



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

**PAPEL DE LAS LIPOPROTEINAS DE ALTA DENSIDAD EN EL RIESGO  
DE DIABETES TIPO 2**

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:  
Ana Teresa Ochoa Guzmán

DIRECTORA DE TESIS

Dra. María Teresa Tusié Luna  
Instituto de Investigaciones Biomédicas  
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

COMITÉ TUTOR

Dr. Alejandro Zentella Dehesa  
Instituto de Investigaciones Biomédicas  
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

Dr. Carlos Alberto Aguilar Salinas  
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

Ciudad de México, CDMX, Mayo de 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán  
Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica

**PAPEL DE LAS LIPOPROTEINAS DE ALTA DENSIDAD EN EL**  
**RIESGO DE DIABETES TIPO 2**

Ciudad de México, CDMX, Mayo de 2020

*A Erwin,  
que sin su apoyo incondicional  
y su amor, no habría llegado hasta aquí.*

*A mis padres Ana Lilia y Luis,  
que sin sus consejos y su paciencia,  
este camino habría sido complicado.*

*“Pon todo lo que eres en lo mínimo que hagas”*

*Fernando Pessoa*

*(1888-1935)*

## **A G R A D E C I M I E N T O S**

La aspirante al grado de Doctora de Ciencias y autora de este trabajo de tesis, deseo agradecer a mi directora de tesis, la Dra. María Teresa Tusié Luna, por su paciencia, dedicación y su apoyo en todo este proceso, desde los pasos iniciales para concebir la idea de este trabajo, hasta los finales en la producción de los resultados. Muy agradecida estoy con mis cotutores, el Dr. Alejandro Zentella Dehesa y el Dr. Carlos A. Aguilar Salinas, por siempre tenderme la mano y mostrarme su apoyo de forma ilimitada.

También deseo extender mi agradecimiento a Daniela Guillén Quintero, Dra. Liliana Muñoz Hernández y Alejandro García López, compañeros, maestros y amigos incondicionales.

Este trabajo no habría sido posible sin la participación de colegas, profesores y amigos, cuya dedicación en el trabajo, sus consejos y su generosa amistad, pudieron darle celeridad y armonía a todo este proceso. Ellos son (sin algún orden en particular): Dra. Hortensia Moreno Macías, Dr. Victor Ortiz, Dr. Eulises Díaz Díaz, Dr. Oscar Pérez Méndez, María Luisa Ordoñez Sánchez, Rosario Rodríguez Guillén, Dra. Irma Mitre, Dra. Myrian Velasco, Dra. Marcia Hiriart, Yayoi Segura Kato, Saúl Cano Colín, Salvador Ramírez, Maribel Rodríguez Torres, José Luis Ventura Gallegos, Saúl-Cano Colín, Carmita Pérez Guitar y Angelina Pérez.

En general, muchas son las personas cuya participación fue importante en el desarrollo de los objetivos de esta tesis. Seguramente omití los nombres de algunos de ellos en este documento, pero no en mi memoria.

# ÍNDICE

---

<b>Índice de tablas</b>	.....	<b>6</b>
<b>Índice de figuras</b>	.....	<b>7</b>
<b>Lista de abreviaturas</b>	.....	<b>9</b>
<b>Resumen</b>	.....	<b>11</b>
<b>1. Introducción</b>	.....	<b>14</b>
<b>2. Antecedentes</b>	.....	<b>16</b>
<b>3. Planteamiento del problema</b>	.....	<b>34</b>
<b>4. Hipótesis</b>	.....	<b>35</b>
<b>5. Objetivos</b>	.....	<b>36</b>
<b>6. Metodología</b>	.....	<b>37</b>
<b>7. Resultados</b>	.....	<b>62</b>
<b>8. Discusión</b>	.....	<b>87</b>
<b>9. Conclusiones</b>	.....	<b>94</b>
<b>10. Bibliografía</b>	.....	<b>95</b>
<b>11. Apéndice</b>	.....	<b>102</b>
<b>Anexo A: Productos de la tesis</b>		

---

## ÍNDICE DE TABLAS

---

### **Antecedentes**

<i>Tabla 2.3.1. Clasificación de las subclases de HDL</i>	.....	25
---	-------	----

### **Metodología**

<i>Tabla 6.1.4. Descripción de las variables de estudio y su escala de medición</i>	.....	39
---	-------	----

<i>Tabla 6.2.2. Endonucleasas usadas para la generación de fragmentos de ADN</i>	.....	44
--	-------	----

### **Resultados**

<i>Tabla 7.2. Características de los participantes por genotipos de ABCA1</i>	.....	63
---	-------	----

<i>Tabla 7.3.1. Características de los individuos por genotipo rs2422493</i>	.....	65
--	-------	----

<i>Tabla 7.3.2. Características de los individuos por genotipo rs9282541</i>	.....	66
--	-------	----

<i>Tabla 7.4.1. Características de los portadores y no portadores del genotipo rs2422493</i>	.....	67
--	-------	----

<i>Tabla 7.4.2. Características de los portadores y no portadores del genotipo rs9282541</i>	.....	68
--	-------	----

<i>Tabla 7.5. Características de los individuos con diabetes tipo 2 y controles</i>	.....	69
---	-------	----

<i>Tabla 7.7.1. Resultados del análisis de senderos</i>	.....	75
---	-------	----

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

### Antecedentes

<i>Figura 2.2.2. Localización de sitios potenciales de unión a factores de transcripción en el gen ABCA1 de humanos</i>	.....	20
<i>Figura 2.2.5. Estructura esquemática del transportador ABCA1</i>	.....	21
<i>Figura 2.2.6.1. Secuencia genómica que precede al exón 1 del gen ABCA1 de humanos</i>	.....	22
<i>Figura 2.2.6.2. Diagrama de ABCA1 y análisis estructural de DEC1</i>	.....	23
<i>Figura 2.3.1. Clasificación de las subclases de HDL</i>	.....	26
<i>Figura 2.3.2. Principales componentes de la HDL</i>	.....	27
<i>Figura 2.3.4. Metabolismo de las HDL</i>	.....	31

### Metodología

<i>Figura 6.2. Representación esquemática de la actividad del promotor de ABCA1</i>	.....	43
<i>Figura 6.2.3. Productos de PCR en gel de agarosa al 1%</i>	.....	45
<i>Figura 6.2.4. Electroferograma que muestra los amplicones secuenciados</i>	.....	46
<i>Figura 6.2.5.1. Gel de agarosa que muestra las bandas el amplicón digerido</i>	.....	47
<i>Figura 6.2.5.2. Gel de agarosa al 1% que muestra el vector pGL4.10</i>	.....	47
<i>Figura 6.2.8. Representación esquemática de la secuencia de ADN recombinante</i>	.....	51
<i>Figura 6.2.9. Electroferograma de la mutagénesis dirigida</i>	.....	52
<i>Figura 6.2.10.1. Micrografías de la línea celular HeLa</i>	.....	52
<i>Figura 6.3.1.1. Micrografías de la línea celular MIN-6</i>	.....	54
<i>Figura 6.3.1.2. Micrografías de la línea celular Rin-m5F</i>	.....	55
<i>Figura 6.3.2. Bandas que muestran las lipoproteínas aisladas</i>	.....	56
<i>Figura 6.3.4. Electroforesis de gel de poliacrilamida de LDL y HDL aisladas</i>	.....	57

### Resultados

<i>Figura 7.7. Diagrama de senderos de la asociación hipotética entre los genotipos de ABCA1 y otras variables</i>	.....	71
<i>Figura 7.7.1. Modelo final de la asociación entre los genotipos de ABCA1 y otras variables</i>	.....	74
<i>Figura 7.8. Actividad de la actividad del promotor del gen ABCA1</i>	.....	77
<i>Figura 7.9. Efecto de las HDL sobre la secreción de insulina en células MIN-6</i>	.....	79
<i>Figura 7.10. Efecto de las HDL sobre la secreción de insulina en células MIN-6</i>	.....	80
<i>Figura 7.11. Masa total y composición química de la subfracciones de HDL</i>	.....	81
<i>Figura 7.12. Efecto de las subfracciones de HDL sobre la secreción de insulina con baja glucosa</i>	.....	82

---

<i>Figura 7.13. Efecto de las subfracciones de HDL sobre la secreción de insulina con alta glucosa</i>	.....	83
<i>Figura 7.14. Capacidad del flujo de salida de colesterol de las HDL totales y subfracciones de HDL en células MIN-6</i>	.....	84
<i>Figura 7.15. Capacidad del flujo de salida de colesterol de las HDL totales y subfracciones de HDL en células Rin-m5F</i>	.....	85
<i>Figura 7.16. Secreción de insulina mediada por glucosa en células Rin-m5F</i>	.....	86
<i>Figura 7.17. Micrografías electrónicas de las células Rin-m5F</i>	.....	86

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ABCA1</b>	Proteína transportadora (del inglés, <i>ATP-binding cassette transporter A1</i> )
<b>ABCG1</b>	Proteína transportadora (del inglés, <i>ATP-binding cassette transporter G1</i> )
<b>ABCG4</b>	Proteína transportadora (del inglés, <i>ATP-binding cassette transporter G4</i> )
<b>ANOVA</b>	Análisis de la varianza
<b>apoA-I</b>	Apolipoproteína A1
<b>BCA</b>	Ensayo de ácido bicinconínico (del inglés, <i>Bicinchoninic Acid Assay</i> )
<b>CETP</b>	Proteína transferidora de ésteres de colesterol
<b>Ci</b>	Curio
<b>cpm</b>	Cuentas por minuto
<b>CP</b>	Componentes principales
<b>DMEM</b>	Medio de cultivo celular (del inglés, <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> )
<b>DT2</b>	Diabetes tipo 2
<b>DUN</b>	Dominios de unión a nucleótidos
<b>EEM</b>	Error estándar de la media
<b>EGG</b>	Electroforesis en gel de gradiente
<b>g</b>	Gramo
<b><sup>3</sup>H</b>	Tritio
<b>HBSS</b>	Medio de cultivo celular (del inglés, <i>Hanks' Balanced Salt Solution</i> )
<b>HDL</b>	Lipoproteína de alta densidad (del inglés, <i>High Density Lipoprotein</i> )
<b>HDL-c</b>	Colesterol de las lipoproteína de alta densidad (del inglés, <i>High Density Lipoprotein cholesterol</i> )
<b>HeLa</b>	Línea celular derivada de cáncer cervical ( <i>Henrietta Lacks</i> )
<b>HOMA-IR</b>	Índice que evalúa la resistencia a la insulina (del inglés, <i>Homeostatic Model Assessment–Insulin Resistance</i> )
<b>ICT</b>	Índice cintura-talla
<b>IDL</b>	Lipoproteína de densidad intermedia (del inglés, <i>Intermediate Density Cholesterol</i> )
<b>IMC</b>	Índice de masa corporal
<b>LCAT</b>	Lecitin colesterol aciltransferasa
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baja densidad (del inglés, <i>Low Density Lipoprotein</i> )
<b>LXR</b>	Receptores nucleares X hepáticos
<b>MIN-6</b>	Línea celular derivada de insulinoma de ratón (del inglés, <i>Mouse Insulinom</i> )
<b>PBS</b>	Buffer fosfato salino (del inglés, <i>Phosphate Buffered Saline</i> )

<b>PLTP</b>	Proteína transferidora de fosfolípidos
<b>RIA</b>	Radioinmunoensayo (del inglés, <i>Radioimmunoassay</i> )
<b>Rin-m5F</b>	Línea celular derivada de insulinoma de rata (del inglés, <i>Rat insulinom</i> )
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>RPMI</b>	Medio de cultivo celular (del inglés, <i>Roswell Park Memorial Institute</i> )
<b>RXR</b>	Receptor X retinoide
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino
<b>SNP</b>	Polimorfismo de un solo nucleótido (del inglés, <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> )
<b>SR-B1</b>	Receptor basurero, clase B tipo 1 (del inglés, <i>Scavenger receptor, class B type 1</i> )
<b>TG</b>	Triacilglicelores, triglicéridos
<b>VLDL</b>	Lipoproteína de muy baja densidad (del inglés, <i>Very Low Density Cholesterol</i> )
<b>GWAS</b>	Estudio de asociación del genoma completo (del inglés, <i>Genome-Wide Association Study</i> ).

## RESUMEN

**Antecedentes.** Tanto en estudios clínicos como en epidemiológicos, los niveles bajos de colesterol HDL (HDL-c) han sido asociados con un incremento en el riesgo de enfermedad coronaria, enfermedad vascular cerebral isquémica, diabetes tipo 2 (DT2) y distintos tipos de cáncer. Las HDL (lipoproteínas de alta densidad) poseen múltiples funciones, entre las que destaca el transporte de colesterol de células periféricas hacia el hígado (proceso conocido como transporte reverso del colesterol, eliminando así el exceso de colesterol de las células), como secretagogos de insulina en células  $\beta$  y como antioxidantes. Las HDL son partículas de distinto tamaño, composición química y función y se dividen en las siguientes subfracciones: 2a, 2b, 3a, 3b y 3c. El transportador del casete de unión a ATP A1 (ABCA1) tiene un papel fundamental en el primer paso del transporte reverso del colesterol, transfiriendo colesterol celular y fosfolípidos a las apolipoproteínas pobres en lípidos. Ciertas variantes genéticas en el gen *ABCA1* se asocian con bajas concentraciones plasmáticas de HDL-c. La variante genética rs9282541 (R230C) está presente casi de forma exclusiva en poblaciones amerindias y ha sido asociada con niveles bajos de HDL-c (hipoalfalipoproteinemia), DT2 y con otros rasgos metabólicos. Por otro lado, el polimorfismo rs2422493 (-565C/T) muestra una alta frecuencia en nuestra población y también ha sido asociado a hipoalfalipoproteinemia en otras poblaciones. Estas dos variantes segregan de forma independiente, de ahí la importancia de estudiar el efecto combinado de estas variantes en sujetos de la población mexicana.

**Objetivos.** Los objetivos principales de esta tesis fueron *i)* caracterizar los rasgos clínicos y de laboratorio de los individuos con las variantes genéticas rs9282541 y rs2422493 del gen *ABCA1*; *ii)* evaluar el efecto combinado de ambas variantes sobre los niveles de HDL-c y el riesgo a DT2; *iii)* evaluar la actividad del promotor de *ABCA1 in vitro* con y sin el alelo de riesgo del polimorfismo rs2422493 (*i.e.*, alelo T vs. alelo C); *iv)* determinar los efectos de las HDL totales y subfracciones

de HDL sobre la secreción de insulina y flujo de salida de colesterol en una línea de células  $\beta$ .

**Métodos.** Se realizó un análisis de senderos con la información recolectada de 3,303 mestizos mexicanos para evaluar las contribuciones específicas de las variantes genéticas rs2422493 y rs9282541 del gen *ABCA1*, la resistencia a la insulina, el índice cintura-talla (ICT), así como la edad, sobre los niveles plasmáticos de HDL-c y el riesgo de DT2. Los participantes se clasificaron en 4 grupos de acuerdo a su estado de portador de las dos variantes de *ABCA1*: i) el grupo de referencia se consideró al portador de ambos alelos de tipo ancestral para las dos variantes (denominado como  $-/-$ ); ii)  $+/-$  son los portadores de la variante rs2422493, pero no portadores de la rs9282541; iii)  $-/+$  son los portadores de la rs9282541, pero no de la rs2422493; y iv) portadores de los alelos menores (de riesgo) de ambas variantes ( $+/+$ ). Para controlar por ancestría se utilizaron los componentes principales (CP) de 2 estudios de asociación del genoma completo (GWAS, por sus siglas en inglés) previos. Adicionalmente, evaluamos el efecto funcional de la variante rs2422493 (-565C/T) sobre la actividad del promotor del gen reportero pGL4 en la línea celular HeLa. Por último, aislamos HDL totales y subfracciones de HDL 2a, 2b, 3a, 3b y 3c del plasma de individuos sanos para determinar su funcionalidad con respecto a secreción de insulina usando concentraciones bajas, fisiológicas y altas de glucosa y evaluamos el flujo de salida de colesterol mediado por las HDL nativas humanas, en la línea celular MIN-6.

**Resultados.** En las características clínicas y bioquímicas de los cuatro grupos, identificamos que los valores plasmáticos de HDL-c fueron gradualmente más altos en el grupo  $-/-$  comparado con el  $-/+$  y  $+/+$  ( $p < 0.01$ ). Por su parte, el grupo que tuvo mayor frecuencia de hipoalfalipoproteinemia fue el  $+/+$ . El análisis de senderos mostró efectos indirectos significativos sobre el riesgo de DT2 mediado por los niveles plasmáticos de HDL-c en los grupos  $-/+$  y  $+/+$  ( $\beta = 0.04$ ;  $p = 0.03$  y  $\beta = 0.06$ ;  $p < 0.01$ , respectivamente) en comparación con el grupo de referencia  $-/-$ . Las bajas concentraciones HDL-c estuvieron directa y significativamente asociadas con incremento en el riesgo de DT2 ( $\beta = -0.70$ ;  $p < 0.01$ ). El ICT, sexo masculino, edad y resistencia a la insulina también estuvieron asociados a un

mayor riesgo de DT2 ( $p < 0.05$ ). No identificamos efectos directos significativos de ninguno de los grupos por alelos de *ABCA1* sobre el riesgo de DT2 ( $p = 0.99$ ,  $p = 0.58$  y  $p = 0.91$  para los grupos +/-, -/+ y +/+, respectivamente). En cuanto al efecto que la variante rs242293 tuvo sobre la actividad del promotor de *ABCA1*, el constructo del plásmido reportero pGL4 que contenía la secuencia alélica de riesgo (T) tuvo una actividad significativamente menor que el constructo que contenía la secuencia alélica C ( $p < 0.001$ ). La funcionalidad de las HDL medida a través de la secreción de insulina en la línea celular MIN-6 mostró que la incubación con estas en presencia de baja glucosa, incrementó al doble la liberación de insulina, mientras que la incubación con altas concentraciones de glucosa y HDL la incrementó cinco veces comparada con los controles. Las células MIN-6 también mostraron mayor secreción de insulina y de flujo de salida de colesterol al estimularlas con subfracciones de HDL 2a, 2b, 3a, 3b y 3c, comparadas con sus respectivos controles; sin embargo, no detectamos diferencias entre las subfracciones.

**Conclusiones.** La variante rs9282541 (R230C) del gen *ABCA1* está asociada al riesgo de DT2 en mexicanos a través de su efecto sobre la disminución de las concentraciones plasmáticas de HDL-c. Por lo tanto, los niveles de HDL-c actúan como factor intermedio entre la variante R230C de *ABCA1* y la DT2. A pesar de que en los ensayos *in vitro* la variante rs2422493 disminuyó la actividad del promotor de *ABCA1*, ésta no tuvo efecto aparente sobre las variables clínicas y bioquímicas estudiadas. Las concentraciones en plasma de HDL-c son tan importantes como su funcionalidad, ya que las HDL son capaces de desencadenar la secreción de insulina, tanto en condiciones de glucosa baja, fisiológica o alta.

# 1. INTRODUCCIÓN

---

Los bajos niveles de colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (hipoalfalipoproteinemia) han sido extensamente identificados como un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedad cardiovascular (1). También se ha demostrado que esta dislipidemia puede ser factor de riesgo para el desarrollo de la diabetes tipo 2 (DT2) y a su vez, la DT2 promover la disminución en los niveles plasmáticos de colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (HDL-c). Tanto la hipoalfalipoproteinemia como la DT2 son condiciones muy prevalentes asociadas con alta morbilidad y mortalidad en la población mexicana (2, 3). Ambas patologías están fuertemente influenciadas tanto por el estilo de vida (4, 5), como por factores genéticos (6, 7). De particular interés es el descubrimiento de variantes genéticas que tienen efecto sobre varios rasgos metabólicos, incluyendo la hipertrigliceridemia (8, 9), la hipoalfalipoproteinemia (10, 11, 12), la obesidad (13) y la DT2 (14). Entre tales variantes genéticas, el polimorfismo rs9282541 (R230C) (que se encuentra casi de forma exclusiva en poblaciones amerindias) ha sido asociada con bajas concentraciones de HDL-c (10, 11, 15, 16), obesidad (15) y DT2 (14). Por otra parte, la sustitución de citosina (C) por timina (T) en la posición -565 (rs2422493) del gen *ABCA1*, también ha sido relacionada con hipoalfalipoproteinemia (17). Estas dos variantes genéticas son prevalentes en mexicanos, rs2422493 y rs9282541, con frecuencias del alelo menor de 0.5 y 0.11, respectivamente.

La proteína ABCA1 participa en la síntesis inicial de las HDL principalmente en el hígado a través de la unión con la apolipoproteína A1 (apoA-I) (1, 18, 19), pero también lo hacen transfiriendo el colesterol de las células periféricas a las apoA-I pobres en lípidos (20, 21). En modelos animales se ha mostrado que la disfunción de la proteína ABCA1 conlleva a la alteración en la función de las células  $\beta$ , a través de la disminución en el flujo de salida (eflujo) de colesterol (22), contribuyendo de esta forma a la disminución en la secreción de insulina. Estudios epidemiológicos sugieren que los bajos niveles plasmáticos de HDL-c es factor de riesgo para el desarrollo de la DT2 incidente (23-25). También ha sido previamente reconocido que las HDL pueden promover la síntesis y secreción de

insulina (26, 27). Sin embargo las HDL se consideran un grupo de partículas heterogéneas que varían en composición y tamaño, y debido a esta heterogeneidad sus propiedades y funciones no pueden inferirse directamente por las concentraciones plasmáticas de HDL-c (1).

## 2. ANTECEDENTES

---

### 2.1 Lipotoxicidad de célula $\beta$

Actualmente es ampliamente reconocida la relación que existe entre los altos niveles plasmáticos de ácidos grasos libres y otras alteraciones de la regulación del metabolismo de los lípidos, con la disfunción de las células  $\beta$ , que pueden conducir al desarrollo de la DT2 (28). Los ácidos grasos son combustibles fisiológicos para las células  $\beta$ , pero pueden volverse tóxicos a altas concentraciones intracelulares y durante un tiempo prolongado. Las consecuencias de la exposición crónica a los ácidos grasos elevados incluyen la secreción alterada de insulina y de la supervivencia celular (29). Sin embargo, los mecanismos moleculares por los cuales los ácidos grasos deterioran la función de las células  $\beta$  no se entienden completamente. En este sentido existen evidencias sobre la alteración en la oxidación de la glucosa, la acumulación de metabolitos intracitosólicos, la  $\beta$ -oxidación mitocondrial deteriorada y otras formas de disfunción mitocondrial. La mayoría de estos posibles mecanismos de toxicidad de ácidos grasos se basan en la noción de que estos macronutrientes son tóxicos solo en presencia de hiperglucemia crónica (29, 30).

Recientemente, el interés científico se ha centrado en los posibles efectos tóxicos del colesterol sobre la función de las células  $\beta$  (31). El colesterol es un macronutriente con distintas funciones dentro y fuera de las células. Intracelularmente, el colesterol se puede encontrar como un componente estructural de las membranas plasmáticas y en los microdominios ricos en colesterol de la membrana, donde esta desempeña un papel fundamental en la exocitosis de distintas partículas (32). El colesterol participa también en la biogénesis de vesículas secretoras de la red trans-Golgi (33).

Se requiere un receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL) para la absorción de colesterol en las células  $\beta$  pancreáticas (34). El exceso de colesterol intracelular proporcionado principalmente por el influjo de colesterol proveniente de las LDL puede inducir disfunción de células  $\beta$  (34) y promover la reducción en

la secreción de insulina en respuesta a concentraciones basales y altas de glucosa (35). También puede causar apoptosis a través de la generación de estrés oxidativo (36, 37), con producción de radicales libres, así como necrosis, que se observa como picnosis y orgánulos y membranas alterados en las células  $\beta$  (38).

El exceso de colesterol intracelular está directamente relacionado con la secreción reducida de insulina estimulada por glucosa (39). Este exceso de colesterol intracelular se puede observar en los gránulos de insulina, lo que conduce a agrandar la morfología de los gránulos y a una remodelación alterada de la membrana, cambiando las propiedades del gránulo (39). No obstante, los modelos experimentales muestran que la secreción de insulina se puede normalizar mediante la disminución de colesterol intracelular (35, 40).

El estudio del transportador de casete de unión a ATP, subfamilia A, miembro 1 (ABCA1) proporciona fuerte evidencia del papel del metabolismo del colesterol en la función de las células  $\beta$  (31). ABCA1 media la secreción de colesterol y fosfolípidos a la apolipoproteína pobre en lípidos apolipoproteína A-I (apoA-I) (18). El modelo de ratón que carece de expresión de ABCA1 específicamente en las células  $\beta$ , proporcionó evidencia sobre la existencia de lipotoxicidad inducida por colesterol en las células  $\beta$ , lo que resultó en intolerancia a la glucosa y disminución de la secreción de insulina inducida por la glucosa, tanto la primera, como la segunda fase. Esta secreción de insulina alterada fue aún mayor en los islotes que carecen tanto de ABCA1 como del transportador de casete de unión a ATP, subfamilia G, miembro 1 (ABCG1). Interesantemente, estos ratones también presentaron una mayor expresión de interleucina-1 $\beta$  e infiltración de macrófagos, y como consecuencia, una notable inflamación de los islotes. Sin embargo, solo los ratones que carecían de ABCA1 exhibieron acumulación de esteroides intracitosólicos (41) y presentaron alteraciones en la organización de microdominios de membrana, específicamente con respecto a la organización del aparato de Golgi y la morfología del gránulo de insulina. También se observó disminución del calcio intracitosólico que evocaría la despolarización, asociándose así con alteración de la secreción de insulina (40). El exceso de colesterol también disminuye la actividad glucoquinasa (35).

Se ha demostrado que ABCG1 y el transportador de casete de unión a ATP, subfamilia G, miembro 4 (ABCG4) promueven el flujo de colesterol hacia

HDL, tanto a subclases pequeñas (HDL3) como grandes (HDL2), pero no a apolipoproteínas pobres en lípidos (como apoA-I) (42), lo que sugiere que estos dos transportadores operan en una fase posterior del flujo de salida de colesterol (mecanismo observado en células HEK 293). ABCG1 se encuentra en la membrana plasmática, el aparato de Golgi, en el reciclaje de endosomas (43) y en los gránulos de insulina (44). Cuando se aumenta la transcripción del gen *ABCG1*, se incrementa el flujo de salida de colesterol de macrófagos, particularmente hacia las HDL (43).

## **2.2 ABCA1**

La proteína ABCA1 media la secreción de colesterol libre y fosfolípidos hacia un aceptor extracelular, apoA-I, para formar HDL. Mecanismo que ha sido extensamente estudiado en macrófagos, aunque también se lleva a cabo en células que expresan la proteína ABCA1 (se expresa en forma ubicua). ABCA1 transfiere lípidos no solo entre membranas, sino también dentro de las membranas con el objetivo de organizar y reorganizar los microdominios membranales y así modular la proliferación celular y la inmunidad (18).

### **2.2.1 Homeostasis de colesterol y ABCA1**

El colesterol es un componente esencial de la membrana celular y es indispensable para la proliferación celular; sin embargo, la acumulación excesiva de colesterol es tóxica para las células y el almacenamiento excesivo en tejidos periféricos causa aterosclerosis. El exceso de colesterol en tejidos periféricos es transportado de regreso al hígado por las HDL. Ya que el colesterol no puede ser catabolizado en tejidos periféricos, la formación de las HDL es la única vía por la cual el exceso de colesterol es removido de las células periféricas (19).

### **2.2.2 Gen ABCA1**

La secuencia del gen *ABCA1* en humanos incluye 1,453 pares de bases (pb) del promotor, 146,581 pb de intrones y exones, y 1 kb de la región 3' flanqueada. La

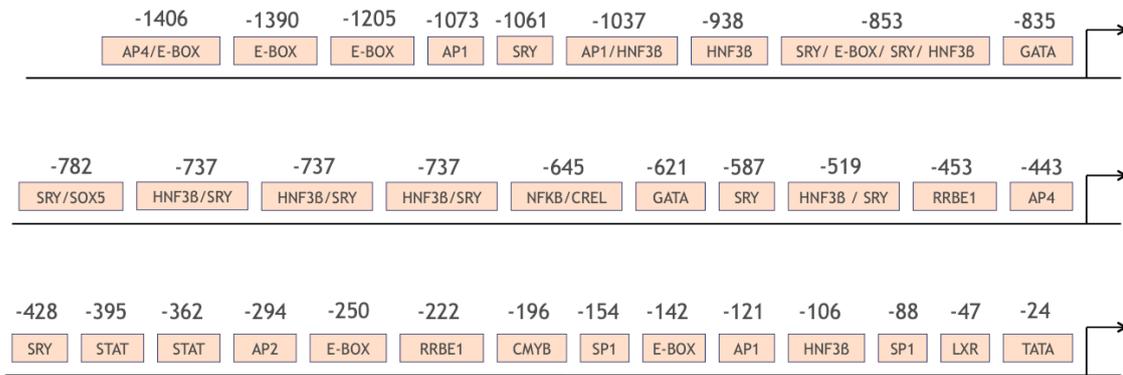
secuencia del gen *ABCA1* se expande 149 kb y se compone de 50 exones. Se han identificado además sesenta y dos secuencias repetitivas Alu en los intrones 1 al 49. El sitio de inicio de la transcripción está 315 pb río arriba de un codón de inicio (metionina) y codifica un marco de lectura abierto de 6,783 pb (45).

### 2.2.3 Regulación transcripcional de *ABCA1*

El flujo de salida de colesterol mediado por *ABCA1* está altamente regulado a nivel transcripcional. En células periféricas, como macrófagos y fibroblastos, la expresión del gen *ABCA1* está aumentada cuando estas células tienen exceso de colesterol. Esta respuesta está mediada por los receptores nucleares X hepáticos  $\alpha$  y  $\beta$  ( $LXR\alpha$  y  $LXR\beta$ ), cuyos ligandos son metabolitos de esteroides como 22-(*R*)-hidroxicolesterol, 24-(*S*)-hidroxicolesterol, 27-hidroxicolesterol y 24-(*S*),25-epoxicolesterol.  $LXR\beta$  se expresa ubicuamente, mientras que  $LXR\alpha$  lo hace principalmente en hígado, tejido adiposo, glándulas adrenales, intestino, pulmones, riñones y células de origen mielóide. La expresión de  $LXR\alpha$  de humanos está altamente regulada y de hecho puede ser autoregulada. Por otro lado el  $LXR\beta$  de humanos está establemente expresado incluso en la ausencia de colesterol. En estado basal, los heterodímeros  $LXR\beta$  y receptor X retinoide (RXR) están unidos a elementos de respuesta X hepáticos (LXREs) en los promotores de genes diana. Cuando el colesterol se acumula en las células, las concentraciones intracelulares de oxisteroides incrementa; posteriormente,  $LXR\beta$  es activado por medio de la unión a oxisteroides, estimulando así la transcripción de *ABCA1* y de  $LXR\alpha$  (18).

En el primer intrón del gen *ABCA1* se ha identificado una región que responde a la proteína de unión al elemento regulador de esteroides 2 (*SREBP2*), la cual está involucrada en la regulación de la expresión de *ABCA1* en el hígado. También, se ha localizado el MiR-33, un micro RNA intrónico localizado en el gen que codifica a *SREBP2* y modula la expresión de *ABCA1* a nivel post-transcripcional (18).

El gen *ABCA1* tiene múltiples sitios de unión a factores de transcripción que juegan un papel muy importante en el metabolismo de lípidos (45) (figura 2.2.3). Una elaborada red de regulación transcripcional modula la síntesis de colesterol y flujo de salida de este, para mantener la homeostasis de colesterol.



**Figura 2.2.2. Localización de sitios potenciales de unión a factores de transcripción en el gen ABCA1 (modificada de Santamarina-Fojo, 2000.)**

### 2.2.4 Regulación post-traduccional de la actividad de ABCA1

El flujo de salida de colesterol mediado por ABCA1 también está altamente regulado a nivel post-traduccional. Ya que el colesterol es un componente esencial de las células, la eliminación excesiva puede resultar en la muerte celular. Por lo tanto, la habilidad de degradar rápidamente ABCA1 con el objetivo de prevenir la eliminación excesiva también es importante. Las proteínas ABCA1 se degradan rápidamente, con una vida media de 1-2 h. Varias proteínas, como  $\alpha$ 1-sintropina,  $\beta$ 1-sintropina, calmodulina y apoA-I, interactúan con ABCA1 reduciendo su velocidad de degradación.

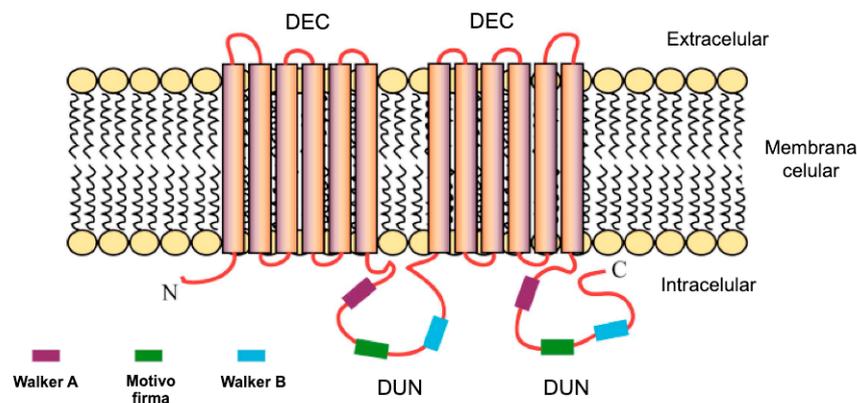
La degradación de ABCA1 se puede llevar a cabo por medio de distintas vías:

1. La proteína ABCA1 presente en la superficie celular es endocitada y reciclada de regreso a la membrana plasmática o bien, es entregada a los lisosomas a través de la degradación de endosomas tempranos y tardíos.
2. La proteasa calpaína degrada a ABCA1 directamente en la membrana plasmática, especialmente cuando apoA-I no está unida a ABCA1.
3. ABCA1 también es degradada a través de la vía ubiquitina-proteosoma (18).

## 2.2.5 Proteína ABCA1

La proteína ABCA1 se localiza principalmente en la membrana plasmática, pero también se encuentra en los compartimientos intracelulares. Se han propuesto dos distintos mecanismos que median la formación de HDL mediada por ABCA1: en el primero, ABCA1 media la formación del complejo de apoA-I con fosfolípidos y colesterol en la superficie celular [modelo de superficies celular], y el segundo se refiere a que apoA-I se une a ABCA1 en la superficie celular, posteriormente el complejo ABCA1/apoA-I es internalizado. El complejo apoA-I/lípido se forma en los endosomas tardíos (probablemente por la actividad vía ABCA1, para posteriormente ser re-secretado por exocitosis [modelo de retro-endocitosis]) (18).

La proteína ABCA1 tiene 2,261 aminoácidos (masa, 254.3 kDa), y es considerada como un transportador completo que contiene dos dominios de unión a nucleótidos (DUNs) distribuidos en series con dos dominios que abarcan la membrana – dominios extracelulares (DECs). Los DUNs de los transportadores ABC están altamente conservados. Cada DUN contiene tres elementos de secuencia altamente conservados (los motivos Walker A y Walker B y el motivo firma) que tienen un papel crítico en la unión e hidrólisis de nucleótido y en la provisión de energía de los transportadores para translocar sus sustratos entre las membranas celulares (figura 2.2.5). Los transportadores ABC usan la energía derivada de la hidrólisis/unión de ATP a DUNs para translocar una amplia variedad de sustratos y proteínas entre las membranas biológicas intra y extracelulares (19).



**Figura 2.2.5. Estructura esquemática del transportador ABCA1 (modificada de Li G, 2013).**

## 2.2.6 Variantes genéticas rs2422493 y rs9282541 del gen ABCA1

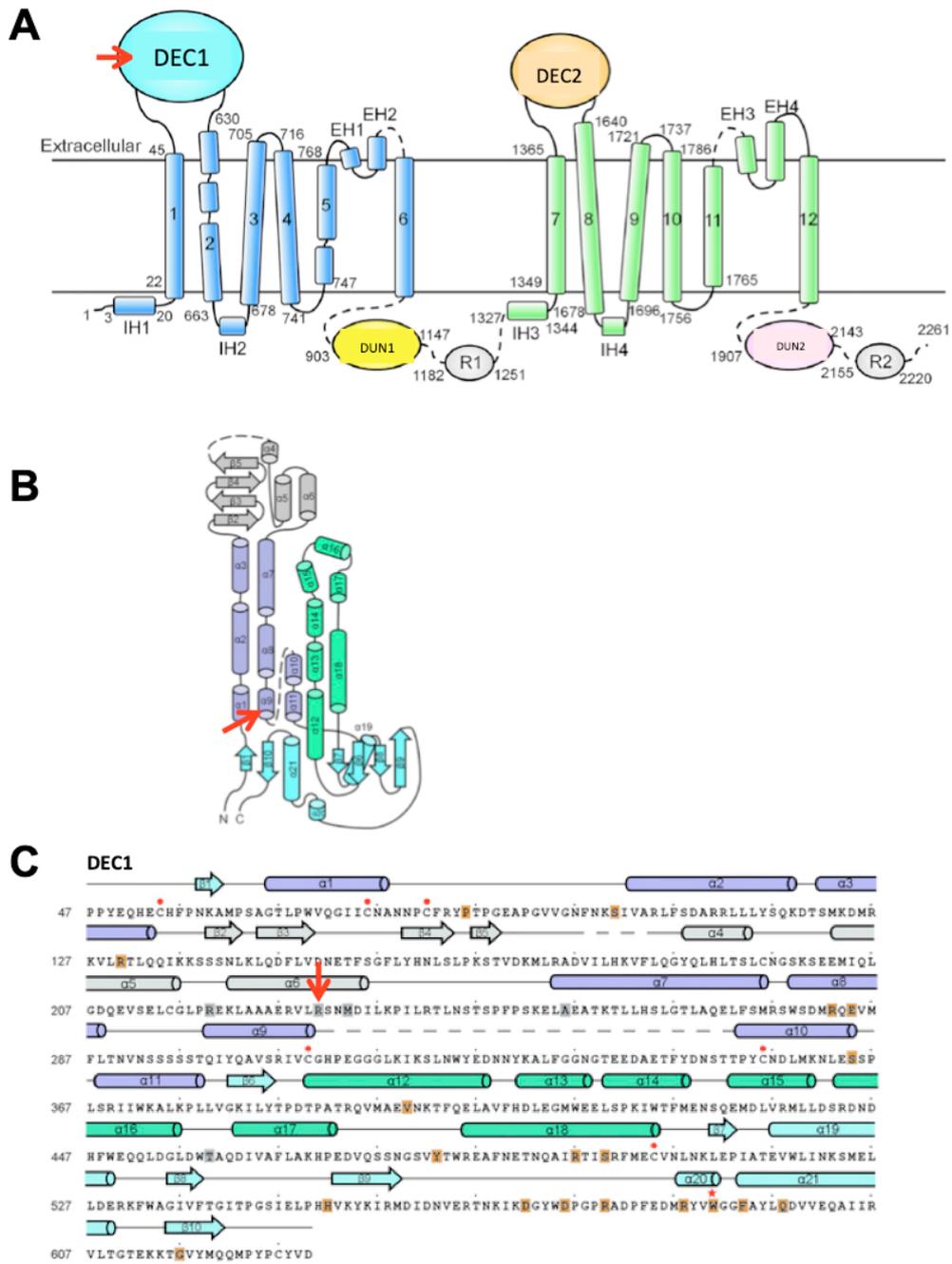
El gen *ABCA1* presenta varios polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en secuencias tanto codificantes como no codificantes que podrían influenciar su expresión (46). De particular interés para la población mexicana son las variantes genéticas rs2422493 y rs9282541, ya que ambas han sido asociadas con hipoalfalipoproteinemia (la dislipidemia con mayor prevalencia en mexicanos); así como con factores de riesgo para el desarrollo de enfermedad cardiovascular, obesidad, hipertrigliceridemia y DT2 (8-17). El SNP rs2422493 se localiza en la región del promotor de *ABCA1*, en la posición -565 (anteriormente designada -477), transición de una citosina por una timina en la posición 104928714 del cromosoma 9 (47) (figura 2.2.6.1). Por otra parte el polimorfismo rs9282541 se refiere a la sustitución de una arginina por una cisteína en la posición 230 de la proteína ABCA1, ubicada en el dominio extracelular 1 (transición de una citosina por timina en la posición 104858554 del cromosoma 9, exón 7 del gen *ABCA1*) (48) (figura 2.2.6.2).

```

NF-kappa B
-669 CTGAGGGACC TGGGGAGCTC AGGCTGGGAA TCTCC AAGGC AGTAGGTGCG
MZF1 SRY
-619 CTATCAAAAA TCAAAGTCCA GGTTTGTGGG GGC AAAACAA AAGCAGCCCA
MZF1
-569 TTACCCAGAG GACTGTCCBC CT TCCCCTCA CCCCAGCCTA GGCCTTTGAA
SRY Evi-1
-519 AGCAAAACAAA AGACAAGACA AAATGATTGG CGTCCTGAGG GAGATTGAGC
SRY
-469 CTAGAGCTCT CTCTCCCCCA ATCCCTCCCT CCGGCTGAGG AACTAA CAA
-419 AGGAAAAAAA AATTGCGGAA AGCAGGATTT AGAGGAAGCA AATTCCACTG
-369 GTGCCCTTGG CTGCCGGGAA CGTGGACTAG AGAGTCTGCG GCGCAGCCCC
-319 GAGCCAGCG CTTCCCGCGC GTCTTAGGCC GCGGGCCCG GCGGGGGAA
ZNF202/SRE-like
-269 GGGGACGCAG ACCGCGGACC CTAAGACACC TGCTGTACCC TCACCCCCA
ZNF202/SRE-like MZF1
-219 CCCCACCCAC TCCCCCAA CTCCTAGAT GTGTCGTGGG CGGCTGAACG
Sp1/3 E-Box
-169 TCGCCCGTTT AAGGGGCGGG CCGGCTCC ACGTGCTTTC TGCTGAGTGA
Sp1
-119 CTGAACTACA TAAACAGAGG CCGGGAACGG GCGGGGGAGG AGGGAGAGCA
DR4 DR4 TATA-Box
-69 CAGGCTTGA CCGATAGTAA CCTCTGCGCT CGGTGCAGCC GAATCTATAA
↓ +1

```

**Figura 2.2.6.1. Secuencia genómica que precede al exón 1 del gen ABCA1 de humanos. El sitio de inicio de la transcripción está indicado con una flecha. Los sitios de unión a factores de transcripción se marcan con rectángulos. El SNP rs2422493 se encuentra ubicado dentro de un cuadro rojo. (modificada de Langmann, 2002).**



**Figura 2.2.6.2. Diagrama de ABCA1 y análisis estructural de DEC1.** Las flechas rojas en A, B y C están señalizando el sitio donde se ubica el SNP R230C de ABCA1. A. Diagrama topológico de la proteína ABCA1. DEC, dominio extracelular; DUN, dominio de unión a nucleótido; R1 y R2, dominios reguladores. B. Ilustración topológica del dominio extracelular 1. C. Estructura secundaria del dominio extracelular 1. Los dominios están coloreados igual en la figura A y B. (modificada de Qian H, 2017).

## **2.3 HDL**

En estudios observacionales se ha identificado una relación inversa entre los niveles plasmáticos de HDL-c y el riesgo de enfermedad coronaria, infarto cerebral, DT2 y algunos tipos de cáncer.

La concentración en plasma de HDL-c es considerada como un marcador no funcional que estima el número de partículas HDL y su tamaño; sin embargo, este subrogado es incapaz de descifrar la composición heterogénea de las HDL, y por lo tanto su funcionalidad (1).

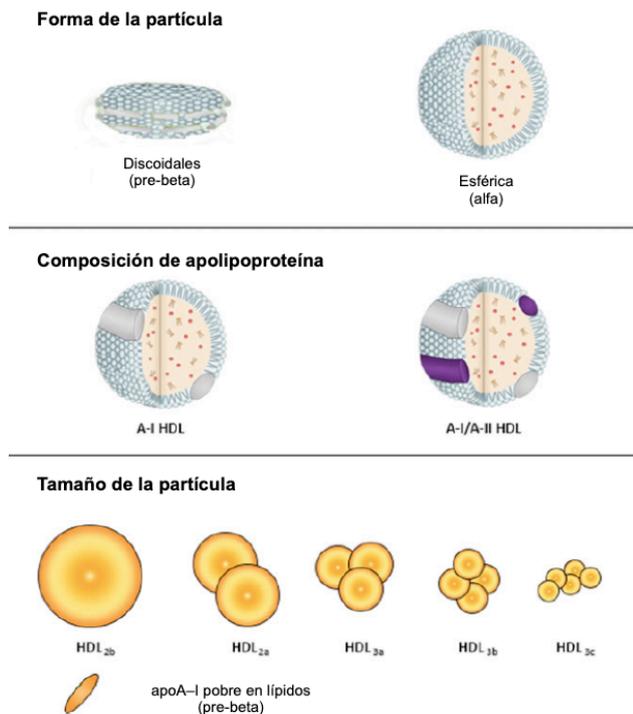
### **2.3.1 HDL y subclases de HDL**

Las HDL conforman una familia de lipoproteínas densas, pequeñas y ricas en proteínas, comparadas con otras clases de lipoproteínas. Tienen un tamaño promedio de 8-10 nm y densidad de 1.063-1.21 g/mL. Las partículas de HDL tienen formas discoidales, son complejos pseudomicelares compuestos principalmente de lípidos polares solubilizados por apolipoproteínas. Aunque también contienen otras proteínas, incluidas enzimas, y pequeñas cantidades de lípidos no polares. Las proteínas de HDL pueden presentar varias isoformas y sufrir modificaciones post-traduccionales. Como consecuencia de tan diversa composición, las partículas de HDL son muy heterogéneas en sus propiedades estructurales, químicas y biológicas (49).

Las subclases de HDL pueden dividirse de acuerdo a su densidad, tamaño, forma, y composición de proteína y lípidos (1, 50) (tabla 2.3.1 y figura 2.3.1).

**Tabla 2.3.1. Clasificación de las subclases de HDL (modificada de von Eckardstein, 2015).**

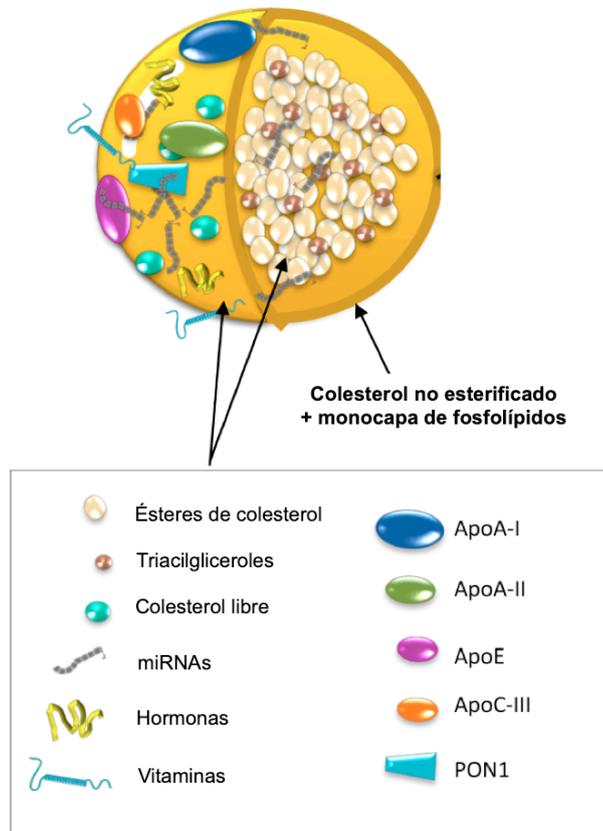
<b>Densidad (ultracentrifugación)</b> HDL2 (1.063–1.125 g/mL) HDL3 (1.125–1.21 g/mL)
<b>Densidad (ultracentrifugación)</b> HDL2b (1.063–1.091 g/mL) HDL2a (1.091–1.110 g/mL) HDL3a (1.110–1.133 g/mL) HDL3b (1.133–1.156 g/mL) HDL3c (1.156–1.179 g/mL)
<b>Tamaño (EGG)</b> HDL2b HDL2a HDL3a HDL3b HDL3c
<b>Tamaño (RMN)</b> HDL grandes (8.8–13.0 nm) HDL medianas (8.2–8.8 nm) HDL pequeñas (7.3–8.2 nm)
<b>Forma y carga (gel de agarosa)</b> HDL- $\alpha$ (esféricas) HDL-pre $\beta$ (discoidales)
<b>Carga y tamaño (electroforesis 2D)</b> HDL-pre $\beta$ (pre $\beta_1$ y pre $\beta_2$ ) HDL- $\alpha$ ( $\alpha_1$ , $\alpha_2$ , $\alpha_3$ y $\alpha_4$ ) HDL-pre $\alpha$ (pre $\alpha_1$ , pre $\alpha_2$ , y pre $\alpha_3$ )
<b>Composición de proteína (electroimmunodifusión)</b> LpA-I LpA-I:A-II



**Figura 2.3.1. Clasificación de las subclases de HDL (modificada de van der Vorst EPC, 2020).**

### 2.3.2 Composición de la HDL

La estructura fundamental de las partículas de HDL está constituida por lípidos anfipáticos (fosfolípidos y colesterol libre), lípidos no polares (triacilgliceroles y ésteres de colesterol) y por apolipoproteínas, principalmente apoA-I y apoA-II. Los lípidos anfipáticos se organizan en una monocapa en la superficie de la lipoproteína, presentando sus grupos polares hacia el medio acuoso. La estabilidad de esta monocapa está garantizada por las apolipoproteínas. Los lípidos no polares son insolubles en un medio acuoso como el plasma y en consecuencia se sitúan en el interior de las lipoproteínas, evitando así las interacciones con grupos polares, y garantizando el transporte de los lípidos en plasma (51, 52) (figura 2.3.2).



**Figura 2.3.2. Principales componentes de la HDL (modificada de Ben-Aicha S, 2020).**

### 2.3.3 Funciones de las moléculas HDL

#### ***Transporte reverso del colesterol***

El transporte reverso de colesterol es el flujo de salida de colesterol desde los tejidos periféricos hacia el hígado, llevado a cabo por las partículas de HDL, permitiendo mantener la homeostasis de colesterol y disminuyendo el riesgo de desarrollo de aterosclerosis. Las partículas de HDL no sólo participan en el transporte reverso de colesterol, sino que además ejercen un efecto protector sobre el organismo a través de múltiples capacidades que involucran a diferentes componentes lipídicos o proteicos de las HDL o bien que se encuentran asociados a estas lipoproteínas en el plasma.

### ***Propiedades Antioxidantes***

El estrés oxidativo es una importante condición de riesgo en el desarrollo de enfermedad cardiovascular, ya que induce la formación de LDL oxidadas pro-aterogénicas. Las HDL proveen una potente protección contra el daño oxidativo producido por los radicales libres presentes en las LDL, inhibiendo la generación y/o facilitando la degradación de lípidos oxidados pro-inflamatorios. Esta capacidad anti-oxidante de las partículas de HDL se debe a la presencia de enzimas como la PON1 que inhibe la modificación oxidativa de las partículas de LDL. PON1 cataliza la degradación de los ácidos grasos oxidados presentes en los lípidos de las LDL, evitando así una respuesta inflamatoria caracterizada por producción de citoquinas y adhesión de monocitos a la superficie endotelial. Además, esta enzima reduce directamente la peroxidación lipídica dentro de las placas ateromatosas coronarias y carotídeas. La actividad de PON1 asociada a las HDL se encuentra reducida en enfermedades con elevado estrés oxidativo, como la enfermedad coronaria, las dislipidemias, diversos procesos inflamatorios, diabetes y ciertas neuropatías (53).

### ***Función Antiplaquetaria***

La formación de un trombo como consecuencia de una placa ateromatosa inestable sería el evento responsable del inicio de la gran mayoría de los síndromes coronarios agudos. El fenómeno trombótico está determinado por distintos elementos (factor tisular, micropartículas apoptóticas, monocitos circulantes) que modulan la trombogenicidad de la placa y la sangre. Asimismo, la activación de las plaquetas y de la cascada de coagulación está influenciada por las partículas de HDL. Las HDL inhiben la producción de factor tisular, evitando la generación de material pro-coagulante e impiden que el fibrinógeno se una a las plaquetas. Además, se sabe que la formación de trombina se inhibe dramáticamente en presencia de las HDL (53).

### ***Actividad Antiapoptótica***

El fenómeno de apoptosis consiste en una muerte celular programada que forma parte de diversas condiciones patológicas, incluyendo la aterosclerosis. Se ha

demostrado que las partículas de HDL inhiben el proceso apoptótico en las células endoteliales, mediante el bloqueo de la vía mitocondrial de la apoptosis. El tratamiento de las células endoteliales con HDL previene la disipación del potencial de la membrana mitocondrial, la liberación de especies reactivas de oxígeno, la liberación de citocromo C hacia el citoplasma y la activación de las caspasas 9 y 3 (53).

### ***Propiedad Antiinflamatoria***

La LDL oxidada y sus componentes modificados inducen la síntesis de citoquinas, mediadores inflamatorios y factores de crecimiento que pueden alterar el comportamiento de las células endoteliales. Una de las primeras manifestaciones de la disfunción endotelial es la expresión de moléculas de adhesión celular (ICAM y VCAM) que promueven el reclutamiento de leucocitos hacia la pared vascular. Los macrófagos y los linfocitos T localizados en la íntima del vaso sanguíneo inician el proceso inflamatorio que eventualmente se convierte en un proceso nocivo contribuyendo a la progresión de la arteriosclerosis. La exposición de las células endoteliales a HDL reconstituidas hace estas células resistentes a la síntesis de moléculas de adhesión inducida por citoquinas (53).

### **2.3.4 Metabolismo de la HDL**

El metabolismo de las HDL inicia con la producción y secreción de la apoA-I, la principal proteína de las HDL, en el hígado (70%) y en el intestino (30%). Una vez en el plasma, la apoA-I pobre en lípidos (HDL naciente) interacciona con células obteniendo colesterol y fosfolípidos en una reacción mediada por la proteína ABCA1. Esto resultará en la formación de HDL pequeñas, pobres en lípidos, discoidales y con migración pre $\beta$ . Posteriormente, el colesterol presente en las HDL discoidales será esterificado por medio de la enzima lecitina colesterol aciltransferasa (LCAT), formando ésteres de colesterol. Ya que estos ésteres de colesterol son altamente hidrofóbicos, no pueden permanecer en la superficie de las HDL donde podrían estar en contacto directo con el plasma. Por lo tanto, estas partículas se colocan y acumulan en el centro de las HDL, formando un centro lipídico. Este proceso transformará la HDL discoidales con migración pre $\beta$  en HDL

esféricas con migración  $\alpha$ , que son las partículas que se encuentran en el plasma (HDL3 y HDL2). Inicialmente, estas partículas esféricas de HDL que se han formado contienen solamente dos apoA-I por partícula. Sin embargo, sufren un extenso remodelamiento por varios factores, cambiando así su composición y tamaño. Por ejemplo, las HDL pequeñas y esféricas pueden incrementar su tamaño al tomar más colesterol libre de tejidos periféricos por medio del flujo de salida de colesterol de los transportadores ABCG1 y SR-B1, y posteriormente esterificando el colesterol por la enzima LCAT. Después de todo el anterior proceso, las partículas de HDL contienen de 3 a 4 moléculas de apoA-I. Adicionalmente la proteína transferidora de fosfolípidos (PLPT) puede transferir fosfolípidos de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y quilomicrones a las HDL, contribuyendo aún más al remodelado. Esta transferencia de fosfolípidos puede desestabilizar la apolipoproteína, resultando en fusión de la partícula remanente y formación de una partícula HDL más grande con migración  $\alpha$ , y enseguida puede sufrir un intercambio de constituyentes con lipoproteínas que contienen apoB (VLDL y lipoproteínas de baja densidad (LDL) vía la proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP). El efecto neto de la CETP es la transferencia de ésteres de colesterol de HDL a lipoproteínas que contienen apoB, a cambio de triacilglicerol, generando así HDL rica en triacilglicerol. Esta transferencia mediada por CETP dará como resultado la transición de partículas grandes con migraciones alfa (HDL2) en partículas más pequeñas de migración alfa (HDL3). Además, esta transición puede ser causada por la absorción de ésteres de colesterol mediada por SR-B1 por el hígado, o por hidrólisis de triacilglicerol por la lipasa hepática o la lipasa endotelial. La acción combinada de la CETP y lipasas finalmente resulta en reducción del tamaño de las HDL, acompañada de pérdida parcial de apoA-I. Esta apoA-I sin lípidos, se excreta por los riñones o se recicla, para nuevamente interactuar con el transportador ABCA1 y así comenzar un nuevo ciclo de lipidación (50, 54) (figura 2.3.4).



(56). Otras estimaciones han sido publicadas por la Federación Internacional de Diabetes (FID) e incluyen los 216 países de las Naciones Unidas. De acuerdo a la FID, globalmente hubo 463 millones de personas (9.3%) con esta enfermedad en 2019, y el 80% de ellas pertenecían a países de bajos y medianos ingresos. Se estima que para el año 2045, alrededor de 700 millones o el 10.9% de la población mundial tendrá DT2 (55). En 2015, México fue el segundo país de América Latina y el décimo en el mundo en cuanto a la prevalencia de esta enfermedad (57).

La prevalencia en México se incrementó de 9.2% en 2012 a 9.4% en 2016 de acuerdo a datos de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016 (58). La DT2 es la segunda causa de muerte en nuestro país, con el 15.4% de muertes, sin embargo, esta enfermedad representa la primera causa de muerte en el grupo de 45 a 65 años de edad, tanto en mujeres como en hombres (59).

#### **2.4.2 Definición**

La diabetes es una enfermedad caracterizada por alteraciones en la glucemia, resultado de defectos en la secreción de insulina, resistencia a esta hormona o por ambos (55). Los pacientes con DT2 muestran una disminución en la función de células  $\beta$  pancreáticas e incapacidad para secretar insulina entre 10 a 12 años previos al inicio de la DT2, así como una disminución del 50% de la función normal del islote pancreático al momento del establecimiento del diagnóstico (60). La función deficiente de la insulina conlleva a anormalidades en el metabolismo de los hidratos de carbono, grasas y proteínas en los tejidos diana de esta hormona (55).

#### **2.4.3 Etiología**

La etiología de la DT2 está asociada con la interacción entre genes y medio ambiente. Se ha demostrado que tener un familiar de primer grado con DT2 incrementa de 2 a 4 veces la probabilidad de desarrollar esta enfermedad en el transcurso de su vida. Existe 40% de riesgo de padecer esta enfermedad cuando

uno de los padres la tiene; y cuando ambos la tienen, este riesgo aumenta a 70% (55).

También causas ambientales o epigenéticas de DT2 son evidentes en ausencia de concordancia en gemelos monocigóticos.

La patogenia de la diabetes puede verse influenciada por disbiosis de la microbiota intestinal, en donde los patógenos o metabolitos específicos producidos por las bacterias intestinales tienen efectos perjudiciales sobre vías metabólicas de importancia para esta patología (55).

También se considera una enfermedad relacionada al estilo de vida, encontrándose de forma más prevalente en individuos con obesidad, hipertensión arterial, y otros factores de riesgo cardiovascular, que en su mayoría podrían ser prevenidos o tratados antes de ocasionar daño más extenso.

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

---

La diabetes tipo 2 se considera un problema de salud a nivel mundial, el cual presenta un gran impacto epidemiológico en la población mexicana, ocupando los primeros lugares de mortalidad y morbilidad en este país. Esta enfermedad se presenta con hiperglucemia derivada de la resistencia a la insulina y/o falta de producción de la misma. La hipoalfalipoproteinemia es la dislipidemia más frecuente en mexicanos, y se considera un factor de riesgo asociado al desarrollo de diabetes tipo 2.

Existen variantes genéticas que han sido asociadas tanto con diabetes tipo 2, como con hipoalfalipoproteinemia, algunas de ellas se han encontrado exclusivamente en la población mexicana y otras tienen una elevada frecuencia en nuestra población. Entender la interrelación entre las variantes genéticas y los factores de riesgo asociados a la diabetes tipo 2 y a los bajos niveles plasmáticos de colesterol de las HDL, podría ayudar a identificar a los individuos susceptibles a padecerlas, así como a la generación de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de la DT2.

Los niveles plasmáticos de colesterol de las HDL no son un indicador de la funcionalidad de las moléculas de HDL. A pesar de existir información relacionada a la funcionalidad de las HDL, aún hay muchos aspectos que faltan por resolver, particularmente su uso como secretagogos de la insulina y en menor medida como partículas que colaboran al flujo de salida de colesterol en tejidos periféricos.

Son estos vacíos del conocimiento los que se han vuelto preguntas de investigación y que se intentarán contestar, en la medida de lo posible, en el presente trabajo de tesis.

## 4. HIPÓTESIS

---

- *Las variantes genéticas rs2422493 y rs9282541 del gen ABCA1 se asocian con hipoalfalipoproteinemia y DT2.*
- *Las HDL totales y subfracciones incrementan el flujo de salida de colesterol y secreción de insulina de células  $\beta$ .*

## 5. OBJETIVOS

---

1. Determinar las frecuencias de las variantes genéticas -565C/T y R230C del gen *ABCA1* de todos los individuos incluidos en el estudio (estudios de población).
2. Documentar el efecto de las variantes genéticas -565C/T y R230C del gen *ABCA1* sobre los niveles plasmáticos de HDL-c (estudios de población).
3. Determinar el efecto de las variantes genéticas -565C/T y R230C del gen *ABCA1* sobre el riesgo de diabetes tipo 2 y otros rasgos metabólicos asociados (estudios de población).
4. Evaluar la diferencia en la actividad del promotor del gen *ABCA1* entre el genotipo -565 C y el -565 T (actividad del promotor).
5. Evaluar la funcionalidad como secretagogos de insulina de las moléculas de HDL y subfracciones de HDL, aisladas de individuos sanos (funcionalidad de HDL).
6. Evaluar la funcionalidad en torno al flujo de salida de colesterol de las moléculas de HDL y subfracciones de HDL, aisladas de individuos sanos (funcionalidad de HDL).

## 6. METODOLOGÍA

---

El diseño metodológico se dividió en tres secciones, basándonos en los objetivos planteados en el presente trabajo. La primera parte se refiere a los estudios de población con las variantes genéticas -565C/T y R230C del gen *ABCA1*, la segunda está enfocada a los ensayos de actividad del promotor del gen *ABCA1* con la variante -565 C/T, y la tercera a la funcionalidad (secreción de insulina y eflujo de colesterol) de las HDL y sus subfracciones.

### **6.1 Metodología empleada para los estudios de población con las variantes genéticas -565C/T y R230C del gen *ABCA1***

#### 6.1.1 Tipo de estudio

Estudio observacional y transversal.

#### 6.1.2 Criterios de selección

Se invitó a participar a individuos que tuvieran al menos 18 años de edad al momento del inicio del estudio. La mayoría de los participantes con DT2 se reclutaron de la consulta externa de la clínica de diabetes, perteneciente al Departamento de Endocrinología y Metabolismo del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ). El grupo control (individuos sin DT2) fue constituido por empleados de dependencias gubernamentales, de 45 años o mayores.

#### 6.1.3 Recolección de datos clínicos y de laboratorio

Se empleó un cuestionario estandarizado y estructurado para compilar datos de los individuos con respecto a la demografía, antecedentes y factores de riesgo relevantes para el desarrollo de DT2.

- Diabetes tipo 2

El diagnóstico de DT2 se realizó tomando en cuenta los criterios basados en la *American Diabetes Association* (61):

- Glucemia en ayuno de 126 mg/dL (7.0 mmol/L), ó
- Examen de hemoglobina A1c de 6.5% o superior, ó
- Prueba de tolerancia a la glucosa oral igual o mayor a 200 mg/dL (11.1 mmol/L) posterior a 2 dos h, ó
- Glucemia plasmática igual o mayor a 200 mg/dL (11.1 mmol/L) en pacientes con síntomas clásicos de hiperglucemia o crisis hiperglucémica.

Si alguno de los criterios 1-3 fue considerado positivo para el diagnóstico de DT2, este se confirmó repitiendo el examen de laboratorio.

- Hipoalfalipoproteinemia

El diagnóstico de hipoalfalipoproteinemia se realizó tomando en cuenta los niveles plasmáticos de HDL-c y el sexo:

- Mujeres con niveles menores a 50 mg/dL (1.3 mmol/L)
- Hombres con niveles menores a 40 mg/dL (1.04 mmol/L)

- Estatus de hipertensión

Se consideró como hipertensión arterial cuando la presión arterial sistólica fuera igual o mayor a 140 mm/Hg, y/ó la presión arterial diastólica igual o mayor a 90 mm/Hg, de acuerdo al octavo reporte de la *Joint National Committee* (JNC) (62).

Para los análisis bioquímicos, se obtuvieron muestras de sangre de los participantes, con ayuno de 9 a 12 h.

La glucemia plasmática se cuantificó usando el método oxidasa de glucosa. Las concentraciones de colesterol total, colesterol de las HDL y triacilglicéridos fueron medidos usando un autoanalizador para laboratorio clínico (Synchron. Beckman Co.). El colesterol de las LDL se estimó a partir del colesterol total, utilizando la fórmula descrita por Friedewald *at al.* (63):  $\text{Colesterol LDL} = \text{colesterol total} - (\text{colesterol HDL} + \text{triacilglicéridos} / 5)$  en mg/dL.

El ADN genómico se extrajo a partir de muestras de sangre total, usando el kit comercial QIAamp 96 DNA Blood kit (Qiagen, EUA). Las variantes genéticas rs2422493 y rs9282541 fueron genotificadas usando sondas Taqman.

El componente de etnicidad fue calculado a partir de los componentes principales (CP), ya que todos los individuos habían participado en al menos un estudio de asociación al genoma completo (GWAS).

**Tabla 6.1.4. Descripción de las variables de estudio y su escala de medición.**

Variable	Definición operacional	Tipo	Escala de medición	Indicador
Edad	Años de vida que tiene el sujeto al momento del estudio	Cuantitativa/continua	Razón	Años
Sexo	Mujer/hombre	Cualitativa	Nominal/dicotómica	Mujer/hombre
Peso	Determinación del peso mediante balanza	Cuantitativa/continua	Razón	Kilogramos
Talla	Estatura del sujeto medido con estadiómetro	Cuantitativa/continua	Razón	Metros
Circunferencia abdominal	Perímetro abdominal a nivel del ombligo	Cuantitativa/continua	Razón	Centímetros
Presión arterial sistólica	Fuerza que ejerce la sangre contra la pared arterial durante la sístole	Cuantitativa/continua	Razón	Milímetros de mercurio
Presión arterial diastólica	Fuerza que ejerce la sangre contra la pared arterial durante la diástole	Cuantitativa/continua	Razón	Milímetros de mercurio
Índice de masa corporal	Kilogramos de masa dividido entre la talla en metros al cuadrado	Cuantitativa/continua	Razón	Kilogramos/metros cuadrados
Índice cintura talla	Perímetro abdominal dividido entre la estatura	Cuantitativa/continua	Razón	Cintura/talla
Glucemia en ayuno	Concentración de glucosa libre en sangre, suero o plasma	Cuantitativa/continua	Razón	mmol/L
Insulina en ayuno	Concentración de insulina en sangre, suero o plasma	Cuantitativa/continua	Razón	mmol/L
Colesterol total	Concentración de colesterol en plasma sanguíneo	Cuantitativa/continua	Razón	mmol/L
Colesterol HDL	Concentración de colesterol contenido en las HDL del plasma sanguíneo	Cuantitativa/continua	Razón	mmol/L
Colesterol LDL	Concentración de colesterol contenido en las LDL del plasma sanguíneo	Cuantitativa/continua	Razón	mmol/L
Triglicéridos	Concentración de triglicéridos contenido en el plasma sanguíneo	Cuantitativa/continua	Razón	mmol/L
HOMA-IR	Índice de resistencia a la insulina	Cuantitativa/continua	Razón	Insulina*Glucosa/22.5
Estatus de hipertensión	Presión arterial elevada	Cualitativa	Nominal/dicotómica	Hipertenso/normotenso
Estatus de hipoalfalipoproteinemia	Niveles de HDL-c bajos	Cualitativa	Nominal/dicotómica	Hipoalfalipoproteinemia/n o hipoalfalipoproteinemia
Estatus de DT2	Diagnóstico de DT2	Cualitativa	Nominal/dicotómica	Diabético/no diabético
Variante genética rs2422493	Genotipo de la variante genética estudiada	Cualitativa	Nominal	Genotipo: CC, CT o TT
Variante genética rs9282541	Genotipo de la variante genética estudiada	Cualitativa	Nominal	Genotipo: CC, CT o TT

### 6.1.5 Agrupación de los participantes de acuerdo al estado de portador de las variantes genéticas

Los participantes fueron agrupados de acuerdo a su estado de portador de las variantes genéticas rs2422493 y rs9282541 del gen *ABCA1*, de tal manera que formaron cuatro grupos. El signo “+” es usado para describir a los portadores de uno o dos alelos de riesgo, ya sea en estado homocigoto o heterocigoto.

- i.* Grupo -/- fue tomado como el de referencia, y engloba aquellos individuos que tienen alelos de tipo ancestral para ambas variantes del gen *ABCA1*.
- ii.* Grupo +/- son los individuos portadores solo de la variante rs2422493 (-565C/T), pero no portadores de la variante rs9282541 (R230C).
- iii.* Grupo -/+ son los individuos portadores exclusivamente de la variante rs9282541, pero no portadores de la rs2422493.
- iv.* Grupo +/+ pertenece a los individuos portadores de ambas variantes, rs2422493 y rs9282541.

Los cuatro grupos anteriores se describen con mayor detalle a continuación:

Las 4 combinaciones de las variantes genéticas **rs2422493** (-565C/T) y **rs9282541** (R230C) de *ABCA1* se estudiaron como sigue:

- **Grupo -/-** Portadores de: Dos alelos ancestrales de la variante rs2422493 / Dos alelos ancestrales de la variante rs9282541.
- **Grupo +/-** Portadores de: Uno o dos alelos de riesgo de la variante rs2422493 / Dos alelos ancestrales de la variante rs9282541.
- **Grupo -/+** Portadores de: Dos alelos ancestrales de la variante rs2422493 / Uno o dos alelos de riesgo de la variante rs9282541.
- **Grupo +/+** Portadores de: Uno o dos alelos de riesgo de la variante rs2422493 / Uno o dos alelos de riesgo de la variante rs9282541.

### 6.1.6 Análisis estadístico

Las características demográficas y clínicas fueron descritas y comparadas entre los 4 cuatro grupos antes mencionados. Las diferencias se evaluaron de acuerdo a la distribución de las variables y número de grupos evaluados como sigue: para variables cuantitativas no paramétricas distribuidas en dos grupos se usó la prueba  $U$  de Mann-Whitney, y para tres o más grupos Kruskal-Wallis. En el caso de variables cuantitativas paramétricas distribuidas en dos grupos fue usada la prueba  $t$  de *Student*, y para tres o más grupos se utilizó ANOVA. La prueba de chi-cuadrada se usó para evaluar las diferencias entre proporciones. La prueba de Bonferroni fue usada para la corrección de múltiples comparaciones.

También evaluamos las frecuencias genóticas de ambas variantes genéticas de *ABCA1*.

El equilibrio de Hardy-Weinberg fue calculado en controles sanos usando la prueba de chi-cuadrada. El desequilibrio de ligamiento fue evaluado usando la estadística  $r^2$ .

Al tener disponibles tanto los CP de GWAS anteriores [GWAS-TG (64) y GWAS-DT2 (65)], así como el porcentaje de ancestría Nativa-Americana de 484 individuos (previamente obtenido por cálculo de ascendencia global), se calculó la correlación entre los CP de GWAS-DT2 y el porcentaje de ancestría Nativa-Americana. Se calculó y determinó una alta correlación entre los CP GWAS-TG y los de GWAS-DT2. Como resultado de lo anterior, se obtuvo un único índice de ancestría y se utilizó para ajustar por estratificación de la población.

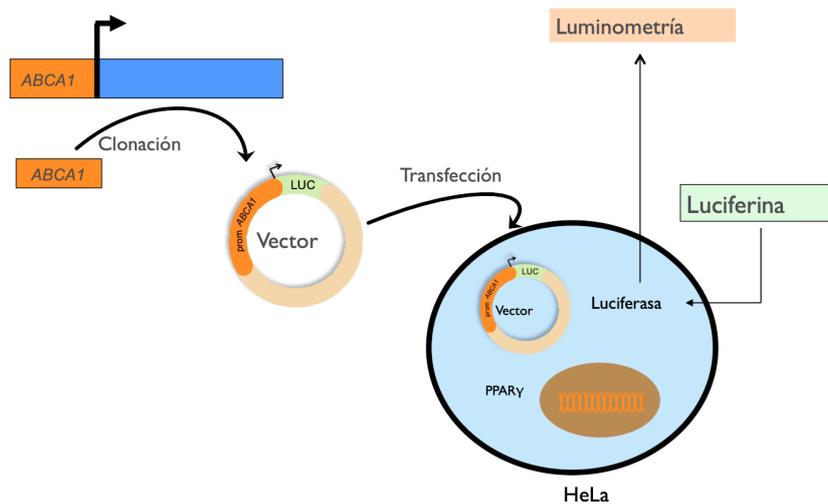
Se usó el análisis de senderos (también conocido como *path analysis*) para evaluar los efectos directos e indirectos de la variantes genéticas de *ABCA1* y de las variables HDL-c y DT2. Ya que la variable mediadora (HDL-c) no fue evaluada bajo el diseño de casos y controles, se realizó el enfoque de prevalencia ponderada sugerido por Vanderweele y Vansteelandt (66) con el fin de evitar un potencial sesgo de estimación. El análisis de senderos es un método estadístico multivariado que consiste en ecuaciones de regresión simultaneas, y que puede incluir desenlaces de variables categóricas o continuas. Este método ha sido empleado en estudios que evalúan la contribución de variantes genéticas en enfermedades metabólicas, como el estudio Framingham (67, 68).

El modelo de senderos teórico se basó en los siguientes antecedentes: asociación de la variante R230C del gen *ABCA1* con DT2 (14), asociación del alelo C230 de la variante rs9282541 con obesidad (15, 16) y la baja expresión de *ABCA1* con resistencia a la insulina en tejido adiposo visceral (69). Las variables independientes fueron: edad, sexo, ancestría y las variantes de *ABCA1* (dividido en 4 grupos). Se consideraron como variables independientes: niveles séricos de HDL-c, índice cintura-talla, HOMA-IR y DT2.

Ya que la variable DT2 es una variable dependiente dicotómica, se usó parametrización *Theta* y el sesgo de errores estándar corregido se obtuvieron mediante el enfoque de *Bootstrap*. En todos los casos, a pesar del valor de *p*, la evaluación de los efectos genéticos sobre DT2, HDL-c e índice cintura-talla, fueron ajustados por ancestría. Fue evaluada la bondad de ajuste del modelo final. Para los análisis anteriores usamos los software Mplus v.8.3 (70) y SPSS Statistics v.25.

## **6.2 Metodología empleada para evaluar la actividad del promotor del gen *ABCA1* con la variante -565 C/T**

La metodología utilizada para alcanzar este objetivo se centró en la clonación *in vivo*. La cual se basa en insertar la región de interés del promotor de *ABCA1* (inserto) en el plásmido pGL4 (vector), mediante un proceso denominado ligación, previamente linearizado con enzimas de restricción (Xho I y Hind III). Para que el ADN recombinante (inserto + vector) se amplifique *in vivo* es necesario llevar a cabo una transformación en bacterias *E. coli*, para posteriormente purificarlo y llevar a cabo la mutagénesis sitio dirigida. Posteriormente las células HeLa se transfectaron con los constructos -565 C o -565 T, con el objetivo de evaluar la actividad del promotor del gen *ABCA1* con ambas construcciones.



**Figura 6.2. Representación esquemática del proceso para evaluar la actividad del promotor de ABCA1 (con los constructos -565C o -565T).**

A continuación se mencionan cada uno de los pasos con más detalle:

### 6.2.1 Extracción de ADN

Se obtuvo sangre total de un individuo, la cual fue usada para la extracción de ADN, que se realizó con el método comercial de columnas de sílica (Qiagen), con el que se obtuvo buen rendimiento, comparado con métodos manuales. El volumen mínimo de sangre empleado para la extracción fue de 400  $\mu$ L. Se cuantificó la concentración de ADN en un espectrofotómetro (Thermo Scientific NanoDrop).

### 6.2.2 Diseño de oligonucleótidos

El diseño de los oligonucleótidos para la amplificación de la región que contiene el nucleótido de interés en el promotor del gen *ABCA1* se realizó utilizando el programa BLAST (del inglés, *Basic Local Alignment Search Tool*), de acuerdo con la secuencia reportada en el *genbank*, y a lo publicado anteriormente (45). A estos oligonucleótidos diseñados se les agregaron otros nucleótidos para el sitio de reconocimiento de las enzimas restricción Xho I y Hind III, para poder llevar a cabo una doble digestión con ambas enzimas.

Para el reconocimiento de enzimas de restricción nos basamos en la información obtenida por *New England Biolabs*:

**Tabla 6.2.2. Endonucleasas usadas para la generación de fragmentos de ADN.**

Enzima	Secuencia del oligo	Porcentaje de escisión	
		2 h	20 h
Xho I	CCGCTCGAGCGG*	10	75
Hind III	CCCAAGCTTGGG*	10	75

\*Sitio de reconocimiento de la enzima de restricción

Los oligonucleótidos diseñados posteriormente se analizaron con el programa Oligo Analyzer 1.1.2, para evitar la formación de auto-anillamientos, o de bucles (del inglés *loops*).

Los diseños quedaron como sigue:

- Oligonucleótido sentido: CCGCTCGAGCGGAGGCAGTAGGTGCGCCTATCA
- Oligonucleótido antisentido: CCCAAGCTTGGGCGGAGAAGGGGAGAAAACAA

### 6.2.3 PCR

Para la reacción en cadena de la polimerasa se usaron los siguientes reactivos:

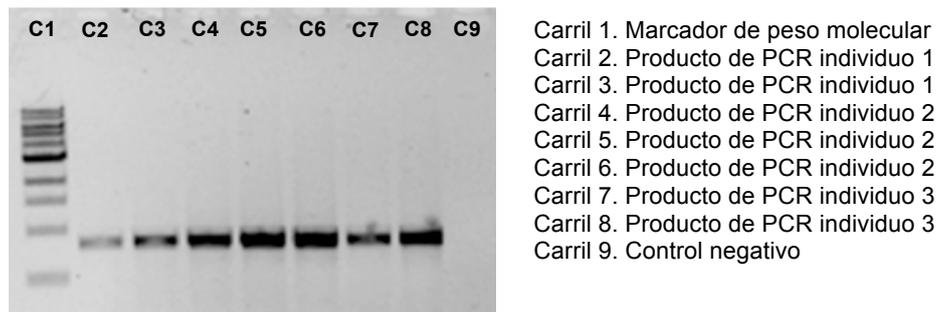
- Master mix: Taq ADN polimerasa, buffer, dNTPs (desoxirribonucleótidos trifosfatados) y MgCl<sub>2</sub>.
- Oligonucleótido sentido.
- Oligonucleótido antisentido.
- MgCl<sub>2</sub>.
- Agua ultrapura (miliq)

Condiciones para la amplificación en termociclador:

1. Inicio de desnaturalización: 95 °C, 7 min
2. Desnaturalización: 95 °C, 30 s
3. Alineamiento: 56 °C, 30 s
4. Extensión: 72 °C, 30 s
5. Extensión final: 72 °C, 10 min

Pasos 2-4 por 35 ciclos.

Posteriormente se verificaron los productos de PCR con electroforesis en geles de agarosa al 1%. Se usó bromuro de etidio para su visualización.



**Figura 6.2.3. Productos de PCR en gel de agarosa al 1%. Tamaño de la secuencia del promotor de ABCA1 de 700 pb.**

#### 6.2.4 Secuenciación de fragmentos de PCR

Realizamos la secuenciación a partir de los tres amplicones anteriores, con la finalidad de obtener el que sería usando para la clonación, preferiblemente el que tuviera el genotipo homocigoto C/C en la posición -565 del gen *ABCA1*.

La secuenciación del producto de PCR se llevó a cabo usando el método Sanger.

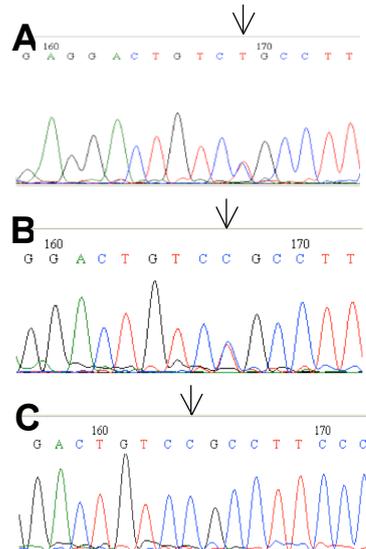
Reactivos:

- Big Dye
- Buffer Big Dye
- Amplicón (previamente purificado)
- Oligonucleótido sentido ó antisentido
- Agua ultrapura (miliq)

Procedimiento:

1. Colocar los tubos con la mezcla anterior en el termociclador, con las siguientes condiciones:
  1. Desnaturalización inicial: 96 °C por 5 min
  2. Seguidos por 35 ciclos a:
    - 95 °C por 10 s
    - 52 °C por 15 s

- 60 °C por 2 min
- 3. 60 °C por 3 min
- 4. Mantener a 4 °C hasta el siguiente paso
- 5. Purificación de los productos
- 6. Secuenciación de los productos
- 7. Revisar los nucleótidos de la secuencia (sentido y antisentido) con el programa bioedit, y hacer un alineamiento con el gen de *ABCA1*.



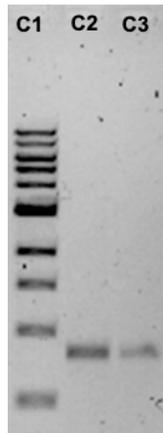
**Figura 6.2.4. Electroferograma que muestra la región de interés (señalada con flecha) de los tres amplicones secuenciados. A y B. Genotipo heterocigoto C/T. C. Genotipo homocigoto C/C.**

## 6.2.5 Clonación

### 6.2.5.1 Digestión del inserto

El producto de PCR que se eligió para ser usado como inserto fue el que tenía el genotipo C/C (figura anterior individuo 3). La digestión del producto de PCR se realizó de dos maneras, para elegir la más exitosa:

1. Se realizó una primera digestión con la endonucleasa Xho I, se purificó el vector, y posteriormente se llevó a cabo la segunda digestión con la segunda endonucleasa Hind III.
2. Se llevó a cabo una digestión simultanea con ambas endonucleasas al mismo tiempo.

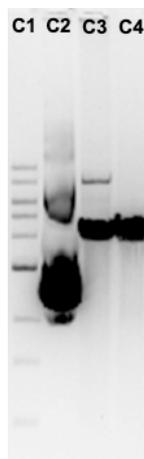


**Figura 6.2.5.1. Gel de agarosa al 1% que muestra las bandas del producto de PCR digerido de 700 pb. C1 carril del marcador de peso molecular. C2 y C3: Doble digestión simultanea del amplicón.**

#### 6.2.5.2 Digestión del vector

El vector que usamos aquí fue el pGL4 (identificación completa: pGL4.10.). Este es un vector básico que no tiene promotor, sin embargo contiene una región amplia que permite la clonación del promotor de elección.

La finalidad de esta digestión fue la de obtener el vector lineal (abierto) para llevar a cabo la posterior ligación. Para esta digestión se usó la forma simultánea, empleando ambas enzimas de restricción Xho I y Hind III.



**Figura 6.2.5.2. Gel de agarosa al 1% que muestra el vector pGL4.10. C1 carril del marcador de peso molecular. C2: vector pGL4 previo a la digestión, mostrando bandas que indican ADN circular, enrollado y superenrollado. C3: vector pGL4 parcialmente digerido. C4: vector pGL4 digerido (peso molecular: 4.2 kb).**

### 6.2.5.3 Desfosforilación del vector

Para la desfosforilación usamos fosfatasa alcalina (Thermo Fisher Scientific), ya que esta enzima elimina los fosfatos 5' del ADN, evitando que los extremos del vector que quedaron abiertos se vuelvan a unir.

La mezcla para la desfosforilación se realizó agregando 70  $\mu\text{L}$  de vector pGL4 digerido y purificado, 8  $\mu\text{L}$  de buffer 10X y 3  $\mu\text{L}$  de fosfatasa alcalina (3 unidades). Se incubó a 37 °C por 30 min, posteriormente se agregaron otros 2  $\mu\text{L}$  de fosfatasa alcalina, se vuelve a incubar a 37 °C por 30 min, y finalmente se purificó y cuantificó el vector en un espectrofotómetro (Thermo Scientific NanoDrop).

### 6.2.5.4 Ligación

El vector pGL4 digerido, desfosforilado y purificado se ligó con el inserto mediante la enzima T4 DNA ligasa (Invitrogen).

La relación molar vector : inserto fue de 1:25. Los volúmenes de reacción fueron de 20  $\mu\text{L}$ , utilizando agua milq de 8.5-16  $\mu\text{L}$ , 2  $\mu\text{L}$  de buffer de ligación 10X y 1  $\mu\text{L}$  de T4 DNA ligasa.

### 6.2.6 Transformación de bacterias electrocompetentes

El proceso de transformación implica introducir el ADN recombinante en células procariotas. Aquí utilizamos bacterias *E. Coli XL1blue* electrocompetentes.

Se agregaron 3  $\mu\text{L}$  del ADN recombinante en un tubo de microcentrífuga que ya contenía 50  $\mu\text{L}$  de bacterias, y la mezcla se colocó en las celdas del electroporador (Electroporador BioRad), previamente enfriadas en hielo. El electroporador se usó con las siguientes especificaciones: resistencia en 200, 1° capacitancia 125  $\mu\text{FD}$ , 2° capacitancia 25  $\mu\text{FD}$  y voltaje 2.5. Posterior al pulso eléctrico, se resuspendieron las bacterias en 1 mL de medio SOC, se centrifugaron y solo se usaron las bacterias que quedaron en parte inferior de tubo, las cuales se sembraron en placas de petri con LB agar suplementadas con ampicilina. Se incubaron a 37 °C durante 12 h.

Las colonias de bacterias que crecieron en la caja de petri son las que fueron exitosamente transformadas (las resistentes a la ampicilina).

Posteriormente se eligieron las colonias de bacterias para llevar a cabo la incubación e inoculación, y así aislar el plásmido (miniprep).

#### 6.2.7 Aislamiento del vector: Miniprep

El aislamiento o purificación de las clonas de ADN recombinante se llevó a cabo con el método de lisis alcalina (Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification System, Promega):

1. Resuspensión celular. Se obtuvieron bacterias con el ADN recombinante a partir de la inoculación e incubación, las cuales se resuspendieron y homogenizaron en 250  $\mu$ L de solución de resuspensión celular.
2. Lisis celular. Se agregó y homogenizó con 250  $\mu$ L de la solución de lisis celular. Esperar hasta que la suspensión celular se aclaró.
3. Lisis alcalina. Agregar y homogenizar con 250  $\mu$ L de la solución de lisis alcalina. Incubar a temperatura ambiente por 5 min.
4. Neutralización. Se agregó y homogenizó con 350  $\mu$ L de la solución de neutralización. Se centrifugó a 14,000 rpm, durante 10 min, a temperatura ambiente. Se transfirió el sobrenadante a una columna y se volvió a centrifugar por un min.
5. Lavado. Se añadieron 750  $\mu$ L de solución de lavado y se centrifugó durante 1 min, a temperatura ambiente.
6. Elución. Se transfirió la columna a un tubo estéril de microcentrífuga y se agregaron 100  $\mu$ L de agua libre de nucleasas y estéril (aqua miliq), se centrifugó a máxima velocidad, durante 1 min, a temperatura ambiente. Se desechó la columna y almacenó el ADN recombinante.

### 6.2.8 Secuenciación del ADN recombinante

Se hizo con el objetivo de verificar que la clona seleccionada tuviera la secuencia de nucleótidos esperada, de acuerdo al inserto seleccionado: homocigoto ancestral (C/C) en la posición -565.

Para la secuenciación se diseñaron un par de oligonucleótidos, uno para la región del vector pGL4 y otro para el inserto:

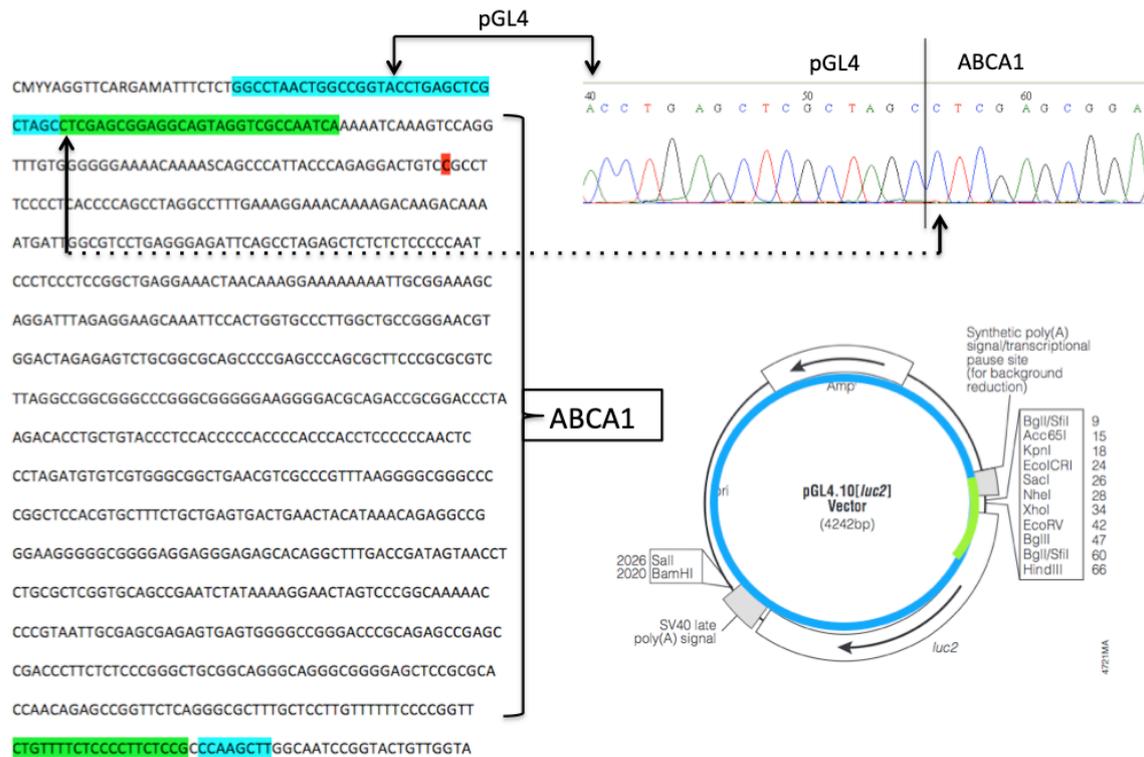
- pGL4 sentido: GAATGAGTGCGACACGAAAA
- *ABCA1* antisentido: TAAATCCTGCTTTCCGCAA

La secuenciación del ADN recombinante se llevó a cabo usando el método Sanger.

Reactivos usados:

- Big Dye
- Buffer Big Dye
- Oligonucleótido (pGL4 sentido ó *ABCA1* antisentido)
- ADN recombinante
- Agua ultrapura (miliq)

La corrida en el secuenciador fue la misma que la usada anteriormente.

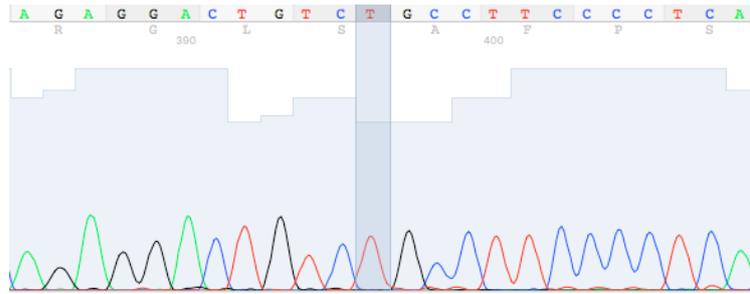


**Figura 6.2.8. Representación esquemática de la secuencia del ADN recombinante.**  
**En la sección izquierda se muestra la secuencia de nucleótidos de la parte fundamental del ADN recombinante, resaltado en azul se representa el vector, en verde el inserto y en rojo el alelo de interés (-565C). El electroferograma muestra las señales de los nucleótidos del vector pGL4 y del promotor de ABCA1 (dividido por una línea intermedia). En la sección inferior derecha se encuentra la representación esquemática del ADN recombinante (en azul el vector y en verde el inserto).**

### 6.2.9 Mutagénesis dirigida

Para la mutagénesis dirigida se utilizó el anterior ADN recombinante, cambiando el nucleótido C por T en la posición -565 del gen *ABCA1*. Esta fue realizada por la empresa ProNovus Bioscience (CA, USA)

Posteriormente secuenciamos todo el inserto para confirmar que el único cambio llevado a cabo fuera el anterior.



**Figura 6.2.9. Electroferograma de la mutagénesis dirigida. Se muestra el nucleótido T en la posición -565 del gen ABCA1 (resaltado en la barra oscura).**

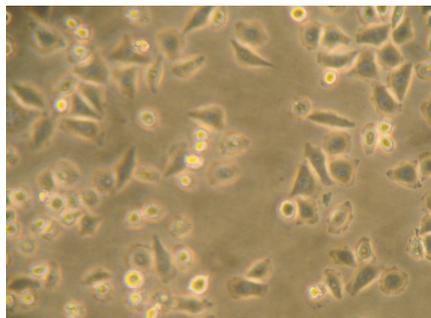
## 6.2.10 Transfección transitoria

Evaluamos la eficiencia de la transfección transitoria con las siguientes líneas celulares: MIN-6, HEK-293T y HeLa. Decidimos continuar los experimentos con las células HeLa, ya que obtuvimos el más alto rendimiento ( $\approx 80\%$ ).

### 6.2.10.1 Cultivo celular

#### *Línea celular HeLa*

La línea celular HeLa derivada de cáncer cervical fue cultivada en medio de cultivo DMEM y equilibrada con 5% CO<sub>2</sub> y 95% de aire. El medio fue suplementado con: 10% de suero fetal bovino (previamente inactivado con calor), 100 mg/L de piruvato de sodio y 1% de penicilina (Sigma-Aldrich).



**Figura 6.2.10.1. Micrografías de la línea celular HeLa observadas en el microscopio confocal invertido**

### 6.2.10.2 Transfección transitoria

Usamos el método de lipofección mediante un reactivo comercial (Lipofectamine 3000, Thermo Fisher Scientific), siguiendo el siguiente protocolo:

Día 1:

1. Las células HeLa tenían una confluencia de 70-90% para poder llevar a cabo la transfección.
2. Diluimos la lipofectamina 3000 en el medio de cultivo DMEM (libre de SFB y de antibiótico) y mezclamos.
3. Preparamos una mezcla de ADN diluyendo el ADN recombinante en medio de cultivo DMEM, y agregamos el reactivo P3000.
4. Agregamos el ADN diluido (del paso 3) a la lipofectamina diluida (del paso 2).
5. Incubamos durante 15 min a temperatura ambiente.
6. Añadimos el complejo ADN-lípido a las células.
7. Incubamos las células por 24 h.

Día 2:

1. Eliminamos y reemplazamos el medio celular por DMEM con SFB y antibiótico, dejándolo por 4 h.
2. Las células fueron lisadas y la actividad de luciferasa fue analizada usando un kit comercial (Dual-Luciferase Reporter Assay, Promega). Se cuantificaron las unidades relativas de luz (actividad de luciferasa de luciérnaga sobre la de luciferasa de *Renilla*) en un luminómetro (BD Monolight 3010C luminometer).

#### 6.2.11 Análisis estadístico

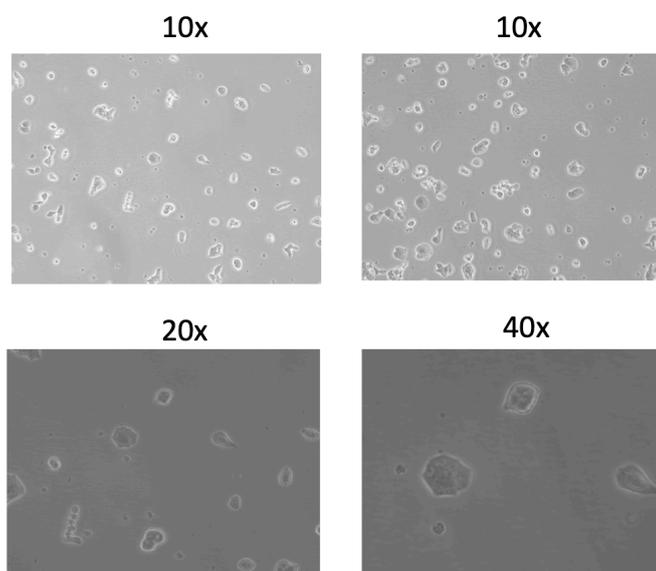
Los datos se presentan como media  $\pm$  error estándar de la media. La prueba *t* de Student se usó para analizar las diferencias entre los dos grupos (-565C vs -565T). Un valor de  $p < 0.05$  se consideró como significativo. El paquete estadístico *GraphPad Prism* versión 6.0 se usó para analizar los datos.

### 6.3 Metodología empleada para evaluar la funcionalidad de las HDL y sus subfracciones. Secreción de insulina y eflujo de colesterol

#### 6.3.1 Cultivo celular

##### *Línea celular MIN-6*

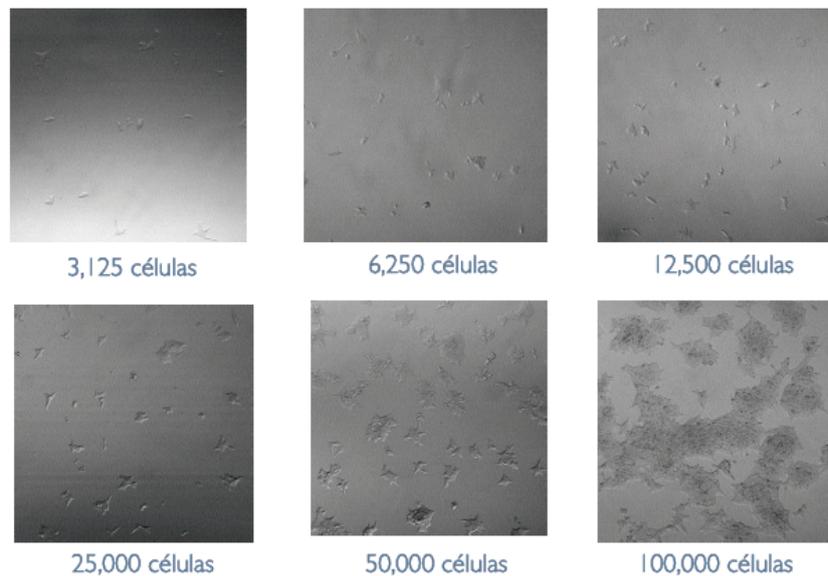
La línea celular MIN-6 (AddexBio, EUA) es una línea celular derivada de insulinoma de ratón. Esta fue cultivada en medio DMEM con 4.5 g/L de glucosa (Thermo Fisher Scientific), equilibrado con 5% CO<sub>2</sub> y 95% aire. El medio celular fue suplementado con: 15% de suero fetal bovino (previamente inactivado con calor), 2 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich) and 1% de penicilina (Sigma-Aldrich).



**Figura 6.3.1.1. Micrografías de la línea celular MIN-6 observadas en el microscopio confocal invertido.**

##### *Línea celular Rin-m5F*

La línea celular Rin-m5F es una clona derivada de la línea celular de islote de rata RIN-m. Se cultivó en medio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich). El medio fue suplementado con: 7.5% de suero fetal bovino (previamente inactivado con calor), 100 mg/L de piruvato de sodio y 1% de penicilina (Sigma-Aldrich).



**Figura 6.3.1.2. Micrografías de la línea celular Rin-m5F observadas en el microscopio confocal invertido.**

### 6.3.2 Aislamiento de HDL total y subfracciones de HDL de humanos

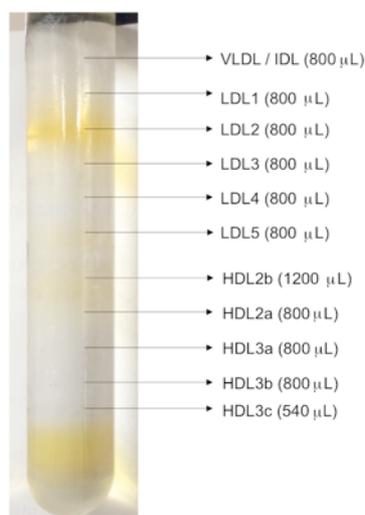
Se recolectaron muestras de sangre venosa de hombres y mujeres, mayores de edad, sin dislipidemia o ninguna otra enfermedad conocida. Ninguno de los voluntarios estaba recibiendo fármacos que afectaran el funcionamiento del metabolismo de lipoproteínas. Posterior a la recolección de sangre, el plasma fue separado mediante centrifugación a 4 °C por 10 min. Se usaron alícuotas de plasma con EDTA para análisis de lípidos, glucosa y lipoproteínas. Las lipoproteínas fueron aisladas a partir de una mezcla del plasma de los ocho donadores, mediante ultracentrifugación por gradiente de densidad isopícnica (68, 69), usando un rotor (Beckman SW41 Ti) a 40,000 rpm, durante 44 h, en una ultracentrífuga (Beckman XL70) a 15 °C, como se describe a continuación:

Primero, la densidad del plasma se incrementó a 1.21 g/mL agregándole sal de KBr. Posteriormente en el respectivo tubo de ultracentrífuga se construyó un gradiente de densidad como sigue: 2 mL de solución de NaCl/KBr de 1.24 g/mL, 3 mL de plasma ( $d=1.21$  g/mL), 2 mL de solución de NaCl/KBr de 1.063 g/mL, 2.5 mL de solución de NaCl/KBr de 1.019 g/mL y 2.5 mL de solución de

NaCl ( $d=1.006$  g/mL). Todas las soluciones de densidad se ajustaron a pH de 7.4 y se corroboraron usando un densitómetro (DA-110M Density Meter, USA).

Posterior a 44 h de centrifugación, los gradientes fueron recolectados desde la parte superior del tubo en 12 fracciones correspondientes a VLDL ( $d<1.017$  g/mL), IDL ( $d=1.018$  a  $1.019$  g/mL), LDL1 ( $d=1.019$  a  $1.023$  g/mL), LDL2 ( $d=1.023$  a  $1.0239$  g/mL), LDL3 ( $d=1.029$  a  $1.039$  g/mL), LDL4 ( $d=1.039$  a  $1.050$  g/mL), LDL5 ( $d=1.050$  a  $1.063$  g/mL), HDL2b ( $d=1.063$  a  $1.091$  g/mL), HDL2a ( $d=1.091$  a  $1.110$  g/mL), HDL3a ( $d=1.110$  a  $1.133$  g/mL), HDL3b ( $d=1.133$  a  $1.156$  g/mL) and HDL3c ( $d=1.156$  a  $1.179$  g/mL).

Por motivos de nuestro estudio, solo usamos las moléculas de LDL y las de HDL. Por lo tanto, solo estas lipoproteínas fueron dializadas en PBS durante 24 h, a  $4$  °C y en oscuridad (71, 72).



**Figura 6.3.2. Bandas que muestran las lipoproteínas aisladas (y su respectivo volumen obtenido) por el método de ultracentrifugación**

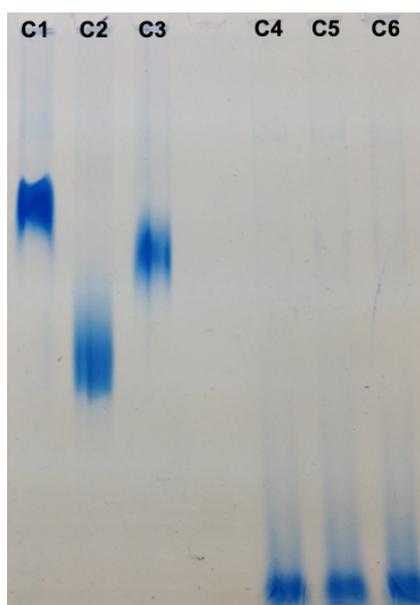
### 6.3.3 Composición química de las subfracciones de HDL

A partir de las cinco subfracciones aisladas de HDL, fueron cuantificados el colesterol total (Wako Diagnostics, USA), colesterol libre, fosfolípidos (DiaSys, USA) y triacilgliceroles (Wako Diagnostics, USA), usando ensayos enzimáticos disponibles comercialmente. La proteína total fue medida usando el ensayo BCA (Thermo Fisher Scientific). Los ésteres de colesterol fueron calculados multiplicando la diferencia entre el colesterol total y el libre por 1.67. La masa total

de la lipoproteína fue calculada sumando la composición de todas las subfracciones de la macromolécula de HDL (72).

#### 6.3.4 Acetilación de LDL

Se hizo una mezcla de todas las moléculas de LDL aisladas para posteriormente acetilarlas con 1 mL de solución de acetato de sodio, por cada 10 mg de proteína contenida en las LDL, la solución se mantuvo en frío (4 °C) con agitación constante. Posteriormente se añadieron 2.5  $\mu$ L de anhídrido acético por cada mg de proteína contenida en las LDL, durante 1 h (distribuida en cuatro partes). El producto final fue dializado con PBS, a 4 °C, durante 24 h. La pureza y carga de las moléculas LDL nativas y acetiladas, así como las moléculas HDL fueron evaluadas examinando la migración electroforética que se llevó a cabo durante 2 h, a 120 V, en un gel de agarosa al 3%. Posteriormente el gel fue teñido con azul de Coomasie y después de 24 h se destiñó con ácido tricloroacético al 10%.



**Figura 6.3.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 3% que muestra las LDL nativas y las químicamente modificadas y las HDL. C1: LDL nativas, C2: LDL acetiladas, C3: LDL oxidadas, C4-C6: HDL totales.**

### 6.3.5 Ensayos de secreción de insulina

Las células MIN-6 fueron sembradas a una densidad de  $3 \times 10^5$  por pozo (placas de 24 pozos) con medio de cultivo DMEM con 5.5 mM de glucosa, e incubadas durante 24 h a 37 °C. Posteriormente se cambió el medio por medio celular HBSS que contenía  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , KCl,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaHCO}_3$ , NaCl,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , con 0.1% de BSA (p/v) y 2.8 mM de glucosa por una h. Después de ese tiempo, se estimuló la secreción de insulina con medio HBSS con glucosa: 2.8 mM, 5.5 mM, o 25 mM, con o sin HDL totales (concentración total de proteína 0.5, 0.75 o 1 mg/mL), o sus subfracciones: 2a, 2b, 3a, 3b, o 3c (concentración total de proteína 1 mg/mL). Posterior a una hora, se recolectó y centrifugó el sobrenadante celular (10 min a 10,000 rpm), y la insulina secretada fue medida mediante la técnica RIA. Para corregir los resultados, se extrajo y cuantificó la proteína celular, usando el método de Bradford (Bio-Rad, USA).

### 6.3.6 Cuantificación de insulina

#### Radioinmunoanálisis

El inmunoensayo es un producto usado para la cuantificación de insulina en múltiples especies de animales. Es un sistema homólogo para la insulina humana y heterólogo para el resto de las insulinas, con reactividad cruzada de más de 95%.

El principio del método se basa en la competencia que se establece entre una hormona sin marca (analito) y una hormona marcada con  $\text{I}^{125}$  (marcador radioactivo) por unirse a un anticuerpo específico que se encuentra en una concentración limitante con respecto a la concentración total de hormona en el tubo. En consecuencia mientras mayor sea la concentración del analito, mayor será la posibilidad de unirse al anticuerpo con respecto al trazador radioactivo y viceversa.

#### Reactivos usados:

- Buffer de ensayo (estándar A)
- Anticuerpo primario. Antisuero anti-insulina humana (producido en cobayo), diluido en buffer de ensayo

- Insulina humana marcada con I<sup>125</sup>
- Estándares de insulina. Insulina recombinante altamente purificada disuelta en buffer de ensayo.
- Controles internos de calidad. Insulina recombinante altamente purificada disuelta en buffer de ensayo a concentraciones conocidas.
- Reactivo de precipitación. Antisuero anti-IgG de cobayo diluido en PBS.

El protocolo se llevó a cabo de la siguiente manera:

Día 1:

1. Añadir 200 µL de buffer de ensayo a los tubos de uniones no específicas (UNE). Pipeteamos 100 µL de buffer de ensayo a los tubos de las uniones específicas máximas.
2. Añadir 100 µL de los estándares por duplicado y de los controles internos de calidad.
3. Añadir 100 µL de cada muestra por duplicado.
4. Añadir 100 µL de anticuerpo anti-insulina a casi todos los tubos, excepto a los tubos totales y a tubos UNE.
5. Añadir 100 µL del marcador radioactivo a todos los tubos.
6. Agitar en vórtex casi todos los tubos, excepto los totales.
7. Incubar de 18-24 h a 4 °C.

Día 2:

8. Agitar manualmente el reactivo de precipitación.
9. Agitar 200 µL del reactivo de precipitación a casi todos los tubos, excepto a los totales.
10. Agitar en vórtex casi todos los tubos, excepto los totales.
11. Incubar 1 h a temperatura ambiente.
12. Centrifugar casi todos los tubos, excepto los totales, durante 30 mi a 4 °C y 3000 RPM.
13. Decantar el sobrenadante, dejamos volteados los tubos sobre papel absorbente durante 5 min.
14. Secar los tubos hasta la mitad con hisopos de papel absorbente.
15. Contar todos los tubos durante 1 min en un contador de radiaciones gamma.

### 6.3.7 Eflujo de colesterol

Los ensayos de eflujo de colesterol se llevaron a cabo usando la HDL total y las cinco subfracciones de HDL (2b, 2a, 3a, 3b y 3c), como sigue:

#### *Día 1. Células MIN-6*

Sembrar 300,000 células MIN-6 por pozo, en placas de 24 pozos, con 500  $\mu$ L medio DMEM por pozo (con SFB al 15% y antibiótico al 1%). Incubar por 24 h en una incubadora con 5% de CO<sub>2</sub>, a 37 °C.

#### *Día 2. Marcar y cargar las células con colesterol <sup>3</sup>H*

1. La concentración de LDL acetiladas requerida fue de 50  $\mu$ g/mL (tomando en cuenta la concentración de las proteínas contenidas en las LDL acetiladas), por lo tanto, para una placa de 24 pozos usar 12.5 mL (considerando 0.5 mL de margen de error) multiplicado x 50  $\mu$ g/mL = 625  $\mu$ g. Es decir, para una placa de 24 pozos se necesitan 625  $\mu$ g de LDL acetiladas (en base proteínas en las LDL).
2. El colesterol <sup>3</sup>H se usa 1  $\mu$ L por cada mL de medio de cultivo. Por lo tanto consideramos 12.5  $\mu$ L de colesterol <sup>3</sup>H por cada placa de 24 pozos.
3. Mezclar las LDL acetiladas + colesterol <sup>3</sup>H, en un tubo para centrifuga tipo Falcon de 15 mL, agitándolo con las manos muy suavemente por unos segundos, posteriormente incubar durante 30 min en una incubadora de CO<sub>2</sub> al 5%, a 37 °C. Pasado este tiempo, centrifugar a 1,000 RPM, durante 5 min.
4. Posteriormente agregar las LDL acetiladas + colesterol <sup>3</sup>H (del paso anterior) al medio de cultivo DMEM. Lavar los pozos de la placa de cultivo 2 veces, con PBS y agregar 0.5 mL de medio de cultivo, el cual también tenía 1% de albúmina de suero bovino. Dejamos exactamente 24 h en una incubadora de CO<sub>2</sub> al 5%, a 37 °C.

#### *Día 3. Flujo de salida de colesterol*

Los ensayos de flujo de salida de colesterol duraron un total de cuatro h, y se llevaron a cabo usando la HDL total, así como sus subfracciones: 2b, 2a, 3a, 3b y

3c (contenido total de proteína de 20 µg/mL) o PBS para los controles. El medio fue recolectado y los detritos celulares fueron eliminados mediante centrifugación. Los lípidos intracelulares fueron extraídos con 3:2 hexano:isopropanolol (v/v). Medimos el colesterol <sup>3</sup>H del medio y el de los lípidos, con centelleo líquido. La capacidad de flujo de salida de colesterol fue calculada como: 
$$\frac{[\text{3H}]\text{-cpm medio}}{([\text{3H}]\text{-cpm medio} + [\text{3H}]\text{-cpm células})} \times 100.$$

#### 6.3.8 Análisis estadístico

Los datos se presentan como media ± error estándar de la media. Múltiples comparaciones fueron analizadas con ANOVA de dos factores para tres o más grupos usando la corrección de Bonferroni post-prueba para múltiples evaluaciones. La prueba *t* de *Student* se usó para variables continuas distribuidas en dos grupos. Un valor de  $p < 0.05$  se consideró como significativo. El paquete estadístico *GraphPad Prism* versión 6.0 se usó para analizar los datos.

## 7. RESULTADOS

---

- **Resultados de los estudios de población**

### **7.1 Frecuencias genotípicas y alélicas de las variantes genéticas rs2422493 y rs9282541 del gen ABCA1**

#### 7.1.1 Variante genética rs2422493 (-565C/T)

Las frecuencias genotípicas en todos los sujetos de estudio fueron: CC 0.268 (886/3303), CT 0.495 (1636/3303) y TT 0.237 (781/3303).

Las frecuencias alélicas para el alelo C fueron de 0.52 y para el alelo T de 0.48.

Estas frecuencias genotípicas se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg ( $p=0.66$ ).

#### 7.1.2 Variante genética rs9282541 (R230C)

Las frecuencias genotípicas en todos los sujetos de estudio fueron: CC 0.797 (2632/3303), CT 0.19 (627/3303) y TT 0.013 (44/3303).

Las frecuencias alélicas para el alelo C fue de 0.88 y para el alelo T de 0.12.

Estas frecuencias genotípicas se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg ( $p=0.41$ ).

#### 7.1.3 Desequilibrio de ligamiento

Ambas variantes (rs2422493 y rs9282541) son heredadas como bloques de disequilibrio de ligamiento independiente  $r^2 = -0.1$ .

### **7.2 Descripción de las principales medidas antropométricas y bioquímicas de los cuatro grupos de ABCA1**

El género y la edad mostraron diferencias significativas entre los cuatro grupos ( $p=0.04$  y  $p=0.05$ , respectivamente). En el grupo -/+ predominaron los hombres. El grupo -/- tuvo individuos de mayor edad que el grupo +/+. Los portadores de la variante genética rs9282541 tuvieron más alta frecuencia de hipoalfalipoproteinemia que los no portadores ( $p<0.001$ ) (tabla 7.2).

**Tabla 7.2. Parámetros clínicos y bioquímicos de los participantes estudiados de acuerdo a los 4 grupos de genotipos de ABCA1.**

<b>Características</b>	<b>-/- (667)</b>	<b>+/- (1965)</b>	<b>-/+ (219)</b>	<b>+/+ (452)</b>	<b>Valor de p</b>
Sexo masculino, n (%)	274 (41.1)	823 (41.9)	113 (51.6)	186 (41.2)	0.036
Edad, mediana (RIC), años	49 (42-58)	49 (42-57)	48 (40-55)	48 (40-54)	0.047 <sup>b</sup>
ICT, mediana (RIC), cm	0.59 (0.55-0.64)	0.58 (0.54-0.64)	0.58 (0.54-0.63)	0.59 (0.55-0.64)	0.059
CC, mediana (RIC), cm	95 (87-103)	94 (87-102)	94 (87-100)	95 (88-103)	0.124
IMC, mediana (RIC), kg/m <sup>2</sup>	28 (26-31)	28 (25-31)	28 (26-31)	29 (25-32)	0.485
HDL-c, mediana (RIC), mg/dL	42.8 (35.9-49.8)	42.1 (35.9-50.9)	40.9 (34-47.1)	39 (32.8-47.1)	<0.001 <sup>b,c,d,e</sup>
LDL-c, mediana (RIC), mg/dL	123.9 (101.5-144.7)	122 (100.7-145.9)	116.9 (96.5-137.8)	118.9 (99.6-142.8)	0.082
TG, mediana (RIC), mg/dL	206.4 (124.9-298.5)	193.1 (116.9-282.6)	186.1 (110.7-276.4)	184.3 (112.5-115)	0.120
Glucemia, mediana (RIC), mg/dL	90.9 (83-109.8)	90.9 (81.9-109.6)	92 (85-122.9)	90.9 (81.9-117.5)	0.331
PAS, mediana (RIC), mmHg	120 (110-132)	120 (110-130)	120 (110-133)	120 (110-130)	0.269
PAD, mediana (RIC), mmHg	80 (70-90)	80 (70-85)	80 (70-90)	80 (70-85)	0.114
Hipertensión, n (%) <sup>a</sup>	129 (23.7)	439 (26.6)	53 (29.4)	96 (25.3)	0.395
Diabetes tipo 2, n (%)	189 (28.3)	532 (27.1)	62 (28.3)	131 (29.0)	0.818
Hipoalfalipoproteinemia, n (%)	390 (58.5)	1149 (58.5)	138 (63)	322 (71.2)	<0.001

Los cuatro grupos estudiados son: los que tienen el genotipo ancestral (denominado como -/-) en las dos variantes, y los otros grupos incluyen a los portadores de una variante (denominados como +/- para los portadores de rs2422493, pero no portadores de la rs9282541 y el grupo -/+ para el caso contrario), o de ambas variantes (grupo +/+). Los portadores de una o ambas variantes se consideraron al tener uno o dos alelos de riesgo. RIC, rango intercuartil; ICT, índice cintura-talla; CC, circunferencia de cintura; IMC, índice de masa corporal; HDL-c, colesterol HDL; LDL-c, colesterol LDL; PAS, presión arterial sistólica; PAD, presión arterial diastólica. <sup>a</sup>n=2756 pacientes. <sup>b</sup>-/- vs +/+,  $p<0.03$ . <sup>c</sup>-/- vs -/+, +/- vs -/+,  $p<0.043$ . <sup>e</sup>+/- vs +/+,  $p<0.009$ .

### **7.3 Descripción de las principales medidas antropométricas y bioquímicas de acuerdo a los tres genotipos de las variantes genéticas rs2422493 o rs9282541**

Comparamos las características clínicas y bioquímicas de acuerdo al número de alelos de riesgo (0, 1 o 2) de ambas variantes genéticas.

#### **7.3.1 Variante genética rs2422493**

No encontramos ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los tres genotipos CC, CT y TT, con respecto a las concentraciones plasmáticas HDL-c, ni a la frecuencia de diabetes tipo 2 o de hipoalfalipoproteinemia. La diferencia más notable fue en la concentración de LDL-c entre los grupos CC vs. TT y CT ( $p=0.041$ ) vs. TT ( $p=0.025$ ) (tabla 7.3.1).

#### **7.3.2 Variante genética rs9282541**

Las diferencias significativas se encontraron en torno a la edad y los niveles plasmáticos de HDL-c. Los individuos portadores del genotipo CT fueron más jóvenes que los portadores de los genotipos CC o TT ( $p=0.002$  y  $p=0.017$ , respectivamente). La concentración en plasma de HDL-c fue más alta en los sujetos portadores del genotipo CC con una mediana de 42.8 mg/dL, comparada con los portadores de los genotipos CT (39.7 mg/dL,  $p<0.001$ ) y TT (34 mg/dL,  $p<0.001$ ) (tabla 7.3.2).

**Tabla 7.3.1. Parámetros clínicos y bioquímicos de los individuos estudiados de acuerdo al genotipo rs2422493.**

Características	Genotipo			Valor nominal de p		
	CC (n=886)	CT (n=1636)	TT (n=781)	CC vs. CT	CC vs. TT	CT vs. TT
Sexo masculino, n (%)	387 (43.7)	684 (41.8)	325 (41.6)	0.376	0.399	0.930
Edad, mediana (RIC), años	49 (41-58)	48 (41-56)	49 (42-57)	0.228	0.688	0.078
ICT, mediana (RIC), cm	0.59 (0.55-0.64)	0.59 (0.54-0.63)	0.59 (0.55-0.65)	0.148	0.570	0.048
CC, mediana (RIC), cm	95 (87-102)	94 (86-102)	94 (88-104)	0.255	0.433	0.049
IMC, mediana (RIC), kg/m <sup>2</sup>	28 (26-31)	28 (25-31)	28 (26-31)	0.600	0.524	0.215
HDL-c, mediana (RIC), mmol/L	42.1 (35.1-49.8)	42.1 (35.1-50.2)	40.9 (35.1-47.9)	0.987	0.890	0.070
LDL-c, mediana (RIC), mmol/L	122 (100-143.2)	120.8 (98.8-144.7)	123.5 (103.8-147.8)	0.986	0.041	0.025
TG, mediana (RIC), mmol/L	204.7 (122.3-295.9)	189.6 (116.1-279.1)	194.9 (116.9-279.1)	0.132	0.303	0.745
Glucemia, mediana (RIC), mmol/L	92 (83.9-113)	90.9 (81.9-109.8)	90.9 (83-108.9)	0.162	0.314	0.835
PAS, mediana (RIC), mmHg	120 (110-132)	120 (110-130)	120 (110-130)	0.116	0.402	0.545
PAD, mediana (RIC), mmHg	80 (70-90)	80 (70-85)	80 (70-86)	0.014	0.126	0.537
Hipertensión, n (%) <sup>a</sup>	182 (25.1)	348 (25.3)	187 (28.5)	0.958	0.161	0.118
Diabetes tipo 2, n (%)	251 (28.3)	453 (27.7)	210 (26.9)	0.745	0.546	0.697
Hipoalfalipoproteinemia, n (%)	528 (59.6)	977 (59.7)	494 (63.3)	0.966	0.131	0.099

RIC, rango intercuartil; ICT, índice cintura-talla; CC, circunferencia de cintura; IMC, índice de masa corporal; HDL-c, colesterol HDL; LDL-c, colesterol LDL; PAS, presión arterial sistólica; PAD, presión arterial diastólica. <sup>a</sup>n=2756 pacientes.

**Tabla 7.3.2. Parámetros clínicos y bioquímicos de los individuos estudiados de acuerdo al genotipo rs9282541.**

Características	Genotipo			Valor nominal de p		
	CC (n=2632)	CT (n=627)	TT (n=44)	CC vs. CT	CC vs. TT	CT vs. TT
Sexo masculino, n (%)	1097 (41.7)	282 (45)	17 (38.6)	0.133	0.685	0.413
Edad, mediana (RIC), años	49 (42-57)	48 (40-54)	52 (43-62)	0.002	0.128	0.017
ICT, mediana (RIC), cm	0.59 (0.54-0.64)	0.59 (0.54-0.64)	0.61 (0.55-0.66)	0.455	0.276	0.407
CC, mediana (RIC), cm	94 (87-102)	95 (87-103)	95 (90-100)	0.343	0.973	0.740
IMC, mediana (RIC), kg/m <sup>2</sup>	28 (25-31)	28 (25-31)	28 (26-31)	0.144	0.966	0.700
HDL-c, mediana (RIC), mg/dL	42.8 (35.9-51)	39.7 (34-47.1)	34 (30.1-45.5)	<0.001	<0.001	0.037
LDL-c, mediana (RIC), mg/dL	122.7 (100.7-145.9)	117.7 (97.6-141.7)	119.7 (102.7-139)	0.027	0.544	0.860
TG, mediana (RIC), mg/dL	198.5 (118.7-286.2)	184.3 (112.5-267.6)	218.8 (132.9-274.7)	0.070	0.617	0.288
Glucemia, mediana (RIC), mg/dL	90.9 (83-109.8)	92 (83-119.9)	94.9 (86.9-124.4)	0.326	0.155	0.292
PAS, mediana (RIC), mmHg	120 (110-130)	120 (110-130)	120 (110-136)	0.628	0.835	0.795
PAD, mediana (RIC), mmHg	80 (70-86)	80 (70-85)	78 (70-90)	0.918	0.777	0.798
Hipertensión, n (%) <sup>a</sup>	568 (25.9)	138 (26.2)	11 (33.3)	0.880	0.332	0.367
Diabetes tipo 2, n (%)	721 (27.4)	180 (28.7)	13 (29.5)	0.508	0.751	0.906
Hipoalfalipoproteinemia, n (%)	1539 (58.5)	427 (68.1)	33 (75)	<0.001	0.027	0.341

RIC, rango intercuartil; ICT, índice cintura-talla; CC, circunferencia de cintura; IMC, índice de masa corporal; HDL-c, colesterol HDL; LDL-c, colesterol LDL; PAS, presión arterial sistólica; PAD, presión arterial diastólica. <sup>a</sup>n=2756 pacientes.

## 7.4 Descripción de las principales medidas antropométricas y bioquímicas de acuerdo al estado de portador o no portador de las variantes genéticas rs2422493 o rs9282541

Comparamos las características clínicas y bioquímicas de acuerdo al estado de portador en estado homocigoto o heterocigoto (1 o 2 alelos de riesgo) de las variantes genéticas rs2422493 o rs9282541 en todos los individuos de estudio.

### 7.4.1 Variante genética rs2422493

No encontramos ninguna diferencia relevante entre los portadores y no portadores del polimorfismo rs2422493 (tabla 7.4.1).

**Tabla 7.4.1. Características clínicas y bioquímicas de los portadores y no portadores de la variante rs242249.**

Características	Portadores (2417)	No portadores (886)	Valor de p
Sexo masculino, n (%)	1009 (41.7)	387 (43.7)	0.321
Edad, mediana (RIC), años	49 (51-56)	49 (41-58)	0.500
ICT, mediana (RIC), cm	0.59 (0.54-0.64)	0.59 (0.54-0.64)	0.418
CC, mediana (RIC), cm	94 (87-102)	95.5 (87-102)	0.616
IMC, mediana (RIC), kg/m <sup>2</sup>	28 (25-31)	28 (25.6-30.9)	0.905
HDL-c, mediana (RIC), mg/dL	42 (35-50)	42 (35-50)	0.485
LDL-c, mediana (RIC), mg/dL	122 (100.8-146)	122 (100-143.3)	0.400
TG, mediana (RIC), mg/dL	190 (116-279)	204 (122-295.5)	0.134
Glucemia, mediana (ICR), mg/dL	91 (82-110)	92 (84-113.2)	0.158
PAS, mediana (RIC), mmHg	120 (110-130)	120 (110-131)	0.143
PAD, mediana (RIC), mmHg	80 (70-85)	80 (70-90)	0.017
Hipertensión (%) <sup>a</sup>	535 (26.3)	182 (25.1)	0.554
Diabetes tipo 2, n (%)	663 (27.4)	251 (28.3)	0.629
Hipoalfalipoproteinemia, n (%)	1471 (60.9)	528 (59.6)	0.520

RIC, rango intercuartil; ICT, índice cintura-talla; CC, circunferencia de cintura; IMC, índice de masa corporal; HDL-c, colesterol HDL; LDL-c, colesterol LDL; PAS, presión arterial sistólica; PAD, presión arterial diastólica. <sup>a</sup>n=2756 pacientes.

#### 7.4.2 Variante genética rs9282541

Las diferencias significativas se encontraron en torno a la edad y los niveles plasmáticos de HDL-c. Los individuos portadores del polimorfismo rs9282541 eran más jóvenes con una mediana de edad de 48 años en comparación con los no portadores que tenían una mediana de 49 años de edad ( $p=0.008$ ). La concentración en plasma de HDL-c fue más alta en los sujetos portadores que en los no portadores (39 mg/dL vs. 42.8 mg/dL,  $p<0.001$ ) (tabla 7.4.2).

**Tabla 7.4.2. Características clínicas y bioquímicas de los portadores y no portadores de la variante rs9282541.**

Características	Portadores (671)	No portadores (2632)	Valor de $p$
Sexo masculino, n (%)	299 (44.6)	1097 (41.7)	0.177
Edad, mediana (RIC), años	48 (40-55)	49 (42-57)	0.008
ICT, mediana (RIC), cm	0.59 (0.55-0.64)	0.59 (0.54-0.64)	0.333
CC, mediana (RIC), cm	95 (88-102)	94 (87-102)	0.358
IMC, mediana (RIC), kg/m <sup>2</sup>	28 (25-31)	28 (25-31)	0.164
HDL-c, mediana (RIC), mg/dL	39 (34-47.1)	42.8 (35.9-51)	<0.001
LDL-c, mediana (RIC), mg/dL	118.1 (97.6-140.9)	122.7 (100.7-145.9)	0.024
TG, mediana (RIC), mg/dL	186.1 (112.5-267.6)	198.5 (118.7-286.2)	0.104
Glucemia, mediana (ICR), mg/dL	92 (83-119.9)	90.9 (83-109.8)	0.204
PAS, mediana (RIC), mmHg	120 (110-130)	120 (110-130)	0.676
PAD, mediana (RIC), mmHg	80 (70-85)	80 (70-86)	0.870
Hipertensión (%) <sup>a</sup>	149 (26.6)	568 (25.9)	0.721
Diabetes tipo 2, n (%)	193 (28.8)	721 (27.4)	0.479
Hipoalfalipoproteinemia, n (%)	211 (68.6)	1539 (58.5)	<0.001

RIC, rango intercuartil; ICT, índice cintura-talla; CC, circunferencia de cintura; IMC, índice de masa corporal; HDL-c, colesterol HDL; LDL-c, colesterol LDL; PAS, presión arterial sistólica; PAD, presión arterial diastólica. <sup>a</sup>n=2756 pacientes.

#### 7.5 Descripción de las principales medidas antropométricas, bioquímicas y genéticas de los individuos con diabetes tipo 2 y sus controles

Todas las características tanto clínicas como bioquímicas de ambos grupos fueron distintas. Los individuos con DT2 eran más añosos, con un mayor índice

cintura-talla, circunferencia de cintura e índice de masa corporal que los controles sin DT2 ( $p < 0.001$ ). Los sujetos con DT2 tenían menores concentraciones plasmáticas de HDL-c que sus contrapartes sin DT2 (38.6 mg/dL vs. 42.8 mg/dL,  $p < 0.001$ ), y por lo tanto una frecuencia mayor de hipoalfalipoproteinemia (73.9% vs. 55.4%,  $p < 0.001$ ). No hubo ninguna diferencia estadísticamente significativa en cuanto a la frecuencia de los alelos de riesgo de ambas variantes genéticas, en ambos grupos (tabla 7.4).

**Tabla 7.5. Características generales de los individuos con diabetes tipo 2 y controles.**

Características	Diabetes tipo 2 (914)	Controles (2389)	Valor de $p$
Sexo masculino , n (%)	312 (34.1)	1084 (45.4)	<0.001
Edad, mediana (RIC), años	53 (45-61)	47 (40-54)	<0.001
ICT, mediana (RIC), cm	0.63 (0.58-0.70)	0.57 (0.54-0.62)	<0.001
CC, mediana (RIC), cm	98.5 (91-108)	93 (86-100)	<0.001
IMC, mediana (RIC), kg/m <sup>2</sup>	29 (26-32)	28 (26-32)	<0.001
HDL-c, mediana (RIC), mg/dL	38.6 (32-45.9)	42.8 (35.9-50.9)	<0.001
LDL-c, mediana (RIC), mg/dL	112.7 (91.1-136.6)	124.7 (103.8-146.7)	<0.001
TG, mediana (RIC), mg/dL	224.1 (151.5-363.3)	170.1 (109-261.4)	<0.001
Glucemia, mediana (RIC), mg/dL	212.8 (131.4-302.6)	86.9 (81-92.9)	<0.001
PAS, mediana (RIC), mmHg	130 (120-140)	120 (110-130)	<0.001
PAD, mediana (RIC), mmHg	80 (70-90)	80 (70-85)	<0.001
Hipertensión, n (%) <sup>a</sup>	303 (43.2)	414 (20.2)	<0.001
Hipoalfalipoproteinemia, n (%)	675 (73.9)	1324 (55.4)	<0.001
Polimorfismo de un solo nucleótido			
rs2422493			0.806
0 alelos de riesgo, n (%)	251 (27.5)	635 (26.6)	
1 alelo de riesgo, n (%)	453 (49.5)	1183 (49.5)	
2 alelos de riesgo, n (%)	210 (23.0)	571 (23.9)	
rs9282541			0.773
0 alelos de riesgo, n (%)	721 (78.9)	1911 (80.0)	
1 alelo de riesgo, n (%)	180 (19.7)	447 (18.7)	
2 alelos de riesgo, n (%)	13 (1.4)	31 (1.3)	

RIC, rango intercuartil; ICT, índice cintura-talla; CC, circunferencia de cintura; IMC, índice de masa corporal; HDL-c, colesterol HDL; LDL-c, colesterol LDL; PAS, presión arterial sistólica; PAD, presión arterial diastólica. <sup>a</sup>n=2756 pacientes.

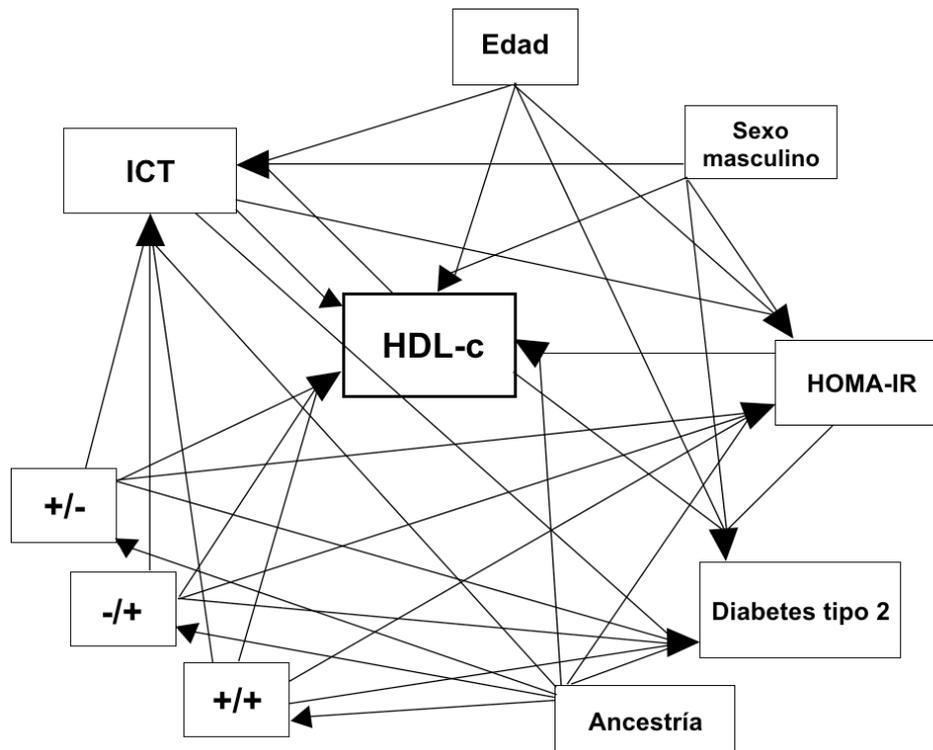
## 7.6 Corrección de estratificación poblacional

Se construyó un único índice de ancestría basado en nuestros hallazgos de una correlación de 0.83 entre el primer CP de GWAS-DT2 y el GWAS-TG, y de 0.91 entre el primer CP de GWAS-DT2 y el porcentaje de ancestría Nativa-Americana. De esta forma, el uso del primer CP discriminaría de forma adecuada entre la ancestría Americana y la Europea. Por lo tanto, incluimos este índice en los análisis de senderos para controlar por un potencial confundidor debido a la estratificación poblacional.

## 7.7 Análisis de senderos

El modelo hipotético se ajustó bien a los datos analizados (CFI=1.0; TLI=1.0; RMSEA=0.0 90%CI (0.0, 0.04) (figura 7.7). Posterior a la eliminación de los senderos que resultaron no significativos, los índices de ajuste del modelo final fueron (CFI=1.0; TLI=1.0; RMSEA=0.0 90%CI (0.0, 0.02) (figura 7.7.1).

Los participantes fueron agrupados de acuerdo a su estado de portador de las variantes genéticas rs2422493 y rs9282541 del gen *ABCA1*, de tal manera que formaron cuatro grupos: -/-, +/-, -/+ y +/+ (diseño metodológico 6.1.5).



**Figura 7.7. Diagrama de senderos de la asociación hipotética entre los genotipos de ABCA1, edad, sexo, HOMA-IR, ICT, ancestría, HDL-c y diabetes tipo 2. El genotipo ancestral en las dos variantes (denominado como -/-) fue tomado como el grupo de referencia. Los otros grupos incluyeron a los portadores de una variante (denominados como +/- para los portadores de rs2422493, pero no portadores de la rs9282541 y el grupo -/+ para el caso contrario), o de ambas variantes (grupo +/+). Los portadores de una o ambas variantes se consideraron al tener uno o dos alelos de riesgo. ICT, índice cintura-talla; HOMA-IR, modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina; HDL-c, colesterol HDL.**

### 7.7.1 Diabetes tipo 2

Después de hacer el ajuste por sexo, edad, niveles plasmáticos de HDL-c, ICT, HOMA-IR y ancestría, no encontramos efectos directos entre ninguno de los grupos de ABCA1 sobre el riesgo a padecer DT2 ( $p=0.99$ ,  $p=0.58$  y  $p=0.91$  para los grupos +/-, -/+ y +/+, respectivamente) (figura 7.7.1 y tabla 7.7.1). Sin embargo, sí encontramos efectos indirectos significativos de los grupos -/+ y +/+ sobre DT2 a través de las concentraciones plasmáticas de HDL-c ( $\beta=0.04$ ;  $p=0.03$  and  $\beta=0.06$ ;  $p<0.01$ , respectivamente). De forma interesante, los efectos

indirectos del grupo +/- no fueron significativos ( $\beta \leq 0.01$ ;  $p = 0.92$ ), lo que quiere decir que los individuos en el grupo +/- fueron igualmente propensos a tener DT2 en comparación con el grupo de referencia -/-. En contraste, los portadores de la variante rs9282541 tuvieron un riesgo más elevado a tener DT2 a través de una disminución en los niveles de HDL-c que los del grupo ancestral. La diferencia entre los efectos indirectos de los grupos -/+ y +/+ sobre el riesgo de DT2 no fue significativa ( $p = 0.46$ ). Sin embargo, encontramos dos efectos indirectos estadísticamente significativos del ICT hacia DT2: uno de ellos a través de las concentraciones plasmáticas de HDL-c ( $\beta = 0.47$ ;  $p = 0.02$ ) y el otro, a través del índice HOMA-IR previo al ICT ( $\beta = 0.20$ ;  $p < 0.01$ ).

Como se esperaba, los niveles en plasma de HDL-c estuvieron inversamente asociadas con el riesgo de DT2 ( $\beta = -0.70$ ;  $p < 0.01$ ). También las variables como sexo masculino y la edad estuvieron significativamente asociadas al riesgo de DT2 ( $p < 0.01$ ). Los coeficientes estandarizados ( $\beta$  estandarizados) sugieren que los efectos más grandes sobre el riesgo de DT2 son HOMA-IR, edad y niveles de HDL-c ( $\beta$  estandarizados = 0.21, 0.20 y -0.19, respectivamente) (figura 7.7.1 y tabla 7.7.1).

### 7.7.2 HDL-c

Después de hacer el ajuste por sexo, edad, ICT, HOMA-IR y ancestría, los efectos directos de los grupos de *ABCA1* -/+ y +/+ sobre las concentraciones plasmáticas de HDL-c, fueron tanto negativas y significativas en comparación con el grupo de referencia ( $\beta = -0.06$ ;  $p = 0.03$  and  $\beta = -0.08$ ;  $p < 0.01$ , respectivamente), lo que significa que los portadores de la variante rs9282541 fueron más propensos a tener bajos niveles de HDL-c que los no portadores. La resistencia a la insulina medida con HOMA-IR estuvo negativamente asociada con la concentración de HDL-c ( $\beta = -0.03$ ;  $p < 0.01$ ).

El sexo, edad y antropometría también estuvieron asociados con los niveles de HDL-c ( $p < 0.05$ ). De acuerdo a los coeficientes estandarizados, pertenecer al sexo masculino tuvo el efecto más grande sobre los niveles de HDL-c ( $\beta$  estandarizado = -0.33,  $p < 0.01$ ). El signo negativo indica que en promedio los

niveles de HDL-c fueron más bajos en hombres que en mujeres. El segundo mayor efecto fue el encontrado para HOMA-IR ( $\beta$  estandarizado=-0.20,  $p<0.01$ ), indicando que los individuos con mayor resistencia a la insulina, en promedio, tuvieron menos cifras de HDL-c (figura 7.7.1 y tabla 7.7.1).

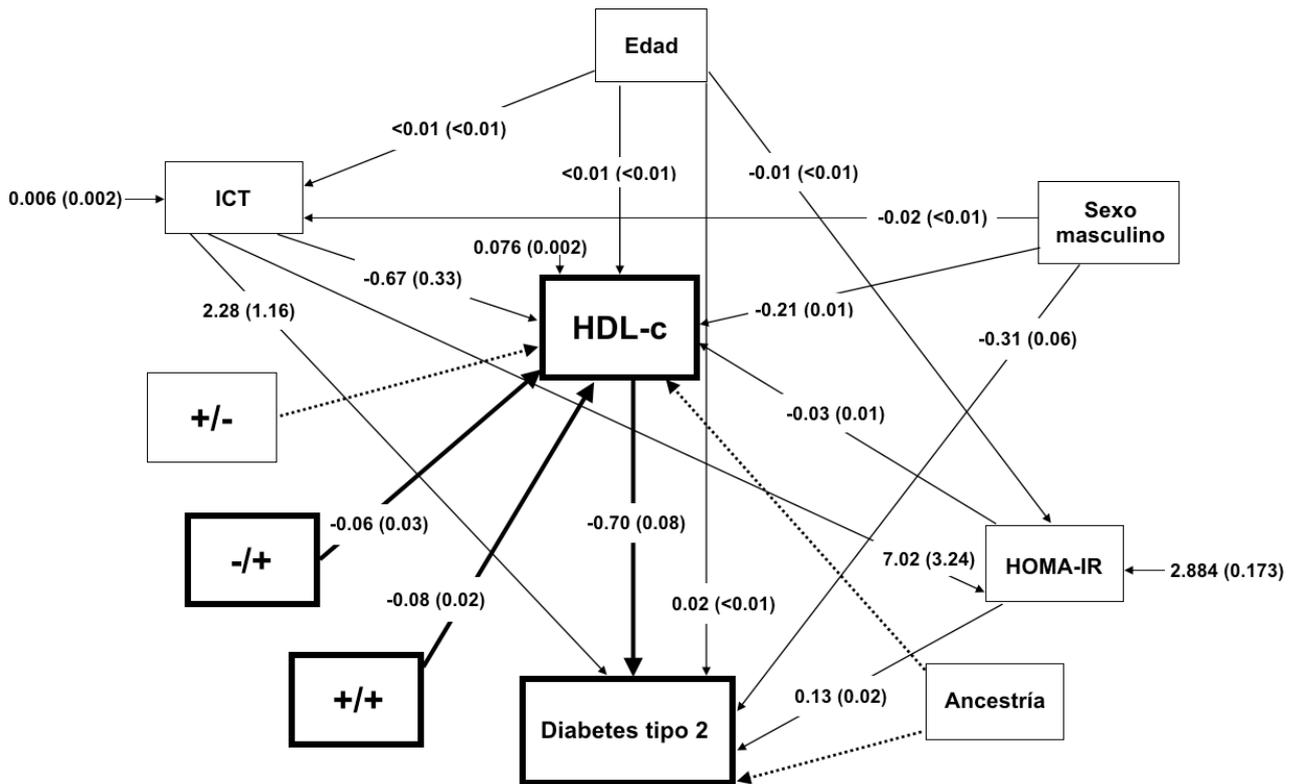
Los efectos indirectos del grupos de genotipos estudiados sobre HDL-c, a través de HOMA-IR o ICT no fueron estadísticamente significativos.

### **7.7.3 HOMA-IR**

No encontramos ningún efecto genético significativo de los grupos evaluados sobre HOMA-IR ( $p=0.47$  para +/-,  $p=0.26$  para -/+ y  $p=0.21$  para +/+) (tabla 7.7.1). Sin embargo, la edad ( $\beta=-0.01$ ;  $p=0.03$ ) y el ICT ( $\beta=7.02$ ;  $p=0.03$ ) sí estuvieron asociados con resistencia a la insulina (figura 7.7.1 y tabla 7.7.1).

### **7.7.4 Índice cintura-talla**

Con respecto al ICT, no encontramos efectos genéticos significativos con ninguno de los grupos ( $p=0.22$  para +/-,  $p=0.27$  para -/+ y  $p=0.29$  para +/+) (tabla 7.7.1). Aunque sí observamos efectos de pertenecer al sexo masculino y la edad, con el ICT ( $\beta=-0.02$ ;  $p<0.01$  y  $\beta<0.01$ ;  $p<0.01$ , respectivamente) (figura 7.7.1 y tabla 7.7.1).



**Figura 7.7.1. Modelo final que representa la asociación entre los genotipos de ABCA1, edad, sexo, HOMA-IR, ICT, ancestría, HDL-c y diabetes tipo 2. El genotipo ancestral en las dos variantes (denominado como -/-) fue tomado como el grupo de referencia, y los otros grupos incluyeron a los portadores de una variante (denominados como +/- para los portadores de rs2422493, pero no portadores de la rs9282541 y el grupo -/+ para el caso contrario), o de ambas variantes (grupo +/+). Los portadores de una o ambas variantes se consideraron al tener uno o dos alelos de riesgo. Las líneas continuas representan efectos estadísticamente significativos y las discontinuas los efectos que no alcanzaron significancia estadística de  $p < 0.05$ . HDL-c y diabetes tipo 2 fueron ajustadas por ancestría. ICT, índice cintura-talla; HOMA-IR, modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina; HDL-c, colesterol HDL.**

**Tabla 7.7.1. Resultados del análisis de senderos: Efectos directos e indirectos de los genotipos de ABCA1, edad, sexo, HOMA-IR e ICT sobre las variables HDL-c y DT2.**

		Efectos directos			Efectos indirectos			
Dependientes	Variab Independientes	Beta estandarizada	Beta no estandarizada	Valor de <i>p</i>		Beta estandarizada	Beta no estandarizada	Valor de <i>p</i>
<b>T2D</b>								
	Sexo masculino	-0.14	-0.31 (0.06)	<0.001				
	HDL-c	-0.19	-0.70 (0.08)	<0.001				
	HOMA-IR	0.21	0.13 (0.02)	<0.001				
	ICT	0.15	2.28 (1.16)	0.049				
					ICT->HDL-c-> DT2	0.03	0.47 (0.20)	0.022
					ICT->HOMA-IR->HDL-c-> DT2	0.01	0.20 (0.05)	<0.001
	Edad	0.20	0.02 (<0.01)	<0.001				
	Ancestría <sup>a</sup>	0.01	0.33 (0.61)	0.588				
	-/-		Referencia <sup>b</sup>					
	+/-	<0.01	<0.01 (0.06)	0.999				
					+/- ->HDL-c->DT2	<0.01	<0.01 (0.01)	0.916
	-/+	0.01	0.06 (0.10)	0.582				
					-/+ ->HDL-c->DT2	0.01	0.04 (0.02)	0.033
	+/+	<0.01	-0.01 (0.08)	0.909				
					+/+ ->HDL-c->DT2	0.02	0.06 (0.02)	<0.001
<b>HDL-c</b>								
	Sexo masculino	-0.33	-0.21 (0.01)	<0.001				
	HOMA-IR	-0.20	-0.03 (0.01)	<0.001				
	ICT	-0.17	-0.67 (0.33)	0.040				
	Edad	0.06	<0.01 (<0.01)	0.007				
	Ancestría <sup>a</sup>	-0.03	-0.25 (0.14)	0.078				

-/-			Referencia <sup>b</sup>	
+/-	<0.01	<0.01 (0.01)		0.916
<b>-/+</b>	<b>-0.05</b>	<b>-0.06 (0.03)</b>		<b>0.030</b>
<b>+/+</b>	<b>-0.09</b>	<b>-0.08 (0.02)</b>		<b>&lt;0.001</b>
<b>HOMA-IR</b>				
<b>Edad</b>	<b>-0.07</b>	<b>-0.01 (&lt;0.01)</b>		<b>0.031</b>
<b>ICT</b>	<b>0.32</b>	<b>7.02 (3.24)</b>		<b>0.031</b>
-/-			Referencia <sup>b</sup>	
+/-	-0.02	-0.07 (0.09)		0.469
-/+	-0.02	-0.16 (0.15)		0.264
+/+	0.03	0.17 (0.13)		0.210
<b>ICT</b>				
<b>Sexo masculino</b>	<b>-0.11</b>	<b>-0.02 (&lt;0.01)</b>		<b>&lt;0.001</b>
<b>Edad</b>	<b>0.20</b>	<b>&lt;0.01 (&lt;0.01)</b>		<b>&lt;0.001</b>
-/-			Referencia <sup>b</sup>	
+/-	-0.03	<0.01 (<0.01)		0.217
-/+	-0.02	-0.01 (0.01)		0.268
+/+	0.02	0.01 (0.01)		0.293

Los cuatro grupos estudiados son: los que tienen el genotipo ancestral (denominado como -/-) en las dos variantes, y los otros grupos incluyen a los portadores de una variante (denominados como +/- para los portadores de rs2422493, pero no portadores de la rs9282541 y el grupo -/+ para el caso contrario), o de ambas variantes (grupo +/+). Los portadores de una o ambas variantes se consideraron al tener uno o dos alelos de riesgo. DT2, diabetes tipo 2; HDL-c, colesterol HDL; HOMA-IR, modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina; ICT, índice cintura-talla.

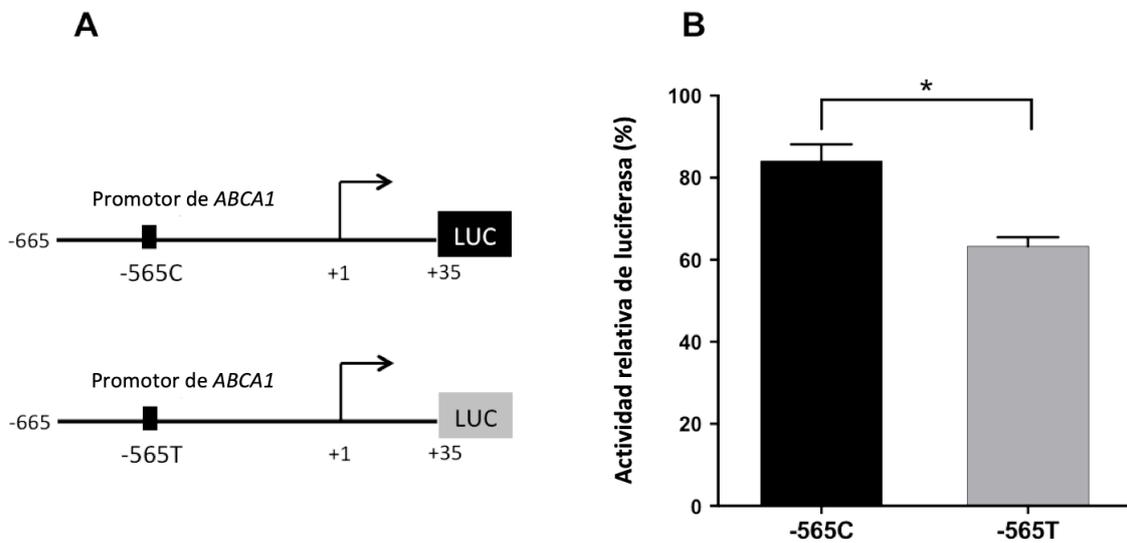
<sup>a</sup>Los componentes principales de dos GWAS fueron usado para estimar la ancestría, diferenciándola entre ancestría Americana o Europea.

<sup>b</sup>La referencia fue tomada en cuenta como el genotipo ancestral de ambos polimorfismos de un solo nucleótido del gen *ABCA1*.

- Actividad de la región promotora

### 7.8 Actividad del promotor de ABCA1

Para analizar si el polimorfismo rs242293 tenía efecto sobre la actividad del promotor de ABCA1, clonamos el promotor del gen ABCA1 teniendo en cuenta la posición de nucleótidos +35 desde el sitio de inicio de la transcripción hasta el -665 (figura 7.8A). Como se muestra en la figura 7.8B el constructo del plásmido reportero pGL4 que contenía la secuencia alélica T, tuvo una actividad significativamente menor que el constructo que contenía la secuencia alélica C ( $p < 0.001$ ). Por lo tanto se concluye que la variante genética rs242293 (-565C/T) disminuye la actividad del promotor de ABCA1.

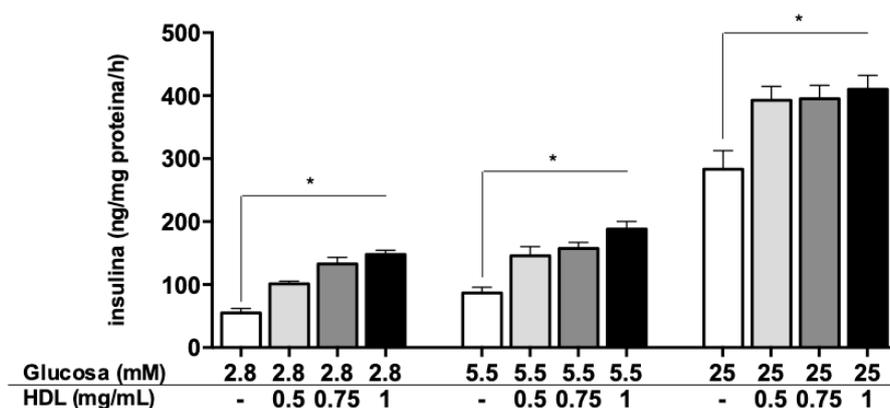


**Figura 7.8. Actividad de la actividad del promotor del gen ABCA1.** A. Representación esquemática del constructo del plásmido pGL4 con el promotor de ABCA1 con el nucleótido C o T en la región -565, con el gen reportero de la luciferasa. B. Porcentaje de la actividad relativa de luciferasa (estandarizada contra la actividad de Renilla luciferasa) con la secuencia de nucleótidos -665 a +35, con el nucleótido C o T, tranfectada en la línea celular HeLa. Los resultados representan tres experimentos hechos por triplicado, con valores de media  $\pm$  EEM, \* $p < 0.001$ .

- Función de HDL

### 7.9 Efecto de las HDL sobre la secreción de insulina

Para evaluar el efecto de las HDL aisladas de plasma de humanos, incubamos la línea celular MIN-6 con distintas concentraciones de glucosa: baja (2.8 mmol/L), fisiológica (5.5 mmol/L) o alta (25 mmol/L), con o sin HDL a concentraciones de 0.5 mg/dL, 0.75 mg/dL o 1 mg/dL (teniendo en cuenta la concentración de proteínas de las HDL). La incubación durante una h con 2.8 mmol/L de glucosa y 0.5 mg/mL de HDL liberó más insulina al medio comparada con las células control sin HDL (101±4 vs. 55±7 ng de insulina/mg de proteína celular,  $p<0.01$ ). Una tendencia similar fue se observó con la secreción de insulina usando una concentración de glucosa de 5.5 mmol/L con 0.5 mg/dL de HDL vs. 5.5 mmol/L de glucosa sin HDL (146±14 vs. 87±9 ng de insulina/mg de proteína celular, respectivamente,  $p<0.05$ ). Cuando la células MIN-6 fueron incubadas con 25 mmol/L de glucosa durante una hora, la concentración de insulina del medio de cultivo incrementó de 55±7 a 283±30 ng de insulina/mg de proteína celular,  $p<0.05$  (figura 7.9). Las HDL a concentración de 0.5 mg/dL aumentaron aún más la secreción de insulina estimulada por glucosa que su respectivo control (393±22 vs. 283±30 ng de insulina/mg de proteína celular, respectivamente,  $p<0.05$ ). Resultados con tendencia similar se encontraron cuando se incubaron las células MIN-6 con HDL a diferentes concentraciones (0.5, 0.75 o 1 mg/dL) en la presencia de concentraciones fisiológicas o altas de glucosa (figura 7.10).



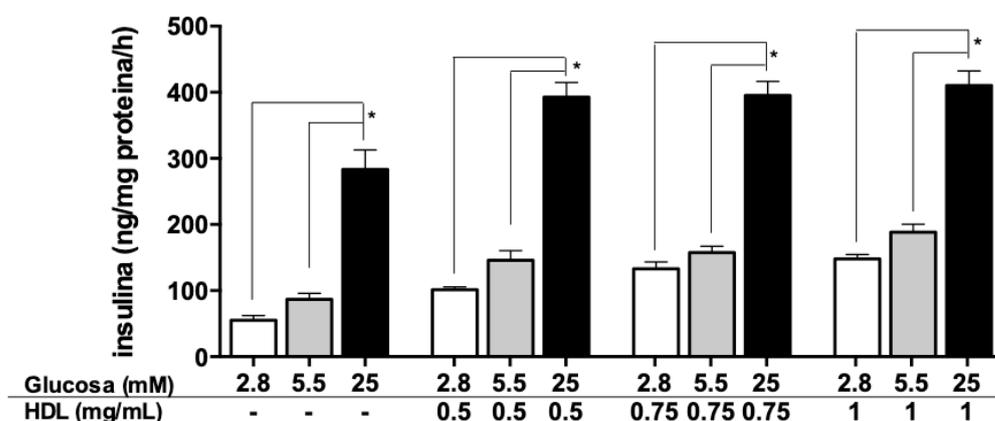
**Figura 7.9. Efecto de las HDL de humanos sobre la secreción de insulina de la línea celular MIN-6. Las células MIN-6 fueron incubadas por 1 hora con 2.8, 5.5, or 25 mm/L de glucosa, en ausencia (barras blancas, control), o presencia de HDL con 0.5 mg/mL (barras grises), 0.75 mg/mL (barras grises oscuras), or 1 mg/mL (barras negras). Todos los resultados fueron normalizados con la concentración de proteínas totales. Los resultados representan la media±EEM de cuatro experimentos llevados a cabo por cuadruplicado, \*p<0.05 comparado con células control.**

### 7.10 Las HDL incrementan la secreción de insulina estimulada por glucosa

En la línea celular MIN-6 la secreción de insulina se puede observar cuando se usan concentraciones altas de glucosa (25 mmol/L), comparada tanto con concentraciones bajas (2.8 mmol/L) como fisiológicas de glucosa (5 mmol/L) (figura 7.10).

Una tendencia similar a la anterior se observa cuando se usan diferentes concentraciones de HDL (0.5, 0.75 o 1 mg/dL) con altas concentraciones de glucosa (figura 7.10).

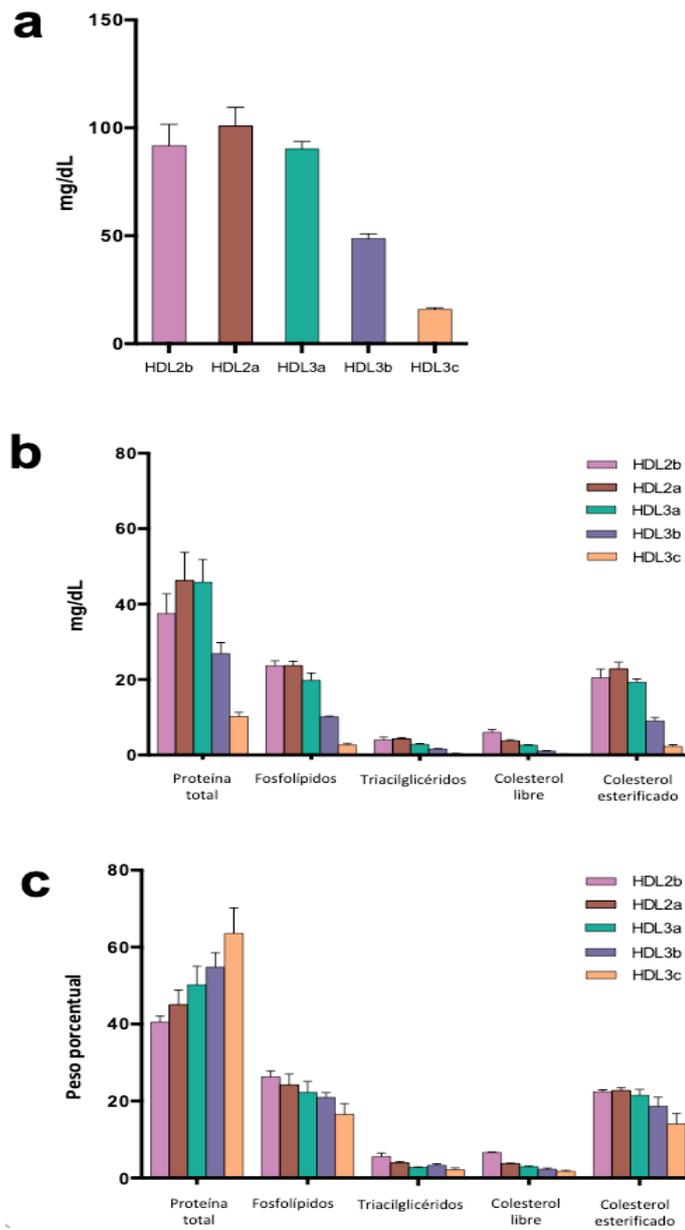
Por lo tanto, estos resultados muestran que las partículas de HDL pueden incrementar la secreción de insulina estimulada por glucosa.



**Figura 7.10. Efecto de las HDL de humanos sobre la secreción de insulina de la línea celular MIN-6. Las células MIN-6 fueron incubadas por 1 h con 2.8, 5.5, or 25 mM de glucosa, en ausencia o presencia de HDL (0.5 mg/mL, 0.75 mg/mL, or 1 mg/mL). Todos los resultados fueron normalizados con la concentración de proteínas totales. Los resultados representan la media±EEM de cuatro experimentos llevados a cabo por cuadruplicado, \*p<0.05.**

### **7.11 Composición química de las subpoblaciones de HDL**

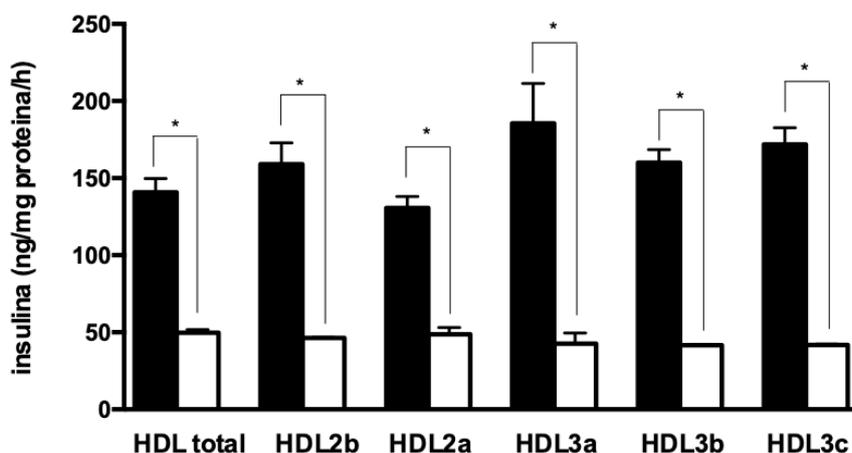
Para evaluar si la secreción de insulina incrementada por las HDL dependía de alguna subpoblación particular de HDL, se aislaron cinco subclases a partir de plasma humano: 2b, 2a, 3a, 3b y 3c. Posteriormente medimos la masa total y la composición química de cada una de ellas, teniendo en cuenta el contenido de proteína total, fosfolípidos, triacilgliceroles, colesterol libre y colesterol esterificado. La masa total de las diferentes subfracciones de HDL se presenta en la figura 7.11a. El contenido total de proteína mostró una tendencia a incrementarse conforme disminuía la concentración total de lípidos, cuantificadas en mg/dL (figura 7.11b) y peso porcentual (figura 7.11c)



**Figura 7.11. Masa total (a) y composición química de la subfracciones de HDL2b, HDL2a, HDL3a, HDL3b and HDL3c aisladas de 4 hombres y 4 mujeres sanos, expresado como mg/dL (b) y como peso porcentual del total de la masa (c). Los datos muestran la media±EEM de tres diferentes experimentos, llevados a cabo por triplicado.**

### 7.12 Efecto de las HDL totales y subfracciones de HDL sobre la secreción de insulina usando concentraciones bajas de glucosa

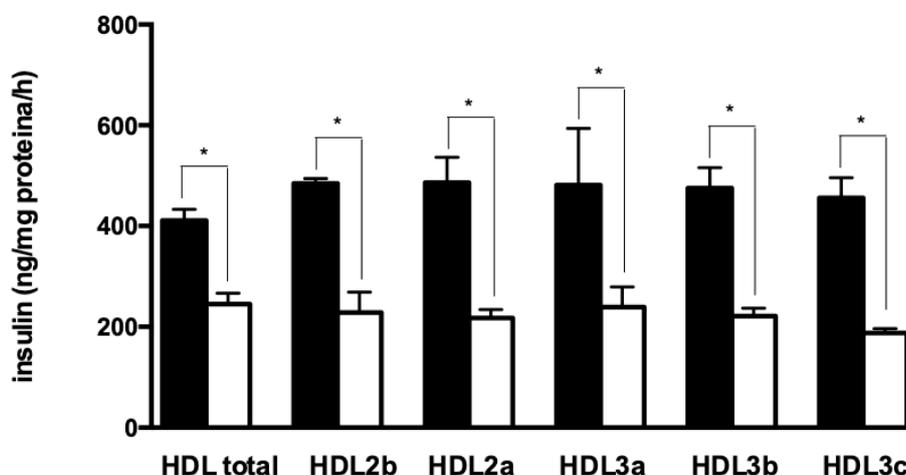
El estímulo con HDL aumentó la secreción de insulina, incluso más que solo la glucosa. Por lo tanto, evaluamos más a fondo la contribución de cada subfracción de HDL: 2b, 2a, 3a, 3b y 3c en la secreción de insulina, teniendo en cuenta la mayor concentración de HDL (concentración de proteína de 1 mg/mL), con 2.8 mmol/L glucosa durante 1 hora en células MIN-6. La figura 7.12 muestra que todas las subfracciones de HDL y HDL total mostraron mayor secreción de insulina que sus respectivos controles ( $p < 0.001$ ). Aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las subfracciones de HDL, sí hubo una tendencia de las subfracciones 2b y 2a que muestran una menor secreción de insulina en comparación con las subfracciones HDL3a, 3b y 3c. Estos resultados sugieren que todas las subfracciones de HDL, así como el HDL total, tienen un efecto potenciador similar en la secreción de insulina.



**Figura 7.12. Efecto de la HDL total y subfracciones de HDL aisladas de humanos sobre la secreción de insulina con baja glucosa en la línea celular MIN-6. Las células MIN-6 fueron incubadas por una hora con 2.8 mM de glucosa, en presencia de 1 mg/mL de HDL total o sus subfracciones 2b, 2a, 3a, 3b and 3c (barras negras) o en ausencia de HDL (barras blancas). Todos los resultados fueron normalizados con la concentración de proteínas totales. Los resultados representan la media  $\pm$  EEM de cuatro experimentos llevados a cabo por triplicado, \* $p < 0.05$  comparado con células control.**

### 7.13 Efecto de las HDL totales y subfracciones de HDL sobre la secreción de insulina usando concentraciones altas de glucosa

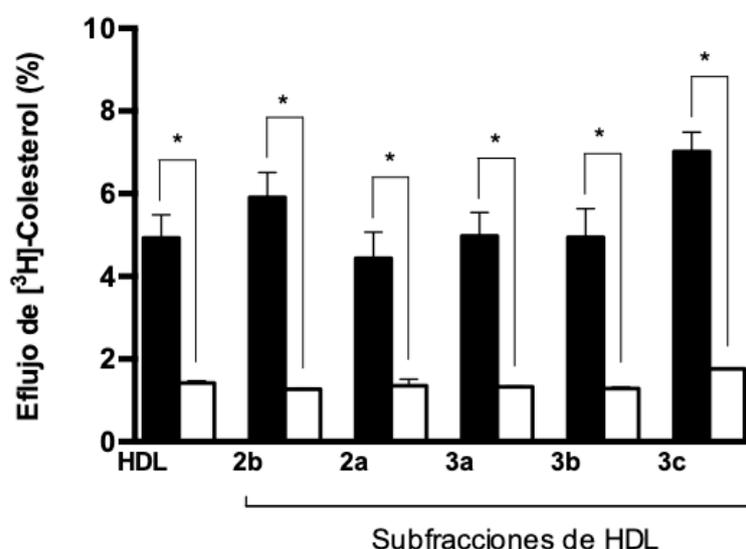
Para determinar si la capacidad de las subfracciones de HDL era diferente entre ellas en cuanto al estímulo que causan en la secreción de insulina con altas concentraciones de glucosa, las células MIN-6 se incubaron con 25 mmol/L durante 1 hora. La incubación de las células MIN-6 con 25 mmol/L de glucosa y 1 mg/L de proteína de HDL aumentó la liberación de insulina de  $245 \pm 22$  a  $410 \pm 22$  ng de insulina/ mg de proteína celular ( $p < 0.001$ ) (figura 7.13). De manera similar, las subfracciones de HDL (2a, 2b, 3a, 3b y 3c) incrementaron la secreción de insulina en comparación con sus respectivos controles ( $p < 0.05$ ). En este experimento tampoco observamos diferencias estadísticamente significativas entre el efecto de la HDL total y sus subfracciones.



**Figura 7.13. Efecto de la HDL total y subfracciones de HDL aisladas de humanos sobre la secreción de insulina con alta glucosa en la línea celular MIN-6. Las células MIN-6 fueron incubadas por una h con 25 mM of glucosa, en presencia de 1 mg/mL de HDL total o sus subfracciones 2b, 2a, 3a, 3b and 3c (barras negras) o en ausencia de HDL (barras blancas). Todos los resultados fueron normalizados con la concentración de proteínas totales. Los resultados representan la media  $\pm$  EEM de cuatro experimentos llevados a cabo por triplicado, \* $p < 0.05$  comparado con células control.**

### 7.14 Efecto de las HDL totales y subfracciones de HDL sobre el flujo de salida de colesterol en las células MIN-6

Evaluamos la función de las HDL totales y de las subfracciones de HDL 2b, 2a, 3a, 3b y 3c con respecto al flujo de salida de colesterol en las células  $\beta$  (MIN-6) y las comparamos con sus respectivos controles. Todas las subfracciones de HDL mostraron un flujo de salida de colesterol más alto que sus controles ( $p < 0.05$ ). La subfracción HDL3c provocó el mayor flujo de salida de colesterol (7.0%), y las subfracciones HDL2a evocaron el menor eflujo (4.4%), pero la diferencia entre estas dos subfracciones no alcanzó significancia estadística ( $p = 0.07$ ) (figura 7.14).



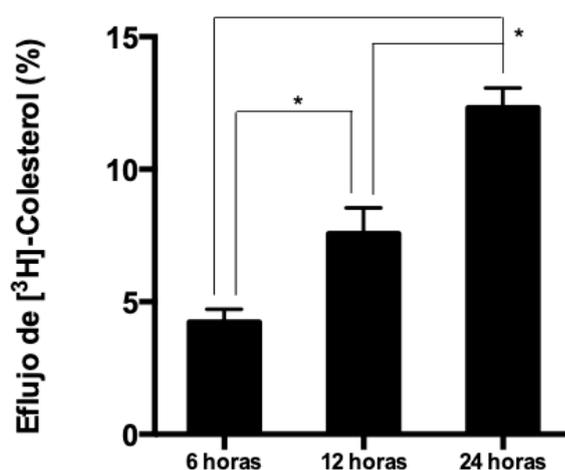
**Figura 7.14.** Capacidad del flujo de salida de colesterol de las HDL totales y subfracciones de HDL en la línea celular MIN-6. Las células MIN-6 fueron incubadas con  $1 \mu\text{Ci/mL}$   $^3\text{[H]}$ -colesterol en LDL acetiladas durante una hora, posteriormente fueron equilibradas con medio DMEM, y el ensayo de eflujo de colesterol se llevó a cabo con HDL totales o subfracciones 2b, 2a, 3a, 3b or 3c. Los resultados representan la media  $\pm$  EEM de tres experimentos llevados a cabo por cuadruplicado, \* $p < 0.05$  comparado con su respectivo control.

### 7.15 Efecto de las HDL totales sobre el flujo de salida de colesterol en las células Rin-m5F

Evaluamos el efecto de las HDL totales sobre el flujo de salida de colesterol en la línea celular Rin-m5F, con el objetivo de comprobar si había diferencias en cuanto al tiempo de exposición con las HDL, entre 6, 12 y 24 h.

El flujo de salida de colesterol usando HDL por 24 h fue más alto que el de 12 h (12.3% vs. 7.6%, respectivamente,  $p < 0.01$ ) o 6 h (12.3% vs. 4.2%, respectivamente,  $p < 0.001$ ). Así como el flujo de salida de colesterol fue más alto cuando se usaron las HDL durante 12 h que 6 h ( $p < 0.05$ ) (figura 7.15).

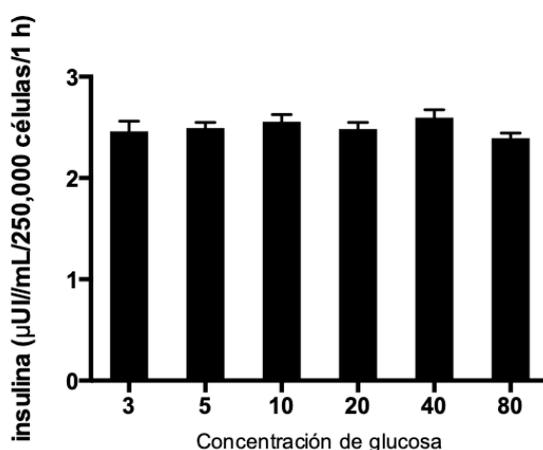
Por lo tanto podemos concluir que el tiempo de exposición (de la línea celular RIN-m5F) con las HDL sí se muestra afectado a la alza. Lo que se interpreta como que un mayor tiempo de exposición con las HDL se traduce en un mayor eflujo de colesterol.



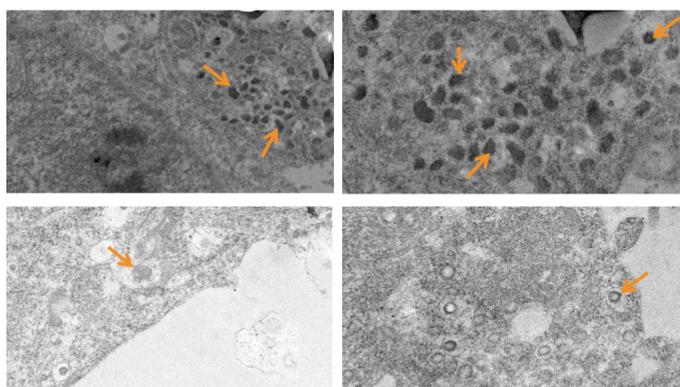
**Figura 7.15.** Capacidad de eflujo de colesterol a las 6, 12 y 24 h con HDL totales en la línea celular Rin-m5F. Las células Rin-m5F fueron incubadas con 1  $\mu\text{Ci/mL}$  <sup>3</sup>[H]-colesterol en LDL acetiladas durante una h, posteriormente fueron equilibradas con medio RPMI, y el ensayo de eflujo de colesterol se llevó a cabo con HDL totales por 6, 12 y 24 h. Los resultados representan la media  $\pm$  EEM de dos experimentos llevados a cabo por triplicado. El control negativo fue restado en cada uno de los tiempo, \* $p < 0.05$ .

### 7.16 Efecto de la glucosa sobre la secreción de insulina en la línea celular Rin-m5F

Los objetivos de evaluar el efecto de la glucosa a diferentes concentraciones (3, 5, 10, 20, 40 y 80 mmol/L) sobre la secreción de insulina en una segunda línea celular de insulinoma (RIN-m5F) fueron: examinar si existía secreción de insulina mediada por glucosa, y posteriormente evaluar si existía aumento de liberación de insulina de acuerdo a los niveles de HDL. Los resultados muestran que la línea celular Rin-m5F no secreta insulina con concentraciones de glucosa bajas, fisiológicas, altas o muy altas, y tampoco hay diferencias significativas entre ellas ( $p > 0.05$ ) (figura 7.16). Lo anterior se encontró a pesar de que esta línea celular sí tiene gránulos de insulina en su interior (figura 7.17).



**Figura 7.16. Secreción de insulina con diferentes concentraciones de glucosa en la línea celular RIN-m5F.**



**Figura 7.17. Micrografías electrónicas de la línea celular Rin-m5F, mostrando los gránulos de insulina (señalados con flechas).**

## 8. DISCUSIÓN

---

Hasta donde tenemos conocimiento, este es el primer estudio que evalúa el efecto combinado de las variantes genéticas rs2422493 y rs9282541 del gen *ABCA1* sobre las concentraciones plasmáticas de HDL-c y el riesgo de DT2. Es posible que la variante rs2422493 del promotor de *ABCA1* cause una disminución en la actividad transcripcional de este gen *in vivo*, tal como se ha mostrado a través de estudios *in vitro* con un gen reportero. Se ha documentado que en placas de aterosclerosis, los portadores del alelo de riesgo T tuvieron menor expresión del gen *ABCA1*, tal como lo han demostrado Kyriakou *et al.* (73). Sin embargo, se han publicado resultados discordantes con respecto al efecto que tiene esta variante genética sobre el riesgo de hipoalfalipoproteinemia. En la presente tesis, los valores plasmáticos de HDL-c no mostraron diferencias significativas entre los portadores y los no portadores de la variante rs2422493, ni tampoco se observaron diferencias en la frecuencia de hipoalfalipoproteinemia, lo cual apoya los hallazgos de las cohortes de población China, Caucásica, Africana-Americana, e Hispana (73-75). En contraste, un estudio llevado a cabo en sujetos Iraníes encontró que los portadores del alelo T tuvieron una mayor prevalencia de hipoalfalipoproteinemia, con menores niveles plasmáticos de HDL-c que los no portadores (17). Sin embargo, el papel de la variante rs2422492 ha sido estudiada más extensamente no solo en relación con el perfil lipídico, sino también en relación con la enfermedad cardiovascular. Por ejemplo, la presencia del alelo T en la transición C por T en la posición -565 ha resultado asociado con el desarrollo (76) y la severidad de la aterosclerosis (77), así como con la calcificación de las arterias coronarias (74).

De manera interesante, en este trabajo encontramos una tendencia de niveles de HDL-c hacia la baja en los cuatro grupos estudiados, con una tendencia de disminución a partir del genotipo ancestral de ambas variantes (-/-), seguido por los portadores del SNP rs2422493 (+/-), los portadores de la rs9282541 (-/+), hasta los portadores de ambas variantes (+/+) que tenían los niveles de HDL-c más bajos. Sin embargo, no encontramos diferencias significativas cuando comparamos los efectos directos que los grupos -/+ y +/+

tenían sobre los niveles de HDL-c. Mas aún, los efectos indirectos que estos grupos tenían sobre el riesgo de DT2, a través de los niveles de HDL-c, no fueron estadísticamente distintos, sugiriendo que los efectos observados sobre los valores de HDL-c y sobre el riesgo de DT2 son resultado del efecto de la variante R230C (rs9282541). Más específicamente, cuando analizamos por separado los portadores vs. los no portadores del alelo de riesgo T de la variante rs9282541, encontramos que el efecto directo sobre DT2 no fue significativo ( $\beta=0.004$ ;  $p=0.94$ ), pero el indirecto sí lo fue, mediado a través de los niveles de HDL-c ( $\beta=0.05$ ;  $p<0.001$ ), lo que corrobora nuestros resultados iniciales. Lo anterior se encuentra en la misma línea de evidencia de hallazgos previos que muestran que la variante R230C de ABCA1 está asociada con incremento en el riesgo de presentar bajos niveles de HDL-c (11) y con mayor prevalencia de hipoalfalipoproteinemia (11, 16).

En el presente trabajo de tesis no encontramos un efecto directo significativo de ningún grupo genético estudiado sobre el riesgo de DT2. Estudios similares han sido previamente elaborados en relación a la variante rs9281541, como el publicado por Miranda-Lora *et al.* en el cual no encontraron asociación de este SNP con DT2 en mexicanos, incluso después de hacer el ajuste por factores de riesgo conocidos (78); tampoco lo encontraron Campbell *et al.* en adultos de Colombia con ascendencia nativa americana (79), ni Haghvirdizadeh *et al.* entre Malayos (80). En contraste, Villarreal-Molina *et al.* identificaron una asociación significativa entre portadores de la variante rs9282541 y DT2 de inicio temprano ( $\leq 45$  años de edad) en mexicanos, pero tal asociación no se observó en el grupo de DT2 de inicio tardío (14). De forma interesante, cuando evaluamos los efectos directos e indirectos de las variantes analizadas con respecto a la edad de inicio de la DT2, tampoco encontramos efectos directos significativos.

Los resultados anteriores son contradictorios debido al papel que tiene la variante R230C sobre el riesgo directo de DT2, lo que posiblemente resulta del tamaño de muestra utilizado en estudios previos (14), diferencias en la metodología para evaluar la ancestría, y por la influencia que la variante funcional -565C/T pudiera tener sobre el riesgo de DT2 cuando está presente en combinación con la variante R230C.

Nuestros resultados muestran que el efecto que la variante R230C tiene sobre el riesgo de DT2 es indirecto, a través de la disminución de los niveles

plasmáticos de HDL-c, hallazgo que está respaldado por el análisis de senderos que llevamos a cabo en un gran número de individuos utilizando una metodología robusta para evaluar y ajustar por ancestría en individuos mestizos mexicanos. Hasta donde tenemos conocimiento, este es el primer reporte que muestra a las concentraciones HDL-c como un factor de riesgo intermedio entre una variante funcional del gen *ABCA1* y la DT2. Estos resultados son consistentes con lo observado en distintos estudios epidemiológicos que han documentado a los niveles bajos de HDL-c como un factor de riesgo para el desarrollo de DT2 (23, 24, 25, 81). De acuerdo a nuestro análisis de senderos, el ICT tiene un efecto directo y positivo sobre el riesgo de DT2 y de resistencia a la insulina (calculado por HOMA-IR), y uno negativo sobre los niveles de HDL-c, sin embargo, ninguna de las variantes de *ABCA1* que estudiamos tuvo algún efecto sobre el ICT. Asociaciones contradictorias de la variante R230C con obesidad (determinadas a través del IMC) han sido reportadas, donde algunos estudios muestran asociación significativa (15), mientras que otros estudios no la han encontrado (82). En este trabajo, utilizamos el ICT en vez del IMC, ya que ha mostrado ser un mejor índice asociado con enfermedad cardiovascular en diferentes poblaciones (83, 84), incluyendo la mexicana (85). También identificamos que el estado de portador del SNP rs9282541, el sexo masculino, la resistencia a la insulina, un alto ICT y la edad avanzada son factores de riesgo independientes para presentar bajas concentraciones plasmáticas de HDL-c en mexicanos. De igual manera, la resistencia a la insulina, la edad avanzada y los bajos niveles de HDL-c son factores de riesgo para presentar DT2, mientras que también identificamos efectos indirectos del ICT hacia DT2, uno a través de HDL-c y el otro a través de HOMA-IR. Sin embargo, cuando evaluamos los efectos indirectos de todos los grupos genéticos de *ABCA1* a DT2, ya fuera a través del ICT o del HOMA-IR, los coeficientes beta no fueron significativos.

Incluso cuando sí observamos una disminución en la actividad del promotor de *ABCA1* con el alelo de riesgo de la variante genética rs2422493, esto no lo pudimos documentar de forma directa en los niveles plasmáticos de HDL-c en la población estudiada. La falta de tal asociación puede deberse a varias causas, como la presencia de factores de riesgo ambientales y genéticos adicionales. Es importante notar que en este trabajo de tesis no consideramos otros polimorfismos en genes involucrados en el metabolismo de las HDL, pero que sí

es relevante mencionar, ya que potencialmente afectan las concentraciones de HDL-c, su estructura y función, como las proteínas codificadas en los siguientes genes: apoA-I, LCAT, CETP, PLTP, SR-B1, lipasa de lipoproteína, lipasa hepática y lipasa endotelial (86). La interacción entre polimorfismos de los anteriores genes y factores ambientales, así como con distintas comorbilidades podrían conllevar a variabilidad en los niveles de HDL-c, los cuales no son predecibles considerando exclusivamente el contexto genético (86).

En el transcurso de los últimos años, estudios clínicos, en animales, así como estudios *in vitro* han identificado una amplia gama de funciones de las HDL que contribuyen a la fisiopatología de la DT2. Distintos estudios sugieren que la disminución de la actividad de ABCA1 conlleva a disfunción de la célula  $\beta$  (22). Las HDL y sus subfracciones 2a, 2b, 3a, 3b y 3c pueden incrementar la secreción de insulina, tal como lo pudimos comprobar en el presente trabajo, el cual muestra que las HDL nativas aisladas de individuos sanos son capaces de promover la salida de insulina de la línea celular pancreática MIN-6. Se ha documentado también que las HDL funcionan tanto como secretagogos de la insulina, así como incrementando el efecto de la glucosa (26, 27, 87). Nosotros observamos que en las células MIN-6 la glucosa promueve la secreción de insulina de forma dependiente de su concentración. Un punto relevante a tomar en cuenta es que nosotros utilizamos HDL aisladas de seres humanos sanos, ya que posiblemente estas partículas retienen gran parte de sus funciones fisiológicas. En presencia de altas concentraciones de glucosa, las HDL incrementan la secreción de insulina estimulada por glucosa, posiblemente mediante la vía secretora clásica, dependiente de la activación de los canales de KATP (88). Sin embargo, con condiciones de concentraciones de glucosa baja, las HDL también incrementaron la liberación de insulina, comparada con los controles, consistente con los resultados publicados por Fryirs *et al.*, donde observaron que las principales proteínas de las HDL, apoA-I y apoA-II estaban involucradas en la activación de AMPc, y la subsecuente liberación de insulina (26).

Posteriormente probamos con diferentes concentraciones de HDL para evaluar si la secreción de insulina también se incrementaba; sin embargo, no encontramos ninguna diferencia al aumentar la concentración de HDL. Tales resultados sugieren que los efectos de las HDL sobre la liberación de insulina tiene una máxima eficiencia a una determinada concentración (*i.e.*, efecto de

techo). También fue importante tomar en cuenta que las HDL producen partículas que varían en tamaño, forma, densidad y composición (89-91), desde las más grandes y menos densas (HDL2) hasta la más pequeñas y más densas (HDL3), clasificándose así como subfracciones 2a, 2b, 3a, 3b y 3c. El componente proteico fue mayor conforme las subfracciones eran más pequeñas, desde 3c hasta 2a. Incluso cuando nosotros no cuantificamos la concentración de cada apolipoproteína, es bien sabido que las proteínas más abundantes en las HDL son la apoA-I (70%) y la apoA-II (20%) (90), seguidas de otras proteínas menores. Además, se ha demostrado que la función y la composición de las subpoblaciones de HDL, principalmente el proteoma y el lipidoma, pueden alterarse en las primeras etapas de ciertas enfermedades, entre ellas el infarto agudo de miocardio y la cardiopatía isquémica o valvular, lo que implica la disfunción de su actividades biológicas (92, 93).

Es interesante que cuando usamos las cinco subfracciones de HDL, no encontramos diferencias significativas en la secreción de insulina. Una posible explicación es que utilizamos la misma concentración de proteína HDL en todas las subfracciones evaluadas. Como se ha demostrado anteriormente, la porción de proteína (principalmente apoA-I) es un regulador importante de la secreción de insulina (26, 94). Sin embargo, a pesar de no haber encontrado diferencias significativas, observamos una tendencia sobre la subfracciones de HDL pequeñas y densas a presentar el efecto más potente sobre la secreción de insulina con bajas concentraciones de glucosa, siendo la subpoblación 3a la que mostró mayor capacidad secretagoga.

En la misma línea de evidencia, también observamos que la subpoblación 3c mostró el mayor efecto sobre el flujo de salida de colesterol. Esta observación es consistente con estudios previos, en diferentes tipos de células, como los macrófagos o líneas celulares derivadas de hepatocitos que muestran gran flujo de salida de colesterol mediado por la subfracción 3c (94, 95). La subfracción HDL3 se considera la subpoblación más activa en términos de flujo de salida de colesterol mediado por ABCA1, probablemente debido a las diferencias conformacionales que la apolipoproteína apoA-I toma entre las partículas pequeñas y densas (HDL3) en comparación con las más grandes (HDL2) (96). Por lo tanto, aunque la subfracción 3c representa menos del 15% de la HDL total, tiene un potente efecto contra la oxidación causada por las partículas de LDL (89),

y que ha sido asociado directamente con la proteína apoA-I (97). Se ha propuesto que los individuos que tienen elevados niveles plasmáticos de HDL2 tienen menor riesgo de DT2 incidente (98); en contraste, otros sugirieron que la actividad de la HDL3 es deficiente entre los pacientes con diabetes tipo 2 (99). De igual forma, en pacientes con DT2 se ha demostrado que la actividad antioxidativa de la subfracción HDL3 está disminuida como resultado de su composición química alterada (99).

En el presente estudio no observamos un efecto diferencial de ninguna de las subfracciones de HDL con respecto a la secreción de insulina. Sin embargo, es posible que la subfracción HDL3c ejerza un efecto secretagogo de insulina al promover el flujo de salida de colesterol de las células MIN-6; ya que otros estudios han mostrado que la incubación con apoA-I o apoA-II aumenta notablemente la secreción de insulina, sin modificar los niveles de colesterol intracelular (26, 94). Aunque no podríamos descartar la posibilidad de una distribución de colesterol subcelular anormal (44). En este sentido se ha sugerido que una alta concentración de colesterol en los gránulos secretores contribuye a la producción de insulina, su empaque (100) y secreción (101). Alternativamente, las HDL pueden afectar la supervivencia de las células  $\beta$  al disminuir la IL-1 $\beta$  y la apoptosis inducida por glucosa, así como por medio de la modulación de estrés del retículo endoplásmico en las células  $\beta$  (102), lo que conllevaría a la muerte de los islotes durante el desarrollo de diabetes (97). Tales efectos están mediados particularmente por los componentes de proteínas y lípidos de las HDL (103). Por otro lado, Brunham *et al.* han propuesto que la toxicidad mediada por colesterol puede afectar la secreción de insulina en el modelo de ratón de inactivación de ABCA1 (31). También estudios en individuos con enfermedad de Tangier, causados por mutaciones en el gen *ABCA1*, han mostrado severa deficiencia de los niveles plasmáticos de HDL-c, acumulación de colesterol en los tejidos periféricos y alterada secreción de insulina estimulada por glucosa (104). Por lo tanto, es de vital importancia la homeostasis de colesterol para la función de las células  $\beta$ ; así como la combinación de colesterol intracelular con la reducción de la expresión de *ABCA1* se asocia con la deposición de amiloidea de los islotes pancreáticos, lo que se considera una característica patológica de la DT2 (105).

Por otro lado, en un ensayo clínico doble ciego, controlado por placebo, en el que usaron una infusión de HDL reconstituida (HDLr) en pacientes con DT2,

posterior a 4 h, los niveles de glucosa plasmática disminuyeron en el grupo de HDLr, mostrando un incremento en los niveles de insulina en plasma, con una mejor función de células  $\beta$  (evaluada mediante el modelo de HOMA- $\beta$ ), y activación de la proteína cinasa de AMP en músculo esquelético (87).

Por lo tanto, los efectos de las HDL sobre las células  $\beta$  se pueden observar no solo como secretagogos de la insulina, sino también como moduladores del metabolismo de la glucosa (97, 106), así como mediadores de la liberación de adiponectina, una hormona de los adipocitos que incrementa la sensibilidad a la insulina (107). Por consiguiente, el impacto positivo en la función de las células  $\beta$  a través de las HDL, se puede observar en estudios tanto *in vitro* como *in vivo*.

Dada la importancia de las funciones de las HDL, se han diseñado estrategias terapéuticas con el fin de incrementar los niveles plasmáticos de HDL-c en seres humanos. Las bases para estos tratamientos se construyeron sobre el conocimiento en ratas y ratones deficientes en CETP, los cuales son resistentes al desarrollo de aterosclerosis, así como variantes genéticas en humanos que podrían condicionar un aumento o disminución de los valores de HDL-c (dependiendo si la variantes en cuestión incrementa o disminuye la expresión del gen *CETP*). Sin embargo, los niveles en plasma de HDL-c no siempre son un reflejo perfecto de la funcionalidad de estas moléculas. Tal como se ha visto en diversos ensayos clínicos con inhibidores de la CETP, como los llevados a cabo con torcetrapib (estudio ILLUMINATE), dalcetrapib (estudio dal-OUTCOMES) y evacetrapib (estudio ACCELERATE), con resultados positivos y significativos en el incremento de HDL-c, pero todos fallaron en la reducción de eventos cardiovasculares. Las posibles explicaciones de esas fallas son: los inhibidores de la CETP producen HDL disfuncionales, eventos adversos no relacionados a los fármacos, el seguimiento fue muy corto para ver algún efecto positivo, las propiedades protectoras de las HDL no se relacionaron con el incremento de las HDL-c, entre otras (108). El único inhibidor de la CETP que mostró eficacia clínica en reducción de eventos cardiovasculares fue anacetrapib con atorvastatina (estudio REVEAL), sin embargo fue debido principalmente a reducción de LDL-c, y no aumento de HDL-c (109)

Por lo tanto, es primordial el estudio de las moléculas de HDL en diferentes contextos de salud y enfermedad, así como también enfocar esfuerzos al incremento de su funcionalidad, y no solo de la concentración de HDL-c.

## 9. CONCLUSIONES

---

El presente trabajo de tesis muestra la asociación de la variante genética rs9282541 del gen *ABCA1* y el riesgo de DT2, a través de la disminución de las concentraciones plasmáticas de HDL-c. Estos resultados indican que las variantes funcionales de *ABCA1* podrían actuar como factores de riesgo heredables para el desarrollo de DT2 en mexicanos, por medio de la influencia de *ABCA1* sobre los niveles de HDL-c. De suma relevancia es la confrontación de los resultados anteriores con la primera hipótesis planteada en esta tesis, ya que nuestra premisa fue que tanto la variante genética de la región promotora (rs2422493) como de la región codificante (rs9282541) del gen *ABCA1* se asociaban con hipoalfalipoproteinemia y DT2. Sin embargo solo encontramos tales asociaciones del SNP rs9282541, de forma directa con hipoalfalipoproteinemia y de forma indirecta con DT2, a través de los valores plasmáticos de HDL-c. En cambio, no hubo tales asociaciones con el SNP rs2422493.

Por otra parte, también analizamos el efecto de las HDL y sus subfracciones sobre la secreción de insulina, encontrando que es probable que las subclases de HDL más pequeñas tengan una mayor capacidad de promover la secreción de insulina, en comparación con las partículas más grandes, y que estas partículas de HDL posiblemente afecten el flujo de salida de colesterol, la secreción de insulina y la homeostasis de la glucosa. Al contrastar la segunda hipótesis de esta tesis con los resultados obtenidos, observamos que efectivamente las HDL totales y sus subfracciones sí incrementaron tanto el flujo de salida de colesterol, como la secreción de insulina, en la línea celular  $\beta$  estudiada.

Por lo anterior, es de suma importancia dilucidar completamente las funciones de las moléculas de HDL en individuos sanos, así como en pacientes con diferentes patologías. Se requieren estudios farmacológicos y no farmacológicos adicionales con el objetivo no solo de aumentar los niveles plasmáticos de HDL-c sino también de mejorar la funcionalidad de las partículas de HDL.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

---

1. von Eckardstein A, Kardassis D. High Density Lipoproteins From Biological Understanding to Clinical Exploitation. Springer International Publishing. Series Volume 224. 2015.
2. Aguilar-Salinas CA, Gómez-Pérez FJ, Rull J, Villalpando S, Barquera S et al. Prevalence of dyslipidemias in the Mexican National Health and Nutrition Survey 2006. *Salud Publica Mex* 52(Suppl 1) 2010:S44–53.
3. Pedroza-Tobias A, Trejo-Valdivia B, Sanchez-Romero LM, Barquera S. Classification of metabolic syndrome according to lipid alterations: analysis from the Mexican National Health and Nutrition Survey 2006. *BMC Public Health* 2014;14:1056.
4. Hu FB, Manson JE, Stampfer MJ, Colditz G, Liu S, et al. Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women. *N Engl J Med* 2001;345:790-7.
5. Mahmood SS, Levy D, Vasan RS, Wang TJ. The Framingham Heart Study and the epidemiology of cardiovascular disease: a historical perspective. *Lancet* 2014;383:999-1008.
6. Scott RA, Lagou V, Welch RP, Wheeler E, Montasser ME, et al. Large-scale association analyses identify new loci influencing glycemic traits and provide insight into the underlying biological pathways. *Nat Genet* 2012;44:991-1005.
7. Scott RA, Scott LJ, Mägi R, Marullo L, Gaulton KJ, et al. DIAbetes Genetics Replication And Meta-analysis (DIAGRAM) Consortium. An expanded genome-wide association study of type 2 diabetes in Europeans. *Diabetes* 2017;66:2888-2902.
8. Weissglas-Volkov D, Aguilar-Salinas CA, Nikkola E, Deere KA, Cruz-Bautista I, et al. Genomic study in Mexicans identifies a new locus for triglycerides and refines European lipid loci. *J Med Genet* 2013;50:298-308.
9. Ko A, Cantor RM, Weissglas-Volkov D, Nikkola E, Reddy PM, et al. Amerindian-specific regions under positive selection harbour new lipid variants in Latinos. *Nat Commun* 2014;5:3983.
10. Flores-Dorantes T, Arellano-Campos O, Posadas-Sánchez R, Villarreal-Molina T, Medina-Urrutia A, et al. Association of R230C ABCA1 gene variant with low HDL-C levels and abnormal HDL subclass distribution in Mexican school-aged children. *Clin Chim Acta* 2010;411:1214-7.
11. Aguilar-Salinas CA, Canizales-Quinteros S, Rojas-Martínez R, Mehta R, Rodríguez-Guillén R, et al. The non-synonymous Arg230Cys variant (R230C) of the ATP-binding cassette transporter A1 is associated with low HDL cholesterol concentrations in Mexican adults: a population based nation wide study. *Atherosclerosis* 2011;216:146-50.
12. Gamboa-Meléndez MA, Galindo-Gómez C, Juárez-Martínez L, Gómez FE, Diaz-Diaz E, et al. Novel association of the R230C variant of the ABCA1 gene with high triglyceride levels and low high-density lipoprotein cholesterol levels in Mexican school-age children with high prevalence of obesity. *Arch Med Res* 2015;46:495-501.
13. León-Mimila P, Villamil-Ramírez H, Villalobos-Comparán M, Villarreal-Molina T, Romero-Hidalgo S, et al. Contribution of common genetic variants to obesity and obesity-related traits in mexican children and adults. *PLoS One* 2013;8:e70640.
14. Villarreal-Molina MT, Flores-Dorantes MT, Arellano-Campos O, Villalobos-Comparan M, Rodríguez-Cruz M, et al. Association of the ATP-binding cassette transporter A1 R230C variant with early-onset type 2 diabetes in a Mexican population. *Diabetes* 2008;57:509-13.

15. Villarreal-Molina MT, Aguilar-Salinas CA, Rodríguez-Cruz M, Riaño D, Villalobos-Comparan M, et al. The ATP-binding cassette transporter A1 R230C variant affects HDL cholesterol levels and BMI in the Mexican population: association with obesity and obesity-related comorbidities. *Diabetes* 2007;56:1881-7.
16. Acuña-Alonzo V, Flores-Dorantes T, Kruit JK, Villarreal-Molina T, Arellano-Campos O, et al. A functional ABCA1 gene variant is associated with low HDL-cholesterol levels and shows evidence of positive selection in Native Americans. *Hum Mol Genet* 2010;19:2877-85.
17. Babashamsi MM, Halalkhor S, Moradi Firouzjah H, Parsian H, Jalali SF, Babashamsi M. Association of ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1)-565 C/T Gene Polymorphism with Hypoalphalipoproteinemia and Serum Lipids, IL-6 and CRP Levels. *Avicenna J Med Biotechnol* 2017;9:38-43.
18. Nagao K, Tomioka M, Ueda K. Function and regulation of ABCA1--membrane meso-domain organization and reorganization. *FEBS J* 2011;278:3190-203.
19. Li G, Gu HM, Zhang DW. ATP-binding cassette transporters and cholesterol translocation. *IUBMB Life* 2013;65:505-12.
20. Lawn RM, Wade DP, Couse TL, Wilcox JN. Localization of human ATP-binding cassette transporter 1 (ABC1) in normal and atherosclerotic tissues. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:378-85.
21. Kielar D, Dietmaier W, Langmann T, Aslanidis C, Probst M, et al. Rapid quantification of human ABCA1 mRNA in various cell types and tissues by real-time reverse transcription-PCR. *Clin Chem* 2001;47:2089-97.
22. Brunham LR, Kruit JK, Pape TD, Timmins JM, Reuwer AQ, et al. Beta-cell ABCA1 influences insulin secretion, glucose homeostasis and response to thiazolidinedione treatment. *Nat Med* 2007;13:340-7.
23. Schmidt MI, Duncan BB, Bang H, Pankow JS, Ballantyne CM, et al. Identifying individuals at high risk for diabetes: The atherosclerosis risk in communities study. *Diabetes Care* 2005;28:2013-8.
24. Wilson PW, Meigs JB, Sullivan L, Fox CS, Nathan DM, et al. Prediction of incident diabetes mellitus in middle-aged adults: the Framingham Offspring Study. *Arch Intern Med* 2007;167:1068-74.
25. Abbasi A, Corpeleijn E, Gansevoort RT, Gans RO, Hillege HL, et al. Role of HDL cholesterol and estimates of HDL particle composition in future development of type 2 diabetes in the general population: the PREVEND study. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:E1352-9.
26. Fryirs MA, Barter PJ, Appavoo M, Tuch BE, Tabet F, et al. Effects of high-density lipoproteins on pancreatic beta-cell insulin secretion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30:1642-1648.
27. Rye KA, Barter PJ, Cochran BJ. Apolipoprotein A-I interactions with insulin secretion and production. *Curr Opin Lipidol* 2016;27:8-13.
28. Janikiewicz J, Hanzelka K, Kozinski K, Kolczynska K, Dobrzyn A. Islet  $\beta$ -cell failure in type 2 diabetes--Within the network of toxic lipids. *Biochem Biophys Res Commun* 2015;460:491-6.
29. Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Poitout V. Beta-cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes* 2004;53 Suppl 1:S119-24.
30. Briaud I, Kelpe CL, Johnson LM, Tran PO, Poitout V. Differential effects of hyperlipidemia on insulin secretion in islets of langerhans from hyperglycemic versus normoglycemic rats. *Diabetes* 2002;51:662-8.
31. Brunham LR, Kruit JK, Verchere CB, Hayden MR. Cholesterol in islet dysfunction and type 2 diabetes. *J Clin Invest* 2008;118:403-8.
32. Salaün C, James DJ, Chamberlain LH. Lipid rafts and the regulation of exocytosis *Traffic* 2004;5:255-64.

33. Wang Y, Thiele C, Huttner WB. Cholesterol is required for the formation of regulated and constitutive secretory vesicles from the trans-Golgi network. *Traffic* 2000;1:952-62.
34. Kruit JK, Kremer PH, Dai L, Tang R, Ruddle P, de Haan W, Brunham LR, Verchere CB, Hayden MR. Cholesterol efflux via ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) and cholesterol uptake via the LDL receptor influences cholesterol-induced impairment of beta cell function in mice. *Diabetologia* 2010;53:1110-9.
35. Hao M, Head WS, Gunawardana SC, Hasty AH, Piston DW. Direct effect of cholesterol on insulin secretion: a novel mechanism for pancreatic beta-cell dysfunction. *Diabetes* 2007;56:2328-38.
36. Lu X, Liu J, Cao X, Hou X, Wang X, Zhao C, Wang Y, Li Y, Seo H, Gao B. Native low density lipoprotein induces pancreatic  $\beta$  cell apoptosis through generating excess reactive oxygen species. *Lipids Health Dis* 2011;10:123.
37. Lu X, Liu J, Hou F, Liu Z, Cao X, Seo H, Gao B. Cholesterol induces pancreatic  $\beta$  cell apoptosis through oxidative stress pathway. *Cell Stress Chaperones* 2011;16:539-48.
38. Cnop M, Hannaert JC, Gruppig AY, Pipeleers DG. Low density lipoprotein can cause death of islet beta-cells by its cellular uptake and oxidative modification. *Endocrinology* 2002;143:3449-53.
39. Bogan JS, Xu Y, Hao M. Cholesterol accumulation increases insulin granule size and impairs membrane trafficking. *Traffic* 2012;13:1466-80.
40. Kruit JK, Wijesekara N, Fox JE, Dai XQ, Brunham LR, Searle GJ, Morgan GP, Costin AJ, Tang R, Bhattacharjee A, Johnson JD, Light PE, Marsh BJ, Macdonald PE, Verchere CB, Hayden MR. Islet cholesterol accumulation due to loss of ABCA1 leads to impaired exocytosis of insulin granules. *Diabetes* 2011;60:3186-96.
41. Kruit JK, Wijesekara N, Westwell-Roper C, Vanmierlo T, de Haan W, Bhattacharjee A, Tang R, Wellington CL, Lütjohann D, Johnson JD, Brunham LR, Verchere CB, Hayden MR. Loss of both ABCA1 and ABCG1 results in increased disturbances in islet sterol homeostasis, inflammation, and impaired  $\beta$ -cell function. *Diabetes* 2012;61:659-64.
42. Wang N, Lan D, Chen W, Matsuura F, Tall AR. ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:9774-9.
43. Wang N, Ranalletta M, Matsuura F, Peng F, Tall AR. LXR-induced redistribution of ABCG1 to plasma membrane in macrophages enhances cholesterol mass efflux to HDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:1310-6.
44. Sturek JM, Castle JD, Trace AP, Page LC, Castle AM, Evans-Molina C, Parks JS, Mirmira RG, Hedrick CC. An intracellular role for ABCG1-mediated cholesterol transport in the regulated secretory pathway of mouse pancreatic beta cells. *J Clin Invest* 2010;120:2575-89.
45. Santamarina-Fojo S, Peterson K, Knapper C, Qiu Y, Freeman L, Cheng JF, Osorio J, Remaley A, Yang XP, Haudenschild C, Prades C, Chimini G, Blackmon E, Francois T, Duverger N, Rubin EM, Rosier M, Denèfle P, Fredrickson DS, Brewer HB Jr. Complete genomic sequence of the human ABCA1 gene: analysis of the human and mouse ATP-binding cassette A promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:7987-92.
46. Fouladseresht H, Khazae S, Javad Zibaenezhad M, Hossein Nikoo M, Khosropanah S, Doroudchi M. Association of ABCA1 Haplotypes with Coronary Artery Disease. *Lab Med*. 2020;51(2):157-168.
47. Langmann T, Porsch-Ozcürümez M, Heimerl S, et al. Identification of sterol-independent regulatory elements in the human ATP-binding cassette transporter A1 promoter: role of Sp1/3, E-box binding factors, and an oncostatin M-responsive element. *J Biol Chem*. 2002;277(17):14443-14450.

48. Qian H, Zhao X, Cao P, Lei J, Yan N, Gong X. Structure of the Human Lipid Exporter ABCA1. *Cell*. 2017;169(7):1228-1239.e10.
49. Bailey A, Mohiuddin SS. *Biochemistry, High Density Lipoprotein (HDL)*. 2019 Nov 4. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan.
50. van der Vorst EPC. High-Density lipoproteins and apolipoprotein A1. *Subcell Biochem* 2020;94:399-420.
51. Pérez-Méndez O. Lipoproteínas de alta densidad (HDL). ¿Un objetivo terapéutico en la prevención de la aterosclerosis?. *Arch Cardiol Méx* 2004; 74: 43-67.
52. Ben-Aicha S, Badimon L, Vilahur G. Advances in HDL: Much more than lipid transporters. *Int J Mol Sci* 2020; 22; 21.
53. Contreras-Duarte S, Varas P, Awad F, Busso D, Rigotti A. Papel protector de las lipoproteínas de alta densidad en sepsis: aspectos básicos e implicancias clínicas. *Revista chilena de infectología* 2014; 31: 34-43.
54. Ponce-Gutiérrez Y, Ponce-Gutiérrez A, Rodríguez-León A, Llanes-Álvarez C. Las lipoproteínas de alta densidad: protectoras vasculares contra la aterosclerosis. *CorSalud* 2013; 5: 366-378.
55. Pinchevsky Y, Butkow N, Raal FJ, Chirwa T, Rothberg A. Demographic and clinical factors associated with development of type 2 diabetes: A Review of the Literature. *Int J Gen Med* 2020;13:121-129.
56. Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract* 2010;87:4-14.
57. García-Chapa EG, Leal-Ugarte E, Peralta-Leal V, Durán-González J, Meza-Espinoza JP. genetic epidemiology of type 2 diabetes in Mexican mestizos. *Biomed Res Int* 2017;2017:3937893.
58. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016. Revisión de abril de 2020. Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/documentos/encuesta-nacional-de-salud-y-nutricion-de-medio-camino-2016>
59. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Mortalidad. Tabulados predefinidos Defunciones Generales: 14. Principales causas de mortalidad por residencia habitual, grupos de edad y sexo del fallecido. Revisión de abril de 2020. Disponible en: <https://www.inegi.org.mx/programas/mortalidad/>
60. Wajchenberg BL. beta-cell failure in diabetes and preservation by clinical treatment. *Endocr Rev* 2007;28:187-218.
61. American Diabetes Association (2011) Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 34(Suppl 1):S62–S69.
62. James PA, Oparil S, Carter BL, Cushman WC, Dennison-Himmelfarb C, Handler J, Lackland DT, LeFevre ML, MacKenzie TD, Ogedegbe O, Smith SC Jr, Svetkey LP, Taler SJ, Townsend RR, Wright JT Jr, Narva AS, Ortiz E. 2014 evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). *JAMA* 2014;311(5):507-20.
63. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499-502.
64. Weissglas-Volkov D, Aguilar-Salinas CA, Nikkola E, Deere KA, Cruz-Bautista I et al. Genomic study in Mexicans identifies a new locus for triglycerides and refines European lipid loci. *J Med Genet* 2013;50:298–308.
65. SIGMA Type 2 Diabetes Consortium, Williams AL, Jacobs SB, Moreno-Macías H, Huerta-Chagoya A, Churchhouse C. Sequence variants in SLC16A11 are a common risk factor for type 2 diabetes in Mexico. *Nature* 2014;506:97-101.
66. Vanderweele TJ, Vansteelandt S. Odds ratios for mediation analysis for a dichotomous outcome. *Am J Epidemiol* 2010;172:1339–1348.
67. Raghavan S, Porneala B, McKeown N, Fox CS, Dupuis J, et al. Metabolic factors and genetic risk mediate familial type 2 diabetes risk in the Framingham heart study. *Diabetologia* 2015;58:988-996.

68. Singh A, Babyak M, Nolan DK, Brummett BH, Jiang R, et al. Gene by stress genome-wide interaction analysis and path analysis identify EBF1 as a cardiovascular and metabolic risk gene. *European Journal of Human Genetics* 2015;23:854-862.
69. Vincent V, Thakkar H, Aggarwal S, Mridha AR, Ramakrishnan L, Singh A. ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) expression in adipose tissue and its modulation with insulin resistance in obesity. *Diabetes Metab Syndr Obes* 2019;12:275-284.
70. Muthén LK, & Muthén BO (1998-2017) Mplus User's Guide. Eighth Edition. Los Angeles, CA: Muthén & Muthén.
71. Chapman MJ, Goldstein S, Lagrange D, Laplaud PM. A density gradient ultracentrifugal procedure for the isolation of the major lipoprotein classes from human serum. *J Lipid Res* 1981;22:339-58.
72. Gomez Rosso L, Lhomme M, Meroño T, Dellepiane A, Sorroche P, Hedjazi L, Zakiev E, Sukhorukov V, Orekhov A, Gasparri J, Chapman MJ, Brites F, Kontush A. Poor glycemic control in type 2 diabetes enhances functional and compositional alterations of small, dense HDL3c. *Biochim Biophys Acta* 2017;1862:188-195.
73. Kyriakou T, Hodgkinson C, Pontefract DE, Iyengar S, Howell WM, et al. Genotypic effect of the -565C>T polymorphism in the ABCA1 gene promoter on ABCA1 expression and severity of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:418-23.
74. 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.
75. Regieli JJ, Doevendans PA, Grobbee DE, Zwinderman AH, van der Graaf Y, Kastelein JJ, Jukema JW. ABCA1 impacts athero-thrombotic risk and 10-year survival in a contemporary secondary prevention setting. *Atherosclerosis* 2011;218:457-63.
76. Mahmoodi K, Kamali K, Ghaznavi H, Soltanpour MS. The C-565T Polymorphism (rs2422493) of the ATP-binding Cassette Transporter A1 Gene contributes to the development and severity of coronary artery disease in an Iranian population. *Oman Med J* 2018;33:309-315.
77. Lutucuta S, Ballantyne CM, Elghannam H, Gotto AM Jr, Marian AJ. Novel polymorphisms in promoter region of atp binding cassette transporter gene and plasma lipids, severity, progression, and regression of coronary atherosclerosis and response to therapy. *Circ Res* 2001;88:969-73.
78. Miranda-Lora AL, Cruz M, Molina-Díaz M, Gutiérrez J, Flores-Huerta S, Klünder-Klünder M. Associations of common variants in the SLC16A11, TCF7L2, and ABCA1 genes with pediatric-onset type 2 diabetes and related glycemic traits in families: A case-control and case-parent trio study. *Pediatr Diabetes* 2017;18:824-831.
79. Campbell DD, Parra MV, Duque C, Gallego N, Franco L, Tandon A, et al. Amerind ancestry, socioeconomic status and the genetics of type 2 diabetes in a Colombian population. *PLoS One* 2012;7:e33570.
80. Haghvirdizadeh P, Ramachandran V, Etemad A, Heidari F, Ghodsian N, Bin Ismail N, Ismail P. Association of ATP-Binding Cassette Transporter A1 Gene Polymorphisms in type 2 diabetes mellitus among Malaysians. *J Diabetes Res*. 2015;2015:289846.
81. Hirano M, Nakanishi S, Kubota M, Maeda S, Yoneda M, Yamane K, Kira S, Sasaki H, Kohno N. Low high-density lipoprotein cholesterol level is a significant risk factor for development of type 2 diabetes: Data from the Hawaii-Los Angeles-Hiroshima study. *J Diabetes Investig* 2014;5:501-6.
82. Villalobos-Comparán M, Antuna-Puente B, Villarreal-Molina MT, Canizales-Quinteros S, Velázquez-Cruz R, León-Mimila P, et al. Interaction between FTO

- rs9939609 and the Native American-origin ABCA1 rs9282541 affects BMI in the admixed Mexican population. *BMC Med Genet* 2017;18:46.
83. Ashwell M, Gunn P, Gibson S. Waist-to-height ratio is a better screening tool than waist circumference and BMI for adult cardiometabolic risk factors: systematic review and meta-analysis. *Obes Rev* 2012;13:275-86.
  84. Myung J, Jung KY, Kim TH, Han E. Assessment of the validity of multiple obesity indices compared with obesity-related co-morbidities. *Public Health Nutr* 2019;18:1-9.
  85. Rangel-Baltazar E, Cuevas-Nasu L, Shamah-Levy T, Rodríguez-Ramírez S, Méndez-Gómez-Humarán I, Rivera JA. Association between high waist-to-height ratio and cardiovascular risk among adults sampled by the 2016 half-way National Health and Nutrition Survey in Mexico (ENSANUT MC 2016). *Nutrients* 2019;11(6). pii: E1402.
  86. Sviridov D, Nestel PJ. Genetic factors affecting HDL levels, structure, metabolism and function. *Curr Opin Lipidol.* 2007;18(2):157-163.
  87. Drew BG, Duffy SJ, Formosa MF, Natoli AK, Henstridge DC, Penfold SA, et al. High-density lipoprotein modulates glucose metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 2009;119:2103-11.
  88. Straub SG, Sharp GW. Glucose-stimulated signaling pathways in biphasic insulin secretion. *Diabetes Metab Res Rev* 2002;18:451-63.
  89. Kontush A, Chantepie S, Chapman MJ. Small, dense HDL particles exert potent protection of atherogenic LDL against oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1881-8.
  90. Arora S, Patra SK, Saini R. HDL-A molecule with a multi-faceted role in coronary artery disease. *Clin Chim Acta* 2016;452:66-81.
  91. Feng M, Darabi M, Tubeuf E, Canicio A, Lhomme M, Frisdal E, Lanfranchi-Lebreton S, Matheron L, Rached F, Ponnaiah M, Serrano CV Jr, Santos RD, Brites F, Bolbach G, Gautier E, Huby T, Carrie A, Bruckert E, Guerin M, Couvert P, Giral P, Lesnik P, Le Goff W, Guillas I, Kontush A. Free cholesterol transfer to high-density lipoprotein (HDL) upon triglyceride lipolysis underlies the U-shape relationship between HDL-cholesterol and cardiovascular disease. *Eur J Prev Cardiol* 2019;2047487319894114.
  92. Rached F, Lhomme M, Camont L, Gomes F, Dauteuille C, Robillard P, Santos RD, Lesnik P, Serrano CV Jr, Chapman MJ, Kontush A. Defective functionality of small, dense HDL3 subpopulations in ST segment elevation myocardial infarction: Relevance of enrichment in lysophosphatidylcholine, phosphatidic acid and serum amyloid A. *Biochim Biophys Acta* 2015;1851:1254-61.
  93. Bonnefont-Rousselot D, Benouda L, Bittar R, Darabi-Amin M, Demondion P, Lesnik P, Leprince P, Kontush A, Charniot JC, Giral P. Antiatherogenic properties of high-density lipoproteins from arterial plasma are attenuated as compared to their counterparts of venous origin. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2020;30:33-39.
  94. Cochran BJ, Bissoendial RJ, Hou L, Glaros EN, Rossy J, Thomas SR, Barter PJ, Rye KA. Apolipoprotein A-I increases insulin secretion and production from pancreatic  $\beta$ -cells via a G-protein-cAMP-PKA-FoxO1-dependent mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014;34:2261-7.
  95. Muñoz-Hernandez L, Ortiz-Bautista RJ, Brito-Córdova G, Lozano-Arvizu F, Saucedo S, Pérez-Méndez O, Zentella-Dehesa A, Dauteuille C, Lhomme M, Lesnik P, Chapman MJ, Kontush A, Aguilar Salinas CA. Cholesterol efflux capacity of large, small and total HDL particles is unaltered by atorvastatin in patients with type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 2018;277:72-79.
  96. Du XM, Kim MJ, Hou L, Le Goff W, Chapman MJ, Van Eck M, Curtiss LK, Burnett JR, Cartland SP, Quinn CM, Kockx M, Kontush A, Rye KA, Kritharides L, Jessup W. HDL particle size is a critical determinant of ABCA1-mediated macrophage cellular cholesterol export. *Circ Res* 2015;116:1133-42.

97. Poteryaeva ON, Usynin IF. [Antidiabetic role of high density lipoproteins]. *Biomed Khim* 2018;64:463-471.
98. Hwang YC, Hayashi T, Fujimoto WY, Kahn SE, Leonetti DL, McNeely MJ, Boyko EJ. Differential Association between hdl subclasses and the development of type 2 diabetes in a prospective study of Japanese Americans. *Diabetes Care* 2015;38:2100-5.
99. Nobécourt E, Jacqueminet S, Hansel B, Chantepie S, Grimaldi A, Chapman MJ, Kontush A. Defective antioxidative activity of small dense HDL3 particles in type 2 diabetes: relationship to elevated oxidative stress and hyperglycaemia. *Diabetologia* 2005;48:529-38.
100. Hussain SS, Harris MT, Kreutzberger AJB, Inouye CM, Doyle CA, Castle AM, Arvan P, Castle JD. Control of insulin granule formation and function by the ABC transporters ABCG1 and ABCA1 and by oxysterol binding protein OSBP. *Mol Biol Cell* 2018;29:1238-1257.
101. Tsuchiya M, Hosaka M, Moriguchi T, Zhang S, Suda M, Yokota-Hashimoto H, Shinozuka K, Takeuchi T. Cholesterol biosynthesis pathway intermediates and inhibitors regulate glucose-stimulated insulin secretion and secretory granule formation in pancreatic beta-cells. *Endocrinology* 2010;151:4705-16.
102. von Eckardstein A, Widmann C. High-density lipoprotein, beta cells, and diabetes. *Cardiovasc Res* 2014;103:384-94.
103. Rütli S, Ehres JA, Sibler RA, Prazak R, Rohrer L, Georgopoulos S, Meier DT, Niclauss N, Berney T, Donath MY, von Eckardstein A. Low- and high-density lipoproteins modulate function, apoptosis, and proliferation of primary human and murine pancreatic beta-cells. *Endocrinology* 2009;150:4521-30.
104. Koseki M, Matsuyama A, Nakatani K, Inagaki M, Nakaoka H, Kawase R, Yuasa-Kawase M, Tsubakio-Yamamoto K, Masuda D, Sandoval JC, Ohama T, Nakagawa-Toyama Y, Matsuura F, Nishida M, Ishigami M, Hirano K, Sakane N, Kumon Y, Suehiro T, Nakamura T, Shimomura I, Yamashita S. Impaired insulin secretion in four Tangier disease patients with ABCA1 mutations. *J Atheroscler Thromb.* 2009;16(3):292-6.
105. Wijesekara N, Kaur A, Westwell-Roper C, Nackiewicz D, Soukhatcheva G, Hayden MR, Verchere CB. ABCA1 deficiency and cellular cholesterol accumulation increases islet amyloidogenesis in mice. *Diabetologia.* 2016;59(6):1242-6.
106. Li N, Fu J, Koonen DP, Kuivenhoven JA, Snieder H, Hofker MH. Are hypertriglyceridemia and low HDL causal factors in the development of insulin resistance? *Atherosclerosis.* 2014;233(1):130-8.
107. Asztalos BF, Tani M, Schaefer EJ. Metabolic and functional relevance of HDL subspecies. *Curr Opin Lipidol.* 2011;22(3):176-85.
108. Tosheska Trajkovska K, Topuzovska S. High-density lipoprotein metabolism and reverse cholesterol transport: strategies for raising HDL cholesterol. *Anatol J Cardiol.* 2017;18(2):149-154.
109. REVEAL Collaborative Group, Bowman L, Chen F, et al. Randomized Evaluation of the Effects of Anacetrapib through Lipid-modification (REVEAL)-A large-scale, randomized, placebo-controlled trial of the clinical effects of anacetrapib among people with established vascular disease: Trial design, recruitment, and baseline characteristics. *Am Heart J.* 2017;187:182-190.

## 11. APÉNDICE

---

**11.1. Anexo A: Producto de publicación de la tesis de postgrado, en revista de circulación internacional.**



# R230C but not – 565C/T variant of the *ABCA1* gene is associated with type 2 diabetes in Mexicans through an effect on lowering HDL-cholesterol levels

A. Ochoa-Guzmán<sup>1</sup> · H. Moreno-Macías<sup>2</sup> · D. Guillén-Quintero<sup>1</sup> · O. Chávez-Talavera<sup>3</sup> · M. L. Ordoñez-Sánchez<sup>1</sup> · Y. Segura-Kato<sup>1</sup> · V. Ortiz<sup>4</sup> · E. Díaz-Díaz<sup>5</sup> · L. Muñoz-Hernández<sup>6</sup> · A. García<sup>7</sup> · O. Pérez-Méndez<sup>8</sup> · A. Zentella-Dehesa<sup>7,9</sup> · C. A. Aguilar-Salinas<sup>6</sup> · M. T. Tusié-Luna<sup>1,9</sup> 

Received: 10 August 2019 / Accepted: 22 January 2020  
© Italian Society of Endocrinology (SIE) 2020

## Abstract

**Purpose** Type 2 diabetes (T2D) and low serum concentration of high-density lipoprotein cholesterol (HDL-c) are common coexisting metabolic disorders. *ABCA1* variants have been shown to be associated to these conditions. We sought to test the combined effect of two *ABCA1* gene common variants, rs2422493 (– 565C > T) and rs9282541 (R230C) on HDL-c levels and T2D risk.

**Methods** Path analysis was conducted in 3,303 Mexican-mestizos to assess the specific contributions of rs2422493 and rs9282541 *ABCA1* variants, insulin resistance, waist-to-height ratio (WHtR), and age on HDL-c levels and T2D risk. Participants were classified into four groups according to their *ABCA1* variants carrier status: (i) the reference group carried wild type alleles for both *ABCA1* variants (–/–), (ii) +/- were carriers of rs2422493 but non-carriers of rs9282541, (iii) –/+ for carriers of rs9282541 but not carriers of rs2422493 and (iv) carriers of minor alleles for both SNPs (+/+). Principal components from two previous genome-wide association studies were used to control for ethnicity.

**Results** We identified significant indirect effects on T2D risk mediated by HDL-c in groups –/+ and +/+ ( $\beta=0.04$ ;  $p=0.03$  and  $\beta=0.06$ ;  $p<0.01$ , respectively) in comparison to the –/– reference group. Low concentrations of HDL-c were directly and significantly associated with increased T2D risk ( $\beta=-0.70$ ;  $p<0.01$ ). WHtR, male gender, age, and insulin resistance were also associated with T2D risk ( $p<0.05$ ). There was no significant direct effect for any of the *ABCA1* groups on T2D risk:  $p=0.99$ ,  $p=0.58$ , and  $p=0.91$  for groups +/-, –/+, and +/+ respectively.

**Conclusions** The *ABCA1* rs9282541 (R230C) allele is associated with T2D in Mexicans through its effect on lowering HDL-c levels. This is the first report demonstrating that HDL-c levels act as an intermediate factor between an *ABCA1* variant and T2D.

**Keywords** *ABCA1* · HDL · HDL-c · Hypoalphalipoproteinemia · Type 2 diabetes · rs2422493 · rs9282541

## Introduction

Type 2 diabetes (T2D) and low serum concentration of high-density lipoprotein cholesterol (HDL-c, i.e., hypoalphalipoproteinemia) are very prevalent metabolic conditions

associated with high morbidity and mortality in the Mexican population [1, 2]. Both disorders are strongly influenced by lifestyle [3, 4] and genetic factors [5, 6]. Of particular interest is the recognition of genetic variants derived from Amerindian ancestry that have a large effect on various metabolic traits, including dyslipidemias such as hypertriglyceridemia [7, 8], hypoalphalipoproteinemia (HA) [9–11], obesity [12], and T2D [13]. Among such variants, the *ABCA1* polymorphism rs9282541 (R230C), which is almost exclusively present in Amerindian and Amerindian-derived populations, has been associated with low HDL-c levels [9, 10, 14, 15], T2D [13] and obesity [15]. On the other hand, the C to T polymorphism at position – 565 (rs2422493) in the *ABCA1*

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s40618-020-01187-8>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ M. T. Tusié-Luna  
mttusie@gmail.com

Extended author information available on the last page of the article

gene promoter results in decreased transactivation activity of a reporter gene in vitro and presumably lowers the expression of *ABCA1* in vivo [16]. In addition, cell lines expressing the *ABCA1* C230 allele (rs9282541) exhibit a cholesterol efflux that is 27% lower than what is observed in cells expressing the wild-type R230 allele [14]. These two *ABCA1* polymorphisms are frequent in Mexicans; rs2422493 and rs9282541 having minor allele frequencies of 0.5 and 0.11 [10], respectively.

The ATP-binding cassette transporter A1 (*ABCA1*) participates in the initial synthesis of HDL molecules mainly in the liver through binding to the lipid-free apolipoprotein A1 [17–19], but it also transfers cholesterol from peripheral cells to lipid-poor apoA1 [20, 21]. In animal models, it has been shown that impaired *ABCA1* function leads to  $\beta$ -cell dysfunction through decreasing cholesterol efflux [22] and contributing to decreased insulin secretion. Epidemiological evidence suggests that low HDL-c levels [23–25], as well as low HDL-c/apoA1 and HDL-c/apoAII ratios are independent risk factors for incident T2D (25). Moreover, it has been previously recognized that HDL and apoA1 molecules promote insulin synthesis and insulin secretion in pancreatic  $\beta$ -cells [26], MIN-6 cells, and rat islet cells [27].

The objective of this study was to elucidate the combined effect of two common *ABCA1* variants on HDL-c levels and T2D risk. Therefore, through a path analysis we tested the direct and indirect effects of two common *ABCA1* gene variants, rs2422493 and rs9282541, on HDL-c levels and T2D risk in a cohort of 3,303 Mexicans.

## Patients and methods

### Study group

Mexican-mestizo individuals (with parents and grandparents born in Mexico) who were 18 years and older and who had participated in at least one of two previous GWAS for triglycerides (GWAS-TG) [7] or T2D (GWAS-T2D) [28] were included. Briefly, most of the participants were recruited at the outpatient diabetes clinic of the Department of Endocrinology and Metabolism of the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) in Mexico City. In addition, a cohort of normoglycemic government employees aged 45 years or older constituted the control group. The resulting study cohort consisted of 914 T2D cases and 2,389 control individuals. T2D was diagnosed based on American Diabetes Association criteria [29]. The Committee of Ethics and the Institutional Review Board of the INCMNSZ on human subjects research approved the study protocol. This study conforms to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki [30]. All individuals provided written informed consent.

## Clinical and laboratory analyses

BMI was calculated as weight (in kg) divided by height (in m<sup>2</sup>), and waist-to-height ratio (WHtR) was assessed dividing waist size by height, both measured in cm. We included the WHtR because it is a better index than BMI and waist circumference (WC) for detecting cardio-metabolic risk factors linked to central obesity [31, 32]. Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance (HOMA-IR) was calculated according to the formula: fasting insulin (microU/L)\*fasting glucose (nmol/L)/22.5. Trained personnel measured the weight, height, and waist circumference of all participants. The diagnosis of HA was considered when women had HDL-c < 1.3 mmol/L, and men < 1.04 mmol/L. For biochemical analyses, blood samples were obtained after a 9- to 12-h fast. Blood glucose concentration was measured by using the glucose oxidase method, and total cholesterol, HDL-c, and triglycerides concentrations were measured using a Synchron Autoanalyzer (Beckman Co). LDL-c was estimated from total cholesterol as described by Friedewald et al. [33]. Genomic DNA was extracted from total blood samples using a QIAamp 96 DNA Blood kit, Qiagen. Both *ABCA1* rs2422493 and rs9282541 variants were genotyped using Taqman probes. In addition, since all individuals had participated in at least one GWAS, the respective principal components (PCs) were available for estimating ethnicity.

## Statistical analysis

Participants were grouped according to their carrier status on *ABCA1* variants in such way that four groups were formed. The reference group consisted of individuals having wild type alleles for both *ABCA1* variants (herein denoted as  $-/-$ ). The “+” sign is being used for carriers of either one or two of the risk alleles as follows: The  $+/-$  group corresponds to individuals are either heterozygous or homozygous for the rs2422493 variant but non-carriers of rs92822541. Group  $-/+$  includes individuals carrying rs92822541 in heterozygous or homozygous state, but without risk alleles for rs2422493 variant; and finally, the  $+/+$  group refers to individuals carrying both rs2422493 and rs9282541 variants in either heterozygous or homozygous state.

Demographic and clinical characteristics were described and compared between groups. Differences were assessed using Mann–Whitney *U* test (for non-parametric quantitative distributions in two groups) or Kruskal–Wallis (for non-parametric quantitative variables distributed in more than two groups) and chi-squared test (for differences between proportions). Finally,

Dunn–Bonferroni post hoc method was used to correct for multiple comparison testing. Genotype frequencies of both variants were evaluated. Hardy–Weinberg equilibrium was determined in healthy controls using chi-squared tests. Linkage disequilibrium (LD) was assessed using  $r^2$  statistic.

Because PCs from previous GWAS (GWAS-TG [7] and GWAS-T2D [28]) were available and the Native-American ancestry percentage of 484 individuals was also known (previously obtained by global ancestry calculation), the correlation between the first PC of GWAS-T2D and the percent of Native American ethnicity was computed. The correlation between the first PC of GWAS-TG and the first PC of GWAS-T2D was calculated and determined to be highly correlated. Thus, through a simple linear regression model, the values of the PC from GWAS-T2D were imputed for those who only had PC from GWAS-TG. As a result, a single index of ethnicity was obtained and used for adjusting for population stratification.

To assess the direct and indirect effects between *ABCA1* variants and HDL-c and T2D, path analysis was used. Because the mediating variable was not sampled under the case–control design, we performed the prevalence-weighted approach suggested by VanderWeele and Vansteelandt [34] aiming to avoid potential bias estimation. Path analysis is a multivariate statistical method consisting of simultaneous regression equations where continuous or categorical outcomes may be included. This method has been applied in the Framingham study to assess the role of genetic variants on metabolic diseases [35, 36]. Gender, age, ethnicity, and the *ABCA1* groups were the independent variables. HDL-c, WHtR, HOMA-IR and T2D were the dependent variables. A theoretical path model was specified based on prior findings of *ABCA1* variant R230C associated to T2D [13]; and of previously reported association between the C230 allele of the rs9282541 with BMI [14, 15], and insulin resistance with low expression of *ABCA1* in visceral adipose tissue in humans [37]. Because T2D is a dichotomous endogenous variable, Theta parameterization was used and bias corrected standard errors were obtained through the Bootstrap approach. To increase parsimony, non-significant paths were removed. In all cases, and regardless of the  $p$  value, the assessment of the genetic effects on T2D, HDL-c, WHtR and HOMA-IR were always adjusted for ethnicity. Furthermore, the direct effects were always taken into account for assessing indirect effects. Goodness-of-fit of the final model was assessed using indices such as the standardized summary of the average covariance residuals [root mean square error of approximation (RMSEA)], Comparative fit index (CFI) and Tucker-Lewis index (TLI). We used Mplus v.8.3 software [38].

## Results

Genotype frequencies for both SNPs were in Hardy–Weinberg equilibrium ( $p > 0.05$ ). Genotype frequencies of the  $-565C > T$  (rs2422493) SNP in all study subjects were as follows: CC 0.268 (886/3303), CT 0.495 (1636/3303) and TT 0.237 (781/3303). Allele frequencies were 0.52 for the C-allele and 0.48 for the T-allele. Regarding the genotype frequencies of the R230C (rs9282541) variant were CC 0.797 (2632/3303), CT 0.19 (627/3303), and TT 0.013 (44/3303). Allele frequencies were 0.88 for the C-allele and 0.12 for the T-allele. Both variants were in Hardy–Weinberg equilibrium ( $p = 0.66$  and  $p = 0.41$ , respectively). Importantly, these two *ABCA1* variants (rs2422493 and rs9282541) are inherited as independent linkage disequilibrium blocks  $r^2 = -0.1$ .

The description of the main anthropometric and biochemical measurements across the four *ABCA1* groups are shown in Table 1. Largely, gender and age showed significant differences among groups ( $p = 0.04$  and  $p = 0.05$  respectively). The group  $-/+$  had a predominance of males, while individuals in the group  $-/-$  were older than group  $+/+$ . Moreover, HA was significantly higher between  $+/+$  vs.  $+/-$  and  $-/-$  (71.2% vs. 58.5%,  $p < 0.001$ , in both cases); thus, carriers of rs9282541 variant have a higher HA frequency than non-carriers.

When we compared anthropometric and biochemical characteristics according to the number of rs2422493 risk alleles (0, 1 or 2 risk alleles), we did not find any clinical or laboratory differences (data not shown). In contrast, for the three genotype combinations of rs9282541 (CC, CT and TT) we observed that, according to the nominal  $p$  value, HDL-c plasma levels were higher among subjects with the CC genotype compared to those with the CT ( $p < 0.001$ ) or TT genotype ( $p < 0.001$ ); interestingly, concentrations of HDL-c were slightly lower in individuals with two risk alleles (TT) in comparison to those carrying only one T allele ( $p = 0.037$ ). Also, CT carriers were younger than CC ( $p = 0.002$ ) or TT carriers ( $p = 0.017$ ) (Supplementary table).

## Population stratification correction

We built a single ethnicity index based on our findings of a correlation of 0.83 between the first PC of GWAS-T2D and the GWAS-TG, and of 0.91 between the first PC of GWAS-T2D and percent of Native-American ethnicity was 0.91. Thus, the use of the first PC of GWAS-T2D would adequately discriminate between American and European ethnicity. We included this index in our analyses to control for potential confounding due population stratification.

**Table 1** Clinical and biochemical parameters of the study participants by *ABCA1* genotypes

Characteristics	-/- (667)	+/- (1965)	-/+ (219)	+/+ (452)	<i>p</i> value
Male gender, <i>n</i> (%)	274 (41.1)	823 (41.9)	113 (51.6)	186 (41.2)	0.036
Age, median (IQR), years	49 (42–58)	49 (42–57)	48 (40–55)	48 (40–54)	0.047 <sup>a</sup>
WHtR, median (IQR), cm	0.59 (0.55–0.64)	0.58 (0.54–0.64)	0.58 (0.54–0.63)	0.59 (0.55–0.64)	0.059
WC, median (IQR), cm	95 (87–103)	94 (87–102)	94 (87–100)	95 (88–103)	0.124
BMI, median (IQR), kg/m <sup>2</sup>	28 (26–31)	28 (25–31)	28 (26–31)	29 (25–32)	0.485
HDL-c, median (IQR), mmol/L	1.11 (0.93–1.29)	1.09 (0.93–1.32)	1.06 (0.88–1.22)	1.01 (0.85–1.22)	<0.001 <sup>b,c,d,e</sup>
LDL-c, median (IQR), mmol/L	3.21 (2.63–3.75)	3.16 (2.61–3.78)	3.03 (2.50–3.57)	3.08 (2.58–3.70)	0.082
Triglycerides, median (IQR), mmol/L	2.33 (1.41–3.37)	2.18 (1.32–3.19)	2.10 (1.25–3.12)	2.08 (1.27–2.98)	0.120
Fasting glucose, median (IQR), mmol/L	5.05 (4.61–6.10)	5.05 (4.55–6.09)	5.11 (4.72–6.83)	5.05 (4.55–6.53)	0.331
SBP, median (IQR), mmHg	120 (110–132)	120 (110–130)	120 (110–133)	120 (110–130)	0.269
DBP, median (IQR), mmHg	80 (70–90)	80 (70–85)	80 (70–90)	80 (70–85)	0.114
Hypertension status, <i>n</i> (%) <sup>f</sup>	129 (23.7)	439 (26.6)	53 (29.4)	96 (25.3)	0.395
T2D status, <i>n</i> (%)	189 (28.3)	532 (27.1)	62 (28.3)	131 (29.0)	0.818
Hypopalipoproteinemia, <i>n</i> (%)	390 (58.5)	1149 (58.5)	138 (63)	322 (71.2)	<0.001

The four studied groups are the wild type genotype (denoted as -/-) in the two variants and the other groups included carriers on either one variant (denoted as +/- for carriers of rs2422493 but non-carriers of rs9282541 and -/+ in the reverse case) or in both (denoted as +/+)

*IQR* interquartile range, *WHtR* waist-to-height ratio, *WC* waist circumference, *BMI* body mass index, *HDL-c* high-density lipoprotein cholesterol, *LDL-c* low-density lipoprotein cholesterol, *SBP* systolic blood pressure, *DBP* diastolic blood pressure, *T2D* type 2 diabetes

<sup>a</sup>-/- vs. +/+, *p*=0.035

<sup>b</sup>-/- vs. -/+, *p*=0.009

<sup>c</sup>-/- vs. +/+, *p*<0.001

<sup>d</sup>-/+ vs. +/-, *p*=0.002

<sup>e</sup>+/- vs. +/+, *p*<0.001

<sup>f</sup>*n*=2756 patients

## Path analysis

The hypothesized model fitted the data well (CFI=1.0; TLI=1.0; RMSEA=0.0 90%CI (0.0, 0.04) (Fig. 1). After removing non-significant paths for improving parsimony, the fit indexes of the final model were CFI=1.0; TLI=1.0; RMSEA=0.0 90% CI [0.0,0.02] (Fig. 2).

## Type 2 diabetes

After adjusting for gender, age, HDL-c levels, WHtR, HOMA-IR, and ethnicity, we did not find any direct effect of any *ABCA1* group on T2D risk: *p*=0.99, *p*=0.58, and *p*=0.91 for groups +/-, -/+, and +/+ respectively (Table 2 and Fig. 2). Nevertheless, significant indirect effects from group -/+ and +/+ to T2D through HDL-c were found ( $\beta=0.04$ ; *p*=0.03 and  $\beta=0.06$ ; *p*<0.01, respectively). Meanwhile, the indirect effect of group +/- was not significant ( $\beta\leq 0.01$ ; *p*=0.92) meaning that people in group +/- were similarly prone to T2D as compared with the reference group. In contrast, rs9282541 carriers have a higher T2D risk through lower HDL-c concentrations than the wild-type group (Table 2 and Fig. 2). The difference between the indirect effects of -/+ and +/+ on T2D was

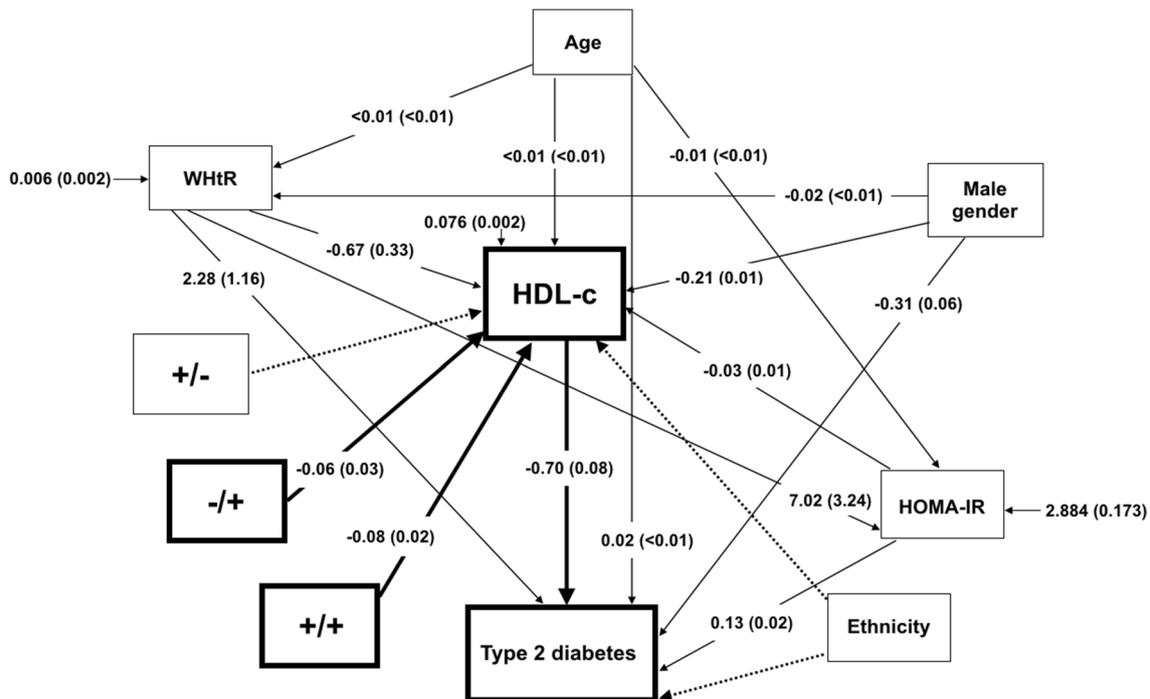
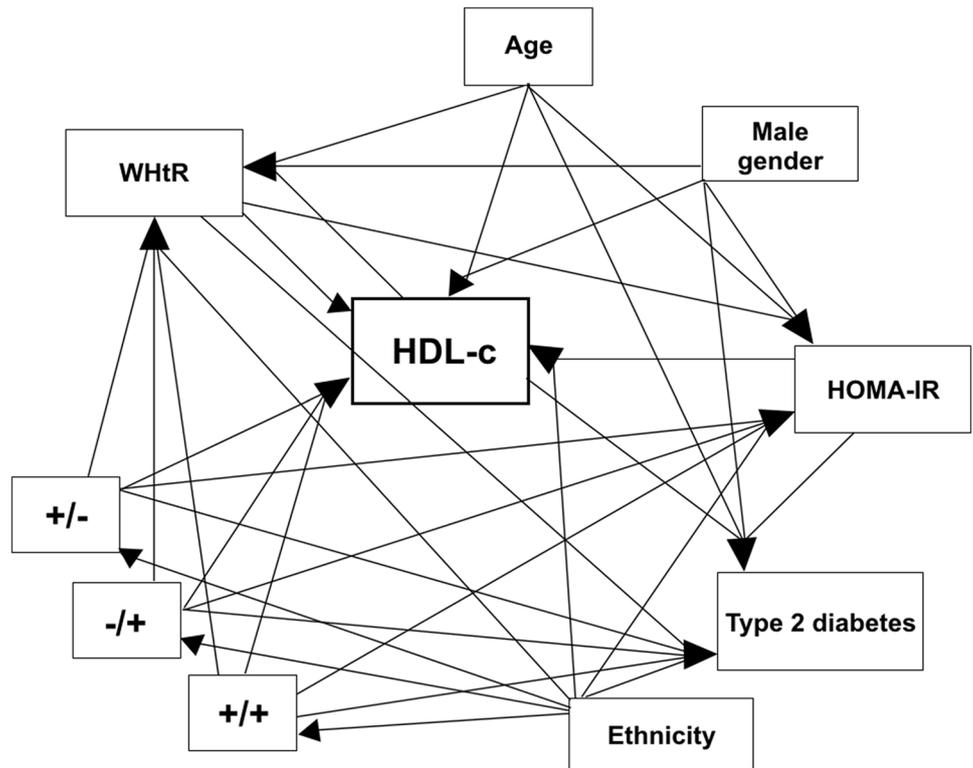
not significant (*p*=0.46). However, we found two significant indirect effects from WHtR to T2D: one of them through HDL-c ( $\beta=0.47$ ; *p*=0.02) and the other, through HOMA-IR before WHtR ( $\beta=0.20$ ; *p*<0.01) (Table 2).

As expected, HDL-c concentrations were inversely associated with T2D risk ( $\beta=-0.70$ ; *p*<0.01). In addition, male gender and age were also significantly associated (*p*<0.01). The standardized coefficients ( $\beta_{\text{stand}}$ ) suggest that HOMA-IR, age and HDL-c concentrations may have the strongest effects on T2D risk ( $\beta_{\text{stand}}=0.21, 0.20$  and  $-0.19$ , respectively) (Table 2 and Fig. 2).

## HDL-c

After adjusting for gender, age, WHtR, HOMA-IR, and ethnicity, the direct effect of -/+ and +/+ *ABCA1* groups on HDL-c concentrations were negative and significant in comparison to the reference group ( $\beta=-0.06$ ; *p*=0.03 and  $\beta=-0.08$ ; *p*<0.01, respectively) meaning that carriers of rs9282541 variant are likely to have lower levels of HDL-c than non-carriers. Insulin resistance measured with HOMA-IR was negatively associated with HDL-c ( $\beta=-0.03$ ; *p*<0.01) (Table 2 and Fig. 2). Gender, age, and anthropometry were also significantly associated to HDL-c levels

**Fig. 1** Path diagram of the hypothesized causal relationships between *ABCA1* genotypes, age, gender, HOMA-IR, WHtR, ethnicity, HDL-c and T2D. The wild type genotype for both variants (denoted as *-/-*) was taken as reference group; the other groups included carriers of one variant (denoted as *+/-* for carriers of rs2422493 but non-carriers of rs9282541), carriers of the other variant (denoted as *-/+* for non-carriers of rs2422493 but carriers of rs9282541) or carriers in both variants (denoted as *+/+*). *HDL-c* high-density lipoprotein cholesterol, *HOMA-IR* homeostatic model assessment for insulin resistance, *WHtR* waist-to-height ratio



**Fig. 2** Final path model presenting the causal relationships between *ABCA1* genotypes, age, gender, HOMA-IR, WHtR, ethnicity, HDL-c and T2D. The wild type genotype for both variants (denoted as *-/-*) was taken as reference group; the other groups included carriers of one variant (denoted as *+/-* for carriers of rs2422493 but non-carriers of rs9282541), carriers of the other variant (denoted as *-/+* for non-carriers of rs2422493 but carriers of rs9282541) or carriers

in both variants (denoted as *+/+*). Solid lines represent statistically significant effects; broken lines represent effects falling short of the conventional level of statistical significance  $p < 0.05$ . HDL-c and T2D were controlled by ethnicity. *HDL-c* high-density lipoprotein cholesterol, *HOMA-IR* homeostatic model assessment for insulin resistance, *WHtR* waist-to-height ratio

**Table 2** Results of path analysis: direct and indirect effects of *ABCA1* genotypes, age, gender, HOMA-IR, WHtR on HDL-c, and T2D

Variables		Direct effects			Indirect effects			
Dependent	Independent	Standardized beta	Unstandardized beta (SE)	<i>p</i> value	Standardized beta	Unstandardized beta (SE)	<i>p</i> value	
T2D	Male gender	-0.14	-0.31 (0.06)	<0.001				
	HDL-c	-0.19	-0.70 (0.08)	<0.001				
	HOMA-IR	0.21	0.13 (0.02)	<0.001				
	WHtR	0.15	2.28 (1.16)	0.049				
					WHtR-> HDL-c-> T2D	0.03	0.47 (0.20)	0.022
					WHtR-> HOMA-IR-> HDL-c-> T2D	0.01	0.20 (0.05)	<0.001
		Age	0.20	0.02 (<0.01)	<0.001			
		Ethnicity <sup>a</sup>	0.01	0.33 (0.61)	0.588			
		-/-		Reference <sup>b</sup>				
		+/-	<0.01	<0.01 (0.06)	0.999			
					+/- -> HDL-c-> T2D	<0.01	<0.01 (0.01)	0.916
		-/+	0.01	0.06 (0.10)	0.582			
					-/+ -> HDL-c-> T2D	0.01	0.04 (0.02)	0.033
		+/+	<0.01	-0.01 (0.08)	0.909			
				+/+ -> HDL-c-> T2D	0.02	0.06 (0.02)	<0.001	
HDL-c	Male gender	-0.33	-0.21 (0.01)	<0.001				
	HOMA-IR	-0.20	-0.03 (0.01)	<0.001				
	WHtR	-0.17	-0.67 (0.33)	0.040				
	Age	0.06	<0.01 (<0.01)	0.007				
	Ethnicity <sup>a</sup>	-0.03	-0.25 (0.14)	0.078				
		-/-		Reference <sup>b</sup>				
		+/-	<0.01	<0.01 (0.01)	0.916			
		-/+	-0.05	-0.06 (0.03)	0.030			
		+/+	-0.09	-0.08 (0.02)	<0.001			
HOMA-IR	Age	-0.07	-0.01 (<0.01)	0.031				
	WHtR	0.32	7.02 (3.24)	0.031				
		-/-		Reference <sup>b</sup>				
		+/-	-0.02	-0.07 (0.09)	0.469			
		-/+	-0.02	-0.16 (0.15)	0.264			
		+/+	0.03	0.17 (0.13)	0.210			
WHtR	Male gender	-0.11	-0.02 (<0.01)	<0.001				
	Age	0.20	<0.01 (<0.01)	<0.001				
		-/-		Reference <sup>b</sup>				
		+/-	-0.03	<0.01 (<0.01)	0.217			
		-/+	-0.02	-0.01 (0.01)	0.268			
		+/+	0.02	0.01 (0.01)	0.293			

The four studied groups are the wild type genotype (denoted as -/-) in the two variants and the other groups included carriers on either one variant (denoted as +/- for carriers of rs2422493 but non-carriers of rs9282541 and -/+ in the reverse case) or in both (denoted as +/+)

T2D type 2 diabetes, HDL-c high-density lipoprotein cholesterol, HOMA-IR homeostatic model assessment for insulin resistance, WHtR waist-to-height ratio

<sup>a</sup>Principal components from two GWAS were used to estimate ethnicity, discriminating between American and European ancestry

<sup>b</sup>Reference was taken as the wild-type alleles of both single nucleotide polymorphisms of *ABCA1* gene

( $p < 0.05$ ). According to the standardized coefficients, male gender has the strongest effect on HDL-c ( $\beta_{\text{stand}} = -0.33$ ;  $p < 0.01$ ). The negative direction indicates that in average

HDL-c concentrations were lower in men than in women. The second strongest effect found was for HOMA-IR ( $\beta_{\text{stand}} = -0.20$ ;  $p < 0.01$ ), indicating that insulin-resistant

individuals, in average, tend to have lower concentrations of HDL-c (Table 2 and Fig. 2).

We also tested indirect effects from genotype groups to HDL-c through HOMA-IR or WHtR but none of them were significant (data not shown).

### HOMA-IR

We did not find any significant genetic effect on HOMA-IR among groups ( $p=0.47$  for +/-,  $p=0.26$  for -/+ and  $p=0.21$  for +/+ groups) (Table 2). Nevertheless, age ( $\beta=-0.01$ ;  $p=0.03$ ) and WHtR ( $\beta=7.02$ ;  $p=0.03$ ) were associated to insulin resistance (Table 2 and Fig. 2).

### WHtR

Regarding WHtR, we did not find any significant genetic effect ( $p=0.22$  for +/-;  $p=0.27$  for -/+; and  $p=0.29$  for +/+) (Table 2). However, significant effects were found for male gender and age ( $\beta=-0.02$ ;  $p<0.01$  and  $\beta<0.01$ ;  $p<0.01$ , respectively) (Table 2 and Fig. 2).

## Discussion

To the best of our knowledge, this is the first study testing the combined effect of rs2422493 and rs9282541 *ABCA1* variants on HDL-c plasma levels and T2D risk. The promoter variant rs2422493 presumably causes a decreased transcriptional activity of the *ABCA1* gene in vivo, as shown through reporter gene studies in vitro. In atherosclerotic plaques, carriers of the T allele have lower *ABCA1* expression as demonstrated by Kyriakou et al. [16]. However, controversial results have been published regarding the effect of rs2422493 variant on HA. In the present study, neither HDL-c levels nor the HA frequency showed differences between carriers and non-carriers of rs2422493 variant, supporting the findings of published studies [16, 39], that included cohorts of White, Chinese, African-American and Hispanics [40]. In contrast, an Iranian study found that T carriers had a higher risk for HA, with lower HDL-c levels than the non-carriers [41]. The role of the rs2422493 SNP has been studied beyond the lipid profile, especially for cardiovascular disease. For instance, the presence of the T allele in -565C>T was associated to the development [42] and severity of atherosclerosis [43], as well as to coronary artery calcification [40].

Interestingly, we found a trend towards lower HDL-c when the four studied groups were analyzed, decreasing from the wild type genotype at both SNPs (-/-), carriers for the rs2422493 (+/-), carriers for rs9282541 (-/+) to carriers of both SNPs (+/+). Nevertheless, when we compared the

direct effects on HDL-c between -/+ and +/+ groups, we did not find a significant difference. Moreover, the indirect effects of these groups on T2D through HDL-c were not statistically different, suggesting that the effects observed on HDL-c levels and on T2D risk are mainly driven by the R230C variant. Accordingly, when we analyzed carriers vs. non-carriers of rs9282541-T separately, we found that the direct effect on T2D was not significant ( $\beta=0.004$ ;  $p=0.94$ ), but the indirect effect through HDL-c was significant ( $\beta=0.05$ ;  $p<0.001$ ), corroborating our original results. This is in line with previous findings showing that the C230 allele of *ABCA1* is associated with increased risk for low HDL-c concentrations [10, 14], and the prevalence of HA among C230 carriers is greater than in non-carriers [10].

In the present study, we did not find a significant direct effect of any of the genetic groups on T2D. Similar results have been published previously for the rs9282541 variant. Miranda-Lora et al. did not find an association of this SNP with T2D in Mexicans even after adjusting for known risk factors [44]; neither did Campbell et al. in adults from Colombia of Native-American ancestry [45], nor Haghvirdizadeh et al., among Malaysians [46]. In contrast, Villarreal-Molina et al. identified a significant association between carriers of rs9282541 and early-onset T2D ( $\leq 45$  years) in Mexican individuals, but such an association was lost in late-onset T2D group [13]. In the present study, we sought to systematically investigate the relationship between two *ABCA1* functional variants and T2D risk, as there are some conflicting results, mainly for the role of the R230C on T2D, possibly derived from the limited samples sizes used in previous studies [13], differences in the methodology to assess ethnicity, and possible influence of the functional variant -565C/T on T2D risk when present in combination with the R230C variant. Our results show for the first time, that the effect of R230C on T2D risk is indirect and through lowering HDL-c levels, a finding supported by a path analysis performed in a large cohort using robust methodology to assess and adjust for ethnicity in Mexican mestizos. Interestingly, when we assessed the direct and indirect effects of the analyzed variants according T2D age of onset we did not find any significant effect.

Importantly, we also tested indirect effects from all genetic groups to T2D through either WHtR or HOMA-IR but coefficients were not significant.

Our results suggest that the rs9282541 variant; regardless of rs2422493 genotype, increases T2D risk through lowering HDL-c levels. To the best of our knowledge, this is the first report on HDL-c concentrations as an intermediate risk factor between a functional *ABCA1* gene variant and T2D. This is in line with previous epidemiological studies that have identified HDL-c levels as a risk factor for T2D [23-25, 47]. According to our path analysis, WHtR has a direct and positive effect on T2D risk and insulin resistance (calculated

by HOMA-IR), and a negative effect on HDL-c, however neither of the studied *ABCA1* variants had any effect over WHtR. While contradictory association of the R230C variant has been reported with obesity (as determined by BMI), where some studies reported significant association [15], while other studies did not [48], in the present study we used WHtR instead of BMI, as it has been shown a better index associated with cardiovascular risk factors in different populations [31, 32], including Mexicans [49].

During the last years, in vitro, animal and clinical studies have uncovered a broad range of HDL actions contributing to the pathophysiology of T2D. Different studies suggest that lowering ABCA1 activity leads to impaired  $\beta$ -cell function [22, 50]. HDL may raise insulin secretion through an increase in cholesterol efflux, as has been proposed by Brunham et al. for the in vivo model of ABCA1 inactivation [51]. ApoAI and apoAII are considered two of the main components of the protein portion of HDL molecules which increase  $\beta$ -cell insulin secretion [27], presumably by two distinct mechanisms, the first one under high-glucose concentrations within the classical glucose-dependent metabolism pathway [27], and the second one, through a heterotrimeric G-protein-cAMP-protein kinase A-FoxO1-dependent mechanism [52] and the modulation of endoplasmic reticulum stress in  $\beta$  cells [53]. Furthermore, in a clinical trial using an infusion of reconstituted HDL (rHDL) in patients with T2D in a double-blind, placebo-controlled study, after four hours, plasma glucose levels decreased in rHDL group by two mechanisms, the first one through increasing plasma insulin levels, with higher  $\beta$ -cell function (evaluated by homeostasis model assessment beta cell function index), and the second one through the activation of AMP protein kinase in skeletal muscle [54]. Thus, the improvement of  $\beta$ -cells function through HDL can be observed in both in vitro as well as in vivo studies.

Our study identified carrier status of the rs9282541 polymorphism, male gender, insulin resistance, high WHtR, and advanced age as independent risk factors for low HDL-c plasma concentrations in Mexicans. In addition, for T2D we found HOMA-IR, age and HDL-c concentrations having the strongest effects on T2D risk, while indirect effects from WHtR to T2D were also identified, one through HDL-c and the other through HOMA-IR. However, when testing indirect effects from all *ABCA1* genetic groups for T2D through either WHtR or HOMA-IR, coefficients were not significant. Therefore, it will be of interest to test whether HDL modifies insulin secretion directly and to what extent the protein and/or lipid fraction of the HDL molecule or its subfractions influence insulin secretion and/or  $\beta$ -cell protection.

In conclusion, the present study shows the association between rs9282541 *ABCA1* gene variant and T2D risk, through lowering HDL-c concentrations. These results indicate that *ABCA1* functional variants might act as a heritable

risk factor for T2D in Mexicans, through influencing HDL-c levels, putatively affecting cholesterol efflux and glucose homeostasis.

**Acknowledgements** Ana Ochoa-Guzmán is a PhD student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and she was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) fellowship 468294. We thank Saúl Cano-Colín, José Luis Ventura-Gallegos, Maribel Rodríguez-Torres, Salvador Ramírez and Irma Mitre for technical assistance.

**Author contributions** AO-G and HM-M designed, analyzed data and wrote the manuscript. DG-Q, OC-T, MLO-S, YS-K, VO, ED-D, LM-H, AG, and OP-M recollected patient's data and/or contributed to the manuscript. AZ-D and CAA-S designed and supervised the research and edited the manuscript. MTT-L designed, supervised the research and wrote the manuscript. MTT-L is the guarantor of this work and, as such, had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

**Funding** We thank Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) for financial support (Project 128877).

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that there are not competing conflicts of interest.

**Ethical approval** All procedures performed in human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional research committee and with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments ethical standards. The study was approved by The Committee of Ethics and the Institutional Review Board of the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ).

**Informed consent** All the participants provided written informed consent before inclusion in the study. Participants did not receive any stipend for taking part in the study.

## References

1. Aguilar-Salinas CA, Gómez-Pérez FJ, Rull J, Villalpando S, Barquera S et al (2010) Prevalence of dyslipidemias in the Mexican National Health and Nutrition Survey 2006. *Salud Publica Mex* 52(Suppl 1):S44–53. <https://doi.org/10.1590/S0036-36342010000700008>
2. Pedroza-Tobias A, Trejo-Valdivia B, Sanchez-Romero LM, Barquera S (2014) Classification of metabolic syndrome according to lipid alterations: analysis from the Mexican National Health and Nutrition Survey 2006. *BMC Public Health* 14:1056. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-14-1056>
3. Hu FB, Manson JE, Stampfer MJ, Colditz G, Liu S et al (2001) Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women. *N Engl J Med* 345:790–797. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa010492>
4. Mahmood SS, Levy D, Vasan RS, Wang TJ (2014) The Framingham Heart Study and the epidemiology of cardiovascular disease: a historical perspective. *Lancet* 383:999–1008. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61752-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61752-3)

5. Scott RA, Lagou V, Welch RP, Wheeler E, Montasser ME et al (2012) Large-scale association analyses identify new loci influencing glycemic traits and provide insight into the underlying biological pathways. *Nat Genet* 44:991–1005. <https://doi.org/10.1038/ng.2385>
6. Scott RA, Scott LJ, Mägi R, Marullo L, Gaulton KJ et al (2017) DIABetes genetics replication and meta-analysis (DIAGRAM) consortium. An Expanded Genome-Wide Association Study of Type 2 Diabetes in Europeans. *Diabetes* 66:2888–2902. <https://doi.org/10.2337/db16-1253>
7. Weissglas-Volkov D, Aguilar-Salinas CA, Nikkola E, Deere KA, Cruz-Bautista I et al (2013) Genomic study in Mexicans identifies a new locus for triglycerides and refines European lipid loci. *J Med Genet* 50:298–308. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2012-101461>
8. Ko A, Cantor RM, Weissglas-Volkov D, Nikkola E, Reddy PM et al (2014) Amerindian-specific regions under positive selection harbour new lipid variants in Latinos. *Nat Commun* 5:3983. <https://doi.org/10.1038/ncomms4983>
9. Flores-Dorantes T, Arellano-Campos O, Posadas-Sánchez R, Villarreal-Molina T, Medina-Urrutia A et al (2010) Association of R230C ABCA1 gene variant with low HDL-C levels and abnormal HDL subclass distribution in Mexican school-aged children. *Clin Chim Acta* 411:1214–1217. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2010.04.025>
10. Aguilar-Salinas CA, Canizales-Quinteros S, Rojas-Martínez R, Mehta R, Rodríguez-Guillén R et al (2011) The non-synonymous Arg230Cys variant (R230C) of the ATP-binding cassette transporter A1 is associated with low HDL cholesterol concentrations in Mexican adults: a population based nationwide study. *Atherosclerosis* 216:146–150. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2010.10.049>
11. Gamboa-Meléndez MA, Galindo-Gómez C, Juárez-Martínez L, Gómez FE, Díaz-Díaz E et al (2015) Novel association of the R230C variant of the ABCA1 gene with high triglyceride levels and low high-density lipoprotein cholesterol levels in Mexican school-age children with high prevalence of obesity. *Arch Med Res* 46:495–501. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2015.07.008>
12. León-Mimila P, Villamil-Ramírez H, Villalobos-Comparán M, Villarreal-Molina T, Romero-Hidalgo S et al (2013) Contribution of common genetic variants to obesity and obesity-related traits in Mexican children and adults. *PLoS ONE* 8:e70640. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070640>
13. Villarreal-Molina MT, Flores-Dorantes MT, Arellano-Campos O, Villalobos-Comparán M, Rodríguez-Cruz M et al (2008) Association of the ATP-binding cassette transporter A1 R230C variant with early-onset type 2 diabetes in a Mexican population. *Diabetes* 57:509–513. <https://doi.org/10.2337/db07-0484>
14. Acuña-Alonzo V, Flores-Dorantes T, Kruit JK, Villarreal-Molina T, Arellano-Campos O et al (2010) A functional ABCA1 gene variant is associated with low HDL-cholesterol levels and shows evidence of positive selection in Native Americans. *Hum Mol Genet* 19:2877–2885. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq173>
15. Villarreal-Molina MT, Aguilar-Salinas CA, Rodríguez-Cruz M, Riaño D, Villalobos-Comparán M et al (2007) The ATP-binding cassette transporter A1 R230C variant affects HDL cholesterol levels and BMI in the Mexican population: association with obesity and obesity-related comorbidities. *Diabetes* 56:1881–1887. <https://doi.org/10.2337/db06-0905>
16. Kyriakou T, Hodgkinson C, Pontefract DE, Iyengar S, Howell WM et al (2005) Genotypic effect of the -565C>3eT polymorphism in the ABCA1 gene promoter on ABCA1 expression and severity of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:418–423. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000149379.72018.20>
17. Nagao K, Tomioka M, Ueda K (2011) Function and regulation of ABCA1—membrane meso-domain organization and reorganization. *FEBS J* 278:3190–3203. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08170.x>
18. VE Arnold K Dimitris 2015 High Density Lipoproteins Springer From Biological Understanding to Clinical Exploitation 10.1007/978-3-319-09665-0
19. Li G, Gu HM, Zhang DW (2013) ATP-binding cassette transporters and cholesterol translocation. *IUBMB Life* 65:505–512. <https://doi.org/10.1002/iub.1165>
20. Lawn RM, Wade DP, Couse TL, Wilcox JN (2001) Localization of human ATP-binding cassette transporter 1 (ABC1) in normal and atherosclerotic tissues. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:378–385. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.21.3.378>
21. Kieklar D, Dietmaier W, Langmann T, Aslanidis C, Probst M et al (2001) Rapid quantification of human ABCA1 mRNA in various cell types and tissues by real-time reverse transcription-PCR. *Clin Chem* 47:2089–2097
22. Brunham LR, Kruit JK, Pape TD, Timmins JM, Reuwer AQ et al (2007) Beta-cell ABCA1 influences insulin secretion, glucose homeostasis and response to thiazolidinedione treatment. *Nat Med* 13:340–347. <https://doi.org/10.1038/nm1546>
23. Schmidt MI, Duncan BB, Bang H, Pankow JS, Ballantyne CM et al (2005) Identifying individuals at high risk for diabetes: the atherosclerosis risk in communities study. *Diabetes Care* 28:2013–2018. <https://doi.org/10.2337/diacare.28.8.2013>
24. Wilson PW, Meigs JB, Sullivan L, Fox CS, Nathan DM et al (2007) Prediction of incident diabetes mellitus in middle-aged adults: the Framingham Offspring Study. *Arch Intern Med* 167:1068–1074. <https://doi.org/10.1001/archinte.167.10.1068>
25. Abbasi A, Corpeleijn E, Gansevoort RT, Gans RO, Hillege HL et al (2013) Role of HDL cholesterol and estimates of HDL particle composition in future development of type 2 diabetes in the general population: the PREVEND study. *J Clin Endocrinol Metab* 98:E1352–E1359. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-1680>
26. Rye KA, Barter PJ, Cochran BJ (2016) Apolipoprotein A-I interactions with insulin secretion and production. *Curr Opin Lipidol* 27:8–13. <https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000253>
27. Fryirs MA, Barter PJ, Appavoo M, Tuch BE, Tabet F et al (2010) Effects of high-density lipoproteins on pancreatic beta-cell insulin secretion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30:1642–1648. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.207373>
28. SIGMA Type 2 Diabetes Consortium, Williams AL, Jacobs SB, Moreno-Macías H, Huerta-Chagoya A, Churchhouse C (2014) Sequence variants in SLC16A11 are a common risk factor for type 2 diabetes in Mexico. *Nature* 506:97–101. <https://doi.org/10.1038/nature12828>
29. American Diabetes Association (2011) Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 34(Suppl 1):S62–S69. <https://doi.org/10.2337/dc11-S062>
30. Carlson RV, Boyd KM, Webb DJ (2004) The revision of the Declaration of Helsinki: past, present and future. *Br J Clin Pharmacol* 57:695–713. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2004.02103.x>
31. Ashwell M, Gunn P, Gibson S (2012) Waist-to-height ratio is a better screening tool than waist circumference and BMI for adult cardiometabolic risk factors: systematic review and meta-analysis. *Obes Rev* 13:275–286. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2011.00952.x>
32. Myung J, Jung KY, Kim TH, Han E (2019) Assessment of the validity of multiple obesity indices compared with obesity-related co-morbidities. *Public Health Nutr* 18:1–9. <https://doi.org/10.1017/S1368980019000090>
33. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS (1972) Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 18:499–502

34. Vanderweele TJ, Vansteelandt S (2010) Odds ratios for mediation analysis for a dichotomous outcome. *Am J Epidemiol* 172:1339–1348. <https://doi.org/10.1093/aje/kwq332>
35. Raghavan S, Porneala B, McKeown N, Fox CS, Dupuis J et al (2015) Metabolic factors and genetic risk mediate familial type 2 diabetes risk in the Framingham heart study. *Diabetologia* 58:988–996. <https://doi.org/10.1007/s00125-015-3498-7>
36. Singh A, Babyak M, Nolan DK, Brummett BH, Jiang R et al (2015) Gene by stress genome-wide interaction analysis and path analysis identify EBF1 as a cardiovascular and metabolic risk gene. *Eur J Hum Genet* 23:854–862. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2014.189>
37. Vincent V, Thakkar H, Aggarwal S, Mridha AR, Ramakrishnan L, Singh A (2019) ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) expression in adipose tissue and its modulation with insulin resistance in obesity. *Diabetes Metab Syndr Obes* 12:275–284. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S186565>
38. Muthén LK, & Muthén BO (1998–2017) Mplus User's Guide. Eighth Edition. Muthén & Muthén, Los Angeles.
39. Regieli JJ, Doevendans PA, Grobbee DE, Zwinderman AH, van der Graaf Y, Kastelein JJ, Jukema JW (2011) ABCA1 impacts athero-thrombotic risk and 10-year survival in a contemporary secondary prevention setting. *Atherosclerosis* 218:457–463. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.07.008>
40. Benton JL, Ding J, Tsai MY, Shea S, Rotter JI, Burke GL, Post W (2007) Associations between two common polymorphisms in the ABCA1 gene and subclinical atherosclerosis: multi-ethnic study of atherosclerosis (MESA). *Atherosclerosis* 193:352–360. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2006.06.024>
41. Babashamsi MM, Halalkhor S, Moradi Firouzjah H, Parsian H, Jalali SF, Babashamsi M (2017) Association of ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1)-565 C/T gene polymorphism with hypoalphalipoproteinemia and serum lipids, IL-6 and CRP Levels. *Avicenna J Med Biotechnol* 9:38–43
42. Mahmoodi K, Kamali K, Ghaznavi H, Soltanpour MS (2018) The C-565T polymorphism (rs2422493) of the ATP-binding cassette transporter A1 gene contributes to the development and severity of coronary artery disease in an Iranian population. *Oman Med J* 33:309–315. <https://doi.org/10.5001/omj.2018.57>
43. Lutucuta S, Ballantyne CM, Elghannam H, Gotto AM Jr, Marian AJ (2001) Novel polymorphisms in promoter region of atp binding cassette transporter gene and plasma lipids, severity, progression, and regression of coronary atherosclerosis and response to therapy. *Circ Res* 88:969–973. <https://doi.org/10.1161/hh0901.090301>
44. Miranda-Lora AL, Cruz M, Molina-Díaz M, Gutiérrez J, Flores-Huerta S, Klünder-Klünder M (2017) Associations of common variants in the SLC16A11, TCF7L2, and ABCA1 genes with pediatric-onset type 2 diabetes and related glycemic traits in families: a case-control and case-parent trio study. *Pediatr Diabetes* 18:824–831. <https://doi.org/10.1111/vedi.12497>
45. Campbell DD, Parra MV, Duque C, Gallego N, Franco L, Tandon A et al (2012) Amerind ancestry, socioeconomic status and the genetics of type 2 diabetes in a Colombian population. *PLoS ONE* 7:e33570. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033570>
46. Haghvirdizadeh P, Ramachandran V, Etemad A, Heidari F, Ghodisian N, Bin Ismail N, Ismail P (2015) Association of ATP-binding cassette transporter A1 gene polymorphisms in Type 2 diabetes mellitus among Malaysians. *J Diabetes Res*. 2015:289846. <https://doi.org/10.1155/2015/289846>
47. Hirano M, Nakanishi S, Kubota M, Maeda S, Yoneda M, Yamane K, Kira S, Sasaki H, Kohno N (2014) Low high-density lipoprotein cholesterol level is a significant risk factor for development of type 2 diabetes: data from the Hawaii-Los Angeles-Hiroshima study. *J Diabetes Investig* 5:501–506. <https://doi.org/10.1111/jdi.12170>
48. Villalobos-Comparán M, Antuna-Puente B, Villarreal-Molina MT, Canizales-Quinteros S, Velázquez-Cruz R, León-Mimila P et al (2017) Interaction between FTO rs9939609 and the Native American-origin ABCA1 rs9282541 affects BMI in the admixed Mexican population. *BMC Med Genet* 18:46. <https://doi.org/10.1186/s12881-017-0410-y>
49. Rangel-Baltazar E, Cuevas-Nasu L, Shamah-Levy T, Rodríguez-Ramírez S, Méndez-Gómez-Humarán I, Rivera JA (2019) Association between high waist-to-height ratio and cardiovascular risk among adults sampled by the 2016 half-way national health and nutrition survey in Mexico (ENSANUT MC 2016). *Nutrients* 11(6):E1402. <https://doi.org/10.3390/nu11061402>
50. Vergeer M, Brunham LR, Koetsveld J, Kruit JK, Verchere CB, Kastelein JJ, Hayden MR, Stroes ES (2010) Carriers of loss-of-function mutations in ABCA1 display pancreatic beta-cell dysfunction. *Diabetes Care* 33:869–874. <https://doi.org/10.2337/dc09-1562>
51. Brunham LR, Kruit JK, Verchere CB, Hayden MR (2008) Cholesterol in islet dysfunction and type 2 diabetes. *J Clin Invest* 118:403–408. <https://doi.org/10.1172/JCI33296>
52. Cochran BJ, Bisoendial RJ, Hou L, Glaros EN, Rossy J, Thomas SR, Barter PJ, Rye KA (2014) Apolipoprotein A-I increases insulin secretion and production from pancreatic  $\beta$ -cells via a G-protein-cAMP-PKA-FoxO1-dependent mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34:2261–2267. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.304131>
53. von Eckardstein A, Widmann C (2014) High-density lipoprotein, beta cells, and diabetes. *Cardiovasc Res* 103:384–394. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvu143>
54. Drew BG, Duffy SJ, Formosa MF, Natoli AK, Henstridge DC, Penfold SA et al (2009) High-density lipoprotein modulates glucose metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 119:2103–2111. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.843219>

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## Affiliations

A. Ochoa-Guzmán<sup>1</sup> · H. Moreno-Macías<sup>2</sup> · D. Guillén-Quintero<sup>1</sup> · O. Chávez-Talavera<sup>3</sup> · M. L. Ordoñez-Sánchez<sup>1</sup> · Y. Segura-Kato<sup>1</sup> · V. Ortiz<sup>4</sup> · E. Díaz-Díaz<sup>5</sup> · L. Muñoz-Hernández<sup>6</sup> · A. García<sup>7</sup> · O. Pérez-Méndez<sup>8</sup> · A. Zentella-Dehesa<sup>7,9</sup> · C. A. Aguilar-Salinas<sup>6</sup> · M. T. Tusié-Luna<sup>1,9</sup> 

<sup>1</sup> Unit of Molecular Biology and Genomic Medicine, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán,

Vasco de Quiroga #15, Tlalpan, Belisario Domínguez Sección XVI, 14080 Mexico City, Mexico

<sup>2</sup> Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico City, Mexico

<sup>3</sup> PECEM, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

<sup>4</sup> Department of Physiology of Nutrition, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico

<sup>5</sup> Department of Reproductive Biology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico

<sup>6</sup> Research Unit On Metabolic Diseases, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico

<sup>7</sup> Department of Biochemistry, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico

<sup>8</sup> Department of Molecular Biology, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Mexico City, Mexico

<sup>9</sup> Institute for Biomedical Research, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico