

ESTUDIO MULTIDISCIPLINARIO DE ENFERMEDADES CRÓNICAS RELACIONADAS CON DESARREGLOS EN EL PESO CORPORAL DE ORIGEN MULTIFACTORIAL Y DE RELEVANCIA REGIONAL Y NACIONAL

M. Perelló, C. Sala, S. S. Rodríguez, G. L. Vigo, C. I. Catanesi, J. Lacunza, B. Tosti, M. R. Santos, M. V. Cuello, L. R. Aguilar, G. García Romero, J. Raingo, C. M. Bravi, L. B. Arbeletche, S. E. Gambaro, M. Uriarte Donati, A. Portales, G. Fernández, F. Barrile, M. P. Cornejo, E. R. Mustafá, S. A. Trejo, D. M. Hohl, G. Di Santo Meztler, D. C. Castrogiovanni, A. Alzamendi, A. Cabral, C. I. Mc Carthy, P. Paz, M. Anello, M. A. Rey, G. Bailliet, M. J. Tolosa, M. G. Zubiría, F. Di Rocco, V. Martínez Damonte, M. Muzzio, A. Giovambattista, V. Baliño, S. Noo Bermúdez, P. N. De Francesco, M. S. Daverio, I. Miguel, E. Cálcena, S. Cordisco Gonzáles, D. Lufrano, M. Reynaldo, D. C. Rodríguez Golpe, A. E. Harnichar, R. Llovera, M. B. Silbestro, J. B. Martínez, J. M. Parisi, M. R. Ermácora, A. Fernández, V. Garrido, J. Hernández, M. Dalieri.*

Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE)
secretaria@imbice.gov.ar

RESUMEN

La obesidad es un trastorno multifactorial que incluye predisposición genética y la exposición a un ambiente obesogénico. La obesidad infantil ha aumentado drásticamente en los últimos años, lo que representa un problema para la salud pública. El desconocimiento de factores genéticos predictivos sobre la susceptibilidad individual y la falta de biomarcadores para objetivar el estado nutricional de los pacientes dificultan el abordaje médico de esta problemática. A través del proyecto de Fortalecimiento de Centros CIC, se propone hallar biomarcadores hormonales y genéticos que puedan brindar utilidad clínica en pacientes infanto-juveniles con desórdenes del peso corporal. Aún no hemos estudiado muestras de los pacientes ya que aguardamos la aprobación del Comité Institucional de Revisión de Protocolos de Investigación del Hospital de Niños. Entretanto, hemos usado la técnica de High Resolution Melting para analizar en muestras de la Argentina algunas variantes de marcadores genéticos conocidos que han sido previamente asociados a la obesidad en otras poblaciones. Gracias a este estudio ya contamos con las muestras controles a través de las cuales se podrán identificar los genotipos de los pacientes participantes del proyecto. Por otro lado, actualmente estamos trabajando en el desarrollo de métodos de la valoración hormonal y en la caracterización de nuevos marcadores circulantes.

Palabras clave: obesidad infantil, ghrelina, adipoquinas, polimorfismos genéticos.

* IMBICE: M. Perelló: marioperello@imbice.gov.ar, C. Sala, S. S. Rodríguez, G. L. Vigo, C. I. Catanesi, J. Lacunza, B. Tosti, M. R. Santos, M. V. Cuello, L. R. Aguilar, G. García Romero, J. Raingo, C. M. Bravi, L. B. Arbeletche, S. E. Gambaro, M. Uriarte Donati, A. Portales, G. Fernández, F. Barrile, M. P. Cornejo, E. R. Mustafá, S. A. Trejo, D. M. Hohl, G. Di Santo Meztler, D. C. Castrogiovanni, A. Alzamendi, A. Cabral, C. I. Mc Carthy, P. Paz, M. Anello, M. A. Rey, G. Bailliet, M. J. Tolosa, M. G. Zubiría, F. Di Rocco, V. Martínez Damonte, M. Muzzio, A. Giovambattista, V. Baliño, S. Noo Bermúdez, P. N. De Francesco, M. S. Daverio, I. Miguel, E. Cálcena, S. Cordisco Gonzáles, D. Lufrano, M. Reynaldo, D. C. Rodríguez Golpe, A. E. Arnichar, R. Llovera, M. B. Silbestro, J. B. Martínez, J. M. Parisi, M. R. Ermácora.

En colaboración con el Servicio de Nutrición y Dietoterapia. Unidad de Trastornos Alimentarios. Hospital de Niños "Sor María Ludovica": Dra. A. Fernández: adrianafernandezlp@gmail.com, V. Garrido, J. Hernández, M. Dalieri.

INTRODUCCIÓN

La obesidad infanto-juvenil se ha convertido en una enorme preocupación de los sistemas mundiales de salud en las últimas décadas. Según la Organización Mundial de la Salud, 43 millones de niños preescolares presentaron sobrepeso u obesidad en el año 2010 y se estima que habrá 70 millones de niños preescolares en esa situación en el año 2025. Según la misma fuente, 170 millones de niños menores de 18 años presentaron sobrepeso u obesidad en el año 2016. En la Argentina, la Encuesta Nacional de Nutrición y Salud del año 2007 indicó que la prevalencia de obesidad y de sobrepeso en niños de entre 6 y 60 meses fue de 10 % y 32 %, respectivamente. Se estima que el 85 % de los niños obesos resulta en adultos obesos, lo que representa un claro factor de riesgo de morbilidad y mortalidad en la adultez. Estos indicadores pronostican que, de no corregirse la prevalencia de la obesidad infantil, las generaciones de jóvenes actuales tendrán una expectativa de vida menor que sus antecesoras.

La causa fundamental del sobrepeso y la obesidad infantil es el desequilibrio entre la ingesta y el gasto calórico. En esta ecuación se conjugan diversos factores tanto biológicos, como culturales y económicos, que transforman esta alteración del peso corporal en un problema multifactorial de abordaje complejo que sigue aumentando a ritmo alarmante. En este proyecto, proponemos estudiar tres aspectos diferentes pero relacionados de la obesidad infantil para generar nuevos biomarcadores genéticos y neuroendocrinos útiles para el diagnóstico diferencial y el tratamiento personalizado de los pacientes. En particular:

1- Manejar el régimen dietario de la población infanto-juvenil es particularmente complejo porque la ingesta de nutrientes y calorías debe encontrarse en un nivel adecuado para garantizar el crecimiento y desarrollo del organismo sin favorecer la obesidad. La hormona ghrelina controla no solo el apetito sino también la secreción de la hormona de crecimiento; así, parte de nuestros esfuerzos estarán focalizados en estudiar esta hormona y determinar si su nivel plasmático y el de sus formas derivadas pueden ser de utilidad como biomarcadores en el manejo de pacientes.

2- El tejido adiposo cumple un rol esencial en la homeostasis energética del organismo, no solo por su función como reservorio energético sino por la capacidad de producir un conjunto de moléculas denominadas adipoquinas que intervienen en la regulación del balance energético. Parte de nuestras actividades se destinarán a explorar el uso de algunas adipoquinas como biomarcadores del tipo de tejido adiposo y las alteraciones metabólicas de los pacientes.

3- La carga genética de un individuo es un factor importante en la susceptibilidad a la obesidad; así, ciertas variantes genéticas generan propensión o resistencia a su desarrollo. Las frecuencias de estas variantes genéticas en los niños obesos de nuestro país no son conocidas. Esta información no solo es importante desde el punto de vista poblacional sino también a nivel individual porque ayudaría a concentrar el tratamiento de estos niños en aspectos específicos del trastorno. En los siguientes párrafos se profundiza cada uno de los temas de estudio abarcados en esta propuesta.

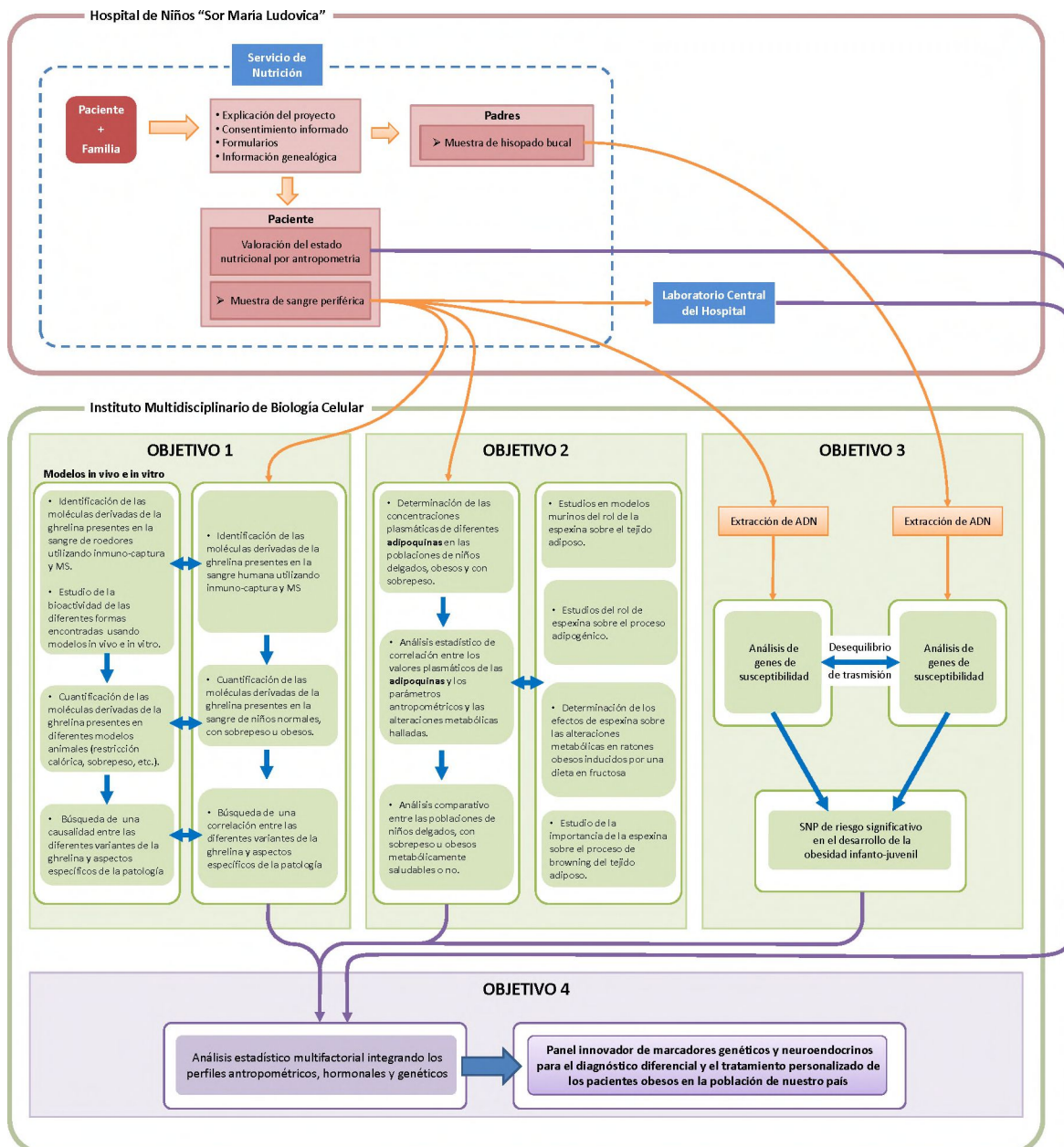
OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Objetivo 1: explorar el uso de las variantes moleculares de la ghrelina plasmática como biomarcadores de utilidad clínica en el manejo de pacientes infanto-juveniles con desórdenes del peso corporal o de la alimentación.

Objetivo 2: estudiar los niveles de varias adipoquinas en niños no-obesos y obesos y determinar si estas medidas permiten subagrupar a la población con obesidad infantil en relación a su respuesta al tratamiento y recaídas posteriores.

Objetivo 3: caracterizar variantes de genes que incrementan la susceptibilidad al desarrollo de alteraciones del peso corporal en niños obesos y las mutaciones que causan obesidad monogénica para utilizar esta información en el desarrollo de paneles genéticos de utilidad clínica en nuestro país.

Objetivo 4: realizar un análisis estadístico multifactorial integrando los perfiles antropométricos, hormonales y genéticos con el fin de identificar un panel innovador de marcadores genéticos y neuroendocrinos para el diagnóstico diferencial y el tratamiento personalizado de los pacientes obesos en la población infanto-juvenil argentina.



METODOLOGÍA

El Servicio de Nutrición del Hospital de Niños de La Plata admite alrededor de 100-150 niños y adolescentes al año con diagnóstico de sobrepeso u obesidad, que llegan en forma espontánea o derivados por otros servicios del mismo hospital u otros hospitales de la provincia de Buenos Aires, ya que es centro de referencia provincial. Se incluyen como criterios de derivación aquellos pacientes que en seis meses no han mejorado con las indicaciones del pediatra, pacientes con obesidad y complicaciones médicas o con sospecha de complicaciones metabólicas, pacientes con índice de masa corporal (IMC) igual o mayor al percentilo 95 y pacientes que registren un aumento del IMC de más de dos puntos en un año. El aumento del IMC es el único parámetro diagnóstico consensuado internacionalmente y el más utilizado para determinar obesidad en niños. En este proyecto se utilizará como herramienta diagnóstica de obesidad las nuevas curvas de IMC de la Organización Mundial de la Salud. Los niños se clasificarán como obesos si se encuentran por encima del percentil 95 o con sobrepeso si están entre el percentil 85 y el 95, según la edad y el sexo. Además, se contará con un grupo de niños controles. El proyecto ya se ha presentado al Comité Institucional de Revisión de Protocolos de Investigación (CIRPI) de la unidad hospitalaria participante para su aprobación. El proyecto será explicado a los potenciales participantes, quienes expresarán su voluntad de participar a través de la firma del consentimiento informado. Dichos consentimientos serán almacenados en el Servicio de Nutrición y las muestras serán codificadas para lograr su anonimidad durante el análisis. Al ingresar al estudio, se obtendrá sangre periférica de los pacientes y saliva de los progenitores. La sangre periférica se centrifugará para obtener glóbulos blancos que se utilizarán para obtener el ADN y el plasma. Parte del plasma se utilizará para realizar los objetivos 1 y 2, y el resto se empleará para dosajes de parámetros metabólicos y endocrinos estándar en el laboratorio central del hospital, como glucemia, perfil lipídico, insulina, hormonas tiroideas, etc. Las muestras de saliva de los padres de los pacientes también se utilizarán para obtener ADN. Además, se recolectará sangre de una población de niños con IMC normal, parámetros menores al percentil 85 para su edad, que se utilizarán como grupo control para los objetivos 1 y 2, ya que no existen valores de referencia en niños para la ghrelina o las adipocinas que se determinarán en este proyecto. Con los datos de laboratorio, se identificará a los individuos con sobrepeso u obesos que ya han desarrollado alguna o varias de las alteraciones asociadas a la obesidad, lo que nos permitirá diferenciar entre los niños obesos metabólicamente saludables y los que no. El Servicio de Nutrición realizará la recolección de datos de antecedentes familiares, como obesidad, diabetes mellitus, hipertensión, etc.; a los pacientes se les efectuará un examen físico y, a su vez, se recolectarán datos, como hábitos alimentarios, enfermedades padecidas, toma de medicamentos, datos de laboratorio, etc. Los pacientes son normalmente atendidos en el Servicio de Nutrición durante años y en este período se hace no solo su seguimiento clínico sino que se toman nuevas muestras de sangre para evaluar distintos parámetros endocrino-metabólicos; dichas muestras serán también utilizadas para su estudio en el IMBICE. Finalmente, es importante mencionar que en el futuro planeamos obtener muestras de ADN de pacientes obesos y sus padres, de otras áreas del país, con el objetivo de realizar estudios en diferentes poblaciones de Argentina. En este sentido, ya están muy avanzadas las negociaciones con la unidad de Genética Médica del centro materno infantil Dr. H. Quintana de San Salvador de Jujuy, quienes aportarían un caudal adicional de muestras al estudio.

Objetivo 1: los detalles técnicos de las metodologías a utilizar se encuentran detallados en artículos publicados. Para caracterizar las moléculas derivadas de la ghrelina presentes en la sangre de pacientes y de ratones, se usará una técnica de inmuno-captura haciendo uso de nanopartículas ferromagnéticas funcionalizadas con anticuerpos específicos contra la porción N-terminal acilada de ghrelina,

y posteriormente las moléculas inmuno-capturadas se analizarán mediante espectrometría de masas MALDI TOF y nLC-MS. Las moléculas detectadas en muestras biológicas serán sintetizadas y testeadas tanto *in vitro* como *in vivo*. *In vitro* se evaluarán sus actividades en células HEK transfectadas con GHSR mediante técnicas de electrofisiología y microscopía confocal. *In vivo*, dichas moléculas serán administradas a ratones para determinar sus efectos comportamentales: por ejemplo, ingesta de alimento; efecto sobre aspectos hedónicos de la ingesta, metabólicos: por ejemplo, control de la glucemia; y endócrinos: por ejemplo, efecto sobre el eje hipotálamo-hipófiso-adrenal. En el caso de que se encuentren efectos significativos, las mismas moléculas serán estudiadas en ratones deficientes de GHSR, para corroborar la participación del receptor en el efecto. En forma paralela a estos estudios, se generarán anticuerpos monoclonales contra diferentes segmentos de la ghrelina, los que serán utilizados para desarrollar métodos ELISA específicos para las moléculas derivadas de ghrelina presentes en circulación. Se desarrollarán diferentes formatos de ELISA y magneto-ELISA y tras analizar la sensibilidad y especificidad de estos, se seleccionará el mejor esquema de cuantificación para las formas más relevantes de ghrelina. Estos métodos de dosaje se utilizarán para estudiar estas formas de la ghrelina en pacientes y en modelos experimentales. En el primer caso, se cuantificarán las concentraciones de las moléculas derivadas de la ghrelina presentes en la sangre de niños normales, con sobrepeso u obesos. Posteriormente, se buscarán correlaciones entre las diferentes variantes de la ghrelina y aspectos específicos de la patología inicial o luego del tratamiento –nivel de ingesta absoluta y discriminada por composición en los días previos al dosaje, ganancia de peso, nivel subjetivo de apetito, talla, glucemia, parámetros hormonales, etc.–. Para el análisis estadístico se utilizará el programa SPSS-IBM SPSS Statistics 22, IBM Corp. En el trabajo con ratones se cuantificarán las moléculas derivadas de la ghrelina presentes en ratones macho de la cepa C57BL/6 que habrán sido previamente expuestos a dieta regular o a dieta rica en grasa para promover obesidad. En estos animales se registrarán: a) curvas de crecimiento, b) bioquímica sanguínea, c) ingesta de comida, actividad, consumo de agua y gasto de energía. Para estudiar el control glucémico se emplearán las pruebas de tolerancia a la glucosa o la insulina. En ambos grupos experimentales se determinará, por un lado, si la concentración absoluta y relativa de las distintas formas de la ghrelina se altera y si existe alguna una correlación de dichas concentraciones con los parámetros registrados –metabólicos, endócrinos, etc.–, y, por otro lado, si la sensibilidad de estos animales a las distintas moléculas derivadas de la ghrelina está alterada. Finalmente, se intentará encontrar alguna indicación de causalidad entre las alteraciones de las diferentes variantes de la ghrelina que se encuentren y aspectos específicos de la patología como por ejemplo: cambio de la sensibilidad a la insulina.

Objetivo 2: Las adipoquinas a determinar en este proyecto son: 1) leptina y adiponectina como marcadores de la hipertrofia y funcionalidad del adipocito; 2) DLK-1 como indicador de la capacidad adipogénica del TA; 3) A-FABP y espexina, por ser las adipoquinas descritas más recientemente y con un potencial clínico y predictivo. Estas adipoquinas se determinarán por ELISAs comerciales –Leptina R&D DY398, Adiponectina R&D DY1065, A-FABP R&D DY3150, DLK-1 R&D DY1144, IL-10 R&D DY217B, espexina Biomatik Corp.EKC35648–. A partir de los resultados, se realizarán diferentes análisis: se determinará la correlación entre las concentraciones de las diferentes adipoquinas con parámetros como el IMC, peso, circunferencia de cintura, glucosa, insulina y otros valores de laboratorio, absoluto y ajustado por sexo y edad. Por otro lado, se agruparán, como se mencionó anteriormente, en diferentes grupos de niños: delgados, con sobrepeso metabólicamente saludables y no saludables, y obesos metabólicamente saludables y no saludables, para analizar si existen diferencias significativas en los niveles plasmáticos de adipoquinas. Por último, se intentará correlacionar durante el seguimiento de los pacientes en tratamiento los cambios de los parámetros antropométricos y de laboratorio con los niveles de las

diferentes adipoquinas propuestas. Para el análisis estadístico se utilizará el programa SPSS, al igual que se describe en el objetivo 1. Dado el reciente descubrimiento de la espexina en el año 2007, es muy escaso el conocimiento de las acciones de este péptido sobre el desarrollo y la función del tejido adiposo. Aquí proponemos complementar el proyecto con estudios en modelos experimentales. Para ello, realizaremos estudios *in vitro* e *in vivo* utilizando ratones machos de la cepa C57BL/6. En los estudios *in vitro* se evaluará, a partir de los precursores adipocitarios, los efectos de espexina sobre la capacidad de diferenciación de los precursores a adipocitos blancos o beige y de los adipocitos maduros de secretar adipoquinas. Dada la experiencia previa en modelos animales de obesidad causada por consumo de fructosa, se usará un modelo de dieta rica en fructosa para evaluar los cambios de expresión de espexina y los potenciales efectos benéficos de su administración exógena. Por último, se evaluará el rol de espexina sobre el proceso de *browning* del tejido adiposo inducido por la exposición crónica al frío (4 °C).

Objetivo 3: se usará ADN de los pacientes y de sus padres para analizar las variantes alélicas de genes candidatos. El método de análisis propuesto es un análisis de tríos –paciente, madre y padre–, que permite evidenciar el desequilibrio de transmisión de alelos de padres a hijos. Este método disminuye el factor de confusión que provoca la estructuración étnica de las poblaciones humanas. Se analizarán variantes genéticas descritas como factores de riesgo para obesidad en poblaciones infanto-juveniles. Se analizarán genes de: 1) la vía de la leptina: LEP, LEPR y las moléculas de señalización JAK2, SOCS3 y STAT3; 2) la vía de la melanocortina: MC4R, los péptidos AGRP y POMC y PCSK1; 3) la vía de la ghrelina: GHRL y GHSR; 4) la vía del péptido similar al glucagón 1 y su receptor GLP1 y GLP1R; 5) la vía del neuropéptido Y y sus receptores NPY1R y NPY5R; 6) la vía de la serotonina: sus receptores HTR2A y GTR2C y la catecol-O-metiltransferasa (COMT) implicada en las vías de señalización de la serotonina, noradrenalina y dopamina; 7) la vía del OPRM1. También, evaluaremos otros genes asociados a cambios del IMC como el TMEM18, GNPDA2 (glucosamina-6-fosfato deaminasa 2), NEGR1, regulador del crecimiento neuronal humano, y los adaptadores proteicos SH2B1, SH2B y el transportador mitocondrial 2 (MTCH2). También estudiaremos los genes relacionados a procesos inflamatorios del tejido adiposo por citoquinas proinflamatorias, interleukina-6 (IL-6, rs1800795, rs2069845) y la proteína C reactiva (CPR, rs1205). Examinaremos las variantes del gen ABCA1 que codifica un transportador de lípidos en exceso desde las células al exterior y que está relacionado con la diferenciación de preadipocitos en adipocitos maduros. Estudiaremos también el gen LIPC, que codifica una lipasa hepática, clave en las vías catabólicas de lipoproteínas, y el gen del receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR γ), que regula la diferenciación de los adipocitos y genes del metabolismo lipídico. Algunas de las variantes genéticas propuestas codifican los factores hormonales que se estudiarán en el proyecto, los resultados genéticos se contrastarán con los datos de las variantes antropométricas y los resultados de los dosajes hormonales para identificar la implicancia biológica de dichas variantes y su capacidad de predicción de un perfil determinado de susceptibilidad a la obesidad o síndrome metabólico. Por último, intentaremos identificar casos de obesidad monogénica y de evaluar su prevalencia en la población. Se estudiarán mutaciones en los genes MC4R, LEP, LEPR, POMC y PCSK1. Para ello se secuenciará la región codificante completa de estos genes por el método de Sanger en las muestras de los pacientes. Para los genes de mayor tamaño, como LEPR y PCSK1, la presencia de mutaciones se buscará por la técnica de HRM y luego se confirmarán las variantes halladas por secuenciación del fragmento de interés. Las mutaciones identificadas se tipificarán en los padres mediante HRM utilizando las muestras de pacientes, cuyo genotipo fue determinado por secuenciación, como control. Este estudio se realizará evaluando la historia clínica y las medidas bioquímicas para complementar el diagnóstico. La patogenicidad de nuevas variantes que no hayan sido descritas previamente en la literatura se

determinará utilizando la herramienta web GeneVetter, que permite comparar los casos analizados contra la base de datos de 1000 Genomas –2500 secuencias– y cuantificar la incerteza en el diagnóstico de las variantes causales, teniendo en cuenta además la frecuencia de las mutaciones en poblaciones de distinta ancestría. Los análisis de diversidad genética y el *test* de desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg de las frecuencias genotípicas se llevarán a cabo mediante el programa Arlequin versión 3.11. Los tríos compuestos por casos y padres serán analizados en el contexto de un estudio de caso-control pareado por origen étnico. Con estos, se llevarán a cabo los siguientes análisis: a) Análisis no pareado de genotipos de los casos y de los padres. b) Análisis pareado de genotipos de los casos y paternos. c) *Test* de desequilibrio de transmisión y el método de Weinberg para el estudio de asociación genética con genes candidatos. d) *Test* de desequilibrio de transmisión con la que se evalúa la transmisión de alelos desde los padres heterocigotos hacia los hijos. Los análisis de asociación se realizarán utilizando el programa informático: LEM 1.0 y métodos iterativos.

Objetivo 4: finalmente, planeamos realizar un análisis estadístico multifactorial retrospectivo integrando diferentes parámetros medidos en los pacientes, como datos antropométricos, dosajes metabólicos y hormonales, carga genética, evolución de peso corporal y respuesta al tratamiento. Este análisis será intrínsecamente complejo porque la muestra no solo es heterogénea desde su origen (pacientes que ingresen al estudio a diferente edad y que se irán sumando a lo largo del tiempo que dura el proyecto), sino que también factores ulteriores, como el tratamiento al que se someta a cada paciente, su respuesta a este, etc., pueden variar dramáticamente en los diferentes casos. Además, el número de muestras de sangre y el tiempo que cada paciente pueda ser monitoreado pueden variar notablemente. Ante este panorama, nuestro objetivo primario es generar una base de datos que compile la información recabada de un número elevado de casos, aspiramos a tener al menos 500 pacientes en los primeros cinco años. Esta base de datos se abocará a generar un Plan de Gestión de Datos, en el marco del cumplimiento de la ley 26899, reglamentada por resolución del MINCYT 753-E/2016, y estará estructurada de manera de facilitar el análisis comparativo de diversos parámetros entre colecciones de cohortes de pacientes agrupados con criterios específicos. Algunos ejemplos plausibles de estas agrupaciones son: varones que bajaron de peso en respuesta al tratamiento dietario frente a varones que no bajaron de peso en repuesta al tratamiento, mujeres con hiperglucemia frente a mujeres con normoglucemia, o grupos de pacientes que poseen diferentes variantes genéticas del MC4R. En estos grupos se buscarán correlaciones ya sea por regresión múltiple o regresión logística dependiendo de las variables analizadas, continuas o no continuas. Otros análisis para realizar incluyen utilizar modelos lineales generalizados que se utilizarán para estimar el efecto de la presencia o ausencia de ciertas variantes genéticas sobre diferentes parámetros monitoreados. *A priori*, es difícil predecir bajo qué criterios serán agrupados los pacientes o qué abordaje estadístico será más apropiado. Para abordar este objetivo, el proyecto cuenta con el invaluable asesoramiento del Dr. López Camelo y de su grupo de trabajo del Departamento de Epidemiología Genética del CEMIC, quienes cuentan con una amplia y reconocida trayectoria en este campo.

RESULTADOS PRELIMINARES

Respecto al objetivo 1, resultados publicados por otros grupos de investigación y nuestros resultados preliminares sugieren que la ghrelina existe en diferentes formas moleculares. La ghrelina puede sufrir la hidrólisis del grupo octanoilo o la proteólisis (figura 1. A), y en plasma se detectan la versión DAG y versiones aún no identificadas, diferentes a la ghrelina, reconocidas por anticuerpos contra el extremo

N-terminal (figuras 1. B y C). En el IMBICE hemos puesto a punto un efectivo protocolo de inmunocaptura para ghrelina nativa en soluciones que contienen otros péptidos (figura 1. D). Dado que la ghrelina1-11 es una de las candidatas a producirse por proteólisis, comenzamos a estudiar su bioactividad. Encontramos que la ghrelina1-11 se une a GHSR, en forma indistinguible a la unión detectada para la ghrelina intacta (figura 1. E); sin embargo, es menos potente que la ghrelina para inhibir los canales de calcio en un sistema de expresión heterólogo (figura 1. F) y, a diferencia de ghrelina, es inefectiva para estimular el apetito en animales saciados (figura 1. G).

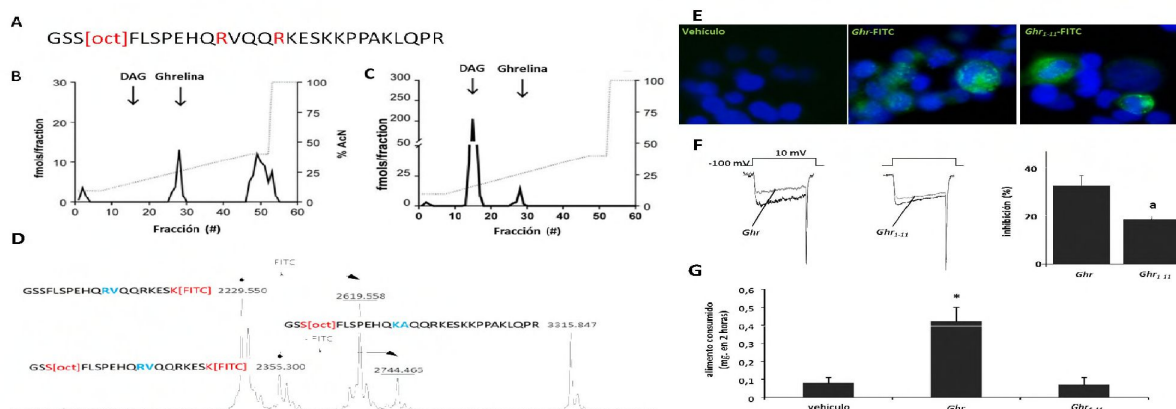


Figura 1. A : Secuencia de ghrelina: en rojo se indican el grupo octanilo y las argininas, las cuales son susceptibles al clivaje. B y C: Perfiles de FPLC de inmunoreactividad contra ghrelina en plasma humano detectados con ensayos contra la porción N- o C-terminal de la ghrelina (Patterson *et al.* 2005). D: Puesta a punto de la inmunocaptura usando un anticuerpo comercial contra la ghrelina. El panel muestra los espectros de MALDI-TOF MS para la mezcla de moléculas a la ghrelina presentes en la premezcla, en estas condiciones la ghrelina fue eficazmente inmunocapturada entre el resto de otras variantes moleculares unidas a FITC. E: Fotografías de células HEK 293T transfectadas con plásmidos que expresan GHSR y luego incubadas en medio de cultivo solo (izquierda), o conteniendo ghrelina fluorescente o ghrelina1-11 fluorescente. F: Corrientes de calcio en células HEK 293T transfectadas con plásmidos que expresan canales de calcio y GHSR y luego expuestas a gradientes de potencial en presencia o en ausencia de ghrelina o ghrelina1-11. G: Ingesta de alimento en respuesta a vehículo, ghrelina o ghrelina1-11 (0,2 µg/g de peso corporal, intraperitoneal). a: $p < 0,05$ vs. inhibición inducida por ghrelina. *: $p < 0,01$ vs. ingesta de alimento en respuesta al vehículo

Respecto al objetivo 3, se desarrollaron los métodos de caracterización de las siguientes variantes que dan susceptibilidad genética al sobrepeso u obesidad en poblaciones infanto-juveniles: GHRL (rs35683), SOCS3 (rs4969170), FTO (rs9939609a), TMEM18 (rs6548238), MC4R (rs17782313), GNPDA2 (rs10938397). Mediante la búsqueda de estos marcadores en las secuencias genómicas obtenidas en 762 cromosomas (381 individuos) de muestras de Argentina, obtuvimos una frecuencia de 0.1063 de la variable C –alelo mutado– del gen TMEM18, mientras que no se encontraron genotipos homocigotas para esta variante. A través del método de RT HRM se han analizado 4 polimorfismos en 25 individuos provenientes del Banco de ADN del Laboratorio de Genética Molecular Poblacional. En los restantes marcadores se evidenciaron genotipos homocigotas para el alelo mutado. En FTO, el alelo mutado estuvo en una frecuencia mayoritaria (72 %). Para GNPDA2, GHRL y SOC3, el alelo mutado fue minoritario: 31 %, 36 % y 48 %, respectivamente. Los genotipos homocigotas para el alelo salvaje fueron mayoritarios para GNPDA2, GHRL y SOC3, y minoritario para FTO. En este último, el genotipo mayoritario (60 %) fue el homocigota portador del alelo mutado. Las muestras estuvieron en equilibrio de H-W para los loci SOCS-3, FTO, GNPDA-2, mientras que GHRL presenta un desvío respecto a dicho equilibrio. En conclusión, la técnica de HRM es un método rápido y eficiente para distinguir variantes en genes asociados a la obesidad.

CONCLUSIONES

En esta primera etapa del desarrollo del proyecto, hemos realizado algunas determinaciones y estudios tanto en roedores como en muestras humanas procedentes de personas sin obesidad (muestras controles).

Estos nos han permitido concluir que:

- Como primer paso en el desarrollo de sistemas de cuantificación, hemos demostrado que la ghrelina pudo ser inmunocapturada a partir de sistemas complejos.
- Por otro lado, hemos comenzado a caracterizar la ghrelina1-11, una de las candidatas a producirse luego del clivaje de la hormona intacta. Encontramos que la ghrelina1-11 se une a su receptor en forma indistinguible a la unión detectada para la ghrelina intacta. Sin embargo, la ghrelina1-11 es menos potente que la ghrelina para inhibir los canales de calcio en un sistema de expresión heterólogo y, a diferencia de ghrelina, es inefectiva para estimular el apetito en roedores saciados.
- Se obtuvieron tres perfiles de *melting* diferentes para cada uno de los cuatro marcadores analizados con muestras de Argentina.
- Los marcadores hallados que se corresponden con dos genotipos homocigotas y un heterocigota serán utilizados como muestras controles para identificar los genotipos en pacientes del Hospital de Niños.
- Los métodos de la valoración hormonal están en desarrollo.

PATTERSON, M.; MURPHY, K. G.; LE ROUX, C. W.; GHATEI, M. A. y BLOOM, S. R. (2005). "Characterization of Ghrelin-Like Immunoreactivity in Human Plasma". *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 90, n.º 4, pp. 2205-2211.