula  $\beta$  (Finegood y col., 1999). Además dado que los genes que codifican para proteínas implicadas en la señalización intracelular de la insulina, como el IRS-2 (Smith y col., 2001) y el p85 $\alpha$ PI-3K (Rieusset y col., 2001) son genes diana del PPAR $\gamma$  en los adipocitos en humanos, los efectos del PPAR $\gamma$  sobre la sensibilidad a la insulina podrían ser mediados, al menos en parte, por un efecto directo del PPAR $\gamma$  sobre la secreción de insulina.

#### **5.4 ESTUDIO IV. POLIMORFISMO K121Q DEL GEN DE LA GLICOPROTEINA PC-1.**

Las formas comunes de obesidad en humanos están caracterizadas por altos niveles circulantes de leptina (Matzoros, 1999), a menudo junto a hiperinsulinemia, resistencia a la insulina y una fuerte predisposición para el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 (Dagogo-Jack y col., 1996). El polimorfismo K121Q del gen de la PC-1 ha sido asociado con resistencia a la insulina en algunos estudios en poblaciones Caucásicas (Pizzuti y col., 1999; Gu y col., 2000; Kubaszek y col., 2003) pero no en otros (Rasmussen y col., 2000b).

Estudios de asociación entre este polimorfismo y varios parámetros antropométricos y bioquímicos relacionados con resistencia a la insulina podrían proporcionar información sobre el efecto de este polimorfismo en los componentes del Síndrome Metabólico.

La frecuencia alélica en nuestra población estudiada fue similar a la descrita en población Siciliana (Pizzuti y col., 1999), Danesa (Rasmussen y col., 2000b), Sueca y Finlandesa (Gu y col., 2000), pero en estos estudios no se investigó la interacción de este polimorfismo con los niveles de leptina, un postulado componente del Síndrome Metabólico.

Encontramos una asociación entre el alelo Q121 con mayores niveles de leptina y triglicéridos, pero no con insulina, proinsulina, niveles de glucosa ni con sensibilidad a la insulina.

Algunos estudios mostraron asociación entre el alelo Q121, resistencia a la insulina (Pizzuti y col., 1999) y un aumento en los niveles de glucosa (Pizzuti y col., 1999; Gu y col., 2000) con diferencias entre pacientes con diabetes tipo 2 y sujetos controles (Gu y col., 2000), sin embargo en otro estudio también en población Caucásica no encontraron estas diferencias (Rasmussen y col., 2000b). Estas discrepancias entre sujetos controles y sujetos

con diabetes mellitus podrían estar indicando una interacción variable del alelo Q121 con otros factores genéticos.

Estudios funcionales (Costanzo y col., 2001) también han demostrado que la variante Q121 es más potente que la variante K121 en cuanto a la inhibición de la fosforilación del receptor de insulina. Por ello, es probable que el alelo Q121 tenga un efecto mayor sobre la resistencia a la insulina.

Las razones por las que los portadores del alelo Q121 en nuestra población de estudio tienen elevados niveles de leptina son desconocidas. Los niveles de leptina están relacionados con alteraciones metabólicas que constituyen el Síndrome Metabólico, como obesidad central, resistencia a la insulina e hipertrigliceridemia (Leyva y col., 1998). Leyva y col. (1998) han descrito una asociación negativa entre las concentraciones plasmáticas de leptina y sensibilidad a la insulina, sugiriendo que la disminución de la sensibilidad a la insulina está relacionada con un aumento en las concentraciones plasmáticas de leptina. Por otro lado, varios estudios han mostrado que la leptina inhibe la secreción de insulina (Kulkarni y col., 1997; Zhao y col., 1998), e incluso que la señalización de leptina está mediada por cambios conformacionales del receptor de leptina inducidos por ligando, activando la transducción intracelular de señales de la proteína janus quinasa 2 (JAK-2) (Tartaglia 1997), una cascada de señales similar a la del receptor de insulina (Szanto y col., 2000). Además se ha observado que en células transfectadas con altos niveles de receptor de leptina y quinasa JAK-2, la leptina puede también estimular la fosforilación del sustrato del receptor de insulina (Szanto y col., 2000). Todos estos resultados sugieren que las señales de leptina e insulina podrían estar conectadas en varios niveles.

Dado que en obesidad y diabetes mellitus tipo 2 los tejidos están a menudo expuestos a altos niveles de leptina e insulina y dado que el receptor de insulina y algunas formas del receptor de leptina están presentes en la mayoría de los tejidos, es posible que estos dos sistemas de señalización hormonal puedan interactuar en algunos estados patológicos. Además la hipertrigliceridemia ha sido asociada con variables del SM sugiriendo que los elevados niveles de leptina podrían ser una manifestación temprana del SM o un predictor del mismo (de Courten y col., 1997).

## 6. CONCLUSIONES

1. El alelo Glu27 del receptor  $\beta_2$  adrenérgico no sólo favorece la acumulación de grasa visceral sino que también podría incrementar el riesgo de intolerancia a la glucosa y diabetes mellitus tipo 2 en varones pero no en mujeres.
2. Nuestros resultados sugieren la idea de una implicación del polimorfismo Trp64Arg del receptor  $\beta_3$  adrenérgico en la alteración de los mecanismos que regulan los niveles plasmáticos de leptina y refuerzan las consecuencias funcionales del polimorfismo. Además encontramos una asociación entre el alelo -3826G del gen de la UCP1 y obesidad, reflejando un efecto relacionado con el sexo, pero no encontramos un efecto aditivo de ambos polimorfismos cuando ambos fueron combinados.
3. El alelo Ala12 del gen PPAR $\gamma$  está asociado con una mayor sensibilidad a la insulina y un mejor perfil lipídico en las mujeres de nuestra población de estudio. El papel de otros polimorfismos, particularmente los localizados en las proximidades de Pro12Ala deben ser todavía definidos.
4. El polimorfismo K121Q del gen de la PC-1 puede tener un impacto sobre el complejo de señalización insulina-leptina y favorecer la aparición de hiperleptinemia e hipertrigliceridemia como una manifestación temprana del Síndrome Metabólico.
5. En resumen, cada uno de estos polimorfismos estudiados mantienen una asociación significativa con uno o varios parámetros de los componentes del Síndrome Metabólico o (polimorfismo K121Q del gen de la PC1) pueden predisponer a hiperleptinemia como posible precedente del futuro desarrollo del Síndrome Metabólico con Resistencia a la Insulina.

Nuestro estudio es, creemos el primero realizado en población española sobre base epidemiológica, poblacional.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Adams M, Montague CT, Prins JB, Holder JC, Smith SA, Sanders L, Digby JE, Sewter CP, Lazar MA, Chatterjee VK, O'Rahilly S (1997). Activators of peroxisome proliferator-activated receptor gamma have depot-specific effects on human preadipocyte differentiation. *J Clin Invest* 100:3149-53.
- Ahima RS, Flier JS (2000a). Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab* 11:327-32.
- Ahima RS, Flier JS (2000b). Leptin. *Annu Rev Physiol* 62:413-37.
- Allison DB, Heo M, Faith MS, Pietrobelli A (1998). Meta-analysis of the association of the Trp64Arg polymorphism in the  $\beta$ 3 adrenergic receptor with body mass index. *Int J Obes Relat Metab Disord* 22:559-66.
- Almind K, Frederiksen SK, Ahlgren MG, Urhammer S, Hansen T, Clausen JO, Pedersen O (1998). Common amino acid substitutions in insulin receptor substrate-4 are not associated with Type II diabetes mellitus or insulin resistance. *Diabetologia* 41:969-74.
- Altshuler D, Hirschhorn JN, Klannemark M, Lindgren CM, Vohl MC, Nemesh J, Lane CR, Schaffner SF, Bolk S, Brewer C, Tuomi T, Gaudet D, Hudson TJ, Daly M, Groop L, Lander ES (2000). The common PPARgamma Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. *Nature Genetics* 26:76-79.
- Antonucci T, Whitcomb R, McLain R, Lockwood D (1997). Impaired glucose tolerance is normalized by treatment with the thiazolidinedione troglitazone. *Diabetes Care* 20:188-93.
- Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y (1999). Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 257:79-83.
- Armstrong M, Haldane F, Avery PJ, Mitcheson J, Stewart MW, Turnbull DM, Walker M (1996). Relationship between insulin sensitivity and insulin receptor substrate-1 mutations in non-diabetic relatives of NIDDM families. *Diabet Med* 13:341-5.
- Arner P, Hoffsted F (1999). Adrenoreceptor genes in human obesity. *J Intern Med* 6: 667-72.
- Arner P (2000). Obesity: a genetic disease of adipose tissue? *Br J Nutr* 83 (suppl 1): S9-S16.
- Auwerx J, Staels B (1998). Leptin. *Lancet* 351:737-42.
- Auwerx J (1999). PPAR $\gamma$ , the ultimate thrifty gene. *Diabetologia* 42:1033-49.
- Baier LJ, Sacchettini JC, Knowler WC, Eads J, Paolisso G, Tataranni PA, Mochizuki H, Bennett PH, Bogardus C, Prochazka M (1995). An amino acid substitution in the human intestinal fatty acid binding protein is associated with increased fatty acid binding, increased fat oxidation, and insulin resistance. *J Clin Invest* 95:1281-7.
- Baroni MG, D'Andrea MP, Montali A, Pannitteri G, Barilla F, Campagna F, Mazzei E, Lovari S, Seccareccia F, Campa PP, Ricci G, Pozzilli P, Urbinati G, Arca M (1999). A common mutation of the insulin receptor substrate-1 gene is a risk factor for coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:2975-80
- Beamer B, Yen C, Andersen R, Muller D, Elahi D, Cheskin L, Andres R, Roth J, Schuldiner A (1998). Association of the Pro12Ala variant in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 gene with obesity in two Caucasian populations. *Diabetes* 47:1806-08.

- Beck-Nielsen H, Groop LC (1994). Metabolic and genetic characterization of prediabetic states. Sequence of events leading to non-insulin dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 94:1714-21.
- Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE (2001). The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med* 7: 947-53.
- Berger J, Bailey P, Biswas C, Cullinan CA, Doebber TW, Hayes NS, Saperstein R, Smith RG, Leibowitz MD (1996a). Thiazolidinediones produce a conformational change in peroxisomal proliferator-activated receptor- $\gamma$ : Binding and activation correlate with antidiabetic actions in db/db mice. *Endocrinology* 137:4189-95.
- Berger J, Biswas C, Hayes N, Ventre J, Wu M, Doebber TW (1996b). An antidiabetic thiazolidinedione potentiates insulin stimulation of glycogen synthase in rat adipose tissue. *Endocrinology* 137 1984-90.
- Bernal D, Almind K, Yenush L, Ayoub M, Zhang Y, Rosshani L, Larsson C, Pedersen O, White MF (1998). Insulin receptor substrate-2 amino acid polymorphisms are not associated with random type 2 diabetes among Caucasians. *Diabetes* 47:976-9.
- Bouchard C, Rice T, Lemieux S, Despres JP, Perusse L, Rao DC (1996). Major gene for abdominal visceral fat area in the Quebec Family Study. *Int J Obes Relat Metab Disord* 20:420-27.
- Bouloumie A, Marumo T, Lafontan M, Busse R (1999). Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells. *FASEB Journal* 13:1231-8.
- Braissant O, Foufelle F, Scotto C, Dauça M, Wahli W (1996). Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR- $\alpha$ , - $\beta$ , and - $\gamma$  in the adult rat. *Endocrinology* 137:354-66.
- Brown PO (1994). Genome scanning methods. *Curr Opin Genet Dev* 4:366-73.
- Brun RP, Tontonoz P, Forman BM, Ellis R, Chen J, Evans RM, Spiegelman BM (1996). Differential activation of adipogenesis by multiple PPAR isoforms. *Genes Dev* 10:974-84.
- Buettner R, Schäffler A, Arndt H, Rogler G, Nusser J, Zietz B, Enger I, Hugl S, Cuk A, Scholmerich J, Palitzsch K (1998). The Trp64Arg polymorphism of the beta3-adrenergic receptor gene is not associated with obesity or type 2 diabetes mellitus in a large population-based Caucasian cohort. *J Clin Endocrinol Metab* 83:2892-97.
- Carlsson M, Orho-Melander M, Hedenbro J, Groop LC. (2001). Common variants in the beta2-(Gln27Glu) and beta3-(Trp64Arg)--adrenoceptor genes are associated with elevated serum NEFA concentrations and type II diabetes. *Diabetologia* 44: 629-36.
- Clement K, Vaisse C, Manning BS, Basdevant A, Guy-Grand B, Ruiz J, Silver KD, Shuldiner AR, Froguel P, Strosberg AD (1995). Genetic variation in the beta 3-adrenergic receptor and an increased capacity to gain weight in patients with morbid obesity. *N Engl J Med* 333:352-54.
- Clement K, Ruiz J, Cassard-Doulcier AM, Bouillaud F, Ricquier D, Basdevant A, Guy-Grand B, Froguel P (1996). Additive effect of A $\rightarrow$ 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* 20:1062-66.
- Clement K, Manning BS, Basdevant A, Strosberg AD, Guy-Grand B, Froguel P (1997). Gender effect of the Trp64Arg mutation in the beta 3 adrenergic receptor gene on weight gain in morbid obesity. *Diabetes Metab* 23:424-7.
- Combs TP, Berg AH, Obici S, Scherer PE, Rossetti L (2001). Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *J Clin Invest* 108 :1875-81.
- Consenso del Grupo de Trabajo Resistencia a la Insulina de la Sociedad Española de Diabetes (2002). La Resistencia a la Insulina y su implicación en múltiples factores de riesgo asociados a diabetes mellitus tipo 2. *Medicina Clínica*. Documento 1.

- Costanzo BV, Trischitta V, Di Paola R, Spampinato D, Pizzuti A, Vigneri R, Frittitta L (2001). The Q allele variant (Gln121) of membrane glycoprotein PC-1 interacts with the insulin receptor and inhibits insulin signaling more effectively than the common K allele variant (Lys121). *Diabetes* 50:831-36.
- Criteria ADA 1997. (1998) (Report of the Expert Committee on the Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, vol 21, Suppl 1).
- Dagogo-Jack S, Fanelli C, Paramore D, Brothers J, Landt M (1996). Plasma leptin and insulin relationship in obese and nonobese humans. *Diabetes* 45: 695-98.
- D'Alfonso R, Marini MA, Frittitta L, Sorge R, Frontoni S, Porzio O, Mariani LM, Lauro D, Gambardella S, Trischitta V, Federici M, Lauro R, Sesti G (2003). Polymorphisms of the insulin receptor substrate-2 in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 88:317-22.
- Dalziel B, Gosby AK, Richman RM, Bryson JM, Caterson ID (2002). Association of the TNF-alpha -308 G/A promoter polymorphism with insulin resistance in obesity. *Obes Res* 10:401-7.
- Dammerman M, Breslow JL (1995). Genetic basis of lipoprotein disorders. *Circulation* 91:505-12.
- de Courten M, Zimmet P, Hodge A, Collins V, Nicolson M, Staten M, Dowse G, Alberti KG (1997). Hyperleptinaemia: the missing link in the metabolic syndrome? *Diabet Med* 14:200-08.
- De Fronzo R.A, Ferrannini E (1991). Insulin resistance: a multifocal syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 14:173-94.
- Deeb SS, Fajas L, Nemoto M, Pihlajamaki J, Mykkanen L, Kuusisto J, Laakso M, Fujimoto W, Auwerx J (1998). A Pro12Ala substitution in PPARgamma2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nat Genet* 20:284-7.
- Deprés JP, Lamarche B, Mauriége P, Cantin B, Dagenais GR, Moorjani S, Lupien PJ (1996). Hyperinsulinemia as an independent risk factor for ischemic heart disease. *N Engl Med* 334:952-57.
- Despres H, Marette A (1999). Obesity and insulin resistance: epidemiologic, metabolic and molecular aspects. In: Reaven GM, Laws A, eds. *Insulin resistance. The metabolic syndrome X*. Clifton: Humana Press 51-82.
- Douglas JA, Erdos MR, Watanabe RM, Braun A, Johnston CL, Oeth P, Mohlke KL, Valle TT, Ehnholm C, Buchanan TA, Bergman RN, Collins FS, Boehnke M, Tuomilehto J. (2001). The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 Pro12A1a variant: association with type 2 diabetes and trait differences. *Diabetes* 50:886-90.
- Dubois M, Pattou F, Kerr-Conte J, Gmyr V, Vandewalle B, Desreumaux P, Auwerx J, Schoonjans K, Lefebvre J (2000). Expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in normal human pancreatic islet cells. *Diabetologia* 43:1165-9.
- Duggirala R, Blangero J, Almasy L, Arya R, Dyer TD, Williams KL, Leach RJ, O'Connell P, Stern MP (2001). A major locus for fasting insulin concentrations and insulin resistance on chromosome 6q with strong pleiotropic effects on obesity-related phenotypes in nondiabetic Mexican Americans. *Am J Hum Genet* 68:1149-64.
- Echwald SM, Sorensen TI, Tybjaerg-Hansen A, Andersen T, Pedersen O (1998). Gln27Glu variant of the human beta2-adrenoreceptor gene is not associated with early-onset obesity in Danish men. *Diabetes* 47:1657-58.

- EGIR (2002). The European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). The frequency of the WHO metabolic syndrome in European cohorts, and an alternative definition of the insulin resistance syndrome. *Diabetes Metab* 28:364-76.
- Ehrenborg E, Skogsberg J, Ruotolo G, Large V, Eriksson P, Arner P, Hamsten A (2000). The Q/E27 polymorphism in the beta2-adrenoceptor gene is associated with increased body weight and dyslipoproteinaemia involving triglyceride-rich lipoproteins. *Journal of Internal Medicine* 247:651-56.
- Ek J, Urhammer SA, Sorensen TIA, Andersen T, Auwerx J, Pedersen O (1999). Homozygosity of the Pro12Ala variant of the peroxisome proliferation-activated receptor- $\gamma$ 2 (PPAR- $\gamma$ 2): divergent modulating effects on body mass index in obese and lean Caucasian men. *Diabetologia* 42:892-95
- Ek J, Andersen G, Urhammer SA, Hansen L, Carstensen B, Borch-Johnsen K, Drivsholm T, Berglund L, Hansen T, Lithell H, Pedersen O (2001). Studies of the Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 (PPAR-gamma2) gene in relation to insulin sensitivity among glucose tolerant caucasians. *Diabetologia* 44:1170-6.
- Erickson JC, Clegg KE, Palmiter RD (1996a). Sensitivity to leptin and susceptibility to seizures of mice lacking neuropeptide Y. *Nature* 381:415-18.
- Erickson JC, Hollopeter G, Palmiter RD(1996b). Attenuation of the obesity syndrome of ob/ob mice by the loss of neuropeptide Y. *Nature* 274:1704-07.
- Erkkila AT, Lindi V, Lehto S, Pyorala K, Laakso M, Uusitupa MI (2002). Variation in the fatty acid binding protein 2 gene is not associated with markers of metabolic syndrome in patients with coronary heart disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 12:53-9.
- Esterbauer H, Oberkofler H, Liu YM, Breban D, Hell E, Krempler F, Patsch W (1998). Uncoupling protein-1 mRNA expression in obese human subjects: the role of sequence variations at the uncoupling protein-1 gene locus. *J Lipid Res* 39: 834-44.
- Evans D, Minouchehr S, Hagemann G, Mann WA, Wendt D, Wolf A, Beisiegel U (2000a). Frequency of and interaction between polymorphisms in the beta3-adrenergic receptor and in uncoupling proteins 1 and 2 and obesity in Germans. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24:1239-45.
- Evans D, Mann WA, Heer J, Michel U, Wendt D, Kortner B, Wolf A, Beisiegel U (2000b). Variation in the gene for human peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPARgamma) does not play a major role in the development of morbid obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24:647-51.
- Fajas L, Auboeuf D, Raspé E, Shoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R, Najib J, Laville M, Fruchart JC, Deeb S, Vidal-Puig A, Flier J, Briggs MR, Staels B, Vidal H, Auwerx J (1997). The organization, promoter analysis, and expression of the human PPAR $\gamma$  gene. *J Biol Chem* 272:18779-89.
- Fenger M, Poulsen P, Beck-Nielsen H, Vaag A (2000). Impact of the Xba1-polymorphism of the human muscle glycogen synthase gene on parameters of the insulin resistance syndrome in a Danish twin population. *Diabet Med* 17:735-40.
- Fernández Real JM, Gutierrez C, Ricart W, Casamitjana R, Fernández Castañer M, Vendell J, Richart C, Soler J (1997). The TNF-alpha gene NcoI polymorphism influences the relationship among insulin resistance, percent body fat, and increased serum levels. *Diabetes* 46:1468-72.
- Ferranini E, Andrea M (1998). How to measure insulin sensitivity. *J Hypertens* 16:895-906.
- Ferrara A, Barrett-Connor EL, Edelstein SL (1994). Hyperinsulinemia does not increase the risk of fatal cardiovascular disease in elderly men or women without diabetes: the Rancho Bernardo Study. *Am J Epidemiology* 140:857-69.

- Finegood DT, McArthur MD, Kojwang D, Thomas MJ, Buckingham RE, Leonard TB (1999). The PPAR $\gamma$  agonist rosiglitazone decreases net loss of pancreatic  $\beta$ -cell mass in Zucker diabetic fatty rats. *Diabetes* 48 (Suppl 1) A18
- Ford ES, Giles WH, Dietz WH (2002). Prevalence of the Metabolic Syndrome Among US Adults. Findings From the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA* 287:356-359.
- Frederiksen L, Brodbeck K, Fenger M, Jorgensen T, Borch-Johnsen K, Madsbad S, Urhammer SA (2002). Comment: studies of the Pro12Ala polymorphism of the PPAR-gamma gene in the Danish MONICA cohort: homozygosity of the Ala allele confers a decreased risk of the insulin resistance syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 87:3989-92.
- Frittitta L, Youngren J, Vigneri R, Maddux BA, Trischitta V, Goldfine ID (1996). PC-1 content in skeletal muscle of non-obese, non-diabetic subjects: relationship to insulin receptor tyrosine-kinase activity and whole body insulin sensitivity. *Diabetologia* 39:1190-95.
- Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, Yen FT, Bihain BE, Lodish HF (2001). Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:2005-10.
- Fumeron F, Durack-Bown I, Betoulle D, Cassard-Doulier AM, Tuzet S, Bouillaud F, Melchior JC, Ricquier D, Apfelbaum M (1996). Polymorphisms of uncoupling protein (UCP) and beta 3 adrenoceptor genes in obese people submitted to a low calorie diet. *Int J Obes Relat Metab Disord* 20:1051-54.
- Gabriel R, Serrano-Ríos M, Vega S, Segura A, Horcajo P, Muñoz J, Gómez L, Pladevall M, Parra J, Cabello JB, Soriguer F, Haffner S and the Spanish Insulin Resistance Study Group (1997). Relationship between visceral adiposity, body size and fat distribution with fasting insulin and proinsulin levels in a population based survey in Spain. *Can J Cardiol* 13: (Suppl B):280B.
- Gagnon J, Mauriege P, Roy S, Sjostrom D, Chagnon YC, Dionne FT, Oppert JM, Perusse L, Sjostrom L, Bouchard C (1996). The Trp64Arg mutation of the beta3 adrenergic receptor gene has no effect on obesity phenotypes in the Quebec Family Study and Swedish Obese Subjects cohorts. *J Clin Invest* 98:2086-93.
- Gagnon J, Lago F, Chagnon Y, Perusse L, Näslund I, Lissner L, Sjöström L, Bouchard C (1998). DNA polymorphism in the uncoupling protein 1 (UCP1) gene has no effect on obesity related phenotypes in the Swedish Obese Subjects cohorts. *Int J Obes Relat Metab Disord* 22:500-5.
- Giacobino JP (2002). Uncoupling proteins, leptin and obesity: an updated review. *Ann N Y Acad Sci* 967:398-402.
- Ginsberg HN (2000). Insulin resistance and cardiovascular disease. *J Clin Invest* 106 453-58.
- Goldfine ID, Maddux BA, Youngren JF, Frittitta L, Trischitta V, Dohm GL (1998). Membrane glycoprotein PC-1 and insulin resistance. *Mol Cell Biochem* 182:177-84.
- Gonzalez Sanchez JL, Serrano Rios M, Fernandez Perez C, Laakso M, Martinez Larrad MT (2002). Effect of the Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma-2 gene on adiposity, insulin sensitivity and lipid profile in the Spanish population. *Eur J Endocrinol* 147:495-501.
- Green SA, Turki J, Innis M, Liggett SB. (1994). Amino-terminal polymorphisms of the human beta 2-adrenergic receptor impart distinct agonist-promoted regulatory properties. *Biochemistry* 33:9414-9419.
- Groop LC, Kankuri M, Schalin-Jantti C, Ekstrand A, Nikula-Ijas P, Widen E, Kuusmanen E, Eriksson J, Franssila-Kallunki A, Saloranta C, Koskimies S (1993). Association



- between polymorphism of the glycogen synthase gene and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 328:10-4.
- Groop L, Forsblom C, Lehtovirta M, Tuomi T, Karanko S, Nissen M, Ehrnstrom BO, Forsen B, Isomaa B, Snickars B, Taskinen MR (1996). Metabolic consequences of a family history of NIDDM (The Botnia Study). *Diabetes* 45:1585-93.
- Groop L, Tuomi T (1997). Non-insulin-dependent diabetes mellitus: a collision between thrifty genes and an affluent society. *Ann Med* 29:37-53.
- Groop L (2000). Genetics of the metabolic syndrome. *Br J Nutr* 83 (suppl 1):S39-48.
- Gu HF, Almgren P, Lindholm E, Frittitta L, Pizzuti A, Trischitta V, Groop LC (2000). Association between the human glycoprotein PC-1 gene and elevated glucose and insulin levels in a paired-sibling analysis. *Diabetes* 49:1601-03.
- Haffner SM (1999). Epidemiology of insulin resistance and its relation to coronary artery disease. *Am J Cardiol* 84:11j-14j.
- Hara K, Okada T, Tobe K, Yasuda K, Mori Y, Kadowaki H, Hagura R, Akanuma Y, Kimura S, Ito C, Kadowaki T (2000). The Pro12Ala polymorphism in PPAR gamma2 may confer resistance to type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 271:212-6.
- Hara K, Boutin P, Mori Y, Tobe K, Dina C, Yasuda K, Yamauchi T, Otabe S, Okada T, Eto K, Kadowaki H, Hagura R, Akanuma Y, Yazaki Y, Nagai R, Taniyama M, Matsubara K, Yoda M, Nakano Y, Tomita M, Kimura S, Ito C, Froguel P, Kadowaki T (2002). Genetic variation in the gene encoding adiponectin is associated with an increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetes* 51:536-40.
- Hayakawa T, Nagai Y, Taniguchi M, Yamashita H, Takamura T, Abe T, Nomura G, Kobayashi K (1999). Phenotypic characterization of the beta3-adrenergic receptor mutation and the uncoupling protein 1 polymorphism in Japanese men. *Metabolism* 48:636-40.
- Hayakawa T, Nagai Y, Kahara T, Yamashita H, Takamura T, Abe T, Nomura G, Kobayashi K (2000). Gln27Glu and Arg16Gly polymorphisms of the beta2-adrenergic receptor gene are not associated with obesity in Japanese men. *Metabolism* 49:1215-18.
- Hegele RA, Harris SB, Zinman B, Hanley AJ, Cao H (2001). Absence of association of type 2 diabetes with CAPN10 and PC-1 polymorphisms in Oji-Cree. *Diabetes Care* 24:1498-9.
- Heilbronn LK, Kind KL, Pancewicz E, Morris AM, Noakes M, Clifton PM (2000). Association of -3826 G variant in uncoupling protein-1 with increased BMI in overweight Australian women. *Diabetologia* 43:242-4.
- Hellstrom L, Large V, Reynisdottir S, Wahrenberg H, Arner P (1999). The different effects of a Gln27Glu beta 2-adrenoceptor gene polymorphism on obesity in males and in females. *J Intern Med* 245:253-59.
- Himms-Hagen J (2001). Does brown adipose tissue (BAT) have a role in the physiology or treatment of human obesity? *Rev Endocr Metab Disord* 2:395-401.
- Hoffstedt J, Poirier O, Thorne A, Lonqvist F, Herrmann SM, Cambien F, Arner P (1999). Polymorphism of the human beta3-adrenoceptor gene forms a well-conserved haplotype that is associated with moderate obesity and altered receptor function. *Diabetes* 48:203-05.
- Hoffstedt J, Eriksson P, Hellstrom L, Rossner S, Ryden M, Arner P (2000). Excessive fat accumulation is associated with the TNF alpha-308 G/A promoter polymorphism in women but not in men. *Diabetologia* 43:117-20.
- Hotamisligil GS, Spiegelman BM (1994a). Tumor necrosis factor-alpha: a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes* 43:1271-8.

- Hotamisligil GS, Budavari A, Murray D, Spiegelman BM (1994b). Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J Clin Invest* 94:1543-9.
- Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, Iwahashi H, Kuriyama H, Ouchi N, Maeda K, Nishida M, Kihara S, Sakai N, Nakajima T, Hasegawa K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Hanafusa T, Matsuzawa Y (2000). Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:1595-9.
- Hribal ML, Federici M, Porzio O, Lauro D, Borboni P, Accili D, Lauro R, Sesti G (2000). The Gly $\rightarrow$ Arg972 amino acid polymorphism in insulin receptor substrate-1 affects glucose metabolism in skeletal muscle cells. *J Clin Endocrinol Metab* 85:2004-13.
- Ishiyama-Shigemoto S, Yamada K, Yuan X, Ichikawa F, Nonaka K. (1999) Association of polymorphisms in the beta2-adrenergic receptor gene with obesity, hypertriglyceridaemia, and diabetes mellitus. *Diabetologia* 42:98-101.
- Isomma B, Almgren P, Tuomi T, Forsen B, Lathi K, Nissen M, Taskinene MR, Groop L (2001). Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 24:683-89.
- Iwamoto Y, Kosaka K, Kuzuya T, Akanuma Y, Shigeta Y, Kaneko T (1996). Effects of troglitazone : A new hypoglycemic agent in patients with NIDDM poorly controlled by diet therapy. *Diabetes Care* 19:151-56.
- Janssen JA, Koper JW, Stolk RP, Englaro P, Uitterlinden AG, Huang Q, van Leeuwen JP, Blum WF, Attanasio AM, Pols HA, Grobbee DE, de Jong FH, Lamberts SW (1998). Lack of associations between serum leptin, a polymorphism in the gene for the beta 3-adrenergic receptor and glucose tolerance in the Dutch population. *Clin Endocrinol (Oxf)* 49:229-34.
- Ji J, Herbison CE, Mamotte CD, Burke V, Taylor RR, van Bockxmeer FM (2002). Hepatic lipase gene -514 C/T polymorphism and premature coronary heart disease. *J Cardiovasc Risk* 9:105-13.
- Kawamura T, Egusa G, Fujikawa R, Okubo M. (2001). Gln27Glu variant of the beta2-adrenergic receptor gene is not associated with obesity and diabetes in Japanese-Americans. *Metabolism* 50:443-46.
- Kelly IE, Han TS, Walsh K & Lean ME (1999). Effects of a Thiazolidinedione compound on body fat and fat distribution of patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 22:288-93.
- Kissebah AH, Sonnenberg GE, Myklebust J, Goldstein M, Broman K, James RG, Marks JA, Krakower GR, Jacob HJ, Weber J, Martin L, Blangero J, Comuzzie AG (2000). Quantitative trait loci on chromosomes 3 and 17 influence phenotypes of the metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:14478-83.
- Koch M, Rett K, Maerker E, Volk A, Haist K, Deninger M, Renn W, Haring HU (1999). The PPAR $\gamma$ 2 amino acid polymorphism Pro 12 Ala is prevalent in offspring of Type II diabetic patients and is associated to increased insulin sensitivity in a subgroup of obese subjects. *Diabetologia* 42:758-62.
- Koch M, Rett K, Volk A, Maerker E, Haist K, Weisser M, Rettig A, Renn W, Haring HU (2000). The tumor necrosis factor alpha -238 G $\rightarrow$ A and -308 G $\rightarrow$ A promoter polymorphisms are not associated with insulin sensitivity and insulin secretion in young healthy relatives of type II diabetic patients. *Diabetologia* 43:181-4.
- Kortner B, Wolf A, Wendt D, Beisiegel U, Evans D (1999). Lack of association between a human beta-2 adrenoceptor gene polymorphism (gln27glu) and morbid obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23:1099-100.

- Kubaszek A, Pihlajamaki J, Karhapaa P, Vauhkonen I, Laakso M (2003). The K121Q Polymorphism of the PC-1 Gene Is Associated With Insulin Resistance but not With Dyslipidemia. *Diabetes Care* 26:464-7.
- Kulkarni RN, Wang ZL, Wang RM, Hurley JD, Smith DM, Ghatel MA, Withers DJ, Gardiner JV, Bailey CJ, Bloom SR. (1997). Leptin rapidly suppresses insulin release from insulinoma cells, rat and human islets and, in vivo, in mice. *J Clin Invest* 100:2729-36.
- Lander ES, Schork NJ (1994). Genetic dissection of complex traits. *Science* 265:2037-48.
- Large V, Hellstrom L, Reynisdottir S, Lonnqvist F, Eriksson P, Lannfelt L, Arner P (1997). Human beta-2 adrenoceptor gene polymorphisms are highly frequent in obesity and associate with altered adipocyte beta-2 adrenoceptor function. *J Clin Invest* 100:3005-13.
- Large V, Arner P (1998). Regulation of lipolysis in humans. Pathological modulation in obesity, diabetes, and hyperlipidaemia. *Diabetes Metab* 24:409-18.
- Lavebratt C, Ryden M, Schalling M, Sengul S, Ahlberg S, Hoffstedt J (2002). The hormone-sensitive lipase 16 gene polymorphism and body fat accumulation. *Eur J Clin Invest* 32:938-42.
- Lee SC, Pu YB, Thomas GN, Lee ZS, Tomlinson B, Cockram CS, Critchley JA, Chan JC (2000). Tumor necrosis factor alpha gene G-308A polymorphism in the metabolic syndrome. *Metabolism* 49:1021-4.
- Leyva F, Godsland IF, Ghatel M, Proudler AJ, Aldis S, Walton C, Bloom S, Stevenson JC (1998). Hyperleptinemia as a component of a metabolic syndrome of cardiovascular risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:928-33.
- Liggett, S. B. (1997) Polymorphisms of the beta2-adrenergic receptor and asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 156:S156-162.
- Lin SY, Sheu WH, Lee WJ, Song YM, Chen YT (1999). Trp64Arg polymorphism of the beta 3-adrenergic receptor gene is associated with increased plasma leptin levels in obese Chinese women. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)* 62:569-76.
- Lindi V, Sivenius K, Niskanen L, Laakso M, Uusitupa MIJ (2001). Effect of the Pro12Ala polymorphism of the PPAR- $\gamma$ 2 gene on long-term weight change in Finnish non-diabetic subjects. *Diabetologia* 44:925-26.
- Liu LS, Spelleken M, Rohrig K, Hauner H, Eckel J (1998). Tumor necrosis factor-alpha acutely inhibits insulin signaling in human adipocytes: implication of the p80 tumor necrosis factor receptor. *Diabetes* 47:515-22.
- Lonnqvist F, Wennlund A, Arner P (1997). Relationship between circulating leptin and peripheral fat distribution in obese subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord* 21:255-60.
- Luan JA, Wong MY, Day NE, Wareham N.J (2001a). Sample size determination for studies of gene-environment interaction. *Int Epid Assoc* 30:1035-40.
- Luan J, Browne PO, Harding AH, Halsall DJ, O'Rahilly S, Chatterjee VK, Wareham NJ (2001b). Evidence for gene-nutrient interaction at the PPARgamma locus. *Diabetes* 50:686-9.
- Maddux BA, Sbraccia P, Kumakura S, Sasson S, Youngren J, Fisher A, Spencer S, Grupe A, Henzel W, Stewart TA, Reaven GM, Goldfine ID (1995). Membrane glycoprotein PC-1 and insulin resistance in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* 373: 448-51.
- Maddux BA, Goldfine ID (2000). Membrane glycoprotein PC-1 inhibition of insulin receptor function occurs via direct interaction with the receptor alpha-subunit. *Diabetes* 49:13-9.
- Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K (1996). cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1

- (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun* 221:286-9.
- Magre J, Laurell H, Fizames C, Antoine PJ, Dib C, Vigouroux C, Bourut C, Capeau J, Weissenbach J, Langin D (1998). Human hormone-sensitive lipase: genetic mapping, identification of a new dinucleotide repeat, and association with obesity and NIDDM. *Diabetes* 47:284-6.
- Mammarella S, Romano F, Di Valerio A, Creati B, Esposito DL, Palmirotta R, Capani F, Vitullo P, Volpe G, Battista P, Della Loggia F, Mariani-Costantini R, Cama A (2000). Interaction between the G1057D variant of IRS-2 and overweight in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Hum Mol Genet* 9: 2517-21.
- Mancini FP, Vaccaro O, Sabatino L, Tufano A, Rivellese AA, Riccardi G, Colantuoni V (1999). Pro12Ala substitution in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 is not associated with type 2 diabetes. *Diabetes* 48:1466-68.
- Mantzoros CS (1999). The role of leptin in human obesity and disease: A review of current evidence. *Ann Intern Med* 130:671-80.
- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC (1985). Homeostasis model assessment: insulin resistance and  $\beta$ -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28:412-19.
- Martínez Larrad MT (2001). Insulina, Proinsulina y Leptina: estudio poblacional en España. Correlación con factores de riesgo cardiovascular. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid.
- Martínez Larrad MT, González Sánchez JL, Serrano Ríos M (2002). Insulin Resistance: A Genetic Approach. Overview. *Nutrition and Aging. Nestlé Nutrition Workshop Series Clinical & Performance Program* 6:79-95.
- Matsuzawa Y, Funahashi T, Nakamura T (1999). Molecular mechanism of metabolic syndrome X: contribution of adipocytokines adipocyte-derived bioactive substances. *Ann N Y Acad Sci* 892:146-54.
- Matsubara M, Chiba H, Maruoka S, Katayose S (2000). Elevated serum leptin concentrations in women with components of multiple risk factor clustering syndrome. *J Atheroscler Thromb* 7:231-7.
- Mayer EJ, Newman B, Quesenberry CP Jr, Selby JV (1993a). Usual dietary fat intake and insulin concentrations in healthy women twins. *Diabetes Care* 16:1459-69.
- Mayer EJ, Newman B, Quesenberry CP Jr, Friedman GD, Selby JV (1993b). Alcohol consumption and insulin concentrations. Role of insulin in associations of alcohol intake with high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides. *Circulation* 88:2190-7.
- Mayer-Davis EJ, D'Agostino R Jr, Karter AJ, Haffner SM, Rewers MJ, Saad M, Bergman RN (1998). Intensity and amount of physical activity in relation to insulin sensitivity: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *JAMA* 279:669-74.
- Meirhaeghe A, Helbecque N, Cottel D, Amouyel P (2000a). Impact of polymorphisms of the human beta2-adrenoceptor gene on obesity in a French population. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24:382-87.
- Meirhaeghe A, Fajas L, Helbecque N, Cottel D, Auwerx J, Deeb SS, Amouyel P (2000b). Impact of the peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$ 2 Pro12Ala polymorphism on adiposity, lipids and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* 24:195-99.
- Mekeigue PM (1999). Ethnic variation in insulin resistance and risk of type 2 diabetes. In: Reaven GM, Laws A, eds. *Insulin resistance. The metabolic syndrome X*. Clifton: Humana Press 15-34.

- Menzaghi C, Ercolino T, Di Paola R, Berg AH, Warram JH, Scherer PE, Trischitta V, Doria A (2002). A haplotype at the adiponectin locus is associated with obesity and other features of the insulin resistance syndrome. *Diabetes* 51:2306-12.
- Minocci A, Savia G, Lucantoni R, Berselli ME, Tagliaferri M, Calo G, Petroni ML, de Medici C, Viberti GC, Liuzzi A (2000). Leptin plasma concentrations are dependent on body fat distribution in obese patients. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24:1139-44.
- Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, Sewter CP, Digby JE, Mohammed SN, Hurst JA, Cheetham CH, Earley AR, Barnett AH, Prins JB, O'Rahilly S (1997). Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 387:903-8.
- Mori Y, Kim-Motoyama H, Katakura T, Yasuda K, Kadowaki H, Beamer BA, Shuldiner AR, Akanuma Y, Yazaki Y, Kadowaki T (1998). Effect of the Pro12Ala variant of the human peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 gene on adiposity, fat distribution, and insulin sensitivity in Japanese men. *Biochem Biophys Res Commun* 251:195-8.
- Mori H, Ikegami H, Kawaguchi Y, Seino S, Yokoi N, Takeda J, Inoue I, Seino Y, Yasuda K, Hanafusa T, Yamagata K, Awata T, Kadowaki T, Hara K, Yamada N, Gotoda T, Iwasaki N, Iwamoto Y, Sanke T, Nanjo K, Oka Y, Matsutani A, Maeda E, Kasuga M (2001). The Pro12 -->Ala substitution in PPAR-gamma is associated with resistance to development of diabetes in the general population: possible involvement in impairment of insulin secretion in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes* 50:891-4.
- Morton NE (1982). Outline of genetic epidemiology. Basel: S. Karger.
- Morton NE (1992). The future of genetic epidemiology. *Ann Medic* 24:557-62.
- Murthy V, Julien P, Gagne C (1996). Molecular pathobiology of the human lipoprotein lipase gene. *Pharmacol Ther* 70:101-35.
- Neel V (1962). Diabetes Mellitus: A thrifty genotype rendered detrimental by progress? *Am J Hum Genet* 14:352-62.
- Oberkofler H, Esterbauer H, Hell E, Krempler F, Patsch W (2000). The Gln27Glu polymorphism in the beta2-adrenergic receptor gene is not associated with morbid obesity in Austrian women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24:388-90.
- Oeveren van-Dybicz AM, Vonkeman HE, Bon MA, van den Bergh FA, Vermes I (2001). Beta 3-adrenergic receptor gene polymorphism and type 2 diabetes in a Caucasian population. *Diabetes Obes Metab* 3:47-51.
- Oh EY, Min KM, Chung JH, Min YK, Lee MS, Kim KW, Lee MK (2000). Significance of Pro12Ala mutation in peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 in Korean diabetic and obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 85:1801-4.
- Oizumi T, Daimon M, Saitoh T, Kameda W, Yamaguchi H, Ohnuma H, Igarashi M, Eguchi H, Manaka H, Tominaga M, Kato T; Funagata Diabetes Study (2001). Genotype Arg/Arg, but not Trp/Arg, of the Trp64Arg polymorphism of the beta(3)-adrenergic receptor is associated with type 2 diabetes and obesity in a large Japanese sample. *Diabetes Care* 24:1579-83.
- Oppert JM, Oppert JM, Vohl MC, Chagnon M, Dionne FT, Cassard-Doulier AM, Ricquier D, Perusse L, Bouchard C (1994). DNA polymorphism in the uncoupling protein (UCP) gene and human body fat. *Int J Obes Relat Metab Disord* 18:526-31.
- Orho M, Nikula-Ijäs P, Schalin-Jäntti C, Permutt M, Groop L (1995). Isolation and characterization of the human muscle glycogen synthase gene. *Diabetes* 44:1095-105.
- Orho-Melander M, Almgren P, Kanninen T, Forsblom C, Groop LC (1999). A paired-sibling analysis of the XbaI polymorphism in the muscle glycogen synthase gene. *Diabetologia* 42:1138-45.

- Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y (1999). Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* 100:2473-6.
- Palou A, Serra F, Bonet ML, Pico C (2000). Obesity: Molecular bases of a multifactorial problem. *Eur J Nutr* 39:127-44.
- Parhami F, Tintut Y, Ballard A, Fogelman AM, Demer LL (2001). Leptin enhances the calcification of vascular cells: artery wall as a target of leptin. *Circ Res* 88:954-60.
- Pedersen O (1999). Genetic components of insulin resistance. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 107:113-8.
- Pereira MA, Jacobs DR, Van Horn L, Slattery ML, Kartashov AI, Ludwig DS (2002). Dairy Consumption, obesity and the insulin resistance syndrome in young adults: the CARDIA study. *JAMA* 288:2081-89.
- Perry HM 3rd, Morley JE, Horowitz M, Kaiser FE, Miller DK, Wittert G (1997). Body composition and age in African-American and Caucasian women: relationship to plasma leptin levels. *Metabolism* 46:1399-405.
- Pietri-Rouxel F, St John Manning B, Gros J, Strosberg AD (1997). The biochemical effect of the naturally occurring Trp64-->Arg mutation on human beta3-adrenoceptor activity. *Eur J Biochem* 247:1174-9.
- Pihlajamaki J, Karjalainen L, Karhapaa P, Vauhkonen I, Taskinen MR, Deeb SS, Laakso M (2000). G-250A substitution in promoter of hepatic lipase gene is associated with dyslipidemia and insulin resistance in healthy control subjects and in members of families with familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:1789-95.
- Pizzuti A, Frittitta L, Argiolas A, Baratta R, Goldfine ID, Bozzali M, Ercolino T, Scarlato G, Iacoviello L, Vigneri R, Tassi V, Trischitta V (1999). A polymorphism (K121Q) of the human glycoprotein PC-1 gene coding region is strongly associated with insulin resistance. *Diabetes* 48:1881-4.
- Prins JB, Nielser CU, Winterford CM, Bright NA, Siddle K, O'Rahilly S, Walker NI, Cameron DP (1997). Tumor necrosis factor-alpha induces apoptosis of human adipose cells. *Diabetes* 46:1939-44.
- Proenza AM, Poissonnet CM, Ozata M, Ozen S, Guran S, Palou A, Strosberg AD (2000). Association of sets of alleles of genes encoding beta3-adrenoreceptor, uncoupling protein 1 and lipoprotein lipase with increased risk of metabolic complications in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24:93-100.
- Rasmussen SK, Urhammer SA, Jensen JN, Hansen T, Borch-Johnsen K, Pedersen O (2000a). The -238 and -308 G->A polymorphisms of the tumor necrosis factor-alpha gene promoter are not associated with features of the insulin resistance syndrome or altered birth weight in Danish Caucasians. *J Clin Endocrinol Metab* 85:1731-4.
- Rasmussen SK, Urhammer SA, Pizzuti A, Echwald SM, Ekstrom CT, Hansen L, Hansen T, Borch-Johnsen K, Frittitta L, Trischitta V, Pedersen O (2000b). The K121Q variant of the human PC-1 gene is not associated with insulin resistance or type 2 diabetes among Danish Caucasians. *Diabetes* 49:1608-11.
- Ravussin E, Valencia ME, Esparza J, Bennett PH, Schulz LO (1994). Effects of a traditional lifestyle on obesity in Pima Indians. *Diabetes Care* 17:1067-74.
- Regensteiner JG, Mayer EJ, Shetterly SM, Eckel RH, Haskell WL, Marshall JA, Baxter J, Hamman RF (1991). Relationship between habitual physical activity and insulin levels among nondiabetic men and women. San Luis Valley Diabetes Study. *Diabetes Care* 14:1066-74.

- Rieusset J, Chambrier C, Bouzakri K, Dusserre E, Auwerx J, Riou JP, Laville M, Vidal H (2001). The expression of the p85 $\alpha$  subunit of phosphatidylinositol 3-kinase is induced by activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human adipocytes. *Diabetologia* 44:544-54.
- Rissanen J, Kuopusjärvi M, Pihlajamäki J, Sipiläinen R, Heikkinen S, Vanhala M, Kekäläinen P, Kuusisto J, Laakso M (1997a). The Trp64Arg polymorphism of the beta3-adrenergic receptor gene: lack of association with NIDDM and features of insulin resistance syndrome. *Diabetes Care* 20:1319-23.
- Rissanen J, Pihlajamäki J, Heikkinen S, Kekäläinen P, Mykkänen L, Kuusisto J, Kolle A, Laakso M (1997b). New variants in the glycogen synthase gene (Gln71His, Met416Val) in patients with NIDDM from eastern Finland. *Diabetologia* 40:1313-19.
- Ristow M, Müller-Wieland D, Pfeiffer A, Krone W, Kahn CR (1998). Obesity associated with a mutation a genetic regulator of adipocyte differentiation. *N Engl J Med* 339:953-59.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). *Molecular Cloning*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York.
- Sandouk T, Reda D, Hofmann C (1993). Antidiabetic agent pioglitazone enhances adipocyte differentiation of 3T3-F442A cells. *American Journal of Physiology* 264 C1600-08.
- Santos JL, Perez-Bravo F, Martinez JA, Montalvo D, Albala C, Carrasco E (2002). No evidence for an association between genetic polymorphisms of beta(2)- and beta(3)-adrenergic receptor genes with body mass index in Aymara natives from Chile. *Nutrition* 18:255-8.
- Schaffler A, Palitzsch KD, Watzlawek E, Drobniak W, Schwer H, Scholmerich J, Schmitz G (1999). Frequency and significance of the A-->G (-3826) polymorphism in the promoter of the gene for uncoupling protein-1 with regard to metabolic parameters and adipocyte transcription factor binding in a large population-based Caucasian cohort. *Eur J Clin Invest* 29:770-9.
- Schalin-Jääntti C, Härkönen M, Groop LC (1992). Impaired activation of glycogen synthase in people at increased risk for developing NIDDM. *Diabetes* 41:598-604.
- Schrauwen P, Walder K, Ravussin E (1999). Human uncoupling proteins and obesity. *Obesity Research* 7:97-105.
- Shimada F, Makino H, Hashimoto N, Iwaoka H, Taira M, Nozaki O, Kanatsuka A, Holm C, Langin D, Saito Y (1996). Detection of an amino acid polymorphism in hormone-sensitive lipase in Japanese subjects. *Metabolism* 45:862-4
- Sigal RJ, Doria A, Warram JH, Krolewski AS (1996). Codon 972 polymorphism in the insulin receptor substate-1 gene, obesity, and risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 81:1657-9.
- Sivenius K, Valve R, Lindi V, Niskanen L, Laakso M, Uusitupa M (2000). Synergic effect of polymorphisms in uncoupling protein 1 and  $\beta$ 3-adrenergic receptor genes on long-term body weight change in Finnish type 2 diabetic and non-diabetic control subjects. *Int J Obes* 24:514-19.
- Smith S, Boam DS, Bretherton-Watt D, Cawthorne MA, Moore G, Loughborough S (1998). Rosiglitazone increases pancreatic islet area, density and insulin content, but not insulin gene expression. *Diabetes* 47 (Suppl 1) A18.
- Smith U, Gogg S, Johansson A, Olausson T, Rotter V, Svalstedt B (2001). Thiazolidinediones (PPARgamma agonists) but not PPARalpha agonists increase IRS-2 gene expression in 3T3-L1 and human adipocytes. *FASEB J* 15:215-20.
- Spiegelman BM (1998). PPAR $\gamma$ : Adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes* 47:507-14.

- Sramkova D, Kunesova M, Hainer V, Hill M, Vcelak J, Bendlova B (2002). Is a Pro12Ala polymorphism of the PPARgamma2 gene related to obesity and type 2 diabetes mellitus in the Czech population?. *Ann N Y Acad Sci* 967:265-73.
- Stangl K, Cascorbi I, Laule M, Stangl V, Vogt M, Ziemer S, Roots I, Wernecke K, Baumann G, Hauner H (2000). Elevated serum leptin in patients with coronary artery disease: no association with the Trp64Arg polymorphism of the beta3-adrenergic receptor. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24:369-75.
- Stanley BG (1993). En: Colmers WF, Wahlestedt C, editores. *The biology of neuropeptide Y and related peptides*. Totowa, New Jersey 457-510.
- Stephens JW, Humphries SE (2003). The molecular genetics of cardiovascular disease: clinical implications. *J Inter Med* 253: 120-27.
- Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Lazar MA (2001). The hormone resistin links Obesity to Diabetes. Resistin. *Nature* 409:307-12.
- Stern M (1997). *The insulin resistance syndrome*. En: Alberti KGMM, Zimmet P, De Fronzo RA, eds. International textbook of diabetes mellitus, 2nd ed. Dichester: Wiley & Sons: 255-75.
- Strobel A, Issad T, Camoin L, Ozata M, Strosberg AD (1998). A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nat Genet* 18:213-5.
- Strosberg D (1997). Association of  $\beta$ 3 adrenoceptor polymorphism with obesity and diabetes: current status. *Trends Pharmacol Sci* 12:449-54.
- Stumvoll M, Wahl HG, Jacob S, Rettig A, Machicao F, Haring H (2001a). Two novel prevalent polymorphisms in the hormone-sensitive lipase gene have no effect on insulin sensitivity of lipolysis and glucose disposal. *J Lipid Res* 42 :1782-8.
- Stumvoll M, Wahl HG, Loblein K, Becker R, Machicao F, Jacob S, Haring H (2001b). Pro12Ala polymorphism in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 gene is associated with increased antilipolytic insulin sensitivity. *Diabetes* 50:876-81.
- Stumvoll M, Haring H (2002). The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 Pro12Ala polymorphism. *Diabetes* 51:2341-7.
- Sweetser DA, Birkenmeier EH, Klisak IJ, Zollman S, Sparkes RS, Mohandas T, Lusia AJ, Gordon JI (1987). The human and rodent intestinal fatty acid binding protein genes. A comparative analysis of their structure, expression, and linkage relationships. *J Biol Chem* 1987 262:16060-71.
- Szanto I, Kahn R (2000). Selective interaction between leptin and insulin signaling pathways in a hepatic cell line. *PANS* 97: 2355-60.
- Tahvanainen E, Molin M, Vainio S, Tirt L, Nicaud V, Farinero E, Masana L, Ehnholm C (2000). Intestinal fatty acid binding protein polymorphism at codon 54 is not associated with postprandial responses to fat and glucose tolerance tests in healthy young Europeans. Results from EARS II participants. *Atherosclerosis* 152:317-25.
- Tartaglia LA (1997). The leptin receptor. *J Biol Chem* 272: 6093-96.
- Trayhurn P, Hoggard N, Mercer JG, Rayner DV (1999). Leptin: fundamental aspects. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23 Suppl 1:22-8
- Tuomilehto J, Lindstrom J, Eriksson JG, Valle TT, Hamalainen H, Ilanne-Parikka P, Keinanen-Kiukaanniemi S, Laakso M, Louheranta A, Rastas M, Salminen V, Uusitupa M; Finnish Diabetes Prevention Study Group (2001). Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Med* 344:1343-50.
- Ukkola O, Rankinen T, Weisnagel SJ, Sun G, Perusse L, Chagnon YC, Despres JP, Bouchard C (2000). Interactions among the alpha2-, beta2-, and beta3-adrenergic receptor genes and obesity-related phenotypes in the Quebec Family Study. *Metabolism* 49:1063-70.



- Ukkola O, Tremblay A, Sun G, Chagnon YC, Bouchard C (2001a). Genetic variation at the uncoupling protein 1, 2 and 3 loci and the response to long-term overfeeding. *Eur J Clin Nutr* 55:1008-15.
- Ukkola O, Tremblay A, Bouchard C (2001b). Beta-2 adrenergic receptor variants are associated with subcutaneous fat accumulation in response to long-term overfeeding. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25:1604-8.
- Ukkola O, Tremblay A, Bouchard C (2002). Lipoprotein lipase polymorphisms and responses to long-term overfeeding. *J Intern Med* 251:429-36.
- Umekawa T, Yoshida T, Sakane N, Kogure A, Kondo M, Honjyo H (1999). Trp64Arg mutation of beta3-adrenoceptor gene deteriorates lipolysis induced by beta3-adrenoceptor agonist in human omental adipocytes. *Diabetes* 48:117-20.
- Ura S, Araki E, Kishikawa H, Shirota T, Todaka M, Isami S, Shimoda S, Yoshimura R, Matsuda K, Motoyoshi S, Miyamura N, Kahn CR, Shichiri M (1996). Molecular scanning of the insulin receptor substrate-1 (IRS-1) gene in Japanese patients with NIDDM: identification of five novel polymorphisms. *Diabetologia* 39:600-8.
- Valve R, Sivenius K, Miettinen R, Pihlajamaki J, Rissanen A, Deeb SS, Auwerx J, Uusitupa M, Laakso M (1999). Two polymorphisms in the peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  gene are associated with severe overweight among obese women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 84: 3708-12.
- Vendrell J, Gutierrez C, Broch M, Fernandez-Real JM, Aguilar C, Richart C (1998). Beta 3-adrenoreceptor gene polymorphism and leptin. Lack of relationship in type 2 diabetic patients. *Clin Endocrinol (Oxf)* 49:679-83.
- Vidal H (2001). Gene expression in visceral and subcutaneous adipose tissues. *Ann Med* 33:547-55.
- Vidal-Puig A, Jimenez-Linan M, Lowell BB, Hamann A, Hu E, Spiegelman B, Flier JS, Moller DE (1996). Regulation of PPAR gamma gene expression by nutrition and obesity in rodents. *J Clin Invest* 97:2553-61.
- Vidal-Puig AJ, Considine RV, Jimenez-Liñan M, Werman A, Pories WJ, Caro JF, Flier JS (1997). Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. *J Clin Invest* 99:2416-22.
- Vidal-Puig AJ (2000). Uncoupling expectations. *Nat Genet* 26:387-88.
- Vidal-Puig, O'Rahilly (2001). Resistin: a new link between obesity and insulin resistance? *Clin Endocrinol* 55:437-8.
- Vionnet N, Hani El-H, Dupont S, Gallina S, Francke S, Dotte S, De Matos F, Durand E, Lepretre F, Lecoeur C, Gallina P, Zekiri L, Dina C, Froguel P (2000). Genomewide search for type 2 diabetes-susceptibility genes in French whites: evidence for a novel susceptibility locus for early-onset diabetes on chromosome 3q27-qter and independent replication of a type 2-diabetes locus on chromosome 1q21-q24. *Am J Hum Genet* 67:1470-80.
- Virkamäki A, Ueki K, Kahn CR (1999). Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 103: 931-43.
- Walston J, Silver K, Bogardus C, Knowler WC, Celi FS, Austin S, Manning B, Strosberg AD, Stern MP, Raben N, Sorkin JD, Roth J, Shuldiner AR (1995). Time of onset of non-insulin-dependent diabetes mellitus and genetic variation in the beta 3-adrenergic-receptor gene. *N Engl J Med* 333: 343-47.
- Walston J, Seibert M, Yen CJ, Cheskin LJ, Andersen RE (1999). Tumor necrosis factor alpha -238 and -308 polymorphism do not associated with traits related to obesity and insulin resistance. *Diabetes* 48:2096-8.

- Warden C (1999). Genetics of uncoupling proteins in humans. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23 (suppl 6): S46-48.
- Way JM, Gorgun CZ, Tong Q, Uysal KT, Brown KK, Harrington WW, Oliver WR, Willson TM, Kliewer SA, Hotamisligil GS (2001). Adipose tissue resistin expression is severely suppressed in obesity and stimulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J Biol Chem* 276:25651-53.
- Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, Tataranni PA (2001). Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 86:1930-5.
- WHO (1999). Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. Report of a WHO Consultation, 1999.
- Wittrup HH, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG (1999). Lipoprotein lipase mutations, plasma lipids, lipoproteins, and risk of ischemic heart disease. A meta-analysis. *Circulation* 99:2901-7.
- Yamada K, Yuan X, Ishiyama S, Koyama K, Ichikawa F, Koyanagi A, Koyama W, Nonaka K (1997). Association between Ala54Thr substitution of the fatty acid-binding protein 2 gene with insulin resistance and intra-abdominal fat thickness in Japanese men. *Diabetologia* 40:706-10.
- Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T (2001). The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med* 7: 941-6.
- Yang WS, Lee WJ, Funahashi T, Tanaka S, Matsuzawa Y, Chao CL, Chen CL, Tai TY, Chuang LM (2001). Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab* 86:3815-19.
- Youngren JF, Maddux BA, Sasson S, Sbraccia P, Tapscott EB, Swanson MS, Dohm GL, Goldfine ID (1996). Skeletal muscle content of membrane glycoprotein PC-1 in obesity. Relationship to muscle glucose transport. *Diabetes* 45:1324-8.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-32.
- Zhao AZ, Bornfeldt KE, Beavo JA (1998). Leptin inhibits insulin secretion by activation of phosphodiesterase 3B. *J Clin Invest* 102: 869-73.
- Zhu Y, Qi C, Korenberg JR, Chen XN, Noya D, Rao MS, Reddy JK (1995). Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR gamma) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:7921-5.
- Zimmet P, Taylor R, Ram P, King H, Sloman G, Raper LR, Hunt D (1983). Prevalence of diabetes and impaired glucose tolerance in the biracial (Melanesian and Indian) population of Fiji: A rural-urban comparison. *Am J Epidemiol* 118:673-88.

## 8. ANEXO I

### I.- DISEÑO DEL ESTUDIO. FISS 95/0029

Estudio multicéntrico en 9 autonomías del Estado Español de diseño transversal para análisis de Prevalencias en población

2. Estimar la prevalencia Síndrome de Resistencia a la Insulina (SRI) y su relación de los factores de alto riesgo cardiovascular como obesidad, HTA y dislipidemia con Resistencia a la Insulina (RI)/Hiperinsulinemia.

3. Estudiar la asociación de los distintos factores potencialmente aterogénicos.

Previamente, para valorar la viabilidad y asegurar el buen funcionamiento del proyecto, se llevó a cabo un estudio piloto en una muestra representativa de la población estudiada.

### II.-POBLACIÓN DE ESTUDIO

Población de ambos sexos, de edades comprendidas entre los 35 y 64 años. Sobre la muestra teórica planteada se solicitó participar a 5363 sujetos preseleccionados mediante muestreo aleatorio estratificado. Entre ellos se detectaron 1177 (21.9%) errores censales y 1014 (18.9%) rechazaron participar. Finalmente pudieron ser encuestados 3172 sujetos de los que 147 (4.6%) fueron excluidos por no cumplir criterios de inclusión exigidos en el protocolo (de ellos 20 eran diabéticos insulino dependientes). 2929 (92.3%) sujetos completaron el estudio y 88 (2.8%) sujetos que no completaron el estudio.

Estudio multicéntrico poblacional. Ambito de estudio: distintas comunidades españolas.

En una única visita clínica: entrevista estructurada, se determinó en ayunas: glucemia, insulina plasmática, proinsulina, leptina, perfil lipídico, Colesterol Total (CT), Colesterol –HDL (c-HDL), Triglicéridos (TG), Colesterol-LDL (c-LDL), Ácido Úrico (AcUr), Test de Tolerancia Oral a la Glucosa (TTOG) con glucemia a las 2 horas, mediciones antropométricas, peso (P), talla (T), Índice de Masa Corporal (IMC), cociente cintura/cadera (Ci/Ca) y Diámetro Sagital Abdominal (DSA), y presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) estandarizadas.

### III.- RECLUTAMIENTO DE LA POBLACION

#### CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y DE EXCLUSIÓN

#### **Reclutamiento: Areas Geográficas. Modo de aproximación al reclutamiento poblacional. Envío de cartas/respuestas.**

Este estudio ha sido financiado por el FISS 95/0029 y codirigido por el Profesor Manuel Serrano Ríos y Dr. Rafael Gabriel. Participaron en este Proyecto: los siguientes Centros: Hospital General Universitario de Guadalajara (Guadalajara, Castilla La Mancha), Investigador: Dr. Pedro Horcajo Aranda; Hospital de Talavera (Talavera de la Reina, Castilla La Mancha), Investigador: Dr Antonio Segura Fragosa; Hospital de Arévalo (Arévalo, Castilla y León), Investigador: Dr. Saturio Vega Quiroga; Hospital San Agustín de Avilés (Avilés, Asturias), Investigador: Dr. José María Fernández Carreira; Hospital de la Coruña (Coruña, Galicia), Investigador: Dr. Javier Muñiz; Hospital Civil de Málaga (Málaga, Andalucía), Investigador: Dr. Federico Soriguer Escofet; Hospital General de Vic (Vic-Barcelona, Cataluña), Investigador: Manel Pladevall Vila; Hospital General Universitario de Alicante (Alicante, Comunidad Valenciana), Investigador: Dr. Juan Cabello López; Hospital Insalud Mérida (Mérida, Extremadura), Investigador: Dr Pedro Saenz de Aranzubia .

Se citó a los participantes mediante carta y telefónicamente para que acudieran al centro de salud. Para disminuir la tasa de no respondedores se añadió un 30% más.

Ningún sujeto se excluyó del estudio sin antes solicitar dos veces su participación y obtener respuesta negativa. Las negativas no se sustituyeron por un nuevo participante. Solamente los ausentes en dos ocasiones, los cambios domiciliarios definitivos y los fallecimientos se sustituyeron por el siguiente en la lista de sustitutos de edad- sexo correspondiente.

-De inclusión:

Mujeres y hombres de 35 a 64 años inscritos en la zona de estudio

-De exclusión (situaciones que pueden alterar la composición y tamaño corporales habituales en un individuo).

Ascitis

Hernia abdominal

Cirugía mayor abdominal en el último año

Presencia de embarazo o parto en el último año

Diagnóstico médico de insuficiencia cardiaca congestiva

Personas institucionalizados (ingresados en hospital, (residencia en el momento del exámen)

Ganancia o pérdida de 5 ó más kg. En los últimos 6 meses. Diabetes en tratamiento insulínico si edad comienzo anterior a los 35 años (posibilidad de confundir las mediciones de insulina endógena y/o posibilidad de mala clasificación de la Diabetes).

#### IV.- SELECCIÓN DE LOS PARTICIPANTES

Se realizó un muestreo aleatorio estratificado por edad, sexo en varios grupos de población adulta española.

#### V.- TAMAÑO MUESTRAL

##### Tamaño muestral para el estudio de prevalencia.

Un estudio publicado en 1994 (A. Goday, M. Serrano Ríos. Epidemiología de la Diabetes Mellitus en España. Revisión crítica y nuevas perspectivas. Med Clin (Barc), 102 (8): 306 – 315; 1994) ofrece la información necesaria para predeterminar el tamaño muestral mínimo para estimar la prevalencia global y por estratos de edad y sexo, de intolerancia a la glucosa en ayunas, test de tolerancia anormal a las 2 horas y Diabetes Mellitus Tipo 2 en población adulta española.

Premisas utilizadas:

- Prevalencia global esperada de la condición menos frecuente (DMNID) = 6.4% (IC 95%: 4.75, 8.01)
- Igual prevalencia esperable en ambos sexos
- Rangos de prevalencia esperada para cada estrato de edad: (p)
  - 1-2% en 35 - 44 años
  - 2-4% en 45 - 54 "
  - 4-6% en 55 - 64 "
- Error absoluto admitido para la estimación global y para cada estrato  $\pm 2$  (d).
- Nivel de confianza de la estimación (error a, dos colas)=0.05 ( $Z^2$ );
- Tamaño de la población total (denominador estimado con 10 centros): 50.000 personas (N).

Aplicando la fórmula general para el cálculo del tamaño muestral para estimar proporciones en poblaciones finitas y usando muestreo estratificado aleatorio con igual

afijación (no proporcional) en cada estrato. El número mínimo necesario en cada estrato de edad-sexo para estimar la prevalencia de DMNID serían: 346 individuos (n):

Asumiendo un porcentaje global de no respuesta del 30% como máximo, el tamaño crudo (2.076 individuos) se vería incrementado en 621 sujetos más; la muestra final de estudio son 2.697 (tamaño teórico planteado inicialmente).

#### VI.- PERIODO DE ESTUDIO

El estudio piloto se desarrolló en los 9 primeros meses del año 1995. En los 27 meses siguientes se completó el estudio transversal. El tiempo del estudio se completó en 3 años (1995-1997).

#### VII.- VARIABLES DE ESTUDIO

##### - Variables dependientes:

Intolerancia a la glucosa

Diabetes Mellitus Tipo 2

Insulino-resistencia

##### - Variables independientes:

Variables demográficos y de hábitos de vida

Variables demográficas (edad, sexo, estado civil)

Socio-económicas: profesión, situación laboral, años de educación.

Estilo de vida: tabaco, alcohol, ejercicio, nutrición.

Antecedentes, familiares/personales (historia familiar de diabetes, grado de parentesco, enfermedad cardiovascular, peso al nacer, si es mujer: historia de diabetes gestacional).

Historia de cambios en el peso a lo largo de la vida.

Consumo de medicamentos (diuréticos, hormonas esteroideas, ácido nicotínico).

Historia hormonal (edad menarquia, paridad, fecha última regla, menopausia quirúrgica o funcional).

##### - Exploración física, medidas cardiovasculares

- Frecuencia cardíaca

- Presión arterial sistólica y diastólica.

- Electrocardiograma (ECG).

**- Medidas e índices antropométricos**

- Peso (Kg)
- Talla (m)
- Índice de masa corporal (IMC):  $\text{Peso (Kg)}/\text{Talla}^2 \text{ (m)}$
- Circunferencia y cociente cintura/cadera (Ci/Ca).
- Diámetro sagital abdominal (DSA)

**-Determinaciones biológicas (en sangre venosa y tras 12 horas de ayuno):**

- Tolerancia oral a la glucosa (75 gr. de glucosa, basal y 2 horas) según los criterios OMS (*Expert Committee on Diabetes Mellitus, WHO Technical report series report series 646.pp1-80 Geneva 1980*).
- Insulina
- Insulina a las 2 horas
- Proinsulina
- Proinsulina a las 2 horas
- Leptina
- Leptina a las 2 horas
- Perfil Lipídico: Colesterol Total (CT), Triglicéridos (TG), Colesterol-HDL (c- HDL), Colesterol-LDL (c-LDL).
- Ácido úrico (AcUr).

**Variables dependientes:**

**Intolerancia a la glucosa:** El grado de Tolerancia oral a la glucosa se clasificó de acuerdo a los CRITERIOS ADA 1997 (Report of the Expert Committee on the Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care, vol 21, Suppl 1, January, 1998):

Normo-glucémicos (**NG**):

Valores basales de glucosa < 110 mg/dl (6.1mmol/l).

Intolerancia a la glucosa en ayunas (**IGA**):

Valores basales de glucemia  $\geq 110$  mg/dl (6,1 mmol/l) y <126 mg/dl (7,0 mmol/l).

Tolerancia anormal a la glucosa a las 2 horas (**TAG**):

Valores de glucemia  $\geq 140$  mg/dl (7,8 mmol/l) y <200 mg/dl (11,1 mmol/l), a las 2 horas tras una sobrecarga oral de glucosa (TTOG).

**Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM Tipo 2):** Se consideran criterios diagnósticos de diabetes:

1. Síntomas de diabetes (poliuria, polidipsia y pérdida inexplicable de peso) más glucemia  $\geq 200$  mg/dl (11,1 mmol/l), realizada en cualquier momento del día sin tener en cuenta el momento de la última ingesta.
2. Valores basales de glucemia  $\geq 126$  mg/dl (7,0 mmol/l). Se considera basal, la no ingesta calórica en las últimas 8 horas.
3. Valores de glucemia  $\geq 200$  mg/dl (11,1 mmol/l), a las 2 horas tras una sobrecarga oral de glucosa (TTOG).

**Resistencia a la Insulina:** En este estudio consideraremos que los individuos con valores de Insulin basal superiores al cuarto cuartil afectados de Insulino Resistencia/hiperinsulinemia (*Comment on the provisional report from the WHO consultation. Diabetic Medicine 1999, 16: 442 - 443*).

**Síndrome de Resistencia a la Insulina:** definido por la presencia de insulino resistencia o hiperinsulinemia basal (definida por valores superiores al cuarto cuartil) y dos de los componentes del Síndrome de Resistencia a la Insulina, hiperglucemia (glucemia basal  $\geq 110$  mg/dl, 6.1mmol/l, pero no diabéticos), hipertensión (presión arterial sistólica(PAS)  $\geq 140$  mmHg/ presión arterial diastólica (PAD)  $\geq 90$  mmHg), dislipidemia (triglicéridos  $\geq 180$  mg/dl,  $\geq 2.0$  mmol/l y/o colesterol-HDL  $< 40$  mg/dl,  $< 1.0$  mmol/l), obesidad central ( en varones cociente cintura/ cadera  $\geq 0.94$  y en mujeres  $\geq 0.80$ ) (Grupo EGIR: *Comment on the provisional report from the WHO consultation. Diabetic Medicine 1999, 16: 442 - 443*).

**- Variables independientes:**

**Variables demográficos y de hábitos de vida.** Cuestionario estandarizado adaptado del protocolo Multinational Monitoring of Trends and Determinants in Cardiovascular Disease Projet del estudio MONICA Management Centre Cardiovascular Disease Unit World Health Organization (OMS-MONICA) para variables demográficos y de hábitos de vida:



## Demográficas

**Edad.** Se recogió como fecha de nacimiento (día, mes, año).

**Sexo.** Variable cualitativa 1=hombre 2= mujer.

**Estado civil.** Variable cualitativa. 1=soltero, 2=casado ó en pareja, 3=viudo, 4=separado ó divorciado

### - Estilo de vida

#### Tabaco.

- Fumador. Variable cualitativa: 1=si 2=no 3=exfumador.
- Tipo de tabaco. 1=cigarros, 2=puros, 3=pipa, 4=combinaciones.
- Cantidad/día. Variable cuantitativa.
- Edad de inicio de fumar. Variable cuantitativa.
- Cambio en la cantidad fumada en los últimos 6 meses. 1=si, 2=no, fumo menos, 3= no, fumo más.
- Edad de finalización de fumar. Variable cuantitativa

#### Alcohol

- Bebedor. Variable cualitativa: 1= si 2= no 3=ex - alcoholico.
- Frecuencia de la ingesta. 1= a diario, 2=3-4 veces/semana, 3= 1-2 veces por semana, 4 = ocasionalmente.
- Copas tomadas el último fin de semana. 1=>5, 2=3-5, 3=1-2, 4=ninguna.
- Consumo habitual de fin de semana. 1=si, 2=no, bebo menos, 3= no, bebo más.
- Ingesta alcohólica en las últimas 24 horas. 1=si 2=no

#### Ejercicio.

- Actividad física habitual. Variable cualitativa: 1=si, 2=no
- N° de horas sentado/día. Variable cuantitativa.
- N° de horas acostado/día. Variable cuantitativa.
- Valoración personal de la actividad desarrollada. Variable cualitativa: 1=ligera, 2=moderada, 3=intensa.
- Realización habitual de ejercicio físico, al menos 1 vez por semana. Variable cualitativa: 1=si, 2=no.
- N° de horas que practica ejercicio a la semana. Variable cuantitativa.
- Tipo de ejercicio realizado. Variable cualitativa.

**- Antecedentes**

**Antecedentes familiares.** Se recogió en familiares de primer grado (padres y hermanos consanguíneos) de:

- HTA. Variable cualitativa: 1=si 2=no
- Diabetes. Variable cualitativa: 1=si 2=no
- Dislipemias. Variable cualitativa: 1=si 2=no

**Antecedentes personales.**

- HTA. Variable cualitativa: 1=si 2=no.
- Diabetes. Variable cualitativa: 1=si 2=no.
- Dislipemias. Variable cualitativa: 1=si 2=no.
- Peso al nacer. Variable cuantitativa.
- Historia de diabetes gestacional en mujeres. Variable cualitativa: 1=si 2=no.

**Historia de cambios en el peso corporal.**

- Peso a los 25 años. Variable cuantitativa.
- Cambio en la cantidad ingerida en los últimos 6 meses. Variable cualitativa: 1=si 2=no.
- Cambio cualitativo en lo ingerido en los últimos 6 meses. Variable cualitativa: 1=si 2=no.
- Pérdida de peso en el último año. Variable cualitativa: 1=si 2=no.
- Ganancia de peso en el último año. Variable cualitativa: 1=si 2=no.
- Comidas que hace en el día. 1= 3 o menos, 2=4-5, 3=más de 5.

**Consumo de medicamentos en el momento actual**

- Diuréticos. Variable cualitativa: 1=si 2=no
- Hormonas esteroideas. Variable cualitativa: 1=si 2=no
- Ácido nicotínico. Variable cualitativa: 1=si 2=no
- Otros.

**Historia hormonal**

- Edad menarquia. Variable cuantitativa
  - Paridad. Variable cuantitativa
  - Fecha última regla
  - Menopausia. Variable cualitativa: 1=quirúrgica, 2=funcional, 3=no
- Exploración física, medidas cardiovasculares:**

**Frecuencia cardíaca.**

**Presión arterial sistólica y diastólica.**

De acuerdo al Sexto Informe del Comité Nacional Conjunto (JNC-VI) la hipertensión arterial (HTA) se define como una presión sistólica (PAS)  $\geq 140$  mmHg, una presión diastólica (PAD)  $\geq 90$  mmHg.

**Medidas e índices antropométricos:**

- **Peso.**

- **Talla.**

- **Índice de masa corporal (IMC).**

Se calculó directamente de las medidas de peso y talla observadas, a través de un normograma. La fórmula de cálculo es:  $IMC = \text{peso (kg)} / \text{talla}^2 \text{ (m)}$

1:  $\leq 25$  mujer,  $\leq 26$  varón

2- IMC 2:  $> 26-29$  mujer,  $> 27-29$  varón

3- IMC 3 :  $\geq 30$

- **Circunferencia y cociente cintura/cadera (Ci/Ca)**

El cociente Ci/Ca es aceptado como un buen indicador de la obesidad central, se han propuesto como valores delimitadores de riesgo  $> 1$  en los varones y  $> 0.85$  en las mujeres.

-**Diámetro sagital abdominal (DSA).**

**-LABORATORIO****Determinaciones biológicas (en sangre venosa y tras 12 horas de ayuno):**

Las determinaciones realizadas en el **laboratorio** son las siguientes:

- **Tolerancia oral a la glucosa.**

Se realizó de acuerdo a los criterios de la OMS (*Expert Committee on Diabetes Mellitus, WHO Technical report series report series 646.pp1-80 Geneva 1980*). Se hizo una determinación de glucosa basal y después de la ingestión de 75 grs. de glucosa se midió otra vez a las 2 horas. Los resultados se interpretaron de acuerdo con los criterios de la ADA 1997. Las determinaciones de glucosa se realizaron por el método de la glucosa oxidasa. Se compararon estos resultados de la nueva clasificación de los niveles de glucosa de acuerdo al comité de expertos (*Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care 1998; 21: 5-19*) con los Criterios OMS.

**- Insulina**

La determinación de insulina en suero se realizó por el método de doble anticuerpo por radioinmunoensayo (RIA) (Insulina humana-específica RIA, método LINCO, St. Louise; MO). No da reacción cruzada con proinsulina < 0.2%.

Valor de referencia: 5 - 15  $\mu$ U/ml. El Coeficiente de Variación (CV) intra-análisis fue: < 1% y de entre análisis: 0.67%- 7.43 %.

**- Proinsulina**

La determinación se realizó por el método de anticuerpos policlonales por radioinmunoensayo (RIA) (método de LINCO, St. Louise, MO). Valor de referencia:  $7.94 \pm 1.5$  pmol. CV intra-análisis 0.52 – 10.3% y el de entre análisis 0.3 - 11.8%.

**- Leptina.**

Se realizó por radioinmunoensayo (método de LINCO, St. Louise, MO), Valores de referencia: en varones  $3.8 \pm 1.8$ .ng/ml, en mujeres  $7.4 \pm 3.7$  ng/ml . El CV intraanálisis fue de 2 a 6 %, y el de entre análisis 3 a 7%.

**- Sistemático de sangre**

Se realizó en un sistema automatizado (Hitachi 704, Boehringer Mannheim, Alemania) que nos proporcionó un perfil con 8 componentes hematológicos. Midiendo directamente hematíes, leucocitos, plaquetas, concentración de hemoglobina y hematocrito. A partir de los parámetros anteriormente citados se calculó VCM, HCM y CHCM.

**- Perfil básico**

Creatinina, urea, proteínas, albúmina, calcio, ácido úrico, alanina aminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina, glucosa.

**- Perfil lipídico**

**Colesterol total (CT)**

Se realizaron mediante determinación enzimática (colesterol oxidada, peroxidasa) (CHOD-PAP, Boehringer Mannheim). Valor de referencia  $\leq 200$  mg/dl (5.2 mmol/l).

**Triglicéridos (TG)**

Determinación mediante hidrólisis enzimática de los triglicéridos y valoración enzimática del producto (GPO-PAP Boehringer Mannheim). Valor de referencia  $\leq 200$  mg/dl (2.3mmol/l).

**Colesterol-HDL (c-HDL)**

Método: Enzimático colorimétrico. Se determinó en el sobrenadante previa precipitación de las VLDL, LDL y quilomicrones ácido fosfotungstico y determinación enzimática en el sobrenadante del colesterol (HDL, Boehringer Mannheim). Intervalo de referencia de 35 - 120 mg/dl [ $> 35$  mg/dl (0.9 mmol/l)].

La precisión intraanálisis (control de calidad interno) y el sesgo (control de calidad externo, Murex) fueron siempre mejores que el 3% (a excepción del c-HDL cuyo sesgo interlaboratorios fue siempre mejor que el 4%).

**Colesterol-LDL (c-LDL)**

Se estimó mediante la fórmula de Friedewald, excepto cuando los triglicéridos excedían de 400 mg/dl. (Friedewald WT, Levy IR and Frederickson DS Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without the use of the preparative ultracentrifuge. Clin Chem 1972; 18: 499-502).

Aunque no exista ninguna condición que podamos considerar de forma absoluta carente de riesgo de enfermedad cardiovascular, si se puede hablar de situación deseable, consideramos las determinaciones del perfil lipídico de acuerdo al Consenso de la Sociedad Española de Aterosclerosis, Sociedad Española de Medicina Interna, Liga de la Lucha Contra Hipertensión Arterial (Clínica e Investigación en Aterosclerosis, vol 6 nº 2 abril-junio 1994) se consideró anormal las concentración de colesterol total  $> 200$  mg/dl (5.2 mmol/l), c-HDL  $< 35$  mg/dl (0.9 mmol/l), niveles de triglicéridos  $> 200$  mg/dl (2.3 mmol/l) y c-LDL  $> 160$  mg/dl (4.1mmol/l).

Debido a la elevada prevalencia de colesterol  $> 200$  mg/dl observada al aplicar los criterios antes mencionados se analizaron de acuerdo a Summary of Second Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of high Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel II) JAMA , June 16, 1993; vol 269, Nº 23 :

3015-3023. Colesterol > 200 - 239 mg/dl ( 5.2 – 6.2 mmol/l) y valores elevados  $\geq$  240 mg/dl (6.2 mmol/l).

Para poder comparar con los estudios realizados en población española también clasificamos los niveles de CT en niveles  $\leq$  200 mg/dl (5.2mmol/l), >200 – 250 mg/dl (5.2 – 6.5 mmol/l) y > 250 mg/dl ( 6.5 mmol/l).

## **9. ABREVIATURAS**

- 1.  $\beta$ 2 AR, Receptor Beta-2 Adrenérgico**
- 2.  $\beta$ 3 AR, Receptor Beta-3 Adrenérgico**
- 3. ADA (American Diabetes Association), Asociación Americana de Diabetes**
- 4. ADN, Acido Desoxiribonucleico**
- 5. AGL, Acidos Grasos Libres**
- 6. Ci/Ca, Cociente Cintura Cadera**
- 7. DM 2, Diabetes Mellitus Tipo 2**
- 8. DSA, Diámetro Sagital Abdominal**
- 9. EGIR (European Group for the Study of the Insulin Resistance), Grupo Europeo para el Estudio de la Resistencia a la Insulina**
- 10. FABP2, Proteína de Unión a Acidos Grasos**
- 11. GS, Glucógeno Sintasa**
- 12. HOMA-IR, (Homeostasis model assessment of insulin resistance)**
- 13. IGA, Intolerancia a la Glucosa**
- 14. IMC, Índice de Masa Corporal**
- 15. IRSs, Sustratos del Receptor de Insulina**
- 16. PAD, Presión Arterial Diastólica**
- 17. PAS, Presión Arterial Sistólica**
- 18. PC-1, Glicoproteína Plasmática**
- 19. PPAR $\gamma$ , Receptor Activado por los Proliferadores de Peroxisomas**
- 20. RFLP, Polimorfismos de Longitud de los Fragmentos de Restricción**
- 21. RI, Resistencia a la Insulina**
- 22. RIAs, Radioinmunoanálisis**
- 23. SM, Síndrome Metabólico**
- 24. TAG, Tolerancia Anormal a la Glucosa**
- 25. TNF- $\alpha$ , Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$**
- 26. UCPs, Proteínas Desacoplantes de la Termogénesis**
- 27. WHO, (World Health Organization), Organización Mundial de la Salud**