

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Doctorado en Biología Experimental

T E S I S

para obtener el grado de

Doctora en Biología Experimental

presentada por

María Teresa Villarreal Molina

Dra. Mina Königsberg Fainstein - Codirectora

Dra. María Teresa Tusié Luna - Codirectora

Dr. Samuel Canizales Quinteros - Asesor

México, D. F., Diciembre de 2007.

Comité Tutorial de la Tesis

**“BÚSQUEDA DE POSIBLES VARIANTES FUNCIONALES DEL GEN *ABCA1*
EN INDIVIDUOS MEXICANOS CON HIPO E HIPER α -LIPOPROTEINEMIA Y
SU ASOCIACIÓN CON OTROS RASGOS METABÓLICOS”**

realizada por

María Teresa Villarreal Molina

el día 3 de diciembre de 2007 en las instalaciones de la Universidad Autónoma
Metropolitana, Unidad Iztapalapa

Dra. Mina Königsberg Fainstein

Laboratorio de Bioenergética y Envejecimiento Celular
Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa
mkf@xanum.uam.mx

Dra. María Teresa Tusié Luna

Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”
Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM
tusié@servidor.unam.mx

Dr. Samuel Canizales Quinteros

Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”
Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM
cani@servidor.unam.mx

Los miembros del jurado de examen designados por el Posgrado en Biología Experimental abajo firmantes aprobaron la tesis “**BÚSQUEDA DE POSIBLES VARIANTES FUNCIONALES DEL GEN ABCA1 EN INDIVIDUOS MEXICANOS CON HIPO E HIPER α -LIPOPROTEINEMIA, Y SU ASOCIACIÓN CON OTROS RASGOS METABÓLICOS**” realizada por la alumna **María Teresa Villarreal Molina** y se realizó la disertación pública el día 3 de diciembre de 2007 en las instalaciones de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

PRESIDENTE

Dr. Miguel Betancourt Rule

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

SECRETARIO

Dr. Samuel Canizales Quinteros

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”
Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM

VOCAL

Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

VOCAL

Dr. Carlos Aguilar Salinas

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”,

El programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Iztapalapa (UAM-I: 0904-0) recibe apoyo por parte del CONACyT mediante el programa PNP-CONACyT-SEP clave C/PFPN-2002-35-32. María Teresa Villarreal Molina agradece el apoyo recibido por CONACYT (Registro No. 193056).

Este trabajo fue realizado en la Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” en colaboración con el laboratorio de Bioenergética y Envejecimiento Celular de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud en la Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa.

DEDICATORIA

A Julián Ernesto

A Gustavo, Mariana, Julián Gustavo y Emilio

AGRADECIMIENTOS

Muchas personas me ayudaron en lo profesional y en lo personal a realizar este trabajo. La Dra. Sara Frías, maestra y amiga desde hace muchos años, me animó de una manera muy especial a ingresar al doctorado. El Dr. Miguel Betancourt tuvo la gentileza de orientarme, ayudarme en todo e invitarme al programa de la UAM. La Dra. María Teresa Tusié me invitó a conocer su laboratorio, me platicó de los proyectos que allí se realizaban y me abrió las puertas para participar en la Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica. La Dra. Mina Königsberg siempre amable y buscando la manera de ayudarme, también me abrió las puertas de su laboratorio y me apoyó en todo.

En el trabajo diario, el Dr. Samuel Canizales tuvo la paciencia de enseñarme, escucharme, ayudarme a analizar todos los datos, y compartir conmigo su experiencia, conocimiento y tiempo para realizar este trabajo. Le agradezco además la confianza que tuvo para invitarme a participar en otros trabajos y por su amistad.

Mis compañeras Marisela Villalobos, Margarita Zavala, María Teresa Guerra, Leonor Jacobo, Rosario Pérez y María Teresa Flores, todas ellas comprometidas con sus propios proyectos, se tomaron el tiempo para participar activa y amablemente en la recolección de muestras y me ayudaron de distintas maneras en el trabajo diario del laboratorio. Laura Riba siempre tuvo palabras de aliento y disposición de ayudarme en el laboratorio.

Agradezco también el apoyo técnico, la ayuda en extracciones y la paciencia de Salvador Ramírez, Rosa María Cerezo y Maribel Rodríguez.

Agradezco a los doctores Carlos Aguilar, Francisco Alarcón y Miguel Betancourt por aceptar ser miembros del jurado y por la revisión crítica de la tesis.

A mis amigas y maestras Alessandra Carnevale y Lorena Orozco les agradezco su comprensión, apoyo, ánimo y paciencia al escucharme.

De manera muy especial estoy agradecida con Gilda María Molina y María Elena Miranda, entre muchas otras cosas porque sin ellas no hubiera podido ser mamá y profesionalista, así como con cada uno de mis hermanos (María, Fernanda, Gilda, Carolina y Julián) por animarme a seguir adelante.

A Gustavo le agradezco compartir conmigo éste y todos mis proyectos de vida.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	13
ABSTRACT.....	14
I. INTRODUCCIÓN.....	15
I.1 Generalidades.....	15
I.2 Colesterol plasmático.....	16
I.3 Transporte reverso del colesterol.....	16
I.4 Niveles plasmáticos de HDL-colesterol (HDL-C) como factor anti-aterogénico.....	19
I.5 Heredabilidad de los niveles plasmáticos de las HDL-C.....	20
I.6 Estrategias para identificar genes que regulan los niveles plasmáticos de HDL-C.....	20
I.7 ABCA1.....	22
I.8 Regulación del gen <i>ABCA1</i>	24
I.9 Función de ABCA1 en diferentes estirpes celulares y funciones <i>in vivo</i>	28
I.10 Variabilidad del gen <i>ABCA1</i>	34
II. JUSTIFICACIÓN.....	36
III. OBJETIVOS.....	36
III.1 Objetivo general.....	36
III.2 Objetivos particulares.....	36
IV. HIPÓTESIS.....	37
V. MATERIAL Y MÉTODOS.....	38
V.1 Individuos.....	38
V.2 Parámetros bioquímicos.....	40
V.3 Extracción de ácidos nucleicos.....	41

V.4 Obtención de DNA complementario (DNAC) y amplificación de fragmentos de la región codificadora del gen <i>ABCA1</i>	41
V.5 Secuenciación de los primeros 9 exones del gen <i>ABCA1</i>	43
V.6 Genotipificación de la variante R230C en la población mestiza mexicana.....	43
V.7 Genotipificación de marcadores ancestrales informativos (AIMs)...	43
V.8 Análisis estadístico.....	44
VI. RESULTADOS.....	45
VI.1 Secuenciación parcial del gen <i>ABCA1</i> en individuos con fenotipos extremos.....	45
VI.2 Genotipificación de la variante R230C en la población mestiza mexicana.....	47
VI.3 Asociación de R230C con niveles de HDL/ApoA-I y el IMC.....	49
VI.4 Asociación de R230C con obesidad, síndrome metabólico y DMT2.....	49
VI.5 Frecuencias alélicas y genotípicas en poblaciones indígenas de México.....	51
VI.6 Equilibrio de Hardy-Weinberg.....	51
VII. DISCUSIÓN.....	55
VII.1 Probable funcionalidad de la variante R230C.....	55
VII.2 Efecto en los niveles de HDL-colesterol y ApoA-I.....	56
VII.3 Asociación con obesidad.....	58
VII.4 Asociación con síndrome metabólico.....	59
VII.5 Asociación con diabetes mellitus tipo 2.....	59
VII.6 Las asociaciones observadas no se deben a un efecto de estratificación poblacional.....	61
VII.7 Alta prevalencia de la variante R230C en diferentes poblaciones indígenas de México.....	62

VIII. CONCLUSIONES.....	64
IX. PERSPECTIVAS.....	65
X. REFERENCIAS.....	66
XI. PUBLICACIÓN.....	85

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: El transporte reverso del colesterol.....	18
Figura 2: La proteína ABCA1.....	23
Figura 3: Formación de partículas de HDL por la acción de ABCA1.....	25
Figura 4: Electroferograma de la variante R219K.....	45
Figura 5: Electroferograma de la variante R230C.....	46
Figura 6: Genotipificación de la variante R230C por sondas Taqman.....	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Criterios de la ATP-III para el síndrome metabólico.....	42
Tabla 2: Frecuencia de las variantes R219K y R230C del gen <i>ABCA1</i> en individuos mexicanos con hipo e hiper α -lipoproteinemia.....	47
Tabla 3: Comparación de los parámetros antropométricos y bioquímicos en mestizos mexicanos de la Ciudad de México de acuerdo a la presencia de la variante R230C del gen <i>ABCA1</i>	52
Tabla 4: Asociación de la variante R230C del gen <i>ABCA1</i> con obesidad, síndrome metabólico y diabetes mellitus tipo 2.....	53
Tabla 5: Frecuencias alélicas y genotípicas de la variante R230C en diferentes poblaciones indígenas de México.....	54

RESUMEN

Aunque la proteína ABCA1 (por sus siglas en inglés ATP-binding cassette transporter A1) es conocida por su función en el eflujo de colesterol y la formación de lipoproteínas de alta densidad (HDL), se expresa en una gran variedad de tejidos donde podría tener diferentes funciones. Puesto que la hipoa-lipoproteinemia (niveles sérico bajos de HDL) tiene una alta prevalencia en México, se analizó la secuencia del gen *ABCA1* en individuos mestizos mexicanos con los niveles más altos y más bajos de HDL de la población, con el fin de identificar variantes funcionales. Se encontró una variante no sinónima (R230C) que fue muy frecuente en los individuos con niveles bajos de HDL, pero no en aquéllos con niveles altos de HDL ($P=0.00006$). Por este motivo se analizó la frecuencia de esta variante en mestizos mexicanos de la población general de la Ciudad de México, buscando posibles asociaciones con otros rasgos metabólicos. Se identificaron los genotipos R230C en 429 mestizos mexicanos utilizando sondas Taqman, encontrándose la variante en el 20.1% de ellos, con una frecuencia alélica de 10.9%. La variante R230C mostró asociación estadísticamente significativa no sólo con niveles séricos bajos de HDL-colesterol y apolipoproteína A-I, sino también con obesidad ($RM=2.527$, $P=0.005$), síndrome metabólico ($RM=1.893$, $P=0.0007$) y diabetes mellitus tipo 2 ($RM=4.527$, $P=0.003$). Estas asociaciones no perdieron su significancia aún después de ajustar por mezcla étnica ($P=0.011$, $P=0.001$ y $P=0.006$, respectivamente). La variante R230C había sido previamente descrita como una mutación en un indígena canadiense Oji-Cree con hipoa-lipoproteinemia y no ha sido encontrada en las poblaciones caucásica, africana o asiática. Por este motivo se buscó esta variante en 37 individuos yaquis, 67 teneek, 35 purépechas y 40 mayas, encontrándose frecuencias alélicas significativamente más altas que en la población mestiza mexicana (17.9 a 28.8%; $p < 0.01$). Éste es el primer estudio que reporta la asociación de una variante del gen *ABCA1* con obesidad y sus comorbilidades, la cual parece tener un carácter ancestral y es epidemiológicamente relevante en la población mexicana.

ABSTRACT

Although the ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) is well known for its role in cholesterol efflux and HDL formation, it is expressed in various tissues where it may have different functions. Because hypo α -lipoproteinemia is highly prevalent in Mexico, we screened the *ABCA1* coding sequence in Mexican individuals with low and high HDL cholesterol levels to seek functional variants. A highly frequent nonsynonymous variant (R230C) was identified in low-HDL cholesterol but not in high-HDL cholesterol individuals ($P=0.00006$). We thus assessed its frequency in the Mexican-Mestizo general population, seeking possible associations with several metabolic traits. R230C was screened in 429 Mexican Mestizos using Taqman assays, and it was found in 20.1% of these individuals. The variant was significantly associated not only with decreased HDL-cholesterol and apolipoprotein A-I levels but also with obesity (OR=2.527, $P=0.005$), the metabolic syndrome (OR=1.893, $P=0.0007$), and type 2 diabetes (OR=4.527, $P=0.003$). All of these associations remained significant after adjusting for admixture ($P=0.011$, $P=0.001$, and $P=0.006$, respectively). The R230C variant was previously described as a mutation in an Oji-Cree individual with hypo α -lipoproteinemia and has not been found in Caucasian, African or Asian populations. For this reason this variant was genotyped in 37 Yaqui, 67 Teneek, 35 Purepecha and 40 Mayan individuals, who showed significantly higher allele frequencies (17.9 to 28.8%) as compared to Mexican mestizos (10.9%; $p < 0.01$). This is the first study reporting the association of an *ABCA1* variant with obesity and obesity-related comorbidities, which seems to be an ancestral marker and is epidemiologically relevant in the Mexican population.

I. INTRODUCCIÓN

I. 1 Generalidades

El colesterol es fundamental en la biología de las células animales. En primer lugar, se distribuye por toda la membrana plasmática modulando su fluidez, además de concentrarse en microdominios especializados ricos en esfingolípidos llamados “rafts” o balsas lipídicas y caveolas (Anderson, 1998). Estos microdominios contienen una variedad de moléculas de señalización, cuya actividad normal depende de un equilibrio en el contenido de colesterol, por lo que su papel es fundamental en varias funciones biológicas. El colesterol también es indispensable en la etapa embrionaria, siendo tan importante que los trastornos causados por errores innatos en la biosíntesis del colesterol se caracterizan por dismorfogénesis de múltiples órganos (Yu y Patel, 2005). Recientemente se demostró que el colesterol puede modular la actividad de las proteínas “Hedgehog”, que actúan como morfógenos regulando la adecuada formación de muchas estructuras embrionarias, incluyendo las extremidades (Lewis et al., 2001; Gofflot et al., 2003). El colesterol es además sustrato para la producción de hormonas esteroides con múltiples funciones en el organismo y probablemente tenga muchas más funciones aún no conocidas (Oram y Heinecke, 2005).

La biosíntesis de colesterol puede llevarse a cabo en todas las células somáticas, aunque en animales vertebrados el principal sitio de síntesis es el hígado. En cambio, el catabolismo del colesterol se encuentra muy limitado en la mayoría de las células periféricas y tiene que ser transportado al hígado para ser convertido en ácidos biliares y ser excretado. Así, parece ser que el colesterol es una molécula muy valiosa por lo que evolutivamente nuestro organismo se preparó para manejar su escasez, pero no lo hizo de manera tan eficiente para manejar su exceso (Yokohama, 2006). Por lo tanto, la capacidad de las células somáticas para liberar colesterol en exceso hacia el plasma es fundamental para su homeostasis, tanto a nivel celular como a nivel sistémico.

Esta dificultad para manejar el exceso de colesterol ha cobrado una gran importancia, debido a los cambios en la alimentación y en el estilo de vida, principalmente en poblaciones occidentales (Kuller, 2006). Como consecuencia, ha aumentado dramáticamente la incidencia de enfermedades en las que el metabolismo del colesterol juega un papel importante, como la obesidad, el síndrome metabólico, la diabetes mellitus tipo 2, la aterosclerosis y la cardiopatía isquémica. A pesar de los grandes avances en la prevención y el tratamiento de la aterosclerosis y la cardiopatía isquémica, estas enfermedades siguen siendo las principales causas de muerte en países desarrollados y también en México (American Heart Association, 2005; Estadísticas de Mortalidad en México, Salud Pública 2002; Murray y López, 1997).

1.2 Colesterol Plasmático

En el ser humano, aproximadamente el 66% del colesterol plasmático se encuentra unido a partículas transportadoras llamadas lipoproteínas de baja densidad (LDL), siendo una fuente de colesterol tanto para las membranas celulares como para la síntesis de hormonas esteroideas. El receptor hepático para las LDL es responsable de la depuración de la mayoría de las partículas de LDL-colesterol en plasma. El tercio restante del colesterol plasmático se encuentra en las lipoproteínas de alta densidad (HDL). Aunque estas partículas tienen múltiples funciones, la más estudiada es la de eliminar el exceso de colesterol celular y transportarlo desde los tejidos periféricos hacia el hígado, para ser eliminado a través de la bilis. Este proceso se conoce como transporte reverso del colesterol (Fielding y Fielding, 1995; Oram y Yokoyama, 1996).

1.3 Transporte Reverso del Colesterol

El transporte reverso del colesterol es el proceso por el cual el colesterol que se encuentra en las células periféricas es transportado hacia el hígado para

ser eliminado por vía biliar (Figura 1). El paso más importante de este proceso parece ser la salida de colesterol de la célula, para lo cual se han propuesto dos mecanismos (Yokoyama, 2006):

- 1) El eflujo de colesterol inespecífico desde la superficie celular por un intercambio fisicoquímico entre la membrana celular y moléculas aceptoras extracelulares.
- 2) El eflujo de colesterol mediado por la proteína transmembranal ABCA1 (ATP-Binding Cassette Transporter A1), que inicia con la interacción de ABCA1 y la apolipoproteína A-I, (apoA-I). Esta apolipoproteína funciona como aceptora del colesterol, promoviendo el eflujo de colesterol y fosfolípidos hacia las HDL nacientes. El colesterol es rápidamente esterificado por la enzima lecitina-colesterol aciltransferasa (LCAT), la cual transforma al colesterol en una molécula más hidrofóbica. De esta manera, los ésteres de colesterol abandonan la superficie de la lipoproteína para situarse en el interior de la partícula, aumentando su tamaño y formando partículas de HDL maduras. El colesterol esterificado puede ser intercambiado por triglicéridos presentes en lipoproteínas que contienen apolipoproteína B-100, principalmente las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y de densidad intermedia (IDL). Este intercambio es facilitado por la proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP). Las partículas de HDL pueden unirse al receptor basurero B-I (SR-BI), el cual reconoce a las HDL maduras. Estas partículas son captadas por el hígado para su posterior excreción (Tall y Wang, 2000).

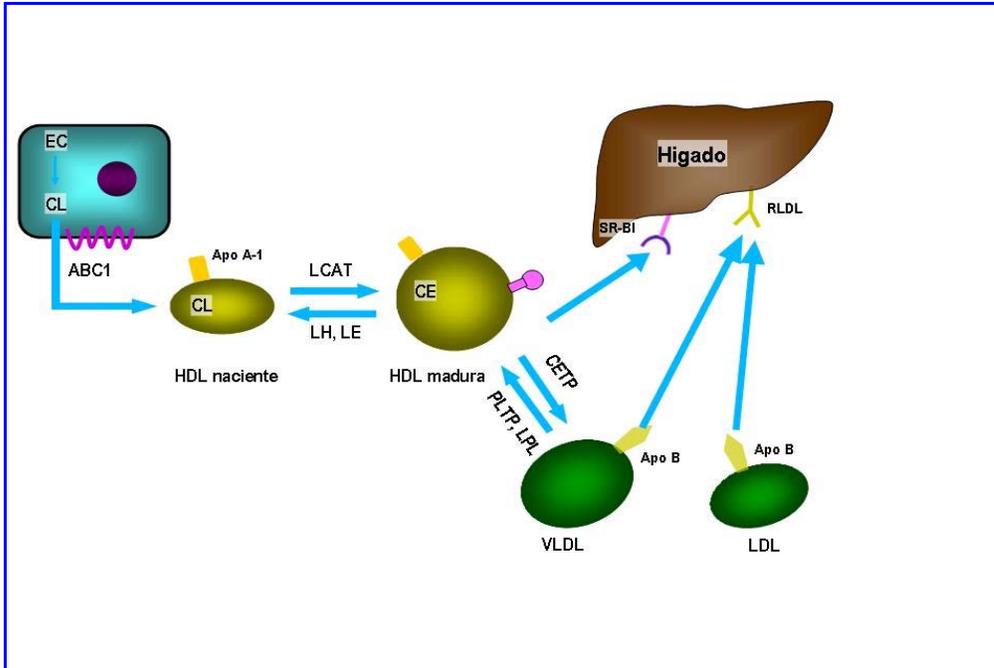


Figura 1: El transporte reverso del colesterol: inicia con la interacción de ABCA1 y la apolipoproteína A-I, (apoA-I), molécula aceptora del colesterol, promoviendo el eflujo de colesterol libre (CL) y fosfolípidos hacia las HDL nacientes. La enzima lecitina-colesterol aciltransferasa (LCAT) convierte al CL en colesterol esterificado (CE), que es más hidrofóbico y se sitúa en el interior de la partícula formando HDLs maduras. La proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP) permite el intercambio de CE por triacilglicerol en lipoproteínas que contienen apolipoproteína B-100 [lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y de densidad intermedia (IDL)]. Las partículas de HDL pueden unirse al receptor basurero B-I (SR-BI) en el hígado, el cual reconoce a las HDL maduras y permite su excreción por vía digestiva. Otras enzimas hidrolizan triglicéridos y/o fosfolípidos en diferentes partículas lipoproteicas, transfiriendo o intercambiando estos lípidos con otras lipoproteínas (LPL: lipasa lipoproteica; PLTP: proteína transferidora de fosfolípidos; LH: lipasa hepática; LE: lipasa endotelial).

I. 4 Niveles Plasmáticos de HDL-Colesterol (HDL-C) como Factor Antiaterogénico.

Estudios epidemiológicos prospectivos han demostrado que existe una relación inversa entre los niveles plasmáticos de HDL-C y la incidencia de enfermedad arterial coronaria (EAC). De hecho, el factor de protección más poderoso para la cardiopatía isquémica independiente de los niveles de lipoproteínas de baja densidad (LDL), son los niveles plasmáticos altos de HDL-C (NCEP 2002; Gordon et al., 1989; Genest et al., 1999; Genest et al., 2003). Los individuos con niveles de HDL-C entre 6 y 7 mg/dL mayores al promedio tienen un riesgo 20 al 27% menor de presentar EAC, calculándose que un incremento de 1 mg/dL de HDL-C puede reducir el riesgo de EAC en un 2 al 3%, independientemente de los niveles plasmáticos de LDL-C (Gotto y Brinton, 2004). En un estudio a gran escala que incluyó a más de 15,000 adultos mexicanos, se encontró que alrededor del 50% de esta población presenta hipoa-lipoproteinemia, definido como niveles de HDL-C < 35 mg/dl (Aguilar-Salinas et al., 2001).

La propiedad antiaterogénica más conocida de las HDL tiene que ver con su papel preponderante en el transporte reverso del colesterol. Sin embargo, las HDL también tienen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antitrombóticas, además de mejorar la función endotelial y reducir la retención de lipoproteínas en las arterias (Ansell et al., 2005). Algunos estudios recientes han demostrado que el incrementar los niveles de HDL no sólo previene la aterosclerosis, sino que incluso la puede revertir (Meyers y Kashyap, 2004; Duffy y Rader, 2006; Packard, 2006). Aún más, las partículas de HDL tienen la capacidad de proteger directamente el miocardio isquémico de la lesión por reperfusión *in vivo* (Theilmeier et al., 2006). Por lo tanto, actualmente los esfuerzos terapéuticos para prevenir o revertir la aterosclerosis se han enfocado en buscar estrategias que incrementen los niveles plasmáticos de HDL-C.

I. 5 Heredabilidad de los Niveles Plasmáticos de las HDL-C.

Se sabe que los niveles plasmáticos de HDL-C son un rasgo complejo, que resulta de la interacción de numerosos factores ambientales y variantes alélicas de muchos genes. En la mayoría de los estudios realizados en gemelos monocigotos, se ha encontrado que entre 40-60% de la variación en los niveles de las HDL-C está determinada genéticamente (Peacock et al., 2001), existiendo evidencia de que más de 50 diferentes genes podrían participar en la regulación de este rasgo fenotípico (Wang y Paigen, 2005). Por otro lado, se conocen algunos factores fisiológicos y ambientales que disminuyen los niveles de HDL-C, como los niveles altos de triglicéridos (Gofman et al., 1954), la resistencia a la insulina (Reaven 1988) y el tabaquismo (Garrison et al., 1978); así como factores que incrementan los niveles de HDL-C como el consumo moderado de alcohol (Castelli et al., 1977) y el ejercicio (Durstine y Haskell, 1994). Hay evidencia de que menos del 50% de la variación tanto inter como intraindividual en los niveles de HDL-C se puede explicar por estos factores de predicción establecidos (Jeffer et al., 2006). Así, aún falta mucho por entender sobre los factores genéticos, ambientales y las interacciones entre estos factores que regulan los niveles plasmáticos de las HDL-C.

I. 6 Estrategias para Identificar Genes que Regulan los Niveles Plasmáticos de HDL-C.

Se han utilizado básicamente dos estrategias para buscar genes que regulan los niveles de HDL-C en diferentes poblaciones: 1) el estudio de genes candidatos conocidos por tener un papel en el metabolismo de las HDL-C y 2) el escrutinio de todo el genoma para buscar nuevos genes mediante el análisis de loci para rasgos cuantitativos (QTLs por sus siglas en inglés “quantitative trait loci”). Al identificar variantes polimórficas de estos genes, se busca confirmar su participación en el rasgo fenotípico mediante estudios de asociación caso-control. Aunque los estudios de asociación han permitido confirmar de manera irrefutable la participación de alrededor de 50 genes y sus variantes alélicas en diferentes enfermedades multifactoriales como la diabetes

mellitus tipo 2 y la obesidad (Ioannidis et al., 2003; Lohmueller et al., 2003), esta estrategia tiene limitaciones que deben tomarse en cuenta:

1. Los resultados de estos estudios de asociación suelen diferir de acuerdo a la población estudiada (Singaraja et al., 2003; Knoblauch et al., 2004; Tregouet et al., 2004).
2. En poblaciones genéticamente heterogéneas como la nuestra, pueden dar resultados falsos positivos o negativos si existe estratificación de la población (Hinds et al., 2004; Ziv y Burchard, 2003).
3. Si el alelo en estudio tiene una baja frecuencia y/o un efecto relativamente pequeño, se necesitan muestras demasiado grandes (decenas de miles de casos y controles) para tener un poder estadístico adecuado, pudiendo dar resultados falsos negativos (Wang et al., 2005).

El papel de muchos de los genes candidatos en la regulación de los niveles de HDL-C no ha sido estudiado. Es posible que varios de estos genes tengan un efecto pequeño, contribuyendo de manera mínima, dependiendo además de su interacción con otros genes y con el medio ambiente. Por esto, entender la complejidad de las relaciones fenotipo-genotipo-ambiente es todo un reto. Las interacciones entre variantes genéticas y variaciones ambientales son la principal causa de diferencias interindividuo en el metabolismo de lípidos, además de que estas interacciones son dinámicas y cambian a lo largo de la vida del individuo. Este hecho constituye el principal obstáculo para los estudios que buscan correlacionar fenotipos con genotipos (Sing et al., 2003).

A pesar de estas limitaciones, se ha confirmado la participación de cerca de 10 de estos genes en la regulación de los niveles de HDL-C en humanos (Wang y Paigen, 2005). Casi todos ellos son responsables de enfermedades mendelianas que cursan con alteraciones en los niveles de HDL-C y participan en el transporte reverso del colesterol. Múltiples estudios tanto en humanos como en modelos animales han demostrado que el gen *ABCA1* es el principal

determinante de los niveles plasmáticos de HDL (Aiello et al., 2003; Attie et al., 2001; Oram y Heinecke, 2005).

1.7 ABCA1

El gen *ABCA1* es responsable de la enfermedad de Tangier, una entidad autosómica recesiva poco frecuente que cursa con niveles muy bajos de HDL-C (< 5 mg/dL), formación de depósitos de colesterol en macrófagos tisulares y en otros tejidos, así como un riesgo alto de EAC prematura, (Rust et al., 1999; Bodzioch et al., 1999; Brooks-Wilson et al., 1999). Los heterocigotos cursan con una enfermedad más leve conocida como hipoa-lipoproteinemia familiar, con herencia autosómica dominante.

El gen tiene 147,153 pares de bases y 50 exones. Codifica para una proteína de membrana dependiente de ATP de 2261 aminoácidos, cuya función es transportar principalmente colesterol y fosfolípidos a través de membranas. El eflujo de colesterol dependiente de ABCA1 se da hacia apolipoproteínas con bajo o nulo contenido lipídico. En cambio, las apolipoproteínas con mayor contenido lipídico (como las partículas maduras de HDL) promueven el eflujo de colesterol por otros mecanismos, incluyendo la difusión pasiva, la interacción con SR-B1 y la actividad de otros transportadores como ABCG1 y ABCG4 (Oram y Heinecke, 2005).

Esta proteína pertenece a la familia de proteínas ABC (por sus siglas en inglés ATP- binding cassette), que utilizan ATP para generar la energía necesaria para transportar metabolitos a través de membranas. Está formada por 2 mitades con estructura similar (Fitzgerald et al., 2001). Cada mitad tiene un dominio transmembranal con seis hélices y un dominio de unión a nucleótidos, que contiene 2 regiones peptídicas Walker A y Walker B conservadas en muchas proteínas que utilizan ATP, además de una región Walker C que es propia de las proteínas ABC (Figura 2). Se predice que el extremo amino terminal de la proteína ABCA1 está orientado hacia el citosol y

que existen 2 asas extracelulares grandes, altamente glicosiladas, unidas entre sí por uno o más enlaces entre residuos de cisteína (Bungert et al., 2001; Dean et al., 2001). En la célula, la proteína ABCA1 se encuentra predominantemente en forma de homodímeros ensamblados en el retículo endoplásmico, en los que los extremos C-terminales se encuentran muy próximos (Trompier et al., 2006). Estas estructuras diméricas pueden transformarse a estructuras de mayor orden como tetrámeros durante el ciclo catalítico de ATP de la proteína. Se ha sugerido que los tetrámeros de ABCA1 son la estructura funcional mínima requerida para la lipidiación de partículas de apoA-I (Denis et al., 2004).

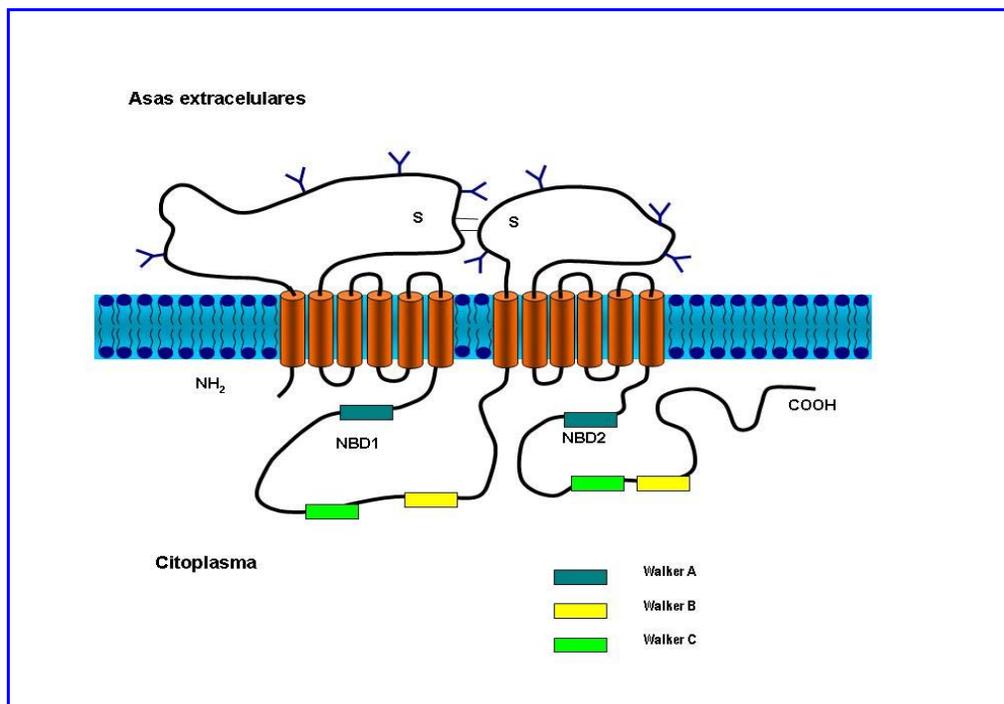


Figura 2: La proteína ABCA1 se encuentra formada por 2 mitades con estructura similar, cada una con un dominio transmembranal (compuesto por seis hélices indicadas en rojo) y un dominio de unión a nucleótidos (NBD por sus siglas en inglés "nucleotide binding fold"). Cada NBD contiene 2 regiones peptídicas llamadas Walker A y Walker B (conservadas en muchas proteínas que utilizan ATP) y una región Walker C que es propia de las proteínas ABC.

Recientemente, Vedhachalam et al. (2007) propusieron un modelo que integra los hallazgos experimentales de varios grupos, según el cual la interacción inicial de apoA-I con ABCA1 estabiliza a la proteína ABCA1 en la membrana plasmática. Esta estabilización activa la translocación de fosfolípidos por parte de ABCA1 hacia la capa externa de la membrana, creando una diferencia en la densidad de fosfolípidos en ambas capas de la misma. Esta diferencia de densidad crea tensión en la membrana, la cual forma dobleces y dominios lipídicos exovesiculados para relajar dicha tensión. Estas exovesiculaciones crean espacios entre los grupos polares de fosfolípidos por los que pueden penetrar las hélices α de las apolipoproteínas, permitiendo la unión de apoA-I a estos dominios con una alta afinidad. La acumulación de moléculas de apoA-I en los defectos formados por espacios en la superficie de la bicapa de lípidos causa desestabilización y rearrreglos en la membrana, llevando a la formación de complejos apoA-I/lípidos (HDL-C nacientes), proceso conocido como “solubilización” de la membrana. Las partículas de HDL discoidales formadas pueden tener 2, 3 ó 4 moléculas de apoA-I, diferentes tipos de fosfolípidos membranales y colesterol (Figura 3).

1.8 Regulación del Gen ABCA1

La regulación del gen y la proteína ABCA1 es un proceso tejido-específico muy complejo que aún no se entiende del todo. Esta regulación ocurre a diferentes niveles:

1) **Regulación de la Expresión.** La expresión de *ABCA1* está regulada por una red transcripcional altamente sofisticada, mediada en parte por diversos grupos de factores de transcripción como los PPAR (peroxisome proliferator-activated receptors), los receptores nucleares hepáticos ($LXR\alpha$ y $LXR\beta$) y el receptor nuclear retinoide (RXR) (Schmitz y Langmann, 2005). Se han encontrado transcritos alternativos, algunos de los cuales son inducidos por una dieta rica en grasas solamente en algunos tipos celulares (Singaraja et al., 2005). En algunos tejidos como el hígado existe evidencia de regulación tejido

específica, por la formación de dímeros de las proteínas LXR y SREBP2 que activan la transcripción de *ABCA1* (Tamehiro et al., 2007).

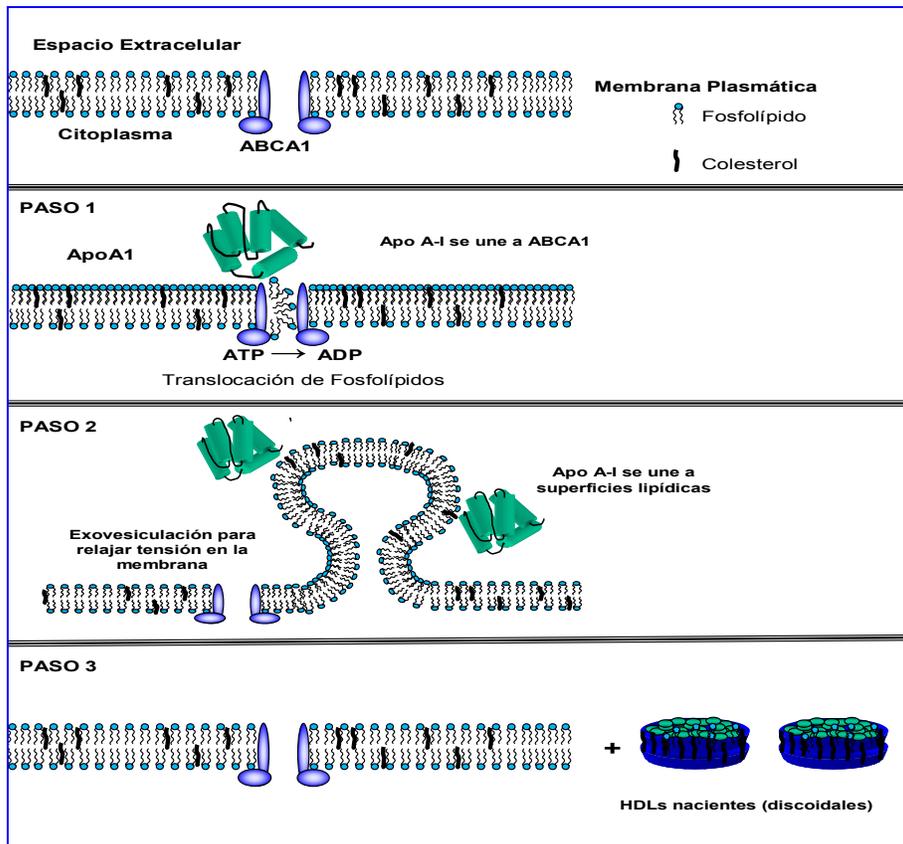


Figura 3: Formación de partículas de HDL por la acción de ABCA1. ApoA-I estabiliza a la proteína ABCA1 en la membrana plasmática, activando la translocación de fosfolípidos hacia la capa externa de la membrana. Esto causa una diferencia de densidad de fosfolípidos en las capas membranales (Paso 1). La tensión es relajada al formarse dominios lipídicos exovesiculados en la membrana, lo cual crea espacios entre los grupos polares de los fosfolípidos permitiendo la interacción de las α -hélices de las apolipoproteínas con los dominios lipídicos (Paso 2). La acumulación de moléculas de apoA-I en la bicapa de lípidos causa desestabilización y rearreglos en la membrana, que llevan a la formación de complejos apoA-I/lípidos (HDL-C nacientes), proceso conocido como "solubilización" de la membrana (Paso 3). (Figura modificada de Vedhachalam et al., 2007).

Una sobrecarga de colesterol en la célula induce la transcripción de *ABCA1* mediante la activación de los receptores nucleares hepáticos X ($LXR\alpha$ y/o $LXR\beta$) y el receptor nuclear retinoide X (RXR) (Costet et al., 2000; Schwartz et al., 2000). Las proteínas LXR y RXR forman heterodímeros obligados que se unen preferentemente a elementos de respuesta localizados en el promotor y el primer intrón de *ABCA1*. Los oxisteroles y el ácido retinoico se unen a LXR y RXR, respectivamente (Repa y Mangelsdorf, 1999). La unión de uno o ambos ligandos puede activar la transcripción. Otros metabolitos lipídicos también pueden modular la expresión de *ABCA1* a través del sistema LXR, como por ejemplo los ácidos grasos poliinsaturados que antagonizan la unión de oxisteroles a elementos de respuesta presentes en el gen *LXR\alpha*, potencialmente interfiriendo con el efecto inductor de los esteroides sobre *ABCA1* (Uehara et al., 2002).

2) Regulación Post-transcripcional. En ausencia de inductores de *ABCA1* y de apolipoproteínas, el RNAm y la proteína son rápidamente degradados (Wang y Oram, 2002). Existen muchos factores metabólicos que modulan la velocidad de degradación de la proteína *ABCA1* ya sea por el sistema de calpaínas o por otros procesos, entre ellos:

- Apolipoproteínas. La interacción con apolipoproteínas reduce drásticamente la velocidad de degradación de *ABCA1* (Wang et al., 2003). Esto funciona como un mecanismo de retroalimentación para aumentar los niveles de *ABCA1* cuando existen aceptores lipídicos disponibles.
- Ácidos grasos libres. Los ácidos grasos libres mono, di y poliinsaturados desestabilizan directamente a la proteína *ABCA1* en células en cultivo (Wang et al., 2004). Es probable que en la mayoría de las células con alto contenido de colesterol *in vivo* y donde la expresión de *ABCA1* es inducida por esteroides que activan a LXR, la exposición a ácidos grasos tanto saturados como insaturados disminuyan el flujo de colesterol al reducir los niveles de *ABCA1* (Wang y Oram 2002). Aparentemente, los

ácidos grasos afectan la estabilidad de ABCA1 a través de una vía de señalización mediada por la activación de la fosfolipasa D2 y la fosforilación de ABCA1 (Wang y Oram 2005).

- Colesterol libre. La acumulación de colesterol libre en el retículo endoplásmico induce apoptosis *in vitro* (Feng et al., 2003). Esta condición también desestabiliza la proteína ABCA1, posiblemente al incrementar su degradación por los proteosomas (Feng y Tabas, 2002). Por lo tanto, la disminución de la capacidad de ABCA1 para promover el eflujo de lípidos en los macrófagos podría potenciar los efectos dañinos del colesterol libre.
- Productos terminales de glucosilación avanzada. Estos productos son generados durante el metabolismo de la glucosa y la glucoxidación de proteínas, afectando de manera importante la función de ABCA1, probablemente al dañar a la proteína. En trastornos como la diabetes mellitus, estos productos se producen en exceso, pudiendo disminuir los niveles séricos de HDL-C en estos pacientes (Passarelli et al., 2005).

3) Regulación del recambio proteico. El recambio de ABCA1 podría ser un factor importante en la modulación de los niveles y la función de ABCA1. Esta proteína se recicla rápidamente entre la membrana plasmática y los compartimentos endosomales/lisosomales tardíos (Neufeld et al., 2001; 2004). Parece ser que la interacción de diferentes proteínas con el dominio carboxilo terminal de ABCA1 tiene un papel importante en este recambio. Estas proteínas forman complejos multiméricos que frecuentemente son mediadores de interacciones del citoesqueleto y de recambio proteico (Kim et al., 1995). Como ejemplo, la α 1-sintrofina se une a ABCA1, estabiliza la proteína y aumenta el eflujo de colesterol en células cultivadas (Munehira et al., 2004); mientras que la syntaxina 13 aparentemente estabiliza a la proteína ABCA1 al modular su transporte en vesículas (Bared et al., 2004).

I. 9 Función de ABCA1 en Diferentes Estirpes Celulares y Funciones In Vivo.

ABCA1 se expresa ampliamente en una gran variedad de tejidos, en donde podría tener muy diversas funciones que aún no se conocen. La función más conocida de *ABCA1* es la de promover el eflujo de colesterol y fosfolípidos a través de membranas, así como la formación de HDLs. Estudios en el modelo de ratón han mostrado que el intestino delgado y el hígado son los principales formadores de HDLs séricas, siendo ambos tejidos también sitios de producción de apoA-I. Sin embargo, aunque la función de *ABCA1* en macrófagos no contribuye a los niveles de HDL-C plasmáticos, es fundamental para evitar la formación de células espumosas y depósitos de colesterol en las arterias, previniendo la aterosclerosis y la cardiopatía isquémica. Recientemente se ha encontrado evidencia de que *ABCA1* participa en otros procesos muy diferentes, como la endocitosis, la apoptosis, el tráfico vesicular y muy recientemente en mecanismos de exocitosis de proteínas que carecen de secuencia señal en el extremo amino terminal (Hamon et al., 2000; 2006; Zha et al., 2003; Neufeld et al., 2004; Schmitz y Schambeck, 2006; Omer et al., 2006).

El análisis de los patrones de expresión muestra que existen varios tejidos con altos niveles de expresión de *ABCA1* que no parecen estar afectados en la enfermedad de Tangier, como el riñón y el pulmón (Oram y Heinecke, 2005). Es posible que en estos tipos celulares existan otras proteínas transportadoras que compensan la falta de función de *ABCA1*.

De esta manera, es bien conocida la función de *ABCA1* en algunos tipos celulares, mientras que en otros apenas se empieza a conocer. A continuación se describen hallazgos sobre la función de *ABCA1 in vivo* en algunos órganos y tejidos:

Hígado

En un modelo de ratón con inactivación del gen *ABCA1* exclusivamente en células hepáticas, los ratones *ABCA1^{-L-L}* presentaron niveles plasmáticos

de HDL-C de tan solo el 17% de los ratones controles, demostrando que el hígado es la fuente más importante de partículas de HDL en plasma. En este modelo también se demostró que el ABCA1 hepático es crítico para mantener la circulación de partículas de HDL maduras por lipidación directa de partículas de apoA-I con pobre contenido lipídico, evitando su catabolismo por el riñón y prolongando su vida media en plasma (Timmins et al., 2005).

Intestino

El intestino delgado es otra fuente importante de biogénesis de las HDL, aunque su contribución es menor a la del hígado. Otro estudio en un modelo de ratón con inactivación específica del gen *ABCA1* en el intestino, demostró que este órgano contribuye aproximadamente al 30% de las partículas de HDL en plasma (Brunham et al., 2006). Aunque inicialmente se pensó que en el enterocito ABCA1 contribuía a disminuir la absorción de colesterol de la dieta al transportar colesterol hacia el lumen intestinal, actualmente se sabe que esta función la cumplen las proteínas ABCG5 y ABCG8 (Graf et al., 2002; Lee et al., 2001). En células derivadas de intestino (Caco-2) se encontró que ABCA1 se localiza en la membrana basolateral, como ocurre con otras células polarizadas (Field et al., 2004; Iqbal et al., 2003; Ohama et al., 2002). En un modelo de gallina se observó que la ausencia de ABCA1 suprimió la secreción de colesterol del lado basolateral del intestino, pero no afectó la reducción de la absorción de colesterol inducida por agonistas LXR (Mulligan et al., 2003). Por lo tanto, parece que la función de ABCA1 en el enterocito es generar partículas de HDL que transportan el colesterol obtenido a través de la dieta hacia el hígado.

Macrófagos

Los macrófagos son “fagocitos profesionales”, engullendo a células muertas (con alto contenido de colesterol), lipoproteínas modificadas y otros detritus celulares (Rader y Pure, 2005), por lo que probablemente este tipo de células sea el interna la mayor cantidad de colesterol en un organismo. El

eflujo de colesterol de células de la pared arterial es el más relevante para prevenir el desarrollo de la aterosclerosis, ya que la falta de ABCA1 en macrófagos lleva a la acumulación de lípidos y la formación de células espumosas (Cuchel y Rader, 2006). Un hallazgo interesante es que los macrófagos carentes de ABCA1 también muestran una mayor respuesta a diversos factores quimiotácticos, indicando que la presencia de células espumosas en la pared arterial probablemente no sea el único mecanismo por el que la deficiencia de ABCA1 acelera la aterosclerosis (Francone et al., 2005).

Sistema Nervioso

Aproximadamente el 50% de los pacientes con enfermedad de Tangier sufre neuropatía (Serfaty-Lacrosniere et al., 1994), que puede ser de dos tipos: a) una neuropatía parecida a la siringomelia con pérdida progresiva de las funciones sensoriales y motoras de la parte superior del cuerpo; y b) neuropatía periférica, con pérdida remitente de las funciones sensoriales y/o motoras periféricas (Pollock et al., 1983; Pietrini et al., 1985). Las biopsias de nervio periférico en estos individuos muestran pérdida neuronal y acumulación de lípidos en las células de Schwann (Schröder, 2001).

ABCA1 se expresa en astrocitos y microglia (Kim et al., 2006), siendo particularmente abundante en células de Purkinje y en neuronas corticales piramidales (Wellington et al., 2002). En la glia, *ABCA1* facilita el eflujo de colesterol hacia apoA-I y apoE, la principal apolipoproteína en el cerebro. En modelos animales la deficiencia de *ABCA1* causa acumulación de lípidos tanto en astrocitos como en microglia, causando hipercatabolismo y disminución de los niveles de apoE en el cerebro (Wahrle et al., 2004). Por su papel en la homeostasis de lípidos y el metabolismo de apoE, diversos autores han buscado asociar polimorfismos del gen *ABCA1* con la enfermedad de Alzheimer, con resultados inconsistentes (Wavrant-De Vrieze et al., 2007;

Sundar et al., 2007; Kölsch et al., 2006; Rodríguez-Rodríguez et al., 2007; Li et al., 2004).

Plaquetas

Los pacientes con enfermedad de Tangier típicamente cursan con trombocitopenia (Assman et al., 2000) y sus plaquetas responden de manera diferente (mayor o menor) a diversos agentes agonistas en comparación con las plaquetas de individuos normales (Shastri et al., 1980; Vergani et al., 1984; Harmon et al., 1986). Los ratones knockout *ABCA1*^(-/-) presentan diátesis hemorrágica leve, así como anomalías visibles en el aparato de Golgi de las plaquetas (Orso et al., 2000). Recientemente se comprobó que las plaquetas de humanos expresan *ABCA1*, además de que la ausencia de esta proteína afecta la formación y liberación de cuerpos densos y disminuye la capacidad de respuesta de las plaquetas tanto a la colágena como a dosis bajas de trombina (Nofer et al., 2004). Parece que esta falla en la respuesta a la colágena se debe a una disfunción de los cuerpos densos, que afecta la liberación de agonistas de los gránulos delta durante el proceso de activación plaquetaria.

La proteína *ABCA1* interactúa con moduladores del tráfico vesicular como la syntaxina-13 y juega un papel en trastornos lisosomales como el síndrome de Chediak-Higashi. Se sabe que algunas mutaciones del gen *ABCA1* alteran la regulación del tráfico vesicular del compartimiento trans Golgi hacia la membrana plasmática (Schmitz y Schambeck, 2006). Resulta de particular interés el que un individuo con Síndrome de Scott (trastorno hemorrágico en donde las plaquetas no tienen capacidad de exponer fosfatidilserina en la cara externa de la membrana plasmática), presentaba una mutación en el gen *ABCA1* (R1295Q) en forma heterocigota (Albrecht et al., 2005). Puesto que la sobre-expresión del alelo normal complementó la exposición de fosfatidil-serina en linfocitos *in vitro*, se propuso que la mutación

contribuyó al fenotipo, pero que el paciente probablemente tenía una mutación en otro gen que actúa en esta vía.

Vesícula Biliar

La bilis es la principal ruta de eliminación del colesterol. Durante la fase interdigestiva, la bilis se concentra y puede quedar sobresaturada de colesterol favoreciendo la litiasis vesicular. Las células epiteliales de la vesícula biliar están expuestas a la bilis por su lado apical, mientras que expresan *ABCA1* en su membrana basolateral, permitiendo el eflujo de colesterol hacia dicho lado de la célula (Lee et al., 2002). Esto sugiere que en la vesícula biliar, *ABCA1* funciona para reducir el contenido de colesterol biliar evitando la formación de litos.

Pulmón

ABCA1 se expresa también en varios tipos celulares del pulmón. En los neumocitos tipo II, *ABCA1* es activado por la presencia de oxisterol y participa en el transporte basolateral del factor surfactante (Agassandian et al., 2004). Los ratones knockout (*ABCA1*^{-/-}) presentaron anomalías en la morfología del tejido pulmonar que aumentaron en frecuencia y severidad con la edad. Los neumocitos tipo II presentaron un aspecto espumoso, con cuerpos lamelares aberrantes y macrófagos intra-alveolares (McNeish et al., 2000). En otro estudio se observó que ratones con delección homocigota del gen *ABCA1* presentan patología focal del pulmón, anomalías en el contenido lipídico del surfactante y proteinosis alveolar (indicativo de la pérdida de la integridad de la membrana capilar alveolar). Estos ratones presentaron respiración superficial y taquipnea, lo cual contrasta con la falta de reportes de problemas respiratorios en pacientes con enfermedad de Tangier. Es probable que en el humano existan mecanismos de compensación en la homeostasis de lípidos en el pulmón (Bates et al., 2005).

Testículo

ABCA1 se expresa abundantemente en las células de Sertoli, de Leydig y en mucha menor cantidad en las células germinales. Los ratones con delección homocigota de *ABCA1* presentaron acumulación de lípidos en las células de Sertoli, y disminución de gotas con contenido lipídico (“lipid droplets”) en las células de Leydig a los 2 meses de edad. A los 6 meses presentaron niveles de testosterona intratesticular y cuentas espermáticas significativamente menores a los observados en ratones controles. Además, la fertilidad de los ratones *ABCA1*^(-/-) fue 21% menor a la de los controles (Selva et al., 2004). Así, *ABCA1* tiene una función importante en el transporte de lípidos en las células de Sertoli y en la fertilidad masculina en el ratón.

La infertilidad no es un dato clínico reportado en la enfermedad de Tangier, y varios estudios han reportado varones con enfermedad de Tangier que tienen descendencia (Bodzioch et al., 1999; Brooks-Wilson et al., 1999; Ishii et al., 2002; Hong et al., 2002). Sin embargo, no se sabe si estos individuos puedan desarrollar degeneración testicular y alteraciones en la espermatogénesis al aumentar la edad, como ocurre en el modelo de ratón (Selva et al., 2004).

Retina

ABCA1 y *APOA1* se expresan en la capa ganglionar, el epitelio pigmentario de la retina, en los segmentos internos de los bastones fotorreceptores del mono y en la retina neural humana (Tserentsoodol et al., 2006). Puesto que los lípidos oxidados, particularmente los oxisteroles, pueden ser altamente citotóxicos, se ha sugerido que al regular el transporte de lípidos y colesterol en las células del epitelio pigmentario de la retina, las HDL y apoA-I podrían estar involucradas en la acumulación patológica de lípidos que se asocia con la degeneración macular dependiente de la edad (Ishida et al., 2006). Recientemente se han asociado variantes alélicas de *APOE* y *ABCA1*

con la susceptibilidad a desarrollar degeneración macular dependiente de la edad (Lakkaraju et al., 2007).

Adipocito

Aunque hay evidencia de que la regulación de la expresión de *ABCA1* en el adipocito es tejido específica, se sabe poco sobre su función en este tipo celular. Le Lay et al., (2003) encontraron que el gen *ABCA1* es inducido de manera muy importante durante la diferenciación de pre-adipocitos 3T3-L1. Esta inducción no causó cambios en el contenido total de colesterol en la célula, pero sí causó un cambio en su distribución intracelular durante el proceso de diferenciación. Esto sugiere que el adipocito tiene poca capacidad para remover colesterol de la célula, y que probablemente funcione como una molécula de señalización en este tipo celular.

I. 10 Variabilidad del Gen *ABCA1*.

Si bien las mutaciones que suprimen la función del gen son raras, *ABCA1* es un gen con una gran cantidad de polimorfismos, reportándose hasta el momento más de 850 diferentes polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en el gen *ABCA1* humano. Múltiples estudios han buscado asociaciones de SNPs de *ABCA1* con los niveles de HDL-C y/o la presencia de aterosclerosis en diferentes poblaciones con resultados inconsistentes (Cenarro et al. 2003; Evans et al., 2003; Singaraja et al., 2003; Harada et al., 2003; Tan et al., 2003; Srinivasan et al., 2003; Shioji et al., 2004; Tregouet et al., 2004; Yamakawa-Kobayashi et al., 2004; Benton et al., 2007). Hasta el momento, solamente 2 estudios han analizado los efectos funcionales de diferentes SNPs *in vitro* (Brunham et al., 2005; Kyriakou et al., 2007), demostrando que las variantes I883M y S1731C disminuyen significativamente el eflujo de colesterol, mientras que los SNPs V771M y V825I parecen incrementarlo. Llama la atención que una de las variantes más frecuentes y más estudiadas (R219K), asociada a niveles más altos de HDL en una gran cantidad de estudios, no mostró

diferencia alguna en el porcentaje de eflujo de colesterol en comparación con el alelo silvestre.

Recientemente se ha utilizado otra estrategia que intenta identificar posibles SNPs funcionales, secuenciando las regiones del promotor proximal y codificadoras de algunos genes candidatos en individuos con fenotipos extremos, esto es, en individuos con los niveles más altos y más bajos de HDL en una población (Cohen et al., 2004; Frikke-Schmidt et al., 2004; Probst et al., 2005). Utilizando esta estrategia, se encontró que aproximadamente el 10% de los individuos con niveles bajos de HDL son heterocigotos para diferentes mutaciones del gen *ABCA1*. En conjunto, varios autores han concluido que tanto las mutaciones como los SNPs del gen *ABCA1* contribuyen a la variación de los niveles de HDL y apoA-I en las poblaciones estudiadas. Sin embargo, los SNPs que se asocian a menores niveles de HDL tienen una frecuencia muy baja (< 1%).

Hasta el momento, las bases genómicas que regulan los niveles séricos de HDL y la variabilidad del gen *ABCA1* no se han estudiado en la población mexicana. Sería de gran ayuda entender las bases genéticas del metabolismo de los lípidos en nuestra población, para poder estudiar después posibles interacciones gen-ambiente, asociaciones con otros rasgos metabólicos e investigar la relación de diferentes SNPs con la respuesta terapéutica a fármacos utilizados para tratar dislipidemias.

II. JUSTIFICACIÓN

La hipo α -lipoproteinemia es la dislipidemia más frecuente en la población mexicana, presente en alrededor del 50% de la población adulta. Esta dislipidemia es un factor de riesgo importante para desarrollar aterosclerosis y cardiopatía isquémica, enfermedades que están entre las primeras causas de mortalidad en México. En cambio, el factor independiente más poderoso de protección para la cardiopatía isquémica es presentar niveles plasmáticos altos de HDL.

Las bases genómicas de la regulación de los niveles de HDL en la población mexicana no han sido estudiadas. Entender dichas bases podría ayudar a identificar individuos susceptibles a desarrollar dislipidemia y cardiopatía isquémica en los que podrían implementarse medidas preventivas oportunas.

III. OBJETIVOS

III. 1 Objetivo General

Identificar variantes de secuencia del gen *ABCA1* que puedan afectar los niveles plasmáticos de HDL en individuos mexicanos.

III. 2 Objetivos Particulares

1. Identificar SNPs no sinónimos con posible repercusión funcional que pudieran contribuir significativamente a la modulación de los niveles séricos de HDL en los pacientes mexicanos, secuenciando la región promotora y los 10 primeros exones del gen *ABCA1* en individuos con hipo e hiper α -lipoproteinemia (fenotipos extremos).

2. Determinar y comparar las frecuencias de los SNPs identificados en ambos grupos.
3. Predecir la probabilidad de que los SNPs no sinónimos encontrados tengan repercusión funcional en la proteína mediante programas informáticos.
4. Determinar la frecuencia de las variantes encontradas en una muestra de la población mestiza mexicana para establecer su relevancia epidemiológica.
5. Comprobar el posible efecto de las variantes encontradas en los niveles plasmáticos de HDL-C.
6. Buscar posibles asociaciones estadísticas de las variantes encontradas con otros rasgos metabólicos.
7. Determinar la frecuencia de las variantes encontradas en algunas poblaciones indígenas de México.

IV. HIPÓTESIS

Si existen variantes funcionales en el gen *ABCA1* que afectan los niveles de HDL en la población mexicana, estos deberán encontrarse en los individuos con fenotipos extremos. Dada la diversidad de funciones de la *ABCA1* en diferentes tejidos, las variantes funcionales podrían afectar a su vez otros rasgos metabólicos.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

Este proyecto fue aprobado por el Comité Institucional de Investigación Biomédica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (INCMNSZ), y todos los participantes dieron su consentimiento informado por escrito.

V.1 Individuos

a) *Fenotipos Extremos (Individuos con los niveles plasmáticos más altos y más bajos de HDL en la población).*

La población inicial consistió en 2 grupos de individuos mestizos mexicanos no emparentados, seleccionados entre aquellos que acudieron al Laboratorio de Endocrinología del INCMNSZ para estudio de perfil lipídico entre enero del 2005 y junio del 2006. El grupo con niveles bajos de HDL comprendió a 40 individuos (22 mujeres y 18 hombres) con niveles de HDL por debajo de la percentila 10 de acuerdo a edad y género para la población mexicana (Aguilar-Salinas et al., 2001). Los criterios de exclusión para este grupo incluyeron cualquier enfermedad o rasgo metabólico asociado con niveles plasmáticos bajos de HDL como diabetes mellitus tipo 2, hipertrigliceridemia (niveles de TG > 150 mg/dL), obesidad (índice de masa corporal > 30 Kg/m²), tabaquismo, uso de fármacos hipolipemiantes, nefropatía, hepatopatía y disfunción tiroidea. El grupo de individuos con niveles altos de HDL comprendió a 34 individuos (19 mujeres y 15 hombres) cuyos niveles de HDL se encontraron por arriba de la percentila 90 de acuerdo a edad y género para la población mexicana (Aguilar-Salinas et al., 2001), excluyendo a aquellos que presentaran alcoholismo, nefropatía, trastornos tiroideos o que estuvieran bajo tratamiento con esteroides.

b) *Población Mestiza Mexicana del Distrito Federal*

Este grupo comprendió 429 individuos no emparentados, nacidos en México, cuyos padres y abuelos se identificaban como mestizos mexicanos, y

que laboraban en 4 diferentes instituciones del Distrito Federal (Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” y el INCMNSZ). Para el análisis de la asociación con el síndrome metabólico, se incluyeron 86 individuos más con este diagnóstico, reclutados del Departamento de Endocrinología del INCMNSZ.

Se utilizó un cuestionario para obtener información sobre el nivel socioeconómico y educativo, así como los antecedentes personales patológicos y no patológicos. La exploración física incluyó medición de peso, talla, cintura, cadera y presión arterial con baumanómetro. Se calculó el índice de masa corporal (IMC) dividiendo el peso en kilogramos entre la talla en metros elevada al cuadrado ($IMC = \text{peso}/\text{talla}^2$). Se definió como obesidad a un $IMC \geq 30 \text{ Kg/m}^2$, y como sobrepeso a un $IMC \geq 25 \text{ Kg/m}^2$ pero $<30 \text{ Kg/m}^2$. Los pacientes con presión arterial diastólica $>140 \text{ mmHg}$ y/o presión arterial diastólica $>90 \text{ mmHg}$, o bien bajo tratamiento con fármacos antihipertensivos fueron considerados como hipertensos (World Health Organization, 1999).

c) Poblaciones Indígenas de México

Se estudiaron un total de 267 individuos pertenecientes a grupos indígenas de México: 37 yaquis (Sonora), 67 teneek (San Luis Potosí), 88 mazahuas (Estado de México), 35 purépechas (Michoacán) y 40 mayas (Yucatán). Todos nacieron y viven en sus comunidades y hablan su lengua nativa, al igual que sus padres y abuelos. Las muestras de sangre de estos individuos fueron tomadas con la autorización de las autoridades locales y con la ayuda de un traductor para el consentimiento informado.

A todos los individuos participantes se les tomó una muestra de 20 ml de sangre periférica después de un ayuno de 12 horas para medir parámetros

bioquímicos y extraer DNA genómico. En los individuos con fenotipos extremos la muestra de sangre fue de 35 ml para extraer además RNA total.

V.2 Parámetros Bioquímicos

Todas las mediciones bioquímicas se realizaron en el Departamento de Endocrinología y Metabolismo de Lípidos del IMCMNSZ utilizando procedimientos estandarizados y reactivos comerciales. La glucosa sérica se midió utilizando el método de la glucosa oxidasa. Los niveles plasmáticos de colesterol total (CT) y triglicéridos (TG) se midieron a través de métodos enzimáticos (Boehringer-Mannheim); los niveles plasmáticos de HDL se midieron usando ácido fosfotúngstico y Mg^{2+} ; los niveles plasmáticos de insulina se midieron por radioinmunoensayo, y los niveles de apoA-I y apoB se midieron con un kit comercial (Beckman). Se calculó el modelo de homeostasis para evaluar resistencia a la insulina (HOMA-IR), a partir de las mediciones de glucosa (mmol/mL) e insulina (mU/mL) en ayunas de acuerdo con la fórmula reportada por Matthews et al. (1985), como sigue:

$$\text{Resistencia a la insulina (\%IR)} = \text{insulina} \times \text{glucosa} / 22.5$$

$$\text{Función de la célula } \beta \text{ (\%}\beta\text{)} = (20 \times \text{insulina}) / (\text{glucosa} - 3.5)$$

De acuerdo con los criterios de la Organización Mundial de la Salud, con estas mediciones se diagnosticó diabetes mellitus tipo 2 a todos aquellos individuos con glucemia en ayunas ≥ 126 mg/dL, (Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2003). Con base en estas mediciones y la exploración física se diagnosticó síndrome metabólico (SM) utilizando 2 diferentes criterios (Tabla 1): 1) "National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults" (Adult Treatment Panel III [ATP-III]) (Grundy et al., 2004), por la presencia de al menos 3 de los siguientes rasgos: cintura >102 cm en hombres o >88 cm en mujeres; TG ≥ 150 mg/dl o tratamiento hipolipemiente,

HDL <40mg/dl en hombres o <50 mg/dl en mujeres; presión arterial sistémica \geq 130/85 mmHg o tratamiento antihipertensivo; y glucemia en ayunas \geq 100 mg/dl o tratamiento médico para la diabetes mellitus. 2) “International Diabetes Federation” (IDF) (Alberti et al., 2005), que utiliza los mismos criterios excepto para la cintura, en donde los puntos de corte se establecen de acuerdo al grupo étnico, sugiriéndose que para los latinoamericanos se utilicen los puntos de corte establecidos para asiáticos (>90 cm en hombres y > 80 cm en mujeres).

V.3 Extracción de Ácidos Nucleicos

Se extrajo DNA genómico utilizando el método de sal-cloroformo (Buffone, 1985). Se aisló RNA total de los individuos con fenotipos extremos a partir de monocitos de sangre periférica mediante centrifugación en gradiente con ficoll-Hypaque (Berthold, 1981). El paquete de mononucleares fue utilizado para aislar RNA total mediante el sistema de columna con un kit comercial (Rneasy minikit, QIAGEN), cuya calidad fue verificada en gel de agarosa al 1%.

V. 4 Obtención de DNA complementario (DNAc) y Amplificación de fragmentos de la región codificadora del gen ABCA1.

Se obtuvo DNAc a partir de RNA total utilizando un kit comercial (GeneAmp® RNA PCR Kit and Core Kit, Applied Biosystems), que utiliza la transcriptasa reversa del virus Moloney de la leucemia murina (MuLV), utilizando la mezcla de hexámeros como oligonucleótidos iniciadores.

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar la secuencia codificante del gen *ABCA1* a partir de DNAc en 13 amplicones y se utilizaron los primeros 2 pares de oligonucleótidos para amplificar los exones 1 al 9, utilizando reactivos comerciales de acuerdo al protocolo descrito (AmpliAq Gold® DNA Polymerase, GeneAmp®, Applied Biosystems). La amplificación consistió de los siguientes pasos:

- | | | |
|------------------------------|-------------------|----------------------------|
| 1. Desnaturalización inicial | | 94°C por 10 minutos |
| 2. 25 ciclos | Desnaturalización | 94°C por 1 minuto |
| | Alineación | 50°C por 45 segundos |
| | Extensión | 72°C por 1 min 30 segundos |
| 3. Extensión final | | 72°C por 10 minutos |

El tamaño esperado de los amplicones se verificó en gel de agarosa (2.5%) y fueron purificados por el método de columna con membrana, utilizando un kit comercial (QIAquick PCR purification kit, QIAGEN). El tamaño de los productos purificados fue verificado nuevamente en geles de agarosa al 2.5%.

Tabla 1. Criterios de la ATP-III para el síndrome metabólico.

1. Obesidad central	Cintura > 102cm en hombres, >88 cm en mujeres.
2. Niveles bajos de HDL-C	HDL-C < 40 mg/dl en hombres, < 50 mg/dl en mujeres.
3. Hipertrigliceridemia	Triglicéridos séricos \geq 150 mg/dl.
4. Hipertensión arterial	Presión arterial \geq 138/85 o uso de medicamentos antihipertensivos.
5. Glucosa plasmática en ayuno	Glucemia \geq 100 mg/dl o uso de hipoglucemiantes.

La presencia de al menos 3 de estos criterios en un individuo es diagnóstico de Síndrome Metabólico (Grundy et al., 2004).

V. 5 Secuenciación de los primeros 9 exones del gen ABCA1

Los amplicones purificados fueron reamplificados en una reacción de secuenciación utilizando oligonucleótidos iniciadores sentido (forward) y antisentido (reverse), liofilizados y resuspendidos en formaldehído para correr en un secuenciador automático ABI-3100 (ABI PRISM BigDye Terminators versión 3.1). Las secuencias se analizaron con el programa Bioedit (<http://www.mbio.ncsu.edu/RNaseP/info/programs/BIOEDIT/bioedit.htm>).

V.6 Genotipificación de la Variante R230C en la Población Mestiza Mexicana

Se genotipificó la variante R230C por ensayos de PCR tiempo real con sondas Taqman y ensayo de discriminación alélica en las poblaciones indígenas y mestiza mexicana, utilizando un sistema ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems).

V. 7 Genotipificación de Marcadores Ancestrales Informativos (AIMs)

Se seleccionó un panel de 10 AIMs que distinguen principalmente las ancestrías indígena de América y europea (rs4884, rs2695, rs17203, rs2862, rs3340, rs722098, rs203096, rs223830, rs281478 y rs1800498) por ser los marcadores más informativos y tener las mayores diferencias ($\delta > 0.44$) en frecuencias en las poblaciones ancestrales mencionadas (Bonilla et al., 2004; Choudhry et al., 2006). Estos 10 AIMs fueron genotipificados en individuos con fenotipos extremos y en la población mestiza mexicana, por la compañía Kbiosciences (Hertfordshire, U.K.), que utiliza el sistema KASPar (www.kbioscience.co.uk). Este es un nuevo sistema de genotipificación alelo-específico por PCR con patente en trámite, que permitió identificar el genotipo en más del 95% de las muestras enviadas, sin observar genotipos discordantes al correr por duplicado a 47 de estas muestras.

V.8 Análisis Estadístico

Se utilizó el paquete estadístico SPSS v10.0 (SPSS Chicago, Il) para el análisis de resultados. Se calcularon medias \pm desviación estándar y frecuencias de los parámetros basales de los individuos participantes. Puesto que los niveles de TG e insulina, así como los índices HOMA-IR no mostraron una distribución normal, se utilizaron los logaritmos naturales para el análisis, aunque en las tablas de resultados se presentan las medias geométricas. Se utilizó el análisis de covarianza para construir un modelo para el análisis de rasgos cuantitativos, tomando como factor fijo el genotipo y utilizando como covariables la edad, género, tabaquismo, nivel educativo, IMC, niveles de TG, HDL-C, apo A-I y DMT2 (GLM Univariate).

Para evaluar el efecto de una posible estratificación poblacional en las asociaciones encontradas con obesidad, SM y DMT2, se utilizó el programa ADMIXMAP (Hoggart et al., 2003; 2004). Este programa utiliza un modelo de regresión logística para analizar un rasgo de acuerdo al mestizaje individual, pudiendo incluir el ajuste por covariables como edad, género, IMC, HDL, apoA-I y otros factores potencialmente confusores. Puesto que la población mexicana es el resultado del mestizaje de las poblaciones indígena y española (la contribución de la población africana fue pequeña) (Gorodezky et al., 2001; Lisker et al., 1990), para el análisis se utilizaron frecuencias alélicas de marcadores ancestrales previamente reportadas para estas dos poblaciones (Bonilla et al., 2004; Choudhry et al., 2006).

Se utilizó la prueba de X^2 para analizar el equilibrio de Hardy-Weinberg y las diferencias entre las frecuencias genotípicas y alélicas encontradas en las poblaciones analizadas. Se consideró como nivel de significancia estadística $P < 0.05$.

VI. RESULTADOS

V.1 Secuenciación Parcial del Gen ABCA1 en Individuos con Fenotipos Extremos.

Se observaron 3 polimorfismos con una frecuencia mayor al 1% en estas poblaciones (Tabla 2). Uno de ellos es un cambio de una guanina (G) por una adenina (A) en la posición 969 del transcrito que da por resultado el cambio de una arginina (R) por una lisina (K) en la posición 219 de la proteína (R219K). El segundo es un cambio de una A por una G en la posición 787 del transcrito, que no produce un cambio de aminoácido en la proteína (L158L) (Figura 4). Ambos polimorfismos se habían reportado previamente, se encuentran en desequilibrio de ligamiento y sus frecuencias no mostraron diferencias significativas en ambos grupos (hipo e hiper α -lipoproteinemia).

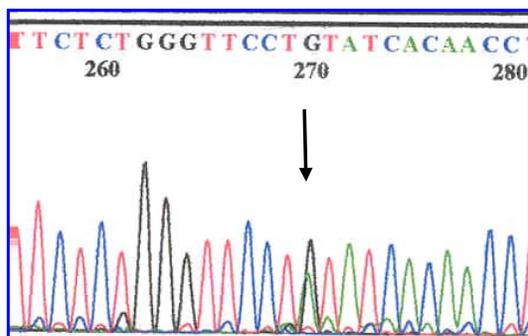


Figura 4: Electroferograma de un individuo heterocigoto para la variante R219K. La flecha indica la presencia de 2 nucleótidos diferentes en la posición 970 del transcrito. La curva negra indica la presencia de guanina en un alelo, y la curva verde superpuesta indica la presencia de adenina en el otro alelo. El cambio de adenina por guanina produce un cambio del aminoácido arginina (R) por el aminoácido lisina (K) en la posición 219 de la proteína ABCA1.

De manera interesante, se observó un cambio de una citosina por una timina en la posición 1001 del transcrito, que origina un cambio de una arginina (R) por una cisteína (C) en la posición 230 de la proteína (R230C; Figura 5). Este cambio se había reportado previamente como una mutación causal de hipoc-lipoproteinemia familiar y no como un SNP. A diferencia de las otras variantes encontradas, la variante R230C fue significativamente más frecuente en el grupo de hipoc-lipoproteinemia, ya que 18 individuos (45%) portaban el cambio (15 heterocigotos y 3 homocigotos), mientras que en el grupo de hiperclipoproteinemia solamente un individuo (2.9%) portaba el cambio en forma heterocigota ($p=0.00006$; Tabla 2). Así, la frecuencia alélica de la variante R230C fue significativamente más alta (26.2%) en el grupo de HDL-C bajo, que en el de HDL-C alto (1.5%; $p=0.00002$). Esta diferencia no perdió su significancia estadística aún después de ajustar por mezcla étnica ($p=0.0005$).

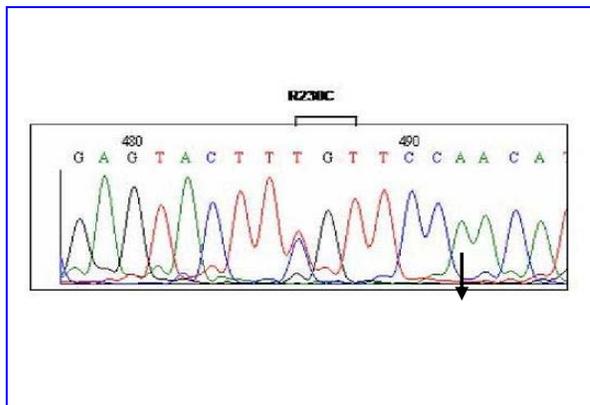


Figura 5: Electroferograma de un individuo heterocigoto para la variante R230C. La flecha indica la presencia de 2 nucleótidos diferentes en la posición 1001 del transcrito. La curva azul indica la presencia de citosina en un alelo, y la curva roja superpuesta indica la presencia de timina en el otro alelo. El cambio de citosina por timina produce el cambio del aminoácido arginina (R) por el aminoácido cisteína (C) en la posición 230 de la proteína ABCA1.

Tabla 2. Frecuencia de las variantes R219K y R230C del gen *ABCA1* en individuos mexicanos con hipo e hiper α -lipoproteinemia.

Genotipo	HDL-C < percentila 10 n (%)	HDL > percentila 90 n (%)	P
R219R	10 (62.5)	5 (55.6)	NS
R219K/K219K	6 (37.5)	4 (44.4)	-
R230R	22 (55.0)	33 (97.1)	-
R230C/C230C	18 (45.0)	1 (2.90)	0.00006

VI. 2 Genotipificación de la Variante R230C en la Población Mestiza-Mexicana.

Fue posible genotipificar el 100% de los individuos con el ensayo de sondas Taqman (Figura 6). Con el fin de confirmar estos resultados se secuenciaron todos los homocigotos C230C, así como 10 heterocigotos R230C y 10 homocigotos R230R, coincidiendo el genotipo por ambos métodos en el 100% de los casos. El análisis por sondas Taqman en 429 mestizos mexicanos mostró que 78 de estos individuos son heterocigotos R230C (18.2%) y 8 son homocigotos C230C (1.9%); el 20.1% de la población analizada porta la variante y la frecuencia alélica fue del 10.9%.

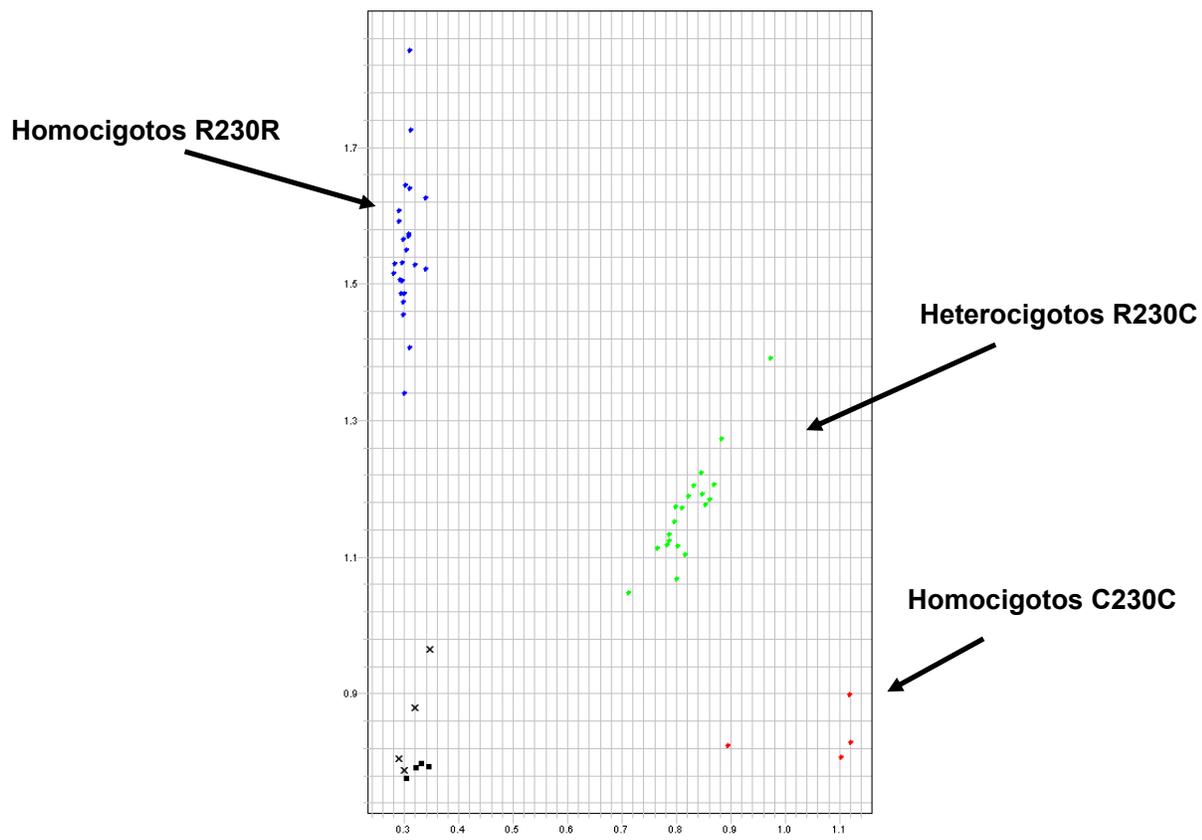


Figura 6: Genotipificación de la variante R230C del gen *ABCA1* por sondas Taqman. La sonda complementaria al alelo “R” está marcada con el fluoróforo VIC, cuya fluorescencia se graficó en el eje de las “Y”. La sonda complementaria al alelo “C” está marcada con el fluoróforo FAM, cuya fluorescencia se graficó en el eje de las “X”. Cada punto representa una muestra; los homocigotos R230R aparecen como un punto azul (sólo fluoresce VIC), los homocigotos C230C como un punto rojo (sólo fluoresce FAM), y los heterocigotos R230C que emiten ambos tipos de fluorescencia aparecen como un punto verde. Los cuadros negros representan controles negativos y las “X” representan muestras que no amplificaron en la reacción.

VI. 3 Asociación de R230C con niveles de HDL/ApoA-I y el IMC

Los parámetros antropométricos y bioquímicos de los individuos de acuerdo a su genotipo se muestran en la Tabla 3. Puesto que sólo se encontraron 8 homocigotos C230C, se hizo el análisis bajo un modelo dominante, donde se compararon los individuos con la variante (genotipos R230C/C230C) con individuos sin la variante (genotipo R230R). Los individuos con genotipos R230C/C230C presentaron niveles de HDL-C y ApoA-I significativamente más bajos (44.4 ± 11.1 y 131.9 ± 24.4 mg/dl, respectivamente) que aquellos con el genotipo R230R (48.7 ± 13.8 y 141.1 ± 23.8 mg/dl, $P = 0.024$ y 0.001 , respectivamente). De manera interesante, los promedios de IMC y de cintura fueron mayores en los individuos con genotipos R230C/C230C (29.3 ± 6.4 kg/m² y 93.1 ± 14.5 cm respectivamente) que en los sujetos R230R (27.1 ± 5.3 y 90.1 ± 13.1 cm, $P = 0.005$ y 0.048 , respectivamente). En esta población se observó la bien conocida correlación inversa entre el IMC y los niveles de HDL-colesterol y apoA-I. Puesto que ambos parámetros mostraron asociación con la presencia de la variante R230C en nuestra población, se decidió ajustar los cálculos de todos los demás parámetros de acuerdo con los niveles séricos de HDL-C y apoA-I. Al ajustar conforme a los niveles de HDL-C, la asociación con mayor cintura perdió su significancia ($P = 0.182$), sin embargo la asociación con mayor IMC siguió siendo significativa ($P = 0.019$). Además, al analizar únicamente a aquellos individuos con niveles de apoA-I mayores de 130 mg/dl (niveles promedio de apoA-I en los portadores de la variante R230C), la asociación de la variante con mayor IMC no perdió su significancia ($P = 0.018$).

VI. 4 Asociación de R230C con Obesidad, Síndrome Metabólico y DMT2

La Tabla 4 muestra que la frecuencia de los genotipos R230C/C230C fue más alta en individuos obesos que en los no obesos (IMC < 25 Kg/m²), encontrándose una asociación estadísticamente significativa con la obesidad, que fue independiente de la edad, género, tabaquismo, nivel educativo, DMT2 y

niveles de HDL-C y apoA-I [razón de momios (RM) = 2.527, IC 95%: 1.667–3.819, $P = 0.005$]. Esta asociación no perdió su significancia aún después de ajustar por mestizaje (RM = 2.428, IC 95%: 1.541 –3.706, $P = 0.011$). Cabe notar que los niveles séricos de HDL-C y apoA-I no mostraron diferencias estadísticamente significativas en los individuos obesos con genotipos R230C/C230C y los obesos R230R (42.9 ± 10.3 y 134.9 ± 20.3 mg/dl vs. 43.7 ± 8.5 y 135.7 ± 27.2 mg/dl, $P = 0.380$ y 0.242 , respectivamente).

Puesto que la variante R230C del gen *ABCA1* mostró asociación con menores niveles de HDL-C y con obesidad, dos de los criterios para el diagnóstico de síndrome metabólico, se decidió evaluar si existe una asociación con dicho síndrome. Efectivamente, los genotipos R230C/C230C fueron significativamente más frecuentes en los individuos con diagnóstico de síndrome metabólico que en los que no lo tenían, tanto bajo los criterios de la ATP-III (RM = 1.893, IC 95%: 1.483–2.460, $P = 0.0007$), como los de la IDF (RM = 1.775, IC 95%: 1.370 –2.336, $P = 0.003$). Las asociaciones bajo ambos criterios (ATP-III e IDF) no perdieron significancia estadística después de ajustar por mestizaje (RM = 1.833, IC 95%: 1.405–2.425, $P = 0.001$; y RM = 1.745, IC 95%: 1.328 –2.298, $P = 0.005$, respectivamente).

Por otro lado, se observó que la frecuencia de los genotipos R230C/C230C fue más alta en los individuos con diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2 que en la población general, por lo que se comparó la distribución de los genotipos en individuos diabéticos y no diabéticos. Puesto que la edad promedio al momento de diagnóstico de DMT2 fue de 44.7 ± 9.75 años, seleccionamos como controles únicamente a individuos no diabéticos mayores de 50 años. Así, los genotipos R230C/C230C fueron significativamente más frecuentes en los sujetos diabéticos que en los controles (41.2 vs. 11.2%), observándose que estos genotipos confieren un riesgo 4.527 veces mayor de desarrollar diabetes (IC 95%: 2.474 – 8.499, $P = 0.003$, ajustado por género, IMC, niveles de HDL-C, apoA-I, y nivel educativo). Esta asociación no perdió su

significancia aún después de ajustar por mezcla étnica ($P = 0.006$). Además, el IMC fue significativamente más alto en diabéticos con la variante R230C que en los diabéticos sin dicha variante (32.3 ± 4.8 vs. 27.8 ± 5.1 Kg/m², $P = 0.048$), aunque los niveles séricos de HDL y apoA-I no mostraron diferencias significativas entre estos grupos ($P = 0.262$ y 0.082 , respectivamente).

VI. 5 Frecuencias Alélicas y Genotípicas en Poblaciones Indígenas de México.

La Tabla 5 muestra las frecuencias del alelo R230C y de sus genotipos en las poblaciones indígenas estudiadas y en la población mestiza de la Ciudad de México. La frecuencia del alelo C230 fue significativamente más alta en los yaquis (0.203), teenek (0.179), purépechas (0.214) y mayas (0.288) en comparación con la población mestiza mexicana (0.109; $P < 0.02$). Los mazahuas en cambio presentaron una frecuencia alélica 230C muy similar a la encontrada en mestizos mexicanos de la Ciudad de México (0.097).

VI. 6 Equilibrio de Hardy-Weinberg.

Las frecuencias observadas de los genotipos R230R, R230C y C230C estuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg en todos los grupos analizados, excepto en los yaquis, donde se observó un exceso de homocigotos.

Tabla 3. Comparación de los parámetros antropométricos y bioquímicos en mestizos mexicanos de la Ciudad de México de acuerdo a la presencia de la variante R230C del gen *ABCA1*.

Característica	R230R	R230C	C230C	R230C/C230C	P*
Número (429)	343	78	8	86	
Sujetos masculinos (%)	37.0	34.7	0.0	31.5	
Edad (años)	40.1 ± 12.8	39.9 ± 10.1	44.4 ± 13.9	40.2 ± 10.5	NS
Tabaquismo (%)	26.3	28.5	28.6	28.4	NS**
IMC (kg/m ²)	27.1 ± 5.3	28.9 ± 6.5	33.2 ± 3.8	29.3 ± 6.4	0.003
Cintura (cm)	90.1 ± 13.1	92.5 ± 14.5	100.6 ± 12.9	93.1 ± 14.5	0.045
Obesidad (%)	38.5	0.553	87.5	64.8	0.003**
Diabetes mellitus (%)	5.8	0.141	37.5	16.3	0.003**
Hipertensión (%)	7.5	0.120	37.5	14.5	NS
PAS (m mmHg)	119.4 ± 18.9	118.8 ± 15.0	126.9 ± 19.8	119.6 ± 15.6	NS
PAD (mmHg)	79.3 ± 10.4	79.8 ± 11.6	81.9 ± 13.6	80.0 ± 11.7	NS
Glucosa (mg/dl)	97.3 ± 33.7	102.7 ± 39.7	127.6 ± 70.5	105.0 ± 43.5	NS
Insulina (μU/ml)	10.5 ± 7.6	10.9 ± 6.7	19.2 ± 16.3	11.6 ± 8.0	NS
HOMA-IR	1.88	2.23	4.30	2.30	NS***
Colesterol (mg/dl)	211.0 ± 42.9	207.5 ± 42.0	205.0 ± 32.7	207.2 ± 41.1	NS
Triglicéridos (mg/dl)	184.7 ± 140.6	189.7 ± 146.3	205.4 ± 94.7	191.2 ± 141.9	NS
HDL-C (mg/dl)	48.7 ± 13.8	44.2 ± 10.9	43.9 ± 7.14	44.4 ± 11.1	0.030
ApoA-I (mg/dl)	141.1 ± 23.8	130.5 ± 20.5	132.6 ± 18.4	131.9 ± 24.4	0.003
Apo B (mg/dl)	112.7 ± 28.9	112.9 ± 28.9	114.1 ± 21.7	112.9 ± 28.3	NS

Los datos presentados representan la media ± desviación estándar, excepto HOMA-IR donde se presenta la mediana. *P comparando los genotipos 230C/C230C vs. R230R, ajustado por edad, género, IMC niveles de triglicéridos, tabaquismo y nivel educativo; ** Prueba de χ^2 . *** U de Mann-Whitney. PAS: presión arterial sistólica, PAD: presión arterial diastólica; HOMA-IR, modelo de homeostasis para evaluar resistencia a la insulina.

Tabla 4. Asociación de la variante R230C del gen *ABCA1* con obesidad, síndrome metabólico y diabetes mellitus tipo 2.

Trastorno Metabólico	Genotipo		RM	P
	R230R n (%)	R230C/C230C n (%)		
Obesos	84 (71.2)	34 (28.8)	2.527	0.005*
No obesos	139 (86.8)	21 (13.2)	-	
Individuos con SM [§]	143 (73.7)	51 (26.3)	1.893	0.0007**
Individuos sin SM	268 (84.8)	48 (15.2)	-	
Diabéticos	20 (59.8)	14 (41.2)	4.527	0.003***
No diabéticos	79 (89.8)	9 (11.2)	-	

* Valor de *P* ajustado por edad, género, tabaquismo, niveles de HDL-C, ApoA-I, nivel educativo y diabetes mellitus tipo 2; **valor de *P* ajustado por edad, género, tabaquismo y nivel educativo; [§]De acuerdo a los criterios de la ATP-III; *** valor de *P* ajustado por edad, género, IMC, HDL-C, apoA-I y nivel educativo. Las asociaciones no perdieron su significancia al ajustar por mezcla étnica (*P* = 0.011, 0.001 y 0.006 para obesidad, síndrome metabólico y diabetes mellitus tipo 2 respectivamente.)

Tabla 5. Frecuencias alélicas y genotípicas de la variante R230C en diferentes poblaciones indígenas de México.

Población	Genotipo			Alelo		P*
	R230R	R230C	C230C	R230	C230	
Yaqui (n=37)	0.703	0.189	0.108	0.797	0.203	0.013
Teneek (n=67)	0.671	0.299	0.030	0.821	0.179	0.015
Mazahua (n=88)	0.818	0.170	0.011	0.903	0.097	NS
Purépecha (n=35)	0.629	0.314	0.057	0.786	0.214	0.007
Maya (n=40)	0.450	0.525	0.025	0.718	0.288	0.000001
Mestiza (n=429)	0.799	0.182	0.019	0.891	0.109	--

*Significancia estadística al comparar con la población mestiza mexicana.

VII. DISCUSIÓN

Desde hace tiempo se conoce el papel de la proteína ABCA1 en el transporte reverso del colesterol y la formación de partículas de HDL-C en macrófagos y enterocitos. Sin embargo, se sabe muy poco sobre su función en otros tipos celulares (Oram y Heinecke, 2005). Se sabe que esta función es crucial en la homeostasis del colesterol, específicamente al transportar colesterol intracelular hacia aceptores lipídicos en el plasma (Tall y Wang, 2000). El exceso de colesterol libre en la membrana o dentro de la célula es causa de citotoxicidad, hecho que ha sido ampliamente estudiado en macrófagos (Tabas, 1997). Los mecanismos involucrados en dicha citotoxicidad incluyen la pérdida de fluidez de la membrana celular que puede causar disfunción de las proteínas integrales; la alteración de dominios membranales, lo cual podría alterar diferentes cascadas de señalización; la inducción de apoptosis; la cristalización de colesterol intracelular, el daño oxidativo por formación de oxiesteroles tóxicos, y la alteración de la expresión de diversos genes (Tabas, 2002). Aunque esta citotoxicidad inducida por un exceso de colesterol libre ha sido ampliamente estudiada en macrófagos, se sabe poco sobre las consecuencias de la acumulación de colesterol libre en otros tipos celulares. Puesto que la disfunción de ABCA1 puede causar acumulación intracelular de colesterol en diversos tipos celulares como el adipocito, podría afectar a otras funciones metabólicas del organismo además de la formación de partículas de HDL-C.

VII. 1 Probable Funcionalidad de la Variante R230C.

Es importante mencionar que a pesar de que el efecto de diversos polimorfismos y mutaciones de la proteína ABCA1 sobre el porcentaje de eflujo de colesterol ha sido cuantificado *in vitro* (Brunham et al., 2005), las consecuencias funcionales de la variante R230C no han sido estudiadas. Por lo tanto, ésta podría ser tan solo un marcador que se encuentra en desequilibrio

de ligamiento con una variante causal cercano a este locus. Sin embargo varios factores sugieren que R230C es funcional:

- 1) La base de datos PANTHER (por sus siglas en inglés Protein Analysis Through Evolutionary Relationships) predice que la probabilidad de que este cambio de aminoácido altere la función de la proteína es del 78%, de acuerdo con el puntaje de conservación evolutiva específico para la posición de la sustitución (Brunham et al., 2005); mientras que el programa de predicción de daño funcional a proteínas Polyphen (Harvard) califica a la variante como posiblemente dañina.
- 2) La variante R230C se localiza en la primer asa extracelular de la proteína, sitio donde se concentran varias mutaciones causales de enfermedad de Tangier e hipoc α -lipoproteinemia familiar (Singaraja et al., 2003; Fitzgerald et al., 2002).
- 3) La naturaleza de los aminoácidos involucrados en el cambio es muy diferente: mientras que la arginina es básica, con carga positiva e hidrofílica, la cisteína es hidrofóbica y contiene un grupo sulfhidrilo que puede formar enlaces disulfuro con otros aminoácidos.

Los resultados del análisis en una muestra de la población general de la Ciudad de México sugieren que la variante R230C afecta no solamente al flujo de colesterol (al disminuir los niveles de HDL-C), sino que también afecta otras funciones metabólicas. La alta frecuencia de esta variante en la población mexicana permitió buscar asociaciones con otros rasgos clínicos y metabólicos además de los niveles séricos de HDL y apoA-I.

VII.2 Efecto en los Niveles de HDL-colesterol y apoA-I.

El efecto de diversas mutaciones del gen *ABCA1* en los niveles séricos de HDL colesterol ha sido ampliamente estudiado y la variante R230C se asoció

con una disminución clara, aunque modesta, de los niveles de HDL-colesterol y apoA-I. Puede inferirse por lo tanto que el cambio R230C disminuye el eflujo de colesterol en las células formadoras de HDL-C, ya que los niveles de estas partículas fueron significativamente menores en individuos con genotipos R230C o C230C, independientemente de la presencia de posibles factores confusores como la edad, género, tabaquismo, índice de masa corporal, niveles de triglicéridos y nivel educativo de los individuos. Los hallazgos de un estudio de ligamiento buscando loci para rasgos cuantitativos (QTL) para niveles de HDL-colesterol en individuos México-americanos apoyan este resultado, ya que reportan un pico modesto en el cromosoma 9q (LOD = 1.4) cercano al marcador D9S299, que se encuentra muy cerca del locus de *ABCA1* (Ayra et al., 2002). Por lo tanto, es posible que la alta frecuencia de la variante R230C en la población mexicana sea la causa de la presencia de esta señal de ligamiento.

Aunque en un inicio se describió a la variante R230C como una mutación causal de hipoc α -lipoproteinemia familiar (Wang et al., 2000), los resultados de este análisis sugieren que la variante no suprime completamente la función de *ABCA1*, aunque sí parece disminuirla. Esto puede afirmarse primeramente porque ninguno de los homocigotos C230C (8 individuos) presentaba enfermedad de Tangier; además de que no todos los individuos portadores de la variante R230C (en forma homocigota o heterocigota) presentaron niveles séricos bajos de HDL-C (< 40 mg/dl). Al existir alrededor de 50 diferentes genes involucrados en la regulación de los niveles de HDL-C (Wang y Paigen, 2005), la presencia de variantes funcionales de algunos de estos genes (como por ejemplo la proteína transferidora de ésteres de colesterol o la lipasa hepática) podría incrementar los niveles de HDL y compensar el efecto negativo de la variante R230C. Esto podría explicar el por qué se encontró un individuo heterocigoto R230C en el grupo de individuos con niveles de HDL-C más altos (> percentila 90) (Singaraja et al., 2003). Llama la atención que los niveles de HDL-C y apoA-I fueron muy similares en homo y heterocigotos, mostrando que este efecto no es dependiente de la dosis génica. Este fenómeno ya se había

observado para algunas mutaciones del gen *ABCA1* que afectan los niveles de HDL-C en humanos, sugiriéndose que podrían causar solamente fenotipos dominantes-negativos sin efecto de dosis génica por la estructura cuaternaria de la proteína *ABCA1*, en donde la alteración de un solo alelo afecta la unidad mínima funcional (Krimbou et al., 2006).

VII. 3 Asociación con Obesidad

Este es el primer trabajo donde se reporta una asociación del gen *ABCA1* con el índice de masa corporal y la obesidad. Llama la atención que esta asociación de la variante R230C con mayor índice de masa corporal en mestizos mexicanos fue más significativa que la encontrada con niveles bajos de HDL-C. A pesar de que esto nunca se había observado, un estudio de ligamiento en individuos México-Americanos para obesidad apoya este resultado, ya que encontraron también un pico de ligamiento positivo (LOD score 2.1) en el cromosoma 9p con el mismo marcador (D9S299) previamente asociado a niveles de HDL-colesterol, muy cercano al locus del gen *ABCA1* (Arya et al., 2002; 2004). Es muy importante el hecho de que la asociación con obesidad no perdió su significancia estadística cuando se excluyeron del análisis a los individuos con niveles de apoA-I < 130 mg/dL (promedio de los portadores de la variante R230C), sugiriendo que el papel de la proteína *ABCA1* en la fisiopatología de la obesidad podría ser independiente de su función en la regulación de los niveles de HDL-colesterol y apoA-I.

Se sabe muy poco sobre la función de *ABCA1* en el adipocito. Le Lay et al. (2003) analizaron la expresión y regulación del gen *ABCA1* en adipocitos 3T3-L1, y encontraron que el gen es inducido de manera muy importante durante la diferenciación de los preadipocitos. Encontraron también evidencia de que existen mecanismos de regulación de *ABCA1* a nivel post-transcripcional que parecen ser específicos para el adipocito. Otra observación importante fue que al aumentar la expresión de *ABCA1* el contenido total de

colesterol celular no cambió, aunque sí hubo un cambio en su distribución intracelular, por lo que los autores sugieren que el colesterol podría ser una molécula de señalización en el adipocito. Aunque hay evidencia de que el adipocito puede formar partículas de HDL *in vitro* (Verghese et al., 2007), no se sabe qué tanto contribuye a los niveles de HDL-C plasmáticos y es probable que la formación de partículas de HDL-C no sea su principal función.

VII. 4 Asociación con Síndrome Metabólico

La obesidad por sí misma es un factor de riesgo para otros trastornos metabólicos (Cossrow y Falkner, 2004). Se ha propuesto que *ABCA1* es un gen candidato para el síndrome metabólico por evidencia previa que sugiere que se asocia a resistencia a la insulina además de su relación con los niveles séricos de HDL-C y riesgo cardiovascular (Phillips et al., 2006). Basados en esta evidencia y en las asociaciones encontradas con niveles bajos de HDL-C y obesidad (2 criterios del síndrome metabólico), identificamos una asociación estadísticamente significativa de la variante R230C con el síndrome metabólico. La significancia estadística de esta asociación no se perdió aún después de ajustar por edad, género y nivel educativo. Llama la atención que mientras el 21.7% de los heterocigotos R230C tenían síndrome metabólico, todos los homocigotos C230C (n=8) cumplían con los criterios diagnósticos tanto de la ATP-III como de la IDF para síndrome metabólico, y una mujer homocigota de 28 años ya tenía este diagnóstico a pesar de su edad. Aunque el número de homocigotos es pequeño, esto sugiere que a diferencia de lo que ocurre con los niveles de HDL-C, la variante R230C pudiera tener un efecto de dosis alélica para el síndrome metabólico. Esto tendrá que evaluarse ampliando el estudio, buscando el efecto de otros factores confusores como la dieta y el estilo de vida.

VII. 5 Asociación con Diabetes Mellitus Tipo 2.

Algunos de los individuos reclutados de la población general de la Ciudad de México tenían diagnóstico de DMT2, mientras que otros se diagnosticaron

por sus niveles de glucemia en ayunas al aceptar participar en el estudio. En total, se incluyeron 34 individuos diabéticos. Se encontró una asociación significativa de la variante R230C con diabetes mellitus tipo 2 en esta población. Aunque este resultado debe interpretarse con cautela por el número reducido de individuos diabéticos, es razonable especular sobre el posible papel de ABCA1 en la patogénesis de las DMT2. En primer lugar, el gen *ABCA1* está regulado por una red transcripcional compleja donde participan varias proteínas y fármacos involucrados en el metabolismo de lípidos y de la glucosa (Schmitz y Langmann, 2005; Gerin et al., 2005). Además, se sabe que la insulina disminuye la expresión de *ABCA1* en adipocitos 3T3-L1, mientras que la glucosa aumenta la expresión de *ABCA1* en leucocitos *in vivo* (Sartipy y Loskutoff, 2003; Albrecht et al., 2004). Existe solamente un estudio que reporta la asociación de un diplotipo del gen *ABCA1* con DMT2 en población japonesa (Daimon et al., 2005). En este estudio los autores sugieren que ABCA1 pudiera tener influencia en la fisiopatología de la DMT2 independientemente de los niveles séricos de HDL, ya que dichos niveles fueron muy similares en el grupo de riesgo y en el grupo que no presentaba el diplotipo.

No fue sino hasta muy recientemente que Brunham et al. (2007) encontraron evidencia crucial sobre la función de ABCA1 en la célula pancreática. Ellos estudiaron un modelo de ratón en el que el gen *ABCA1* fue inactivado de manera homocigota únicamente en las células beta-pancreáticas. Estos ratones mostraron alteración en la tolerancia a la glucosa y deficiencia de la secreción de insulina en respuesta a la glucosa, tanto *in vivo* como *in vitro*. El efecto fue dependiente de la edad y las células beta presentaban depósitos de colesterol. Estos datos apoyan la asociación de la variante R230C con diabetes mellitus tipo 2 y aportan evidencia experimental sobre el concepto de lipotoxicidad como causa de DMT2. Sin embargo, a diferencia del concepto comúnmente manejado para el SM, según el cual un exceso de ácidos grasos libres causaría lipotoxicidad en tejidos periféricos causando resistencia a la insulina, hiperinsulinemia compensatoria y posteriormente DMT2 (Kashyap y

Defronzo, 2007), la citotoxicidad en estos ratones es causada por un exceso de colesterol en la célula beta-pancreática ocasionando un defecto de secreción de insulina. Otro dato que podría apoyar el concepto de que la variante R230C disminuye la función de la proteína ABCA1 sería la evaluación del modelo mínimo (un índice de secreción de insulina en respuesta a una carga de glucosa) en individuos homocigotos C230C y heterocigotos R230C.

Aunque el modelo de ratón muestra la importancia de ABCA1 en la fisiología de la célula β , la asociación de la variante R230C con DMT2 debe evaluarse en una muestra de mayor tamaño, en un estudio diseñado específicamente para ello. La alta frecuencia de la DMT2 y de la variante R230C en la población mestiza de México ofrece la oportunidad de analizar a mayor profundidad esta asociación en la población diabética.

VII. 6 Las asociaciones observadas no se deben a un efecto de estratificación poblacional.

Puesto que la población mexicana resultó del mestizaje entre las poblaciones española (caucásica) e indígena principalmente (con una contribución pequeña de genes de origen africano), fue de primordial importancia descartar una falsa asociación por un efecto de estratificación poblacional. Para lograr esto, se identificaron los genotipos de 10 marcadores informativos de ancestría en todos los casos y controles. Los cálculos de mestizaje que se obtuvieron con estos marcadores en la población mexicana fueron muy similares a los reportados en otros estudios en la población de la Ciudad de México (Martínez-Marignac et al., 2006). Aunque la ancestría indígena se considera un factor de riesgo para la obesidad, el síndrome metabólico y la diabetes, el análisis del programa ADMIXMAP reveló que todas las asociaciones encontradas permanecieron significativas aún después de ajustar por ancestría. Por lo tanto, parece que además de ser un marcador de ancestría por encontrarse solamente en poblaciones indígenas de América y sus descendientes, el cambio R230C de la proteína ABCA1 es también un

factor de riesgo significativo para presentar hipoc-lipoproteinemia, obesidad, síndrome metabólico y posiblemente diabetes mellitus tipo 2.

VII. 7 Alta Prevalencia de la Variante R230C en Diferentes Poblaciones Indígenas de México.

Se ha sugerido que la mayor susceptibilidad genética de la población mexicana a la obesidad y a la diabetes mellitus tipo 2 probablemente esté relacionada con su componente indígena (Cossrow y Falkner, 2004; Lorenzo et al., 2001). La alta frecuencia del alelo 230C en la población mexicana sugiere que éste podría ser uno de varios alelos de diferentes genes que contribuyen a dicha susceptibilidad. Esto puede afirmarse porque en casi todas las poblaciones indígenas analizadas, la frecuencia alélica de esta variante fue de aproximadamente el doble que la observada en mestizos mexicanos, lo cual sería esperado por el mestizaje.

Llama la atención que la variante R230C parece ser exclusiva de poblaciones indígenas de América o que descienden de dichas poblaciones (como los mestizos mexicanos). Esta variante no ha sido encontrada en las poblaciones africana, europea, china, sudasiática o en los indígenas canadienses Inuit (Cohen et al., 2004; Frikke-Schmidt et al., 2004; Probst et al., 2005; Wang et al., 2000). El cambio R230C fue descrito por primera vez en un individuo Oji-Cree (indígenas canadienses), considerándose una mutación que causó hipoc-lipoproteinemia familiar. Posteriormente se encontró en forma heterocigota en 2 de 80 individuos Oji-Cree, por lo que los autores sugirieron que la mutación surgió recientemente en dicha población (Wang et al., 2000). En contraste con lo sugerido por estos autores, el hecho de que la variante también se encuentra en poblaciones indígenas y mestiza de México sugiere más bien que surgió mucho antes, posiblemente en los primeros individuos que cruzaron el Estrecho de Bering. A su vez, en comparación con la población Oji-Cree, la mayor frecuencia alélica de R230C en las poblaciones indígenas de México sugiere que pudo haber sufrido selección natural en los individuos que

se establecieron más al sur. Aunque no existe evidencia funcional sobre alguna ventaja selectiva de esta variante, puede especularse que sea un alelo que ahorra u optimiza la utilización de la energía en el organismo, pudiendo ser favorable en condiciones de escasez de alimentos o hambruna. Por otro lado, recientemente se encontró en un modelo de ratón que la delección homocigota del gen *ABCA1* confiere resistencia total a la malaria cerebral (Combes et al., 2005). Así, puede también especularse que la variante R230C podría conferir protección contra ciertas infecciones o trastornos trombóticos en los que intervienen mecanismos de vesiculación. Es necesario buscar la presencia de esta variante en otras poblaciones indígenas de América, así como hacer estudios funcionales específicos para confirmar esta hipótesis.

VIII. CONCLUSIONES

1. Se identificó una variante del gen *ABCA1* probablemente funcional, con una alta frecuencia en la población general y que contribuye importantemente a la modulación de los niveles de HDL-C en mexicanos mestizos.
2. Por primera vez se presenta evidencia de la asociación del gen *ABCA1* con la obesidad, el síndrome metabólico y la diabetes mellitus tipo 2.
3. Por su alta frecuencia y por estar asociada a trastornos metabólicos, la variante R230C del gen *ABCA1* tiene relevancia epidemiológica en la población mexicana.
4. La variante R230C parece tener un carácter ancestral y ser exclusiva de poblaciones que descienden de grupos indígenas de América.

IX. PERSPECTIVAS

1. El presente estudio aporta evidencia de que la variante R230C, además de ser un marcador ancestral de ancestría indígena del continente americano, es probablemente funcional. Por lo tanto, será importante comprobar dicho efecto funcional *in vitro*, transfectando la variante a fibroblastos o macrófagos en cultivo para comparar el eflujo de colesterol en los homocigotos C230C, heterocigotos R230C y homocigotos R230R.
2. Es de gran interés estudiar y confirmar la asociación de la variante R230C con la diabetes mellitus tipo 2 en un estudio con mayor número de individuos diabéticos y controles bien caracterizados clínicamente. Esto permitiría además evaluar diferencias en el cuadro clínico de los individuos diabéticos con y sin la variante R230C, así como valorar mediante un método más confiable (como el modelo mínimo) si los portadores de esta variante presentan un defecto de secreción de insulina dependiente de la edad, como ocurre en el modelo del ratón.
3. La alta frecuencia de la variante R230C en la población mexicana permitirá hacer estudios genotipo→fenotipo, y podrá así buscarse el posible efecto de esta variante en otros rasgos en los el metabolismo de los lípidos y el colesterol juega un papel importante, como por ejemplo la función neurológica, plaquetaria, de la vesícula biliar y, de manera muy importante, en el riesgo de desarrollar aterosclerosis, infarto agudo al miocardio y enfermedad vascular cerebral.
4. Al existir fármacos agonistas de los receptores PPAR que inducen la transcripción del gen *ABCA1*, será necesario valorar su eficiencia, tanto *in vitro* como *in vivo*, en genotipos homo y heterocigotos.
5. Es necesario evaluar la respuesta de los portadores de la variante R230C a diferentes dietas y al ejercicio, para determinar si puede prevenirse o retrasarse el desarrollo del síndrome metabólico y la diabetes en estudios de cohorte a mediano o a largo plazo.

X. REFERENCIAS

1. Agassandian M, Mathur SN, Zhou J, Field FJ, Mallampalli RK. Oxysterols trigger ABCA1-mediated basolateral surfactant efflux. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 31:227–33.
2. Aguilar-Salinas CA, Olaiz G, Valles V, Torres JM, Pérez FJ, Rull JA, Rojas R, Franco A, Sepúlveda J. High prevalence of low HDL cholesterol concentrations and mixed hyperlipidemia in a Mexican nationwide survey. *J Lipid Res* 2001; 42:1298-307.
3. Aiello RJ, Brees D, Francone OL. ABCA1-deficient mice: insights into the role of monocyte lipid efflux in HDL formation and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:972-80.
4. Albrecht C, McVey JH, Elliott JI, Sardini A, Kasza I, Mumford AD, Naoumova RP, Tuddenham EG, Szabo K, Higgins CF. A novel missense mutation in ABCA1 results in altered protein trafficking and reduced phosphatidylserine translocation in a patient with Scott syndrome. *Blood* 2005; 106: 542-9.
5. Albrecht C, Simon-Vermot I, Elliott JI, Higgins CF, Johnston DG, Valabhji J. Leukocyte ABCA1 gene expression is associated with fasting glucose concentration in normoglycemic men. *Metabolism* 2004; 53: 17–21.
6. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J; IDF Epidemiology Task Force Consensus Group. The metabolic syndrome--a new worldwide definition. *Lancet* 2005; 366:1059-62.
7. American Heart Association. Heart Disease and Stroke Statistics – 2005 Update. Dallas, Texas, 2005.
8. Anderson RG. The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 199 –225.
9. Ansell BJ, Watson KE, Fogelman AM, Navab M, Fonarow GC. High-density lipoprotein function recent advances. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46:1792-8.

10. Arya R, Duggirala R, Almasy L, Rainwater DL, Mahaney MC, Cole S, Dyer TD, Williams K, Leach RJ, Hixson JE, MacCluer JW, O'Connell P, Stern MP, Blangero J. Linkage of high-density lipoprotein-cholesterol concentrations to a locus on chromosome 9p in Mexican Americans. *Nat Genet* 2002; 30:102-5.
11. Arya R, Duggirala R, Jenkinson CP, Almasy L, Blangero J, O'Connell P, Stern MP. Evidence of a novel quantitative-trait locus for obesity on chromosome 4p in Mexican Americans. *Am J Hum Genet* 2004; 74:272-82.
12. Assman G, Brewer HB Jr, von Eckardstein A. In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*, 2000 (Scriver, C. R., Sly, W. S., Childs, B., Beaudet, A. L., Valle, D., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., eds.) pp. 2053-72, MacGraw-Hill, New York.
13. Attie AD, Kastelein JP, Hayden MR. Pivotal role of ABCA1 in reverse cholesterol transport influencing HDL levels and susceptibility to atherosclerosis. *J Lipid Res* 2001; 42:1717-26.
14. Bared SM, Buechler C, Boettcher A, Dayoub R, Siguener A, Grandl M, Rudolph C, Dada A, Schmitz G. Association of ABCA1 with syntaxin 13 and flotillin-1 and enhanced phagocytosis in tangier cells. *Mol Biol Cell* 2004; 15: 5399–5407.
15. Bates SR, Tao JQ, Collins HL, Francone OL, Rothblat GH. Pulmonary abnormalities due to ABCA1 deficiency in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 289: L980–9.
16. Benton JL, Ding J, Tsai MY, Shea S, Rotter JI, Burke GL, Post W. Associations between two common polymorphisms in the ABCA1 gene and subclinical atherosclerosis: Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Atherosclerosis* 2007; 193:352-60.
17. Berthold F. Isolation of human monocytes by Ficoll density gradient centrifugation. *Blut* 1981; 43:367-71.
18. Bodzioch M, Orso E, Klucken J, Langmann T, Bottcher A, Diederich W, Drobnik W, Barlage S, Buchler C, Porsch-Ozcurumez M, Kaminski WE,

- Hahmann HW, Oette K, Rothe G, Aslanidis C, Lackner KJ, Schmitz G. The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat Genet* 1999; 22:347-51.
19. Bonilla C, Parra EJ, Pfaff CL, Dios S, Marshall JA, Hamman RF, Ferrell RE, Hoggart CL, McKeigue PM, Shriver MD. Admixture in the Hispanics of the San Luis Valley, Colorado, and its implications for complex trait gene mapping. *Ann Hum Genet* 2004; 68:139-53.
 20. Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee SM, Zhang LH, Roomp K, van Dam M, Yu L, Brewer C, Collins JA, Molhuizen HO, Loubser O, Ouellette BF, Fichter K, Ashbourne-Excoffon KJ, Sensen CW, Scherer S, Mott S, Denis M, Martindale D, Frohlich J, Morgan K, Koop B, Pimstone S, Kastelein JJ, Genest J Jr, Hayden MR. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat Genet* 1999; 22:336-45.
 21. Brunham LR, Kruit JK, Iqbal J, Fievet C, Timmins JM, Pape TD, Coburn BA, Bissada N, Staels B, Groen AK, Hussain MM, Parks JS, Kuipers F, Hayden MR. Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis in vivo. *J Clin Invest* 2006; 116:1052-62.
 22. Brunham LR, Kruit JK, Pape TD, Timmins JM, Reuwer AQ, VasANJI Z, Marsh BJ, Rodrigues B, Johnson JD, Parks JS, Verchere CB, Hayden MR. Beta-cell ABCA1 influences insulin secretion, glucose homeostasis and response to thiazolidinedione treatment. *Nat Med* 2007; 13:340-7.
 23. Brunham LR, Singaraja RR, Pape TD, Kejariwal A, Thomas PD, Hayden MR. Accurate prediction of the functional significance of single nucleotide polymorphisms and mutations in the ABCA1 gene. *PLoS genetics* 2005; 1:739-47.
 24. Buffone GJ, Darlington GJ. Isolation of DNA from biological specimens without extraction with phenol. *Clin Chem* 1985; 31:164-5.
 25. Bungert S, Molday LL, Molday RS. Membrane topology of the ATP binding cassette transporter ABCR and its relationship to ABC1 and related ABCA transporters: identification of N-linked glycosylation sites. *J Biol Chem* 2001; 276:23539-46.

26. Castelli WP, Doyle JT, Gordon T, Hames CG, Hjortland MC, Hulley SB, Kagan A, Zukel WJ. Alcohol and blood lipids. The cooperative lipoprotein phenotyping study. *Lancet* 1977; 2:153-5.
27. Cenarro A, Artieda M, Castillo S, Mozas P, Reyes G, Tejedor D, Alonso R, Mata P, Pocoví M, Civeira F. A common variant in the ABCA1 gene is associated with a lower risk for premature coronary heart disease in familial hypercholesterolaemia. *J Med Genet* 2003; 40:163-8.
28. Choudhry S, Coyle NE, Tang H, Salari K, Lind D, Clark SL, Tsai HJ, Naqvi M, Phong A, Ung N, Matallana H, Avila PC, Casal J, Torres A, Nazario S, Castro R, Battle NC, Perez-Stable EJ, Kwok PY, Sheppard D, Shriver MD, Rodriguez-Cintron W, Risch N, Ziv E, Burchard EG, Genetics of Asthma in Latino Americans GALA Study. Population stratification confounds genetic association studies among Latinos. *Hum Genet* 2006; 118:652-64.
29. Cohen JC, Kiss RS, Pertsemlidis A, Marcel YL, McPherson R, Hobbs HH. Multiple rare alleles contribute to low plasma levels of HDL cholesterol. *Science* 2004; 305:869-72.
30. Combes V, Coltel N, Alibert M, van Eck M, Raymond C, Juhan-Vague I, Grau GE, Chimini G. ABCA1 gene deletion protects against cerebral malaria. Potential pathogenic role of microparticles in neuropathology. *Am J Pathol* 2005; 166:295-302.
31. Cossrow N, Falkner B. Race/ethnic issues in obesity and obesity-related comorbidities. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:2590-4.
32. Costet P, Luo Y, Wang N, Tall AR. Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *J Biol Chem* 2000; 275: 28240-5.
33. Cuchel M, Rader DJ. Macrophage reverse cholesterol transport: key to the regression of atherosclerosis? *Circulation* 2006; 113: 2548-55.
34. Daimon M, Kido T, Baba M, Oizumi T, Jimbu Y, Kameda W, Yamaguchi H, Ohnuma H, Tominaga M, Muramatsu M, Kato T. Association of the ABCA1 gene polymorphisms with type 2 DM in a Japanese population. *Biochem Biophys Res Com* 2005; 329: 205-10.

35. Dean M, Hamon Y, Chimini G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res* 2001; 42:1007-17.
36. Denis M, Haidar B, Marcil M, Bouvier M, Krimbou L, Genest J. Characterization of oligomeric human ATP binding cassette transporter A1. Potential implications for determining the structure of nascent high density lipoprotein particles. *J Biol Chem* 2004; 279:41529-36.
37. Duffy D, Rader DJ. High-density lipoprotein cholesterol therapies. The next frontier in lipid management. *J Cardiopulm Rehab* 2006; 26:1-8.
38. Duggirala R, Blangero J, Almasy L, Dyer TD, Williams KL, Leach RJ, O'Connell P, Stern MP. A Major Susceptibility Locus Influencing Plasma Triglyceride Concentrations Is Located on Chromosome 15q in Mexican Americans. *Am J Hum Genet* 2000; 66:1237-45.
39. Durstine JL, Haskell WL. Effects of exercise training on plasma lipids and lipoproteins. *Exerc Sport Sci Rev* 1994; 22:477-521.
40. Estadísticas de mortalidad en México: muertes registradas en el año 2000. *Salud Pública Méx* 2002; 44: 266-82.
41. Evans D, Beil FU. The association of the R219K polymorphism in the ATP-binding cassette transporter 1 (ABCA1) gene with coronary artery disease and hyperlipidemia. *J Mol Med* 2003; 81:264-70.
42. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus: Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2003; 26:S5-20.
43. Feng B, Tabas I. ABCA1-mediated cholesterol efflux is defective in free cholesterol-loaded macrophages: mechanism involves enhanced ABCA1 degradation in a process requiring full NPC1 activity. *J Biol Chem* 2002; 277: 43271-80.
44. Feng B, Zhang D, Kuriakose G, Devlin CM, Kockx M, Tabas I. Niemann-Pick C heterozygosity confers resistance to lesional necrosis and macrophage apoptosis in murine atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:10423-8.

45. Field FJ, Born E, Mathur SN. LXR/RXR ligand activation enhances basolateral efflux of beta-sitosterol in CaCo-2 cells. *J Lipid Res* 2004; 45: 905–13.
46. Fielding CJ, Fielding PE. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J Lipid Res* 1995; 36: 211-28.
47. Fitzgerald ML, Mendez AJ, Moore KJ, Andersson LP, Panjeton HA, Freeman MW. ATP-binding cassette transporter A1 contains an NH2-terminal signal anchor sequence that translocates the protein's first hydrophilic domain to the exoplasmic space. *J Biol Chem* 2001; 276:15137-45.
48. Fitzgerald ML, Morris AL, Rhee JS, Andersson LP, Mendez AJ, Freeman MW. Naturally occurring mutations in the largest extracellular loops of ABCA1 can disrupt its direct interaction with apolipoprotein A-I. *J Biol Chem* 2002; 277: 33178 –87.
49. Francone OL, Royer L, Boucher G, Haghpassand M, Freeman A, Brees D, Aiello RJ. Increased cholesterol deposition, expression of scavenger receptors, and response to chemotactic factors in ABCA1-deficient macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25:1198-205.
50. Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG, Jensen GB, Tybjaerg-Hansen A. Genetic variation in ABC transporter A1 contributes to HDL cholesterol in the general population. *J Clin Invest* 2004; 114:1343-53.
51. Garrison RJ, Kannel WB, Feinleib M, Castelli WP, McNamara PM, Padgett SJ. Cigarette smoking and HDL cholesterol. The Framingham Offspring Study. *Atherosclerosis* 1978; 30:17–25.
52. Genest J Jr, Marcil M, Denis M, Yu L. High density lipoproteins in health and in disease. *J Investig Med* 1999; 47:31-42.
53. Genest J, Pedersen TR. Prevention of cardiovascular ischemic events: high-risk and secondary prevention. *Circulation* 2003; 107:2059-65.
54. Gerin I, Dolinsky VW, Shackman JG, Kennedy RT, Chiang SH, Burant CF, Steffensen KR, Gustafsson JA, MacDougald OA. LXRbeta is required for

adipocyte growth, glucose homeostasis, and beta cell function. *J Biol Chem* 2005; 280:23024-31.

Eliminado:

55. Gofflot F, Hars C, Illien F, Chevy F, Wolf C, Picard JJ, Roux C. Molecular mechanisms underlying limb anomalies associated with cholesterol deficiency during gestation: implications of Hedgehog signaling. *Hum Mol Genet* 2003; 12:1187-98.
56. Gofman J, DeLalla O, Glazier F, Freeman NK, Lindgren FT, Nichols AV, Strisower B, Tamplin AR. The serum lipoprotein transport system in health, metabolic disorders, atherosclerosis and coronary heart disease. *Plasma* 1954; 2:413.
57. Gordon DJ, Rifkind BM. High-Density Lipoprotein: the clinical implications of recent studies. *N Engl J Med* 1989; 321:1311-6.
58. Gorodezky C, Alaez C, Vázquez-García MN, de la Rosa G, Infante E, Balladares S, Toribio R, Pérez-Luque E, Muñoz L. The genetic structure of Mexican Mestizos of different locations: tracking back their origins through MHC genes, blood group systems, and microsatellites. *Hum Immunol* 2001; 62:979-91.
59. Gotto AM Jr, Brinton EA. Assessing low levels of high-density lipoprotein cholesterol as a risk factor in coronary heart disease: a working group report and update. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43:717-24.
60. Graf GA, Li WP, Gerard RD, Gelissen I, White A, Cohen JC, Hobbs HH. Coexpression of ATP-binding cassette proteins ABCG5 and ABCG8 permits their transport to the apical surface. *J Clin Invest* 2002; 110: 659 – 69.
61. Grundy SM, Hansen B, Smith SC, Cleeman JI, Kahn RA; American Heart Association; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Diabetes Association. Clinical management of metabolic syndrome: report of the American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute/American Diabetes Association conference on scientific issues related to management. *Circulation* 2004; 109: 551-6.

62. Hamon Y, Broccardo C, Chambenoit O, Luciani MF, Toti F, Chaslin S, Freyssinet JM, Devaux PF, McNeish J, Marguet D, Chimini G. ABC1 promotes engulfment of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine. *Nat Cell Biol* 2000; 2:399-406.
63. Hamon Y, Trompier D, Ma Z, Venegas V, Pophillat M, Mignotte V, Zhou Z, Chimini G. Cooperation between Engulfment Receptors: The Case of ABCA1 and MEGF10. *PLoS ONE* 2006; 1:e120.
64. Harada T, Imai Y, Nojiri T, Morita H, Hayashi D, Maemura K, Fukino K, Kawanami D, Nishimura G, Tsushima K, Monzen K, Tamazaki T, Mitsuyama S, Shintani T, Watanabe N, Seto K, Sugiyama T, Nakamura F, Ohno M, Hirata Y, Yamazaki T, Nagai R. A common Ile 823 Met variant of ATP-binding cassette transporter A1 gene (ABCA1) alters high density lipoprotein cholesterol level in Japanese population. *Atherosclerosis* 2003; 169:105-12.
65. Harmon JT, Tandon NN, Hoeg JM, Jamieson GA. Thrombin binding and response in platelets from patients with dyslipoproteinemias: increased stimulus-response coupling in type II hyperlipoproteinemia. *Blood* 1986; 68: 498-505.
66. Hinds DA, Stokowski RP, Patil N, Konvicka K, Kershensobich D, Cox DR, Ballinger DG. Matching strategies for genetic association studies in structured populations. *Am J Hum Genet* 2004; 74:317-25.
67. Hoggart CJ, Parra EJ, Shriver MD, Bonilla C, Kittles RA, Clayton DG, McKeigue PM. Control of confounding of genetic associations in stratified populations. *Am J Hum Genet* 2003; 72:1492-504.
68. Hoggart CJ, Shriver MD, Kittles RA, Clayton DG, McKeigue PM. Design and analysis of admixture mapping studies. *Am J Hum Genet* 2004; 74:965-78.
69. Hong SH, Rhyne J, Zeller K, Miller M. Novel ABCA1 compound variant associated with HDL cholesterol deficiency. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1587: 60-4.

70. Ioannidis JP, Trikalinos TA, Ntzani EE, Contopoulos-Ioannidis DG. Genetic associations in large versus small studies: an empirical assessment. *Lancet* 2003; 361:567-71.
71. Iqbal J, Anwar K, Hussain MM. Multiple, independently regulated pathways of cholesterol transport across the intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 2003; 278: 31610 – 20.
72. Ishida BY, Duncan KG, Bailey KR, Kane JP, Schwartz DM. High density lipoprotein mediated lipid efflux from retinal pigment epithelial cells in culture. *British Journal of Ophthalmology* 2006; 90:616-20.
73. Ishii J, Nagano M, Kujiraoka T, Ishihara M, Egahira T, Takada D, Tsuji M, Hattori H, Emi M. Clinical variant of Tangier disease in Japan: mutation of the ABCA1 gene in hypoalphalipoproteinemia with corneal lipids. *J Hum Genet* 2002; 47: 366–9.
74. Jeffs JAR, Godsland IF, Johnston DG. Less than 50% of variation in HDL cholesterol between and within individuals is explained by established predictors. *Atherosclerosis* 2006; 184:178-87.
75. Joyce C, Freeman L, Brewer HB Jr, Santamarina-Fojo S. Study of ABCA1 function in transgenic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:965-71.
76. Kashyap SR, Defronzo RA. The insulin resistance syndrome: physiological considerations. *Diab Vasc Dis Res* 2007; 4:13-9.
77. Kim E, Niethammer M, Rothschild A, Jan YN, Sheng M. Clustering of Shaker-type K channels by interaction with a family of membrane-associated guanylate kinases. *Nature* 1995; 378: 85–8.
78. Kim WS, Guillemin GJ, Glaros EN, Lim CK, Garner B. Quantitation of ATP-binding cassette subfamily-A transporter gene expression in primary human brain cells. *Neuroreport* 2006; 17:891-6.
79. Knoblauch H, Bauerfeind A, Toliat MR, Becker C, Luganskaja T, Günther UP, Rohde K, Schuster H, Junghans C, Luft FC, Nürnberg P, Reich JG. Haplotypes and SNPs in 13 lipid-relevant genes explain most of the

- genetic variance in high density lipoprotein and low-density lipoprotein cholesterol. *Hum Mol Gen* 2004; 13:993-1004.
80. Kölsch H, Lütjohann D, Jessen F, Von Bergmann K, Schmitz S, Urbach H, Maier W, Heun R. Polymorphism in ABCA1 influences CSF 24S-hydroxicholesterol levels but is not a major risk factor of Alzheimer's disease. *Int J Mol Med* 2006; 17:791-4.
 81. Krimbou L, Marcil M, Genest J. New insights into the biogenesis of human high-density lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 2006; 17:258-67.
 82. Kuller LH. Nutrition, lipids and cardiovascular disease. *Nutr Rev* 2006; 64(2 Pt 2):S15-26.
 83. Kyriakou T, Pontefract DE, Viturro E, Hodgkinson CP, Laxton RC, Bogari N, Cooper G, Davies M, Giblett J, Day IN, Simpson IA, Albrecht C, Ye S. Functional polymorphism in ABCA1 influences age of symptom onset in coronary artery disease patients. *Hum Mol Genet* 2007; 16:1412-22.
 84. Lakkaraju A, Finnemann SC, Rodriguez-Boulan E. The lipofuscin fluorophore A2E perturbs cholesterol metabolism in retinal pigment epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 11026-31.
 85. Le Lay S, Robichon C, Le Liepvre X, Dagher G, Ferre P, Dugail I. Regulation of ABCA1 expression and cholesterol efflux during adipose differentiation of 3T3-L1 cells. *J Lipid Res* 2003; 44:1499-507.
 86. Lee J, Shirk A, Oram JF, Lee SP, Kuver R. Polarized cholesterol and phospholipid efflux in cultured gall-bladder epithelial cells: evidence for an ABCA1-mediated pathway. *Biochem J* 2002; 364(Pt 2):475-84.
 87. Lee MH, Lu K, Hazard S, Yu H, Shulenin S, Hidaka H, Kojima H, Allikmets R, Sakuma N, Pegoraro R, Srivastava AK, Salen G, Dean M, Patel SB. Identification of a gene, ABCG5, important in the regulation of dietary cholesterol absorption. *Nat Genet* 2001; 27: 79 – 83.
 88. Lewis PM, Dunn MP, McMahon JA, Logan M, Martin JF, St-Jacques B, McMahon AP. Cholesterol modification of sonic hedgehog is required for long-range signaling activity and effective modulation of signaling by Ptc1. *Cell* 2001; 105:599-612.

89. Li Y, Tacey K, Doil L, van Luchene R, Garcia V, Rowland C, Schrodi S, Leong D, Lau K, Catanese J, Sninsky J, Nowotny P, Holmans P, Hardy J, Powell J, Lovestone S, Thal L, Owen M, Williams J, Goate A, Grupe A. Association of ABCA1 with late-onset Alzheimer's disease is not observed in a case-control study. *Neurosci Lett* 2004; 366:268-71.
90. Lisker R, Ramirez E, Briceño RP, Granados J, Babinsky V. Gene frequencies and admixture estimates in four Mexican urban centers. *Hum Biol* 1990; 62: 791-801.
91. Lohmueller KE, Pearce CL, Pike M, Lander ES, Hirschhorn JN. Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. *Nat Genet* 2003; 33:177-82.
92. Lorenzo C, Serrano-Rios M, Martinez-Larrad MT, Gabriel R, Williams K, Gonzalez-Villalpando C, Stern MP, Hazuda HP, Haffner SM. Was the historic contribution of Spain to the Mexican gene pool partially responsible for the higher prevalence of type 2 diabetes in Mexican- origin populations? The Spanish Insulin Resistance Study Group, the San Antonio Heart Study, and the Mexico City Diabetes Study. *Diabetes Care* 2001; 24:2059-64.
93. Martinez-Marignac VL, Valladares A, Cameron E, Chan A, Perera A, Globus-Goldberg R, Wachter N, Kumate J, McKeigue P, O'donnell D, Shriver MD, Cruz M, Parra EJ. Admixture in Mexico City: implications for admixture mapping of Type 2 diabetes genetic risk factors. *Hum Genet* 2007; 120:807-19.
94. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28:412-9.
95. McNeish J, Aiello RJ, Guyot D, Turi T, Gabel C, Aldinger C, Hoppe KL, Roach ML, Royer LJ, de Wet J, Broccardo C, Chimini G, Francone OL. High density lipoprotein deficiency and foam cell accumulation in mice with

- targeted disruption of ATP-binding cassette transporter-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:4245–50.
96. Meyers CD, Kashyap ML. Pharmacologic elevation of high-density lipoproteins: recent insights on mechanisms of action and atherosclerosis protection. *Curr Opin Cardiol* 2004; 19:366-73.
 97. Mulligan JD, Flowers MT, Tebon A, Bitgood JJ, Wellington C, Hayden MR, Attie AD. ABCA1 is essential for efficient basolateral cholesterol efflux during the absorption of dietary cholesterol in chickens. *J Biol Chem* 2003; 278: 13356 – 66.
 98. Munehira Y, Ohnishi T, Kawamoto S, Furuya A, Shitara K, Imamura M, Yokota T, Takeda S, Amachi T, Matsuo M, Kioka N, Ueda K. Alpha1-syntrophin modulates turnover of ABCA1. *J Biol Chem* 2004; 279: 15091–5.
 99. Murray CJL, Lopez AD. Mortality by cause for eight regions of the World: Global burden of disease study. *Lancet* 1997; 349:1269-76.
 100. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). 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; 106:3143-421.
 101. Neufeld EB, Remaley AT, Demosky SJ, Stonik JA, Cooney AM, Comly M, Dwyer NK, Zhang M, Blanchette-Mackie J, Santamarina-Fojo S, Brewer HB Jr. Cellular localization and trafficking of the human ABCA1 transporter. *J Biol Chem* 2001; 276: 27584-90.
 102. Neufeld EB, Stonik JA, Demosky SJ Jr, Knapper CL, Combs CA, Cooney A, Comly M, Dwyer N, Blanchette-Mackie J, Remaley AT, Santamarina-Fojo S, Brewer HB Jr. The ABCA1 transporter modulates late endocytic trafficking: insights from the correction of the genetic defect in Tangier disease. *J Biol Chem* 2004; 279:15571-8.

103. Nofer JR, Herminghaus G, Brodde M, Morgenstern E, Rust S, Engel T, Seedorf U, Assmann G, Bluethmann H, Kehrel BE. Impaired platelet activation in familial high density lipoprotein deficiency (Tangier disease). *J Biol Chem* 2004; 279: 34032-7.
104. Ohama T, Hirano K, Zhang Z, Aoki R, Tsujii K, Nakagawa-Toyama Y, Tsukamoto K, Ikegami C, Matsuyama A, Ishigami M, Sakai N, Hiraoka H, Ueda K, Yamashita S, Matsuzawa Y. Dominant expression of ATP-binding cassette transporter-1 on basolateral surface of Caco-2 cells stimulated by LXR/RXR ligands. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 296: 625– 30.
105. Omer S, Meredith D, Morris JF, Christian HC. Evidence for the role of adenosine 5'-triphosphate-binding cassette (ABC)-A1 in the externalization of annexin 1 from pituitary folliculostellate cells and ABCA1-transfected cell models. *Endocrinology* 2006; 147:3219-27.
106. Oram JF, Heinecke JW. ATP-binding cassette transporter A1: a cell cholesterol exporter that protects against cardiovascular disease. *Physiol Rev* 2005; 85:1343-72.
107. Oram JF, Yokoyama S. Apolipoprotein-mediated removal of cellular cholesterol and phospholipids. *J Lipid Res* 1996; 37: 2473-91.
108. Orso E, Broccardo C, Kaminski WE, Bottcher A, Liebisch G, Drobnik W, Gotz A, Chambenoit W, Diedrich A, Langmann T, Spruss T, Luciani MF, Rothe G, Lackner KJ, Chimini G, Schmitz G. Transport of lipids from golgi to plasma membrane is defective in tangier disease patients and Abc1-deficient mice. *Nat Genet* 2000; 24: 192-6.
109. Packard C. A triumvirate of targets in the prevention and treatment paradigm for cardiovascular disease. *Atherosclerosis Suppl* 2006; 7:21-9.
110. Passarelli M, Tang C, McDonald TO, O'Brien KD, Gerrity RG, Heinecke JW, Oram JF. Advanced glycation end product precursors impair ABCA1-dependent cholesterol removal from cells. *Diabetes* 2005; 54:2198-205.
111. Peacock JM, Arnett DK, Atwood LD, Myers RH, Coon H, Rich SS, Province MA, Heiss G. Genome scan for quantitative trait loci linked to

- high-density lipoprotein cholesterol: The NHLBI Family Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:1823-8.
112. Phillips C, Lopez-Miranda J, Perez-Jimenez F, McManus R, Roche HM. Genetic and nutrient determinants of the metabolic syndrome. *Curr Opin Cardiol* 2006; 21:185-93.
 113. Pietrini V, Rizzuto N, Vergani C, Zen F, Ferro Milone F. Neuropathy in Tangier disease: A clinicopathologic study and a review of the literature. *Acta Neurol Scand* 1985; 72:495-505.
 114. Pollock M, Nukada H, Frith RW, Simcock JP, Allpress S. Peripheral neuropathy in Tangier disease. *Brain* 1983; 106 (Pt 4) 911-28.
 115. Probst MC, Thumann H, Aslanidis C, Langmann T, Buechler C, Patsch W, Baralle FE, Dallinga-Thie GM, Geisel J, Keller C, Menys VC, Schmitz G. Screening for functional sequence variations and mutations in ABCA1. *Atherosclerosis* 2005; 175:269-79.
 116. Rader DJ, Pure E. Lipoproteins, macrophage function and atherosclerosis: beyond the foam cell? *Cell Metab* 2005; 1:223-30.
 117. Reaven G. Banting lecture: role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988; 37:1595-607.
 118. Repa JJ, Mangelsdorf DJ. Nuclear receptor regulation of cholesterol and bile acid metabolism. *Curr Opin Biotechnol* 1999; 10:557-63.
 119. Rodriguez-Rodriguez E, Mateo I, Llorca J, Sanchez-Quintana C, Infante J, Garcia-Gorostiaga I, Sanchez-Juan P, Berciano J, Combarros O. Association of genetic variants of ABCA1 with Alzheimer's disease risk. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2007; 144:964-8.
 120. Rust S, Rosier M, Funke H, Real J, Amoura Z, Piette JC, Deleuze JF, Brewer HB, Duverger N, Deneffe P, Assmann G. Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat Genet* 1999; 22:352-5.
 121. Sartipy P, Loskutoff DJ. Expression profiling identifies genes that continue to respond to insulin in adipocytes made insulin-resistant by treatment with tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem* 2003; 278:52298-306.

122. Schmitz G, Langmann T. Transcriptional regulatory networks in lipid metabolism control ABCA1 expression. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1735:1-19.
123. Schmitz G, Schambeck CM. Molecular defects in the ABCA1 pathway affect platelet function. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2006; 35:166-74.
124. Schröder JM. Pathology of peripheral nerves. An atlas of structural and molecular pathological changes. Berlin: Springer; 2001.
125. Schwartz K, Lawn RM, Wade DP. ABC1 gene expression and ApoA-I-mediated cholesterol efflux are regulated by LXR. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 274: 794 – 802.
126. Selva DM, Hirsch-Reinshagen V, Burgess B, Zhou S, Chan J, McIsaac S, Hayden MR, Hammond GL, Vogl AW, Wellington CL. The ATP-binding cassette transporter 1 mediates lipid efflux from Sertoli cells and influences male fertility. *J Lipid Res* 2004; 45:1040-50.
127. Serfaty-Lacrosniere C, Civeira F, Lanzberg A, Isaia P, Berg J, Janus ED, Smith MP Jr, Pritchard PH, Frohlich J, Lees RS, Barnard GF, Ordovas JM, Schaefer EJ. Homozygous Tangier disease and cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 1994; 107:85-98.
128. Shastri KM, Carvalho ACA, Lees RS. Platelet function and platelet lipid composition in the dyslipoproteinemias. *J Lipid Res* 1980; 21: 467-72.
129. Shioji K, Nishioka J, Naraba H, Kokubo Y, Mannami T, Inamoto N, Kamide K, Takiuchi S, Yoshii M, Miwa Y, Kawano Y, Miyara T, Miyazaki S, Goto Y, Nonogi H, Tago N, Iwai N. A promoter variant of the ATP-binding cassette transporter A1 gene alters the HDL cholesterol level in the general Japanese population. *J Hum Genet* 2004; 49:141-7.
130. Sing CF, Stengard JH, Kardina SLR. Genes, Environment and Cardiovascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:1190-6.
131. Singaraja RR, Brunham LR, Visscher H, Kastelein JJP, Hayden MR. Efflux and Atherosclerosis: The clinical and biochemical impact of variations in the ABCA1 gene. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:720-7.

132. Singaraja RR, James ER, Crim J, Visscher H, Chatterjee A, Hayden M. Alternate transcripts expressed in response to diet reflect tissue-specific regulation of ABCA1. *J Lipid Res* 2005; 46:2061-71.
133. Srinivasan SR, Li S, Chen W, Boerwinkle E, Berenson G. R219K polymorphism of the ABCA1 gene and its modulation of the variations in serum high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides related to age and adiposity in white versus black young adults. The Bogalusa Heart Study. *Metabolism* 2003; 52:930-4.
134. Sundar PD, Feingold E, Minster RL, DeKosky ST, Kamboh MI. Gender-specific association of ATP-binding cassette transporter 1 (ABCA1) polymorphisms with the risk of late-onset Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2007; 28: 856-62.
135. Tabas I. Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications. *J Clin Invest* 2002; 110: 905-11.
136. Tabas I. Phospholipid metabolism in cholesterol-loaded macrophages. *Curr Opin Lipidol* 1997; 8:263-7.
137. Tall AR, Wang N. Tangier disease as a test of the reverse cholesterol transport hypothesis. *J Clin Invest* 2000; 106:1205-7.
138. Tamehiro N, Shigemoto-Mogami Y, Kakeya T, Okuhira KI, Suzuki K, Sato R, Nagao T, Nishimaki-Mogami T. SREBP-2- and LXR-driven dual promoter regulation of hepatic ABCA1 gene expression: mechanism underlying the unique response to cellular cholesterol status. *J Biol Chem* 2007; 282:21090-9.
139. Tan JHH, Low PS, Tan YS, Tong MC, Saha N, Yang H, Heng CK. ABCA1 gene polymorphisms and their associations with coronary artery disease and plasma lipids in males from three ethnic populations in Singapore. *Hum Genet* 2003; 113:106-17.
140. Theilmeier G, Schmidt C, Herrmann J, Keul P, Schafers M, Herrgott I, Mersmann J, Larmann J, Hermann S, Stypmann J, Schober O, Hildebrand R, Schulz R, Heusch G, Haude M, von Wnuck Lipinski K, Herzog C, Schmitz M, Erbel R, Chun J, Levkau B. High-density lipoproteins and their

- constituent, sphingosine-1-phosphate, directly protect the heart against ischemia/reperfusion injury in vivo via the S1P3 lysophospholipid receptor. *Circulation* 2006; 114:1403-9.
141. Timmins JM, Lee JY, Boudyguina E, Kluckman KD, Brunham LR, Mulya A, Gebre AK, Coutinho JM, Colvin PL, Smith TL, Hayden MR, Maeda N, Parks JS. Targeted inactivation of hepatic ABCA1 causes profound hypoalphalipoproteinemia and kidney hypercatabolism of apoA-I. *J Clin Invest* 2005; 115:1333-42.
 142. Tregouet DA, Ricard S, Nicaud V, Arnould I, Soubigou S, Rosier M, Duverger N, Poirier O, Macé S, Kee F, Morrison C, Deneffe P, Tiret L, Evans A, Deleuze JF, Cambien F. In-depth haplotype analysis of ABCA1 gene polymorphisms in relation to plasma ApoA1 levels and myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24:775-81.
 143. Trompier D, Alibert M, Davanture S, Hamon Y, Pierres M, Chimini G. Transition from dimers to higher oligomeric forms occurs during the ATPase cycle of the ABCA1 transporter. *J Biol Chem* 2006; 281:20283-90.
 144. Tserentsoodol N, Gordiyenko NV, Pascual I, Lee JW, Fliesler SJ, Rodriguez IR. Intraretinal lipid transport is dependent on high density lipoprotein-like particles and class B scavenger receptors. *Mol Vis* 2006; 12:1319-33.
 145. Uehara Y, Engel T, Li Z, Goepfert C, Rust S, Zhou X, Langer C, Schachtrup C, Wiekowski J, Lorkowski S, Assmann G, Von Eckardstein A. Polyunsaturated fatty acids and acetoacetate downregulate the expression of the ATP-binding cassette transporter A1. *Diabetes* 2002; 51: 2922–8.
 146. Vedhachalam C, Duong PT, Nickel M, Nguyen D, Dhanasekaran P, Saito H, Rothblat GH, Lund-Katz S, Phillips MC. Mechanism of ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1)-mediated cellular lipid efflux to apolipoprotein A-I and formation of high density lipoprotein particles. *J Biol Chem* 2007; 282:25123-30.

147. Vergani CG, Plancher AC, Zuin M, Cattaneo M, Tramaloni C, Maccari S, Roma P, Catapano AL. Bile lipid composition and haemostatic variables in a case of high density lipoprotein deficiency (Tangier disease). *Eur J Clin Investig* 1984; 14: 49-54.
148. Verghese PB, Arrese EL, Soulages JL. Stimulation of lipolysis enhances the rate of cholesterol efflux to HDL in adipocytes. *Mol Cell Biochem* 2007; 302:241-8.
149. Wang J, Burnett JR, Near S, Young K, Zinman B, Hanley AJG, Connelly PW, Harris SB, Hegele RA. Common and rare ABCA1 variants affecting plasma HDL cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:1983-9.
150. Wang WY, Barratt BJ, Clayton DG, Todd JA. Genome-wide association studies: Theoretical and practical concerns. *Nat Rev* 2005; 6:109-18.
151. Wang N, Chen W, Linsel-Nitschke P, Martinez LO, Agerholm-Larsen B, Silver DL, Tall AR. A PEST sequence in ABCA1 regulates degradation by calpain protease and stabilization of ABCA1 by apoA-I. *J Clin Invest* 2003; 111: 99 –107.
152. Wang X, Paigen B. Genome-wide search for new genes controlling plasma lipid concentrations in mice and humans. *Curr Opin Lipidol* 2005; 16:127-37.
153. Wang Y, Oram JF. Unsaturated fatty acids inhibit cholesterol efflux from macrophages by increasing degradation of ATP-binding cassette transporter A1. *J Biol Chem* 2002; 277: 5692–7.
154. Wang Y, Kurdi-Haidar B, Oram JF. LXR-mediated activation of macrophage stearoyl-CoA desaturase generates unsaturated fatty acids that destabilize ABCA1. *J Lipid Res* 2004; 45: 972–80.
155. Wavrant-De Vrièze F, Compton D, Womick M, Arepalli S, Adighibe O, Li L, Pérez-Tur J, Hardy J. ABCA1 polymorphisms and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 2007; 416:180-3.
156. Wellington CL, Walker EK, Suarez A, Kwok A, Bissada N, Singaraja R, Yang YZ, Zhang LH, James E, Wilson JE, Francone O, McManus BM, Hayden MR. ABCA1 mRNA and protein distribution patterns predict

- multiple different roles and levels of regulation. *Lab Invest* 2002; 82:273-83.
157. Wharle SE, Hong J, Parsadanian M, Legleiter J, Han X, Fryer JD, Kowalewski T, Holtzman DM. ABCA1 is required for normal central nervous system apoE levels and for lipidation of astrocyte-secreted apoE. *J Biol Chem* 2004; 279: 40987-93.
 158. World Health Organization-International Society of Hypertension: Guidelines for the management of hypertension. Guidelines Subcommittee. *J Hypertens* 1999; 17:151-83.
 159. Yamakawa-Kobayashi K, Yanagi H, Yu YX, Endo K, Arinami T, Hamaguchi H. Associations between serum high-density lipoprotein cholesterol or apolipoprotein AI levels and common genetic variants of the ABCA1 gene in Japanese school-aged children. *Metabolism* 2004; 53:182-6.
 160. Yokoyama S. Assembly of High-Density Lipoprotein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 20-7.
 161. Yu H, Patel SB. Recent insights into the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Clin Genet* 2005; 68:383-91.
 162. Zha X, Gauthier A, Genest J, McPherson R. Secretory vesicular transport from the Golgi is altered during ATP-binding cassette protein A1 (ABCA1)-mediated cholesterol efflux. *J Biol Chem* 2003; 278:10002-5.
 163. Ziv E, Burchard EG. Human population structure and genetic association studies. *Pharmacogenomics* 2003; 4:431-41.

Los miembros del jurado de examen designados por el Posgrado en Biología Experimental abajo firmantes aprobaron la tesis "**BÚSQUEDA DE POSIBLES VARIANTES FUNCIONALES DEL GEN ABCA1 EN INDIVIDUOS MEXICANOS CON HIPO E HIPER α -LIPOPROTEINEMIA, Y SU ASOCIACIÓN CON OTROS RASGOS METABÓLICOS**" realizada por la alumna **María Teresa Villarreal Molina** y se realizó la disertación pública el día 3 de diciembre de 2007 en las instalaciones de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.



PRESIDENTE

Dr. Miguel Betancourt Rule

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



SECRETARIO

Dr. Samuel Canizales Quinteros

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"

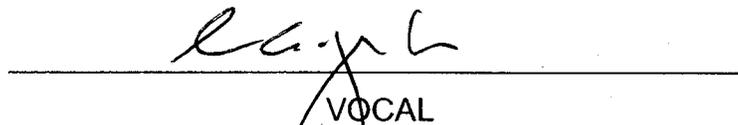
Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM



VOCAL

Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



VOCAL

Dr. Carlos Aguilar Salinas

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán",