

ORIGINAL

## Estudio genético de la implicación del gen *USF1* en el desarrollo del síndrome metabólico

Mark Strunk<sup>a</sup>, Estíbaliz Jarauta Simón<sup>b</sup>, Ana María Bea Sanz<sup>c</sup>,  
José Puzo Foncillas<sup>d</sup>, Fernando Civeira Murillo<sup>b,c</sup> y Ángel-Luis García-Otín<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Investigación Sanitaria Aragón, Unidad de Apoyo Transversal a la Investigación de Genómica, Zaragoza, España

<sup>b</sup> Instituto de Investigación Sanitaria Aragón, Unidad de Lípidos, Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza, España

<sup>c</sup> Instituto de Investigación Sanitaria Aragón, Laboratorio de Investigación Molecular, Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza, España

<sup>d</sup> Servicio de Bioquímica, Hospital General San Jorge, Huesca, España

Recibido el 30 de diciembre de 2010; aceptado el 20 de enero de 2011

Disponible en Internet el 13 de abril de 2011

### PALABRAS CLAVE

Síndrome metabólico;  
Hiperlipidemia  
familiar combinada;  
*USF1*;  
SNP (*single  
nucleotide  
polymorphism*);  
Estudio caso-control

### Resumen

**Introducción:** El síndrome metabólico (SM) y la hiperlipidemia familiar combinada (HLFC) comparten una parte importante de sus rasgos clínicos, y se ha postulado para ambos una etiología parcialmente coincidente. Se considera que su expresión está afectada por múltiples *loci* genéticos, existiendo adicionalmente interacción gen-ambiente. En este trabajo se explora la posible implicación en el desarrollo de SM de *USF1*, un gen previamente asociado con HLFC.

**Métodos:** Se desarrolló un estudio caso-control en el que se analizó la variabilidad genética en *USF1* mediante genotipado por pirosecuenciación de los SNP rs2516837, rs2516838, rs6686076, rs2516839, rs2073653, rs2774276, rs2073656, rs2073658 y rs3737787. Se estudiaron 192 sujetos con SM según los criterios ATPIII y 197 sujetos control. Se analizaron las frecuencias alélicas y genotípicas y se estimaron los haplotipos compuestos por los citados polimorfismos. Se analizó estadísticamente la asociación de SNP aislados y haplotipos estimados con el desarrollo de SM.

**Resultados:** Las frecuencias de los 9 SNP estudiados mostraron que se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg tanto en casos como en controles. Se apreció un importante grado de desequilibrio de unión entre ellos, pero las diferencias en su distribución entre casos y controles no alcanzaron significación estadística. La estimación de haplotipos de los SNP analizados en los grupos estudiados detectó 6 haplotipos principales, pero ninguno de ellos mostró una asociación estadísticamente significativa con la condición de SM.

**Conclusiones:** En la muestra de pacientes estudiados no se ha observado una asociación de la variabilidad genética en el *locus USF1* con el desarrollo de SM definido según los criterios ATPIII.  
© 2010 Elsevier España, S.L. y SEA. Todos los derechos reservados.

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [algarcia.iacs@aragon.es](mailto:algarcia.iacs@aragon.es) (Á.-L. García-Otín).

**KEYWORDS**

Metabolic syndrome;  
Familial combined  
hyperlipidemia;  
*USF1*;  
Single nucleotide  
polymorphism (SNP);  
Case-control study

**Genetic study of the involvement of the *USF1* gene in the development of metabolic syndrome****Abstract**

**Introduction:** Metabolic syndrome (MS) and familial combined hyperlipidemia (FCHL) share many clinical features and a partially overlapping etiology for these two entities has been postulated. The expression of these disorders may be affected by multiple genetic *loci* in addition to gene-environment interaction. This study explored the possible involvement of the *USF1* gene, which has previously been associated with FCHL, in the development of MS.

**Methods:** A case-control study was performed to analyze genetic variation in *USF1* defined by SNPs rs2516837, rs2516838, rs6686076, rs2516839, rs2073653, rs2774276, rs2073656, rs2073658, and rs3737787. SNP genotypes were determined by pyrosequencing in 192 subjects with MS according to the Adult Treatment Panel (ATP)-III criteria and 197 control subjects. Allelic and genotypic frequencies were analyzed for each SNP isolated, and haplotypes were estimated for the combined polymorphisms. A statistical analysis was performed of the association of the SNPs and haplotypes with the development of MS.

**Results:** The frequencies of the nine SNPs studied showed that they were in Hardy-Weinberg equilibrium in both cases and controls. There was a considerable degree of linkage disequilibrium between the SNPs but the differences in their distribution between cases and controls did not reach statistical significance. Estimation of the haplotypes of the SNPs analyzed in the study groups identified six main haplotypes, but none showed a statistically significant association with SM.

**Conclusions:** In the sample of patients studied, no association was observed between genetic variation in the *USF1* locus and the development of MS defined by ATP-III criteria.

© 2010 Elsevier España, S.L. and SEA. All rights reserved.

**Introducción**

El síndrome metabólico (SM) es un trastorno caracterizado clínicamente por la coexistencia de diferentes factores de riesgo cardiovascular como son la obesidad, la hipertensión, la resistencia a la insulina y la dislipidemia, caracterizada por triglicéridos elevados y colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (c-HDL) disminuido. Estos componentes favorecen el desarrollo de un estado proinflamatorio y protrombótico, y la resultante de todo ello es un riesgo cardiovascular aumentado entre 2 y 3 veces para los sujetos que lo padecen<sup>1,2</sup>.

El SM es una alteración muy frecuente, con una prevalencia de alrededor del 25% en adultos a partir de 50 años y un incremento asociado a la edad y dependiente del género<sup>3-5</sup>. El tratamiento de pacientes con SM define un escenario clínico complejo que puede repercutir de forma negativa en su cuidado y hace de su manejo una de las enfermedades más costosas para el sistema sanitario.

El SM comparte ciertas características clínicas con la hiperlipidemia familiar combinada (HLFC), la más común de las dislipidemias hereditarias, con una prevalencia del 1-2% en la población y presente en hasta el 20% de pacientes con enfermedad coronaria prematura<sup>6</sup>. El rasgo principal de la HLFC es la presencia de un fenotipo lipídico caracterizado por su gran variabilidad entre situaciones de dislipidemia mixta e hipertrigliceridemia o hipercolesterolemia moderadas de manera aislada dentro de una misma familia. Son características fenotípicas de la HLFC una concentración elevada de apoB y un patrón lipoproteico con partículas LDL pequeñas y densas altamente aterogénicas. Además, otros

rasgos, como la resistencia a la insulina, la obesidad y la hipertensión, se presentan con gran frecuencia asociados en pacientes que la padecen.

Una posibilidad ampliamente aceptada para la explicación fisiopatológica de la HLFC es que se deriva de una resistencia periférica a la insulina, que puede resultar exacerbada por una situación de obesidad y que podría justificar el fenotipo lipídico mediado por un metabolismo anormal de ácidos grasos, cuya concentración en plasma está elevada, y que sería causante de una hiperproducción de VLDL, resolviéndose en distintos fenotipos lipídicos según la eficiencia lipolítica del individuo<sup>7</sup>.

Por tanto, el SM y la HLFC son dos entidades clínicas cuyas definiciones se solapan en ciertos aspectos y constituyen fenotipos complejos a los que contribuyen factores genéticos y ambientales. Además, la coincidencia parcial de rasgos entre uno y otro sugiere una etiología que puede compartir factores genéticos básicos, cuyo desarrollo hacia un fenotipo u otro puede estar determinado por factores ambientales u otros factores genéticos modificadores.

En 2004, Pajukanta et al<sup>8</sup> identificaron el gen *USF1* (*upstream stimulatory factor 1*) como un gen asociado a la HLFC en una población finlandesa relativamente aislada. Este gen está situado en la región q21 del cromosoma 1, que había sido previamente señalada en distintos análisis genómicos independientes como portadora de un determinante genético de HLFC<sup>9,10</sup>. Asimismo, un estudio realizado sobre sujetos sanos del estudio EARSII mostró la influencia de este gen en parámetros relacionados con el metabolismo de la glucosa y los lípidos<sup>11</sup> y, más recientemente, se ha mostrado su influencia directa en los

lípidos plasmáticos y en rasgos metabólicos en un modelo murino<sup>12</sup>.

Pajukanta et al<sup>8</sup> estudiaron la asociación de 9 posiciones nucleotídicas simples polimórficas (SNP: *single nucleotide polymorphisms*) situadas en posiciones intrónicas y en regiones no codificantes del gen *USF1* y pusieron de manifiesto la existencia de un haplotipo protector y otro de predisposición formados por sólo 2 SNP (rs3737787, rs2073658) para el desarrollo de rasgos de la dislipidemia. El perfil de expresión génica en tejido adiposo es diferente para portadores de cada haplotipo, lo cual sugeriría un defecto a nivel básico que podría ser subyacente a las manifestaciones observadas en la HLFC.

El gen *USF1* codifica para un factor de transcripción expresado ubicuamente, y que se encuentra implicado en la respuesta del organismo a la glucosa y a la ingesta de hidratos de carbono, y entre los genes que es capaz de activar se incluyen los de varias apolipoproteínas (apoCIII, apoAII, apoE), lipasa hormona-sensible, ácido graso sintasa, glucoquinasa, receptor del glucagón, ABCA1 y renina<sup>8,13-18</sup>. Esto lo sitúa en una posición clave dentro de la red de control transcripcional que regula los procesos que se encuentran perturbados en situaciones de resistencia a la insulina, dislipidemia o hipertensión.

En el presente trabajo se plantea la hipótesis de que la variabilidad genética de *USF1* interviene en el desarrollo del SM. Dada la función reconocida de *USF1* en el control del metabolismo de los hidratos de carbono y la síntesis de ácidos grasos, así como la relación existente a nivel fenotípico entre la HLFC y el SM, resulta plausible la implicación de variantes alélicas comunes en el *locus USF1* en la etiología del SM. Para verificar esta hipótesis hemos realizado un estudio caso-control en el que se comparan polimorfismos tipo SNP del gen *USF1* en un grupo de pacientes con SM y otro de sujetos sanos.

## Materiales y métodos

### Sujetos de estudio

El presente estudio fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación Clínica de Aragón (CEICA) y todos los sujetos estudiados dieron su consentimiento informado previamente a su participación. Se obtuvo la colaboración de 192 casos con edades entre 20 y 80 años utilizando los criterios de definición de SM propuestos por el NCEP ATPIII<sup>2</sup>, siendo criterios de exclusión el tratamiento con fármacos hipolipemiantes, el consumo de alcohol superior a 30 g diarios y la coexistencia de enfermedades crónicas de tipo renal, hepático o cáncer. Igualmente se obtuvo la participación de 197 controles con edades entre 20 y 80 años, no sometidos a ningún tratamiento farmacológico y que no presentaran más de un criterio de la definición de SM previamente citada. Para todos los participantes se realizaron determinaciones antropométricas y físicas en el momento de la exploración médica y se obtuvieron muestras de sangre en ayunas que permitieron la realización de medidas bioquímicas por métodos estandarizados, así como la obtención de ADN en un sistema de extracción automática de ADN genómico AutoGenFlex 3000 (Autogen) y reactivos FlexiGene DNA AGF3000 (QIAGEN).

### Genotipado

Se seleccionaron 9 SNP distribuidos a lo largo de la extensión del gen *USF1* para determinar su variabilidad genética en los grupos de estudio. Los criterios utilizados para su inclusión fueron su existencia en la base de datos dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) con frecuencias alélicas descritas en poblaciones europeas superiores a 0,1 y que no fueran iguales entre sí para incrementar la probabilidad de que se comportasen como tag SNP. Entre los 9 SNP elegidos para su genotipado en la muestra estudiada se forzó la inclusión de los SNP rs3737787 y rs2073658, para los que Pajukanta et al<sup>8</sup> describieron su asociación con HLFC e hipertrigliceridemia. Además de estos dos SNP se analizaron los siguientes: rs2073656, rs2774276, rs2073653, rs2516839, rs6686076, rs2516838 y 2516837. La figura 1 muestra la distribución de los SNP analizados a lo largo del gen *USF1*.

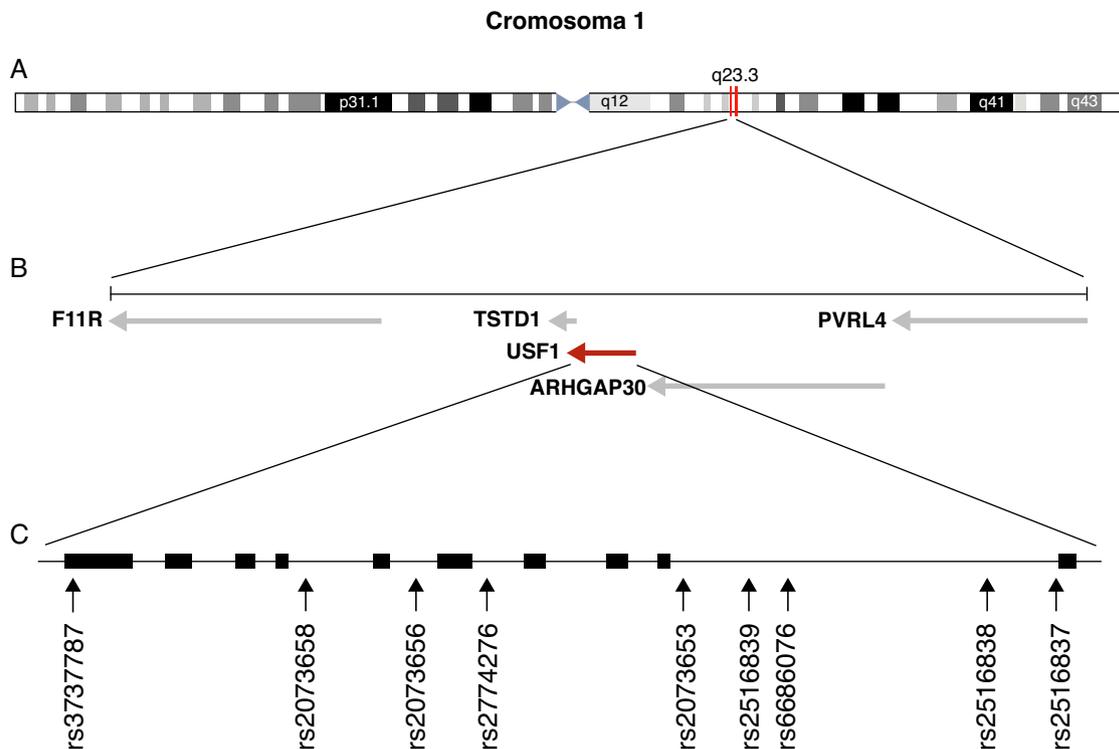
El genotipado para cada SNP en las muestras de ADN genómico de cada participante en el estudio se realizó mediante la técnica de pirosecuenciación<sup>19</sup> utilizando un equipo PSQ 96MA (Biotage). Para ello se amplificaron mediante PCR pequeñas secuencias en torno a las posiciones polimórficas utilizando oligonucleótidos específicos, uno de ellos biotinilado en posición 5' para lograr la inmovilización de la hebra simple de ADN que fue analizada subsiguientemente mediante una sonda adyacente a la posición polimórfica que actúa como cebador en la reacción de pirosecuenciación. Las secuencias de oligonucleótidos utilizadas para el análisis de cada SNP se muestran en la tabla 1. Todas ellas fueron obtenidas del servidor SOP3<sup>20</sup>, excepto las correspondientes a los polimorfismos rs2073658, rs6686076, rs2516838 y rs2516837, que no dieron resultados satisfactorios en el proceso de optimización y fueron sustituidas por nuevos oligonucleótidos diseñados con la ayuda del programa PyroMark Assay Design Software 2.0 (Biotage).

El volumen muestral diseñado para el presente estudio caso-control permitiría una potencia estadística mayor del 70% para un nivel de significación estadística fijado en el 95% en el caso de que las diferencias alélicas estuvieran en un rango similar al descrito por Pajukanta et al<sup>8</sup> según estimación realizada utilizando el programa PAWE<sup>21</sup>.

### Análisis estadísticos

Datos de variables continuas son presentados como media  $\pm$  desviación estándar o medianas (rango intercuar-til) para aquellos casos en los que no se ajustaban a una distribución normal según el test de Kolmogorov-Smirnoff ( $p < 0,05$ ). Datos de variables categóricas se muestran como número (porcentaje). Diferencias entre variables continuas fueron evaluadas utilizando las pruebas t-test desapareado o de Mann-Whitney, según fuera apropiado, y diferencias en variables categóricas se analizaron mediante la prueba de  $\chi^2$ . Se utilizó el programa SPSS 15.0 (SPSS).

Se analizó si los genotipos aislados para cada SNP estudiado estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg mediante una prueba  $\chi^2$  con un grado de libertad y nivel de significación  $p < 0,05$ , y se utilizó el programa Haploview 4.1<sup>22</sup> para estudiar el desequilibrio de unión existente entre los SNP estudiados, tanto utilizando el parámetro D' (desequilibrio



**Figura 1** Localización de los polimorfismos estudiados en el gen *USF1*. A) Situación del locus *USF1* en el cromosoma 1. B) Entorno genómico del gen *USF1* en la región 1q23.1. C) Posición relativa de los SNP en el gen *USF1*.

de unión normalizado) como el coeficiente de correlación entre SNP ( $R^2$ ) y para determinar si los SNP estudiados se comportan como tag SNP y determinar posibles bloques haplotípicos.

Se analizó la posible asociación de cada SNP con el desarrollo de SM a nivel de frecuencias alélicas y genotípicas mediante pruebas de  $\chi^2$  con grados de libertad 1 y 2 respectivamente y un nivel de significación  $p < 0,0056$  considerando la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples.

Se utilizó el programa PHASE 2.1<sup>23,24</sup> para estimar los haplotipos compuestos por los SNP estudiados y realizar un análisis de asociación caso-control para los haplotipos inferidos.

## Resultados

Para el desarrollo del estudio caso-control se consiguió la participación de 192 casos y 197 controles. En la **tabla 2** se muestran las características antropométricas y clínicas de los sujetos de estudio. Existe un desequilibrio estadísticamente significativo en la distribución por género dentro de cada grupo, habiendo una mayor proporción de hombres respecto a mujeres en el grupo de casos, y viceversa en el grupo de controles. Existen diferencias significativas en el promedio de edad para cada grupo, siendo mayor para el grupo de casos. En el resto de variables analizadas se observan diferencias estadísticamente significativas derivadas de los criterios de definición utilizados para incluir a los participantes en cada grupo.

En el grupo de casos el criterio de definición de SM más prevalente fue la hipertensión arterial (88%), seguido de la

condición dislipidémica (79% igual para hipertrigliceridemia y bajo c-HDL) y perímetro de cintura (69%), siendo la hiperglucemia en ayunas el rasgo menos prevalente (41%). En el grupo de controles sólo dos rasgos asociados al SM alcanzan una prevalencia superior al 10%: la hipertensión arterial (27%) y la baja concentración de c-HDL (12%).

Se diseñaron ensayos de genotipado basados en la técnica de pirosecuenciación para cada uno de los SNP seleccionados. En la **tabla 1** se muestran los oligonucleótidos cebadores que permiten la amplificación por PCR de fragmentos de ADN que contienen cada posición polimórfica y las secuencias de los oligonucleótidos sonda que permiten la determinación de cada polimorfismo mediante la obtención de patrones inequívocos de pirosecuenciación. Esta técnica permitió analizar un polimorfismo en 96 muestras al día una vez optimizadas las condiciones del ensayo.

Se calcularon las frecuencias genotípicas y, a partir de ellas, las frecuencias alélicas. Ambas se describen en la **tabla 3** para cada polimorfismo considerado aisladamente. Las frecuencias genotípicas de todos los polimorfismos se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg. Las frecuencias obtenidas para la muestra de población estudiada muestran rangos similares a las descritas en bases de datos públicas (dbSNP en NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/index.html>) para poblaciones de origen europeo, aunque no se corresponden exactamente con ellas tal como cabe esperar de las diferencias existentes entre la población española y las muestras de referencia europeas extraídas de población centroeuropea.

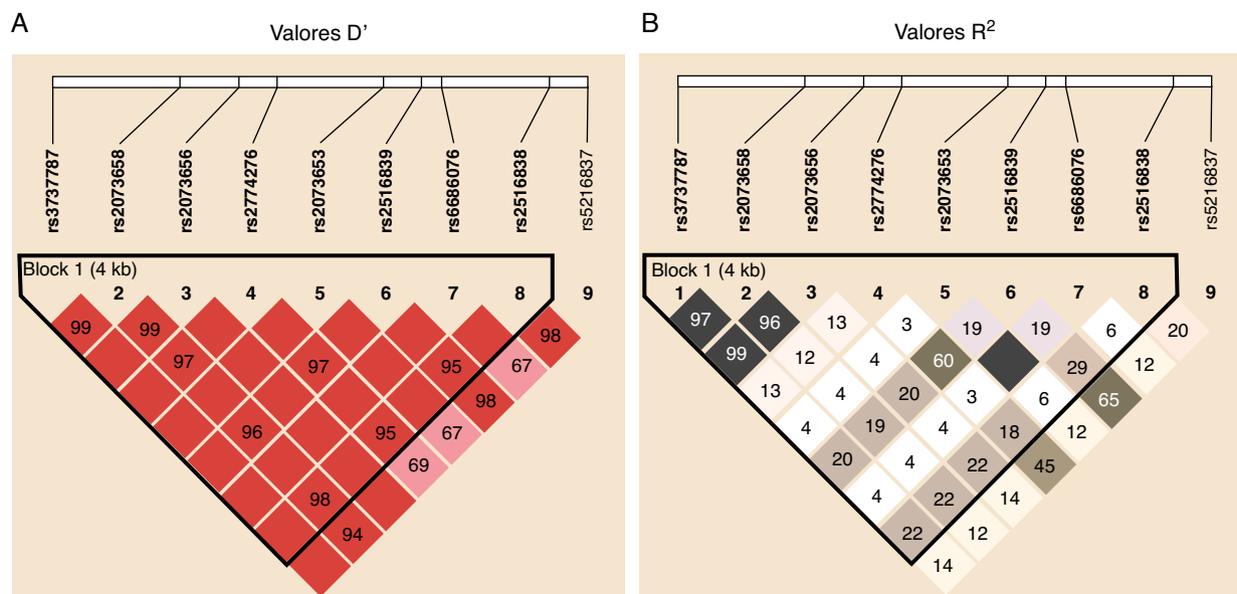
El análisis de los datos de genotipado con el programa Haploview proporcionó información en dos aspectos

**Tabla 1** Secuencias de los oligonucleótidos utilizados en el genotipado

SNP	Cambio	Posición <sup>a</sup>	Secuencia	
rs3737787	A/G	159.276.147	<i>Directo</i>	5'-CAAACCTCTGCTGGGCACTC-3'
			<i>Reverso</i>	5'-Biotina-TGAGGCCTGTGATATGGCG-3'
			<i>Sonda</i>	5'-GCTGTCAGTGCA-3'
rs2073658	C/T	159.277.386	<i>Directo</i>	5'-CGTTTCTCATCCCCAGTCGTC-3'
			<i>Reverso</i>	5'-Biotina-TCGGCCTCCCAAAGTGCTG-3'
			<i>Sonda</i>	5'-GATTTAGCAGGTATTAGGAC-3'
rs2073656	C/G	159.277.979	<i>Directo</i>	5'-CTAGAATAGGCTGTGGGACATGACT-3'
			<i>Reverso</i>	5'-Biotina-TGACATCATCACAAAGAATTGACCTGTG-3'
			<i>Sonda</i>	5'-GAGCCTTCACTCA-3'
rs2774276	C/G	159.278.340	<i>Directo</i>	5'-AGCTGTCCCCCTCCGTGTCAA-3'
			<i>Reverso</i>	5'-Biotina-CAAAGCACTAGGCTCTCCTTTTCTG-3'
			<i>Sonda</i>	5'-TGCAGCTTCTATC-3'
rs2073653	C/T	159.279.384	<i>Directo</i>	5'-CTGCCTGTTTGTGGTGAAGGACA-3'
			<i>Reverso</i>	5'-Biotina-GGAAGTAGTGTCTATCTATCTCGTGG-3'
			<i>Sonda</i>	5'-TGGCTGCAAACCTC-3'
rs2516839	C/T	159.279.745	<i>Directo</i>	5'-GTCATTTTGCATTCTTCCAGGCCAC-3'
			<i>Reverso</i>	5'-Biotina-CAGAGATACTGTTCTGTTTCCTAAACTC-3'
			<i>Sonda</i>	5'-TTGGAGGTCTTTGT-3'
rs6686076	C/T	159.279.936	<i>Directo</i>	5'-CTGATGTTGAGGACTGGCCTAC-3'
			<i>Reverso</i>	5'-Biotina-CCACCAGGAGTTGGAGTGATAA-3'
			<i>Sonda</i>	5'-TTGAGGACTGGCCTAC-3'
rs2516838	C/G	159.280.994	<i>Directo</i>	5'-ATCCCTGACCACAAAGACTAGACT-3'
			<i>Reverso</i>	5'-Biotina-GGTCTAAGGCAGAGCTTGTAG-3'
			<i>Sonda</i>	5'-AAAGCCAAGTGGAT-3'
rs2516837	A/G	159.281.351	<i>Directo</i>	5'-ACTAGTGCTACTTCCCCTTATCGA-3'
			<i>Reverso</i>	5'-Biotina-GGTCTCAACCTTTTCTATC-3'
			<i>Sonda</i>	5'-TCCGAGGCTTATCCA-3'

<sup>a</sup> Posición en el cromosoma 1 según Genome Build 36.3.

### Desequilibrio de unión



**Figura 2** Representación gráfica del desequilibrio de unión entre los SNP estudiados. Se muestran los diagramas elaborados con Haploview para el parámetro D', correspondiente al desequilibrio de unión normalizado (A), y a R<sup>2</sup>, correspondiente al coeficiente de correlación entre alelos de cada SNP (B). Las cifras en los recuadros son los valores de los parámetros multiplicados por 100. Los recuadros sin cifra indican que el valor es máximo (1).

**Tabla 2** Características antropométricas y clínicas de casos y controles

	Casos	Controles	p
N	192	197	
Género (H/M)	112/80	90/107	p = 0,013 <sup>a</sup>
Edad (años)	52,5 ± 11,23	45,2 ± 13,79	p < 0,0001 <sup>b</sup>
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	30,1 ± 3,85	24,1 ± 3,10	p < 0,0001 <sup>b</sup>
Perímetro cintura (cm)	101,7 ± 9,88	83,5 ± 9,97	p < 0,0001 <sup>b</sup>
Hombres	103,2 ± 9,56	90,2 ± 7,57	p < 0,0001 <sup>b</sup>
Mujeres	99,5 ± 9,98	77,8 ± 7,99	p < 0,0001 <sup>b</sup>
Colesterol total (mg/dl)	259,8 ± 64,44	213,5 ± 37,33	p < 0,0001 <sup>b</sup>
Triglicéridos (mg/dl)	216,0 ± 85,38	76,8 ± 32,37	p < 0,0001 <sup>b</sup>
c-LDL (mg/dl)	179,0 ± 59,13	140,9 ± 33,96	p < 0,0001 <sup>b</sup>
c-HDL (mg/dl)	39,2 ± 9,78	57,1 ± 14,34	p < 0,0001 <sup>b</sup>
Hombres	35,4 ± 8,09	49,6 ± 11,83	p < 0,0001 <sup>b</sup>
Mujeres	44,6 ± 9,44	63,4 ± 13,22	p < 0,0001 <sup>b</sup>
ApoA1 (mg/dl)	135,5 ± 28,91	159,9 ± 34,48	p < 0,0001 <sup>b</sup>
ApoB (mg/dl)	147,0 ± 35,88	100,2 ± 26,64	p < 0,0001 <sup>b</sup>
Glucosa (mg/dl)	110,1 ± 27,25	89,0 ± 11,50	p < 0,0001 <sup>b</sup>
PAS (mmHg)	141,0 ± 15,82	119,0 ± 14,85	p < 0,0001 <sup>b</sup>
PAD (mmHg)	85,6 ± 9,91	73,8 ± 10,36	p < 0,0001 <sup>b</sup>
Puntos SM ATPIII	3,54 ± 0,646	0,52 ± 0,501	p < 0,0001 <sup>b</sup>
SM TG (%)	152 (79%)	2 (1%)	p < 0,0001 <sup>a</sup>
SM HDL (%)	151 (79%)	23 (12%)	p < 0,0001 <sup>a</sup>
SM Cintura (%)	129 (69%)	7 (4%)	p < 0,0001 <sup>a</sup>
SM Glucosa (%)	78 (41%)	8 (4%)	p < 0,0001 <sup>a</sup>
SM Hipertensión (%)	168 (88%)	52 (27%)	p < 0,0001 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Prueba  $\chi^2$  con 1 grado de libertad.

<sup>b</sup> Prueba t de Student para comparación de medias.

diferentes: por una parte mostró que entre los SNP estudiados en *USF1* existe un fuerte desequilibrio de unión, según los resultados del parámetro D' (desequilibrio de unión normalizado), que fue 1 en la mayor parte de los emparejamientos de SNP y muy alto en los demás (fig. 2A), aunque el parámetro R<sup>2</sup> (correlación entre alelos) mostrado en la figura 2B resultó parcialmente contradictorio al no alcanzar valores tan altos, aunque claramente sugerentes de la existencia de un ligamiento entre polimorfismos. Este aparente desacuerdo entre medidas del desequilibrio de unión puede deberse a diferentes factores que afectan al desequilibrio de unión, como es el caso del ratio de mutación en el locus que puede dar lugar a diversidad preferentemente respecto a fenómenos de recombinación<sup>25</sup>. En base a estos resultados, y utilizando el algoritmo de Gabriel<sup>26</sup> con los valores instaurados por defecto que se encuentra implementado en Haploview, se identifica un bloque haplotípico que comprende todos los SNP analizados excepto rs2516837. Adicionalmente el análisis de tag SNP muestra que para captar el 100% de la variabilidad genética observada en *USF1* para los 9 marcadores seleccionados en la muestra poblacional analizada es necesaria sólo una combinación determinada de 6 de ellos debido a la estructura existente a nivel genético, que no era conocida a priori.

No se observó una asociación estadísticamente significativa con la condición de SM para ninguno de los polimorfismos estudiados en *USF1* considerados aisladamente, tanto a nivel de frecuencias alélicas como de frecuencias genotípicas, tal como se muestra en la tabla 3.

Se estimaron las frecuencias haplotípicas, y los haplotipos para cada muestra fueron inferidos mediante el algoritmo de Stephens<sup>23</sup>, que está implementado en el programa PHASE 2.1. Se detectaron un total de 18 haplotipos diferentes, como muestra la tabla 4, de los cuales 14 se encontraron en casos y 12 en controles, siendo 8 comunes a ambos grupos. El 98,2% de los alelos detectados en casos y controles corresponden a alguno de los 6 haplotipos más frecuentes, y el 97,2% de los sujetos estudiados son portadores de alelos de *USF1* con alguno de estos haplotipos mayoritarios. El estudio de asociación de haplotipos de *USF1* con SM no resultó estadísticamente significativo.

Siguiendo una metodología similar, se restringió el análisis de haplotipos a los polimorfismos que Pajukanta et al<sup>8</sup> describieron como asociados a HLFC e hipertrigliceridemia, pero no se encontraron diferencias significativas que indicaran una asociación de estos haplotipos reducidos con el desarrollo de SM.

## Discusión

El SM está adquiriendo proporciones cada vez mayores a nivel poblacional y constituye un importante problema clínico porque se asocia al desarrollo de enfermedad cardiovascular y diabetes tipo 2. Aunque su definición como entidad nosológica es controvertida, su utilidad a nivel clínico es indiscutible y existen evidencias que indicarían un componente genético en su manifestación.

**Tabla 3** Frecuencias de los SNP estudiados en casos y controles

rs3737787	N	Alelos		Genotipos		
		A	G	AA	AG	GG
Casos	192	104 (27,0%)	280 (73,0%)	16 (8,3%)	72 (37,5%)	104 (54,2%)
Controles	197	112 (28,4%)	282 (71,6%)	17 (8,6%)	78 (39,6%)	102 (51,8%)
Casos vs. controles <sup>a</sup>		$\chi^2 = 0,175, p = 0,676$		$\chi^2 = 0,225, p = 0,893$		
rs2073658	N	Alelos		Genotipos		
		C	T	CC	CT	TT
Casos	192	278 (72,4%)	106 (27,6%)	104 (54,2%)	70 (36,5%)	18 (9,4%)
Controles	197	282 (71,6%)	112 (28,4%)	103 (52,3%)	76 (38,6%)	18 (9,1%)
Casos vs. controles <sup>a</sup>		$\chi^2 = 0,065, p = 0,798$		$\chi^2 = 0,187, p = 0,911$		
rs2073656	N	Alelos		Genotipos		
		C	G	CC	CG	GG
Casos	192	281 (73,20%)	103 (26,8%)	105 (54,7%)	71 (37,0%)	16 (8,3%)
Controles	197	282 (71,6%)	112 (28,4%)	102 (51,8%)	78 (39,6%)	17 (8,6%)
Casos vs. controles <sup>a</sup>		$\chi^2 = 0,250, p = 0,617$		$\chi^2 = 338, p = 0,844$		
rs2774276	N	Alelos		Genotipos		
		C	G	CC	CG	GG
Casos	192	284 (74,0%)	100 (26,0%)	105 (54,7%)	74 (38,5%)	13 (6,8%)
Controles	197	293 (74,4%)	101 (25,6%)	112 (56,9%)	69 (35,0%)	16 (8,1%)
Casos vs. controles <sup>a</sup>		$\chi^2 = 0,017, p = 0,897$		$\chi^2 = 647, p = 0,724$		
rs2073653	N	Alelos		Genotipos		
		C	T	CC	CT	TT
Casos	192	38 (9,9%)	346 (90,1%)	3 (1,6%)	32 (16,7%)	157 (81,8%)
Controles	197	35 (8,8%)	359 (91,2%)	3 (1,5%)	29 (14,7%)	165 (83,8%)
Casos vs. controles <sup>a</sup>		$\chi^2 = 0,235, p = 0,628$		$\chi^2 = 282, p = 868$		
rs2516839	N	Alelos		Genotipos		
		C	T	CC	CT	TT
Casos	192	139 (36,2%)	245 (63,8%)	27 (14,1%)	85 (44,3%)	80 (41,7%)
Controles	197	135 (34,2%)	259 (65,78%)	27 (13,7%)	81 (41,1%)	89 (45,2%)
Casos vs. controles <sup>a</sup>		$\chi^2 = 0,319, p = 0,572$		$\chi^2 = 511, p = 0,774$		
rs6686076	N	Alelos		Genotipos		
		C	T	CC	CT	TT
Casos	192	38 (9,9%)	346 (90,1%)	3 (1,6%)	32 (16,7%)	157 (81,8%)
Controles	197	35 (8,8%)	359 (91,2%)	3 (1,5%)	29 (14,7%)	165 (83,8%)
Casos vs. controles <sup>a</sup>		$\chi^2 = 0,235, p = 0,628$		$\chi^2 = 282, p = 0,868$		
rs2516838	N	Alelos		Genotipos		
		C	G	CC	CG	GG
Casos	192	244 (63,5%)	140 (36,5%)	75 (39,1%)	94 (49,0%)	23 (12,0%)
Controles	197	246 (62,5%)	148 (37,5%)	79 (40,1%)	88 (44,7%)	30 (15,2%)
Casos vs. controles <sup>a</sup>		$\chi^2 = 0,102, p = 0,750$		$\chi^2 = 1,162, p = 0,559$		
rs2516837	N	Alelos		Genotipos		
		A	G	AA	AG	GG
Casos	192	110 (28,7%)	274 (71,3%)	12 (6,3%)	86 (44,8%)	94 (49,0%)
Controles	197	100 (25,4%)	294 (74,6%)	12 (6,1%)	76 (38,6%)	109 (55,3%)
Casos vs. controles <sup>a</sup>		$\chi^2 = 1,052, p = 0,3050$		$\chi^2 = 1,662, p = 0,436$		

<sup>a</sup> Comparación mediante pruebas  $\chi^2$  con 1 grado de libertad para frecuencias alélicas y 2 grados de libertad para frecuencias genotípicas.

**Tabla 4** Frecuencias de los haplotipos estimados

Haplotipo	Casos	Controles
GGTTTCCCG	139(36,2%)	143(36,3%)
GCTTTGTA	103(26,8%)	111(28,2%)
ACTCTGCCG	78(20,3%)	77(19,5%)
ACCCCTCCG	29(7,6%)	21(5,3%)
GCTCTGCCG	20(5,2%)	20(5,1%)
GCCCCCTCCG	9(2,3%)	14(3,6%)
GCTTTCCCG	1(0,26%)	1(0,25%)
GGTCTCCCG	1(0,26%)	1(0,25%)
GCTTTGCA	0	1(0,25%)
GCTTTCTA	1(0,26%)	0
GCTTTGCCG	0	1(0,25%)
GGTTTCTG	0	1(0,25%)
GGTCTGCCG	0	1(0,25%)
ACTTTGCCG	1(0,26%)	0
ACTCTCTG	1(0,26%)	0
ACTCTGCTG	1(0,26%)	0
AGTTTGCCG	0	1(0,25%)
AGTCTGCCG	0	1(0,25%)

Se ha descrito una heredabilidad del 24% para el SM, así como de sus diferentes componentes<sup>27</sup>, lo cual proporciona una base para la búsqueda de *loci* genéticos que confieran susceptibilidad para el desarrollo de SM. Se ha encontrado asociación de distintos genes relacionados con cada uno de los componentes individuales del SM con el desarrollo del propio SM, aunque no han podido ser reproducidos en todos los casos<sup>28</sup>. Estos resultados no concluyentes son posiblemente debidos al carácter genéticamente complejo que cabe atribuir al SM, en cuyo desarrollo pueden participar varios *loci* con variantes comunes, con la confusión que añade la influencia de factores ambientales que pueden afectar al fenotipo presentado, como son los niveles de ingesta calórica y actividad física, así como la importancia del género y la edad para su establecimiento. La definición de un fenotipo inequívoco para el SM también contribuye a la dificultad para identificar *loci* genéticos relacionados.

El solapamiento de rasgos fenotípicos del SM con determinados aspectos de la HLFC, y la identificación de *USF1* como un gen causal para esta última, han hecho que sea considerado como un posible gen asociado al desarrollo de SM por diferentes grupos<sup>29</sup>. La asociación de *USF1* con HLFC ha sido estudiada y replicada en distintas poblaciones<sup>30</sup>, pero los resultados relativos a SM o patologías relacionadas como la diabetes tipo 2 son escasos y contradictorios<sup>31–35</sup>.

Esta relación hipotética no ha sido evaluada previamente en población española, y nuestro estudio explora la variabilidad genética en *USF1* en una muestra extraída de nuestro entorno y su posible relación con SM en un estudio caso-control. Para ello se han analizado 9 posiciones polimórficas distribuidas en *USF1* con el fin de captar dicha variabilidad. Esto ha permitido definir 6 haplotipos en el *locus USF1* comunes que están presentes en la mayoría de la población.

Los resultados obtenidos en el estudio caso-control realizado no apoyan la hipótesis de que *USF1* pueda estar asociado en el desarrollo de SM. La distribución de frecuencias

de los SNP, considerados aisladamente o formando parte de los haplotipos identificados, no difiere significativamente entre casos y controles como cabría esperar si la variabilidad en el *locus USF1* tuviera una influencia en el desarrollo de SM. Tampoco se ha encontrado relación de los SNP identificados por Pajukanta et al<sup>8</sup> en relación con HLFC.

Considerando que el SM puede estar causado por la contribución de diferentes genes, la interpretación más directa de nuestros resultados sería que la variabilidad genética en *USF1* en población de nuestro entorno no está asociada particularmente con SM debido a las diferencias étnicas existentes respecto a otras poblaciones en las que sí se ha observado una asociación significativa, y que serían otros genes los que tuvieran mayor contribución al desarrollo de SM en nuestra población. Adicionalmente pueden existir interacciones entre genes causantes de SM, y *USF1* no debería ser descartado como un gen con un efecto modificador de la acción de estos genes, como sugieren trabajos recientes que describen una interacción entre *USF1* y *APOA5*<sup>36</sup>.

Nuestro estudio tiene limitaciones que han podido influir parcialmente en el resultado obtenido. El tamaño muestral es adecuado para conseguir una potencia estadística razonable, pero si el efecto de *USF1* fuera más débil de lo descrito en otras poblaciones para la población de nuestro entorno, el número de individuos analizados podría no haber sido suficiente para detectarlo. Adicionalmente los grupos de casos y controles no están perfectamente equilibrados en cuanto a la distribución de género y edad, y este hecho podría tener un efecto sobre el estudio de asociación para una situación fisiopatológica en la que edad y sexo tienen una gran influencia. Sin embargo el desequilibrio entre casos y controles en nuestro estudio es tal que el sesgo que podría haber sido introducido favorecería más bien una asociación positiva, dado que en el grupo de casos la edad es mayor y la proporción de hombres es mayor que la de mujeres, factores ambos que se asocian con el desarrollo de SM.

En conclusión, el estudio caso-control desarrollado en el presente trabajo no ha mostrado una asociación significativa de *USF1* con el desarrollo de SM, lo cual refutaría su participación en el SM para la población de nuestro entorno, aunque todavía sería plausible su implicación como gen modificador de la acción de otros genes con mayor peso en el desarrollo de SM. La verificación de esta posibilidad requerirá el planteamiento de nuevos estudios que podrán tener en cuenta los resultados descritos aquí.

### Contribución de los firmantes a la autoría de este trabajo

Diseño del estudio: ALGO, FCM; Recogida y procesamiento de muestras de pacientes: EJS, FCM, JPF, AMBS, ALGO; Obtención de datos: MS, JPF; Análisis e interpretación de datos: ALGO, MS; Redacción del borrador del artículo: ALGO; Revisión crítica del contenido del artículo: Todos; Aprobación final de la versión a publicar: Todos.

### Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Agradecimientos

Este trabajo ha sido realizado con la financiación de la beca FEA/SEA-Bristol Myers Squibb 2005. A.L.G.O. recibe apoyo del ISCIII/MICINN (PS09/00355) e I+CS (PIPAMER09/08).

## Bibliografía

- Grundy SM, Brewer Jr HB, Cleeman JI, Smith Jr SC, Lenfant C, American Heart Association; National Heart, Lung, and Blood Institute. Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation*. 2004;109:433–8.
- Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). Final report. *Circulation*. 2002;106:3143–3421.
- Alexander CM, Landsman PB, Teutsch SM, Haffner SM, Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III); National Cholesterol Education Program (NCEP). NCEP-defined metabolic syndrome, diabetes, and prevalence of coronary heart disease among NHANES III participants age 50 years and older. *Diabetes*. 2003;52:1210–4.
- Álvarez León EE, Ribas Barba L, Serra Majem L. Prevalencia del síndrome metabólico en la población de las islas Canarias, España. *Med Clin (Barc)*. 2003;120:172–4.
- Lorenzo C, Serrano-Ríos M, Martínez-Larrad MT, Gabriel R, Williams K, Gómez-Gerique JA, et al. Central adiposity determines prevalence differences of the metabolic syndrome. *Obes Res*. 2003;11:1480–7.
- Goldstein JL, Schrott HG, Hazzard WR, Bierman EL, Motulsky AG. Genetic analysis of lipid levels in 176 families and delineation of a new inherited disorder, combined hyperlipidemia. *J Clin Invest*. 1973;52:1544–68.
- De Graaf J, Stalenhoef AF. Defects of lipoprotein metabolism in familial combined hyperlipidaemia. *Curr Opin Lipidol*. 1998;9:189–96.
- Pajukanta P, Lilja HE, Sinsheimer JS, Cantor RM, Lusia AJ, Gentile M, et al. Familial combined hyperlipidemia is associated with upstream transcription factor 1 (USF1). *Nat Genet*. 2004;36:371–6.
- Shoulders CC, Jones EL, Naumova RP. Genetics of familial combined hyperlipidemia and risk of coronary heart disease. *Hum Molec Genet*. 2004; 13 Spec No 1:R149–160.
- Pajukanta P, Nuotio I, Terwilliger JD, Porkka KV, Ylitalo K, Pihlajamäki J, et al. Linkage of familial combined hyperlipidemia to chromosome 1q21q23. *Nat Genet*. 1998;18:369–73.
- Putt W, Palmen J, Nicaud V, Tregouet DA, Tahri-Daizadeh N, Flavell DM, et al. Variation in USF1 shows haplotype effects, gene:gene and gene:environment associations with glucose and lipid parameters in the European Atherosclerosis Research Study II. *Hum Molec Genet*. 2004;13:1587–97.
- Wu S, Mar-Heyming R, Dugum EZ, Kolaitis NA, Qi H, Pajukanta P, et al. Upstream transcription factor 1 influences plasma lipid and metabolic traits in mice. *Hum Mol Genet*. 2010;19:597–608.
- lynedjian PB. Identification of upstream stimulatory factor as transcriptional activator of the liver promoter of the glucokinase gene. *Biochem J*. 1998;333(Pt 3):705–12.
- Casado M, Vallet VS, Kahn A, Vaulont S. Essential role in vivo of upstream stimulatory factors for a normal dietary response of the fatty acid synthase gene in the liver. *J Biol Chem*. 1999;274:2009–13.
- Qian J, Kaytor EN, Towle HC, Olson LK. Upstream stimulatory factor regulates Pdx-1 gene expression in differentiated pancreatic beta-cells. *Biochem J*. 1999;341(Pt 2):315–22.
- Ribeiro A, Pastier D, Kardassis D, Chambaz J, Cardot P. Cooperative binding of upstream stimulatory factor and hepatocyte nuclear factor 4 drives the transcription of the human apolipoprotein A-II gene. *J Biol Chem*. 1999;274:1216–25.
- Moore ML, Park EA, McMillin JB. Upstream stimulatory factor represses the induction of carnitine palmitoyltransferase 1b expression by PGC-1. *J Biol Chem*. 2003;278:17263–8.
- Salero E, Giménez C, Zafra F. Identification of a non-canonical E-box motif as a regulatory element in the proximal promoter region of the apolipoprotein E gene. *Biochem J*. 2003;370(Pt 3):979–86.
- Nordström T, Ronaghi M, Forsberg L, De Faire U, Morgenstern R, Nyrén P. Direct analysis of single-nucleotide polymorphism on double-stranded DNA by pyrosequencing. *Biotechnol Appl Biochem*. 2000;31(Pt 2):107–12.
- Gordon D, Finch SJ, Nothnagel M, Ott J. Power and sample size calculations for case-control genetic association tests when errors are present: application to single nucleotide polymorphisms. *Hum Heredity*. 2002;54:22–33.
- Alexander AM, Pecoraro C, Styche A, Rudert WA, Benos PV, Ringquist S, et al. SOP3: a web-based tool for selection of oligonucleotide primers for single nucleotide polymorphism analysis by Pyrosequencing. *Biotechniques*. 2005;38:87–94.
- Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2005;21:263–5.
- Stephens M, Smith N, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet*. 2001;68:978–89.
- Stephens M, Scheet P. Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing-data imputation. *Am J Hum Genet*. 2005;76:449–62.
- Hedrick PW, Kumar S. Mutation and linkage disequilibrium in human mtDNA. *Eur J Human Genet*. 2001;9:969–72.
- Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, et al. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science*. 2002;296:2225–9.
- Lin HF, Boden-Albala B, Juo SH, Park N, Rundek T, Sacco RL. Heritabilities of the metabolic syndrome and its components in the Northern Manhattan Family Study. *Diabetologia*. 2005;48:2006–12.
- Pollex RL, Hegele RA. Genetic determinants of the metabolic syndrome. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2006;3:482–9.
- Shoulders CC, Naumova RP. USF1 implicated in the aetiology of familial combined hyperlipidemia and the metabolic syndrome. *Trends Mol Med*. 2004;10:362–5.
- Lee JC, Lusia AJ, Pajukanta P. Familial combined hyperlipidemia: upstream transcription factor 1 and beyond. *Curr Opin Lipidol*. 2006;17:101–9.
- Ng MC, Miyake K, So WY, Poon EW, Lam VK, Li JK, et al. The linkage and association of the gene encoding upstream stimulatory factor 1 with type 2 diabetes and metabolic syndrome in the Chinese population. *Diabetologia*. 2005;48:2018–24.
- Holzappel C, Baumert J, Grallert H, Müller AM, Thorand B, Khuseynova N, et al. Genetic variants in the USF1 gene are associated with low-density lipoprotein cholesterol levels and incident type 2 diabetes mellitus in women: results from the MONICA/KORA Augsburg case-cohort study, 1984–2002. *Eur J Endocrinol*. 2008;159:407–16.
- Gibson F, Hercberg S, Froguel P. Common polymorphisms in the USF1 gene are not associated with type 2 diabetes in French Caucasians. *Diabetes*. 2005;54:3040–2.

34. Zeggini E, Damcott CM, Hanson RL, Karim MA, Rayner NW, Groves CJ, et al. Variation within the gene encoding the upstream stimulatory factor 1 does not influence susceptibility to type 2 diabetes in samples from populations with replicated evidence of linkage to chromosome 1q. *Diabetes*. 2006;55:2541–8.
35. Auro K, Kristiansson K, Zethelius B, Berne C, Lannfelt L, Taskinen MR, et al. *USF1* gene variants contribute to metabolic traits in men in a longitudinal 32-year follow-up study. *Diabetologia*. 2008;51:464–72.
36. Singmann P, Baumert J, Herder C, Meisinger C, Holzapfel C, Klopp N, et al. Gene-gene interaction between *APOA5* and *USF1*: two candidate genes for the metabolic syndrome. *Obes Facts*. 2009;2:235–42.