



Universidad Nacional Autónoma de México

---

---

Doctorado en Ciencias Biomédicas

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**Doctora en Ciencias**

Participación de la variante **R230C** del gen transportador de colesterol **ABCA1** en la modulación de los niveles plasmáticos de colesterol-HDL y su asociación con la obesidad y la diabetes tipo 2

PRESENTA:

**QFB. María Teresa Flores Dorantes**

Director de tesis:

**Dr. Samuel Canizales Quinteros**

Comité Tutorial:

Dr. Ramón Coral Vázquez

Dr. Oscar Pérez Méndez

México, D. F.,

Junio 2011.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

<b>ÍNDICE</b> .....	<b>I</b>
<b>FIGURAS</b> .....	<b>IV</b>
<b>TABLAS</b> .....	<b>VI</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>VII</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>IX</b>
<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>X</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>XI</b>
<b>1. RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. ABSTRACT</b> .....	<b>3</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>5</b>
3.1 LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD (HDL) .....	6
3.2 TRC.....	11
3.2.1 ABCA1.....	13
3.2.2 <i>Participación de ABCA1 en la biogénesis de las HDL</i> .....	16
3.2.3 <i>Regulación transcripcional de ABCA1</i> .....	18
3.2.4 <i>Regulación post-transcripcional de ABCA1</i> .....	19
3.2.5 <i>ABCA1 en las enfermedades cardiovasculares</i> .....	19
3.2.6 <i>ABCA1 en la obesidad</i> .....	20
3.2.7 <i>ABCA1 en la diabetes tipo 2</i> .....	20
<b>4. ANTECEDENTES DIRECTOS DEL ESTUDIO</b> .....	<b>23</b>
4.1 VARIANTES GENÉTICAS DE ABCA1 .....	23
4.2 R230C.....	24
<b>5. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>28</b>
<b>6. HIPÓTESIS</b> .....	<b>30</b>
<b>7. OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>30</b>
7.1 OBJETIVOS PARTICULARES.....	30
<b>8. DISEÑO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>31</b>
<b>9. ESTUDIO DE ASOCIACIÓN CON DT2</b> .....	<b>31</b>

9.1	SUJETOS.....	31
9.2	ESTUDIO CASO-CONTROL DE DT2.....	32
9.2.1	<i>Mediciones antropométricas y bioquímicas</i> .....	33
9.2.2	<i>Genotipificación de SNPs</i> .....	33
9.2.3	<i>Análisis de haplotipos</i> .....	36
9.2.4	<i>Análisis de Ancestría</i> .....	36
9.2.5	<i>Análisis estadístico</i> .....	37
9.3	RESULTADOS.....	37
9.4	DISCUSIÓN.....	48
9.4.1	<i>Efecto de R230C en la DT2</i> .....	48
<b>10.</b>	<b>EFFECTO DE LA VARIANTE R230C EN POBLACIÓN PEDIÁTRICA.....</b>	<b>53</b>
10.1	SUJETOS.....	53
10.1.1	<i>Mediciones antropométricas y bioquímicas</i> .....	53
10.1.2	<i>Genotipificación de SNPs</i> .....	53
10.1.3	<i>Clasificación para desarrollo de pubertad</i> .....	53
10.1.4	<i>Población con mediciones de subfracciones de HDL</i> .....	53
10.1.5	<i>Medición de subfracciones de HDL</i> .....	54
10.1.6	<i>Análisis estadístico</i> .....	55
10.1.7	<i>Cálculos</i> .....	55
10.2	RESULTADOS.....	55
10.2.1	<i>Asociación de la variante R230C con los niveles de C-HDL y otros rasgos metabólicos</i> .....	56
10.2.2	<i>Efecto de R230C en la distribución de las subfracciones de las HDL</i> 60	62
10.3	DISCUSIÓN.....	62
<b>10.</b>	<b>EFFECTO DE LA VARIANTE R230C EN POBLACIÓN INDÍGENA.....</b>	<b>66</b>
10.4	SUJETOS.....	66
10.4.1	<i>Mediciones antropométricas y bioquímicas</i> .....	66
10.4.2	<i>Genotipificación de SNPs</i> .....	66
10.4.3	<i>Población para secuenciación</i> .....	67
10.4.4	<i>Secuenciación del gen ABCA1</i> .....	67
10.5	GENERACIÓN DEL CONSTRUCTO CON LA VARIANTE R230C Y LÍNEAS CELULARES.....	69
10.5.1	<i>Generación del fragmento de DNA con el cambio R230C</i> .....	69
10.5.2	<i>Eflujo de colesterol</i> .....	74
10.5.3	<i>Eflujo de fosfolípidos</i> .....	75
10.5.4	<i>Expresión de ABCA1</i> .....	76

10.5.5	<i>Análisis estadístico</i>	76
10.6	RESULTADOS	77
10.6.1	<i>Secuenciación</i>	77
10.6.2	<i>Estudios Funcionales</i>	78
10.6.3	<i>Eflujo de Fosfolípidos</i>	78
10.6.4	<i>Asociación de la variante R230C con los niveles de C-HDL y otros rasgos metabólicos</i>	80
10.7	DISCUSIÓN	90
<b>11.</b>	<b>CONCLUSIONES GENERALES</b>	<b>93</b>
<b>12.</b>	<b>EXPECTATIVAS</b>	<b>95</b>
<b>13.</b>	<b>GLOSARIO</b>	<b>97</b>
<b>14.</b>	<b>RECURSOS DE LA WEB</b>	<b>99</b>
<b>15.</b>	<b>REFERENCIAS</b>	<b>100</b>
<b>16.</b>	<b>ANEXO</b>	<b>¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.</b>

Figura 1. Relación del C-HDL con las enfermedades crónico degenerativas..	6
Figura 2. Estructura de las lipoproteínas de alta densidad (HDL).	7
Figura 3. Clasificación de las subfracciones de las HDL de acuerdo al gradiente de separación por electroforesis.	8
Figura 4. Transporte Reverso del Colesterol.	12
Figura 5. Proteína ABCA1.	15
Figura 6. Participación de la proteína ABCA1 en la formación de las HDL.	17
Figura 7. Mecanismo sugerido de ABCA1 en la secreción de insulina.	22
Figura 8. Comparación de la estructura química de la arginina vs. la estructura de la cisteína.	25
Figura 9. Proteína ABCA con las cisteínas en las asas extracelulares y la variante R230C.	26
Figura 10. Imagen de discriminación alélica en PCR tiempo real.	35
Figura 11. Análisis para determinar bloques en DL con R230C, en el primer grupo de estudio.	47
Figura 12. Mecanismos propuestos del efecto de R230C en la DT2.	52
Figura 13. Distribución de la subfracción HDL <sub>2b</sub> de acuerdo al genotipo para R230C.	60
Figura 14. Distribución de la subfracción HDL <sub>3a</sub> de acuerdo al genotipo para R230C.	61
Figura 15. Distribución de la subfracción HDL <sub>3b</sub> de acuerdo al genotipo para R230C.	62
Figura 16. Representación de la generación del fragmento con la variante R230C.	71
Figura 17. Generación del plásmido con la variante R230C.	72
Figura 18. Procedimiento para la transfección de las células HEK293 con el constructo de la variante R230C.	74
Figura 19. Eflujo de colesterol, formación de las partículas HDL por estímulo con ApoA1.	75
Figura 20. R230C disminuye el eflujo de colesterol en un 27 %.	78
Figura 21. La variante R230C no disminuye el eflujo de Fosfolípidos.	79
Figura 22. La variante R230C no afecta la expresión de la proteína ABCA1	79
Figura 23. Distribución geográfica del alelo menos frecuente de la variante R230C.	86

Figura 24. Pruebas de Máxima Parsimonia para la variante R230C del gen ABCA1.....	88
Figura 25. Pruebas de EHH y REHH para la variante R230C del gen ABCA1 .....	89
Figura 26. Efectos de la variante funcional R230C del gen ABCA1 en los distintos escenarios de la población mexicana.....	94

Tabla 1. Propiedades de las HDL.....	10
Tabla 2. SNPs analizados en la evaluación del efecto de la variante R230C en DT2. ....	34
Tabla 3. Datos bioquímicos y antropométricos del primer grupo de estudio.	38
Tabla 4. Efecto de la variante R230C del gen ABCA1 en población diabética mexicana. ....	40
Tabla 5. Análisis inicial del efecto de la variante R230C en la DT2. ....	42
Tabla 6. Réplica del análisis del efecto de la variante R230C en la DT2.....	43
Tabla 7. Análisis combinado del Efecto de la variante R230C en la DT2.....	44
Tabla 8. Frecuencia de los alelos menos frecuentes de los SNPs utilizados para el análisis de DL con R230C .....	45
Tabla 9. Frecuencias de alelo menor para los SNPs analizados en diabéticos y controles. ....	46
Tabla 10. Asociación de haplotipos con la DT2 en la muestra inicial. ....	48
Tabla 11. Subfracciones de HDL.....	54
Tabla 12. Datos antropométricos y bioquímicos de la población pediátrica.	56
Tabla 13. Efecto de la variante R230C sobre los parámetros bioquímicos y antropométricos en la población pediátrica. ....	58
Tabla 14. Efecto de la variante R230C en la población pediátrica estratificada por género.....	59
Tabla 15. SNPs analizados para el estudio de R230C y estudios de selección positiva en población indígena. ....	67
Tabla 16. Condiciones de reacción para los amplificadores de los 50 exones del gen ABCA1. ....	68
Tabla 17. Condiciones de reacción para PCR para generación del fragmento con R230C. ....	70
Tabla 18. Efecto de la variante R230C en los niveles plasmáticos de C-HDL en la población indígena. ....	81
Tabla 19. Efecto de la variante R230C en los niveles plasmáticos de colesterol total en la población indígena.....	83
Tabla 20. Efecto de la variante R230C en el IMC en la población indígena.	84

---



## Abreviaturas

---

HDL	Lipoproteína de alta densidad
ABCA1	Transportador de colesterol tipo A1
ApoA1	Apolipoproteína A1
ApoB	Apolipoproteína B
ApoC1	Apolipoproteína C1
ApoE	Apolipoproteína E
HA	Hipoalfalipoproteinemia
TRC	Transporte reveso del colesterol
LCAT	Lecitina colesterol acil transferasa
LH	Lipasa hepática
PLTP	Proteína transportadora de fosfolípidos
PLP	Lipasa lipoproteica
CETP	Proteína transportadora de ésteres de colesterol
DL	Desequilibrio de ligamiento
DT2	Diabetes tipo 2
SRB1	Receptor basurero B1
SREBP-1C	Proteína C del elemento regulador de esteroides
LXR	Receptor del hígado X
RXR	Receptor retinoico X
HbA1c	Hemoglobina glicosilada

El presente trabajo fue realizado en la Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, UNAM.

Este trabajo está basado en las siguientes publicaciones:

Association of the ATP-binding cassette transporter A1 R230C variant with early-onset type 2 diabetes in a Mexican population.

Association of R230C ABCA1 gene variant with low HDL-C levels and abnormal HDL subclass distribution in Mexican school-aged children.

A functional ABCA1 gene variant is associated with low HDL-cholesterol levels and shows evidence of positive selection in Native Americans.

## Agradecimientos

---

La realización del presente trabajo fue posible gracias a la beca de Conacyt número 230674 y los apoyos para proyectos de Conacyt número 47414 y 69856.

## Dedicatoria

---

A mis padres y a mis hermanos

## Agradecimientos

---

En especial agradecimiento a mi tutor, Dr. Samuel Canizales Quinteros, por la confianza al permitirme formar parte de su equipo de investigación, ya que era un área nueva para mí y por la asignación de este gran proyecto, además por la paciencia, enseñanzas, consejos y por tu amistad.

A mis cotutores. Dr. Oscar Pérez y Dr. Ramón Coral, por sus valiosos comentarios y por su apoyo incondicional a lo largo del proyecto.

A mis sinodales. Dr. Guillermo Robles Díaz, Dr. Jaime Mas Oliva, Dra. Martha Patricia Ostrosky Shejet, Dra. Elia Martha Pérez Armendáriz y Dr. Samuel Canizales Quinteros, por dedicar parte de su valioso tiempo para revisar mi trabajo, sus comentarios hicieron posible la culminación del mismo.

A la Dra. Ma. Teresa Villarreal Molina, por la disponibilidad en todo momento para escuchar, y apoyar de manera incondicional, por sus consejos tan atinados y por su amistad.

A Víctor Acuña y Marisela Villalobos, gracias chicos por los buenos momentos, por su amistad, por el apoyo durante la realización del proyecto, por compartir las salidas en las colectas de muestras, lo cual hizo de este trabajo algo inolvidable.

A mis compañeros del laboratorio: Blanca Estela López, Paola León, Leonor Jacobo y Hugo Villamil, por su participación en las distintas etapas del trabajo, sin ustedes la realización de este trabajo no habría sido posible, gracias chicos.

Al Biol. Salvador Ramírez por compartir sus conocimientos y por su apoyo técnico para los cultivos celulares.

A la QFB. Olga Barrales, por compartir parte de su experiencia y apoyo en los ensayos que se realizaron.

Al Sr. Jesús Lázaro López, por la disponibilidad para apoyar en todo momento y por su compañía en los días de ensayos prolongados.

A mi amiga Rossana Zepeda, por el apoyo y los consejos desde el inicio de este proyecto.

A mis amigos Janeth Montiel, Eduardo Díaz y Mercedes López, gracias chicos por su apoyo, las porras, los consejos, los comentarios y su buena vibra, han sido de mucha ayuda en este andar.

Especial agradecimiento a mi mejor amigo, Héctor Téllez Castelazo, por estar siempre cerca para reprenderme mis imprudencias o aplaudir mis logros, por la paciencia para escucharme en los momentos de mayor estrés, por tener siempre palabras de aliento, por los regaños bien merecidos y también por su muy valioso apoyo técnico, sin ti no habría sido posible culminar, gracias.

Por su comprensión durante estos años, al disculpar siempre mi ausencia por su apoyo incondicional, siendo mí soporte y mi motor en todo momento, gracias Teresa, Humberto, Gilberto y Roberto.

Un especial agradecimiento a todas las personas que participaron donando muestras sanguíneas, sin su colaboración este trabajo no habría sido posible.

## **1. Resumen**

El transportador de colesterol ABCA1 (ATP-binding cassette transporter, class A type1, por sus siglas en inglés) es una proteína transmembranal que participa en la homeostasis de colesterol, mediante la formación de las lipoproteínas de alta densidad (HDL). Mutaciones en este gen han sido asociadas a la enfermedad de Tangier, la cual se caracteriza por presentar concentraciones muy bajas o casi nulas de colesterol de alta densidad o colesterol-HDL (C-HDL) y por la presencia de células espumosas. Distintos estudios han reportado variantes de este gen asociadas a la modulación de los niveles plasmáticos de C-HDL. La variante R230C (rs9282541) se localiza en el exón 7 y fue inicialmente reportada como una mutación, ya que se encontró sólo en un individuo con hipoalfalipoproteinemia familiar (C-HDL  $\leq$  35 mg/dL), en la población indígena Oji Cree de Canadá. En la población mexicana la variante R230C fue asociada a niveles plasmáticos bajos de C-HDL (una de las dislipidemias más frecuentes en la población mexicana mestiza), obesidad, síndrome metabólico y en una pequeña subpoblación diabética mostró asociación con la diabetes tipo 2 (DT2). La frecuencia de la variante fue heterogénea en los grupos indígenas analizados. Es debido a la marcada asociación de la variante R230C con parámetros metabólicos de riesgo, que se decidió evaluarla en distintos escenarios de la población mexicana. Mediante genotipificación con sondas TaqMan se evaluó la frecuencia de la variante en las distintas poblaciones. Para el análisis estadístico se utilizó un modelo dominante o aditivo dependiendo del tamaño de la muestra. La secuenciación completa de la región codificante, mostró que no hay variantes en desequilibrio de ligamiento con R230C. Inicialmente para confirmar la asociación de la variante con la DT2, se utilizó un estudio de asociación caso-control (incluyó 244 casos y 202 controles, de 20 a 69 años), se realizó un segundo estudio en una muestra independiente, con la finalidad de comprobar los resultados (242 casos y 225 controles, tomando en cuenta los mismos parámetros de inclusión). Por otro lado, se analizó población pediátrica (N = 1253, de 6 a 15 años), ya que es población con menor tiempo de exposición a ambientes obesogénicos y además fue posible realizar el estudio a gran escala en población indígena americana (N = 4405,

> a 18 años), ya que se ha sugerido que la predisposición de la población hispana a enfermedades metabólicas, se debe al componente amerindio. La variante R230C mostró asociación con la DT2 (RM 2.501,  $P = 0.001$ ) y específicamente con la DT2 de inicio temprano (edad de diagnóstico  $\leq 45$  años, RM 3.776,  $P = 3.3 \times 10^{-6}$ ), los resultados fueron independientes de la mezcla étnica ( $P = 0.0008$ ,  $P = 8.1 \times 10^{-6}$ , respectivamente). La variante R230C mostró marcada asociación con niveles plasmáticos bajos de C-HDL en la población pediátrica ( $P = 2.9 \times 10^{-8}$ ), al igual que en la población indígena ( $P = 1.77 \times 10^{-11}$ ). Se mostró un efecto de dosis en ambas poblaciones, ya que los portadores del cambio de manera homocigota (C230C), presentaron menores concentraciones plasmáticas de C-HDL que los heterocigotos (R230C). Además, la variante también se asoció con un índice de masa corporal mayor (IMC), tanto en la población pediátrica ( $P = 0.049$ ), como en la población indígena ( $P = 0.0001$ ). En una subpoblación de la población pediátrica la variante R230C mostró un efecto sobre la distribución de las subfracciones de las HDL y disminución del tamaño de la partícula HDL en los portadores del cambio. Asimismo, se evaluó el efecto funcional mediante células clonadas con el cambio, el eflujo de colesterol mostró una disminución del 27 % en la línea celular con R230C ( $P < 0.001$ ). Por último, pudimos concluir que la variante R230C está asociada a DT2 y específicamente a DT2 de inicio temprano, además está asociada a niveles plasmáticos bajos de C-HDL y a un mayor IMC, tanto en población pediátrica como población indígena. Este es el primer estudio que reporta una variante funcional exclusiva de la población indígena americana y poblaciones descendientes, que presenta un fuerte efecto en la modulación de los niveles plasmáticos de C-HDL y que pudo haber contribuido a la evolución adaptativa de la población nativa americana.



## **2. Abstract**

The cholesterol transporter ABCA1 (ATP-binding cassette transporter, class A type1) is a transmembrane protein which participate in the cholesterol homeostasis through the high density lipoprotein (HDL) formation. Some mutations in this gen have been associated with the Tangier disease, which is characterized by showing very low concentration or any high density cholesterol (HDL-C), but having foamy cells. Different studies have shown that some variants of this gen have been associated with the modulation of the plasmatic levels of HDL-C. The R230C (rs9282541) variant which is found on the exon 7 an initially was reported as a mutation since it was found just in one individual with familial hypoalphalipoproteinemia (HDL-C  $\leq$  35 mg/dL), in the Canadian Oji Cree native population. In Mexican population the R230C variant was associated with low plasmatic levels of HDL-C (one of the most common dyslipidemia in Mexican mestizo population), obesity, metabolic syndrome, even a small subpopulation was associated with type 2 diabetes (T2D). The frequency of the variant was heterogeneous in the analyzed native groups. It was decided to evaluate the variant R230C in different settings in Mexican population, due to a pronounced association with some of the risk metabolic parameter. The evaluation of the frequency was through the genotyping with TaqMan assay in different population. For the statistical analysis we used a dominant or additive model according of the sample's size. The complete sequencing of the coding segment shows that there are not variants in linkage disequilibrium with R230C. Initially in order to confirm the association of the variant with the T2D, was used a case-control association study (it comprise 244 cases and 202 controls, between 20 and 69 years old), a second study was made in a independent sample in order to prove the results (242 cases and 225 controls, with the same inclusion parameters). On the other hand the variant was analyzed in a pediatric population (N = 1253, between 6 and 15 years old) because is a population that have had less time of exposure to obesogenic environments. Also it was able performed a more extensive analysis of this variant in native American population (N = 4405, > to 18 years old), because it has suggested that the native

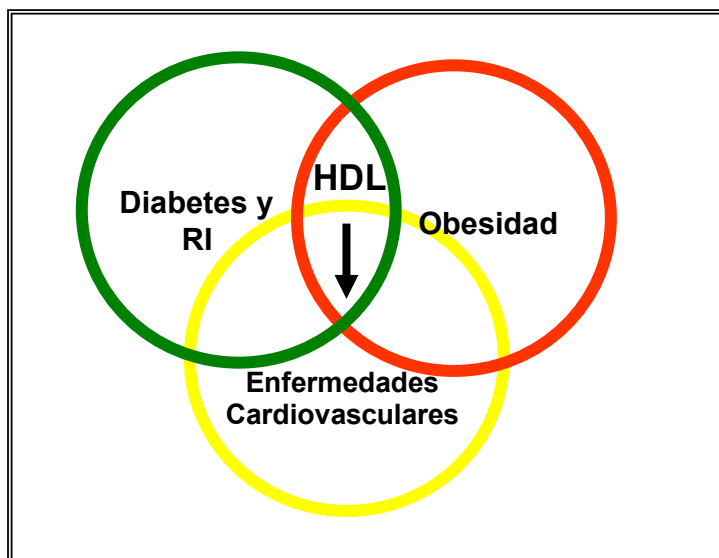
American heritage in Hispanic population predispose to metabolic diseases. The variant R230C showed association with the T2D (OR 2.501,  $P = 0.001$ ) specifically with the early-onset T2D (diagnostic age  $\leq 45$  years old, OR 3.776,  $P = 3.3 \times 10^{-6}$ ) the results were independent from the ethnic mix ( $P = 0.0008$ ,  $P = 8.1 \times 10^{-6}$ , respectively). The R230C variant showed a pronounced association with low plasmatic levels of HDL-C in pediatric population ( $P = 2.9 \times 10^{-8}$ ), as in the native-American population ( $P = 1.77 \times 10^{-11}$ ). It was shown an additive effect in both populations since the homozygous carrier (C230C) show less plasmatic levels of HDL-C that the heterozygous carrier (R230C). Besides the variant was associated with a higher body mass index (BMI) both in pediatric population ( $P = 0.049$ ) and in native population ( $P = 0.0001$ ). In a pediatric subpopulation the R230C variant shows an effect in the distribution of the HDL's subclass distribution and in the size of the HDL particle (was smaller) in the carriers of the change. Also the functional effect was evaluated trough the cloning cells with the change, the cholesterol efflux showed a decrease of 27% in the cells expressing the 230C allele ( $P < 0.001$ ). Finally we have concluded that the R230C is associated to the T2D specifically with the earlier-onset T2D, also is associated with low plasmatic levels of HDL-C and to a higher BMI, in the pediatric population and in the Native American population. This is the first report of a common functional variant exclusive to Native American and descent population, which is a major determinant of HD-C levels and may have contributed to the adaptive evolution of Native American populations

### **3. Introducción**

Las enfermedades crónico degenerativas actualmente son consideradas como un problema grave de salud a nivel mundial, ya que son las principales causas de muerte en la población adulta. En México, las encuestas nacionales de salud han reportado un incremento en la prevalencia de este tipo de enfermedades desde 1993 al 2006, tales como; la diabetes tipo 2 (DT2) (7.7 %), el síndrome metabólico (10.2%), la hipertensión (6.9%) y la hipercolesterolemia (16.6%). (Aguilar-Salinas, Gomez-Perez et al. 2010; Villalpando, Shamah-Levy et al. 2010). La tendencia creciente tanto de la DT2, como de los parámetros de riesgo cardiometabólico ha hecho que los factores relacionados o desencadenantes con estos fenotipos sean considerados blanco de estudio.

Estudios tanto epidemiológico, como farmacológicos y en modelos animales han demostrado que existe una relación inversa entre las concentraciones plasmáticas de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y las enfermedades cardiovasculares, ya que a menor concentración plasmática de colesterol-HDL (C-HDL), se ha reportado una mayor predisposición al desarrollo de enfermedades cardiovasculares (von Eckardstein, Nofer et al. 2001). El efecto de menor concentración de C-HDL, también se ha reportado en otros procesos degenerativos como lo son: la obesidad (Despres, Moorjani et al. 1990; Despres 1991; Robins 2001), la resistencia a la insulina (RI) (Karhapaa, Malkki et al. 1994) y la DT2 (Von Eckardstein, Langer et al. 2001)(Figura 1).

En México, estudios epidemiológicos han reportado que una de las dislipidemias más frecuentes en la población mexicana, es la hipoalfalipoproteinemia, que se caracteriza por la presencia de concentraciones plasmáticas bajas de C-HDL ( $\leq 35$  mg/dL). Estos niveles de C-HDL plasmáticos son considerado como un factor de riesgo cardiometabólico importante (Aguilar-Salinas, Olaiz et al. 2001; Aguilar-Salinas, Gomez-Perez et al. 2010).

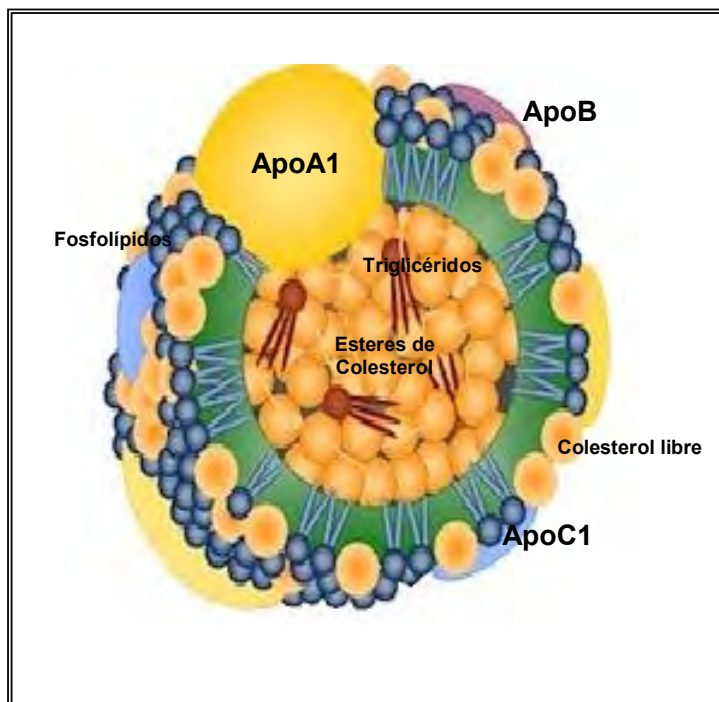


**Figura 1.** Relación del C-HDL con las enfermedades crónico degenerativas. El fenotipo de C-HDL bajos es frecuente en enfermedades como: la diabetes, resistencia a la insulina (RI), obesidad y las enfermedades cardiovasculares.

### 3.1 Lipoproteínas de alta densidad (HDL)

Las lipoproteínas de alta densidad o HDL, son partículas discoidales heterogéneas, las cuales pueden ser ensambladas en el plasma o secretadas por el hígado. Estas partículas contienen tanto lípidos polares (fosfolípidos), como lípidos no polares (ésteres de colesterol y triglicéridos) y apolipoproteínas (ApoA1, ApoB, ApoC1, etc.) (Figura 2). Los lípidos polares forman la monocapa lipídica en la superficie de la partícula, presentando los grupos polares hacia el medio acuoso. Por el contrario, en el interior de la partícula se sitúan los lípidos no polares. Las apolipoproteínas son las encargadas de darle estabilidad a la monocapa de lípidos. Las lipoproteínas HDL se caracterizan por presentar la mayor proporción de proteínas, siendo ApoA1 la apolipoproteína mayoritaria. ApoA1 además de tener una importante función estructural, es indispensable para el eflujo de colesterol en las células periféricas, ya que se ha comprobado que juega un papel importante en la interacción con algunos

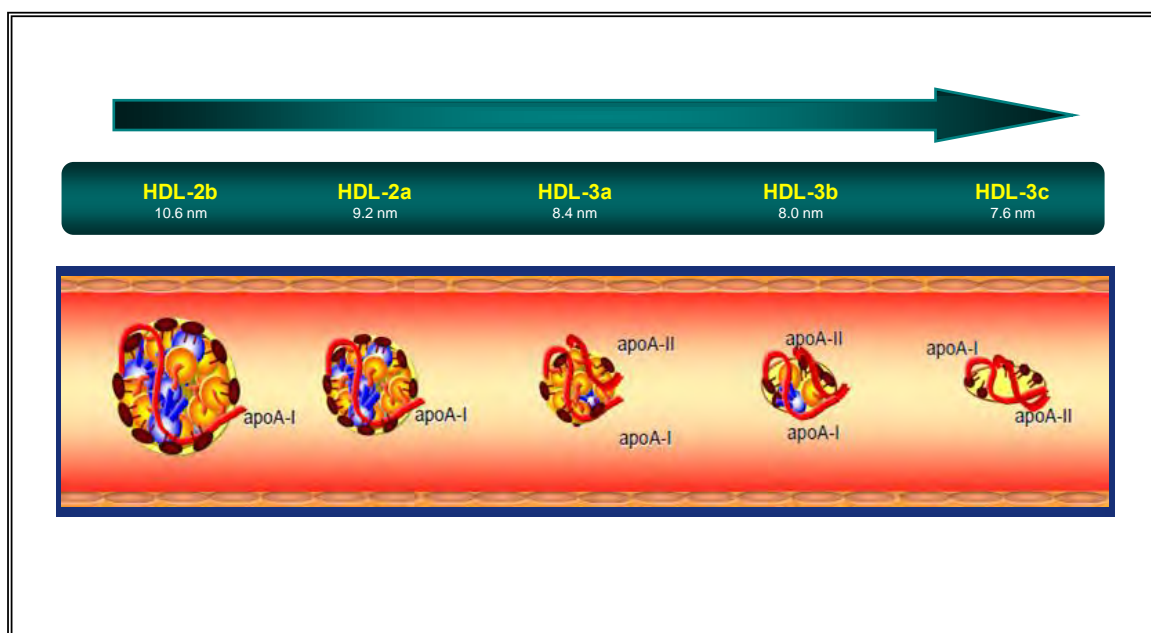
transportadores de membrana como lo es ABCA1 (ATP-binding cassette transporter class A type1, por sus siglas en inglés) (Perez-Mendez 2004).



**Figura 2.** Estructura de las lipoproteínas de alta densidad (HDL). Las HDL son partículas lipídicas heterogéneas que presenta compuestos no polares en el interior de la partícula (triglicéridos, ésteres de colesterol, etc.) y compuestos polares en el exterior de la partícula (apolipoproteínas, fosfolípidos y colesterol libre). (Modificada de <http://www.hdlforum.org/ktmlstandard/images/uploads/HDL-home.jpg>)

Las HDL son moléculas distintas tanto a nivel estructural como funcional. Se clasifican en distintas subpoblaciones de acuerdo al tamaño, forma, densidad, cambios en la superficie y composición. Una de las clasificaciones se basa en la densidad de flotación ( $r$ ), dividiéndolas en dos grupos; las HDL<sub>2</sub> ( $1.063 < r < 1.12$  g/ml) y las HDL<sub>3</sub> ( $1.12 < r < 1.21$  g/ml). Las HDL<sub>2</sub> son partículas grandes ricas en lípidos hidrofóbicos y menos densas que las HDL<sub>3</sub>, las cuales están formadas principalmente por fosfolípidos y proteínas. Por otro lado, de acuerdo al gradiente de separación por electroforesis se dividen en: HDL<sub>2a</sub>, HDL<sub>2b</sub>, HDL<sub>3a</sub>, HDL<sub>3b</sub> y HDL<sub>3c</sub>

(Figura 3), cuyo diámetro va de 10.6 a 7.6 nm (Blanche, Gong et al. 1981). Considerando la movilidad electroforética de las partículas HDL y el tamaño de la partícula, se han descrito otras subpoblaciones, entre las que destacan las partículas pre- $\beta$ 1, las cuales están compuestas esencialmente de fosfolípidos y ApoA1 (Barter, Kastelein et al. 2003).



**Figura 3.** Clasificación de las subfracciones de las HDL de acuerdo al gradiente de separación por electroforesis. Se dividen en: HDL<sub>2a</sub>, HDL<sub>2b</sub>, HDL<sub>3a</sub>, HDL<sub>3b</sub> y HDL<sub>3c</sub>, con diámetros que van de 10.6 a 7.6 nm. Modificado de (Barter, Kastelein et al. 2003).

Existen distintos factores plasmáticos que pueden remodelar las partículas HDL alterando sus características tanto físicas como químicas. Estos factores incluyen distintas enzimas tales como; la lecitina-colesterol acil transferasa (LCAT), la proteína transportadora de ésteres de colesterol (CETP), la proteína transportadora de fosfolípidos (PLTP), la lipasa hepática (LH) y la lipasa endotelial (LE) (Rye, Bursill et al. 2009). La enzima LCAT sintetiza ésteres de colesterol en el plasma, y debido a su característica hidrofóbica se acumulan en el centro de la molécula, convirtiendo a las HDL discoidales en HDL esféricas (Jonas 2000).

De las distintas funciones de las partículas HDL, las propiedades antiaterogénicas son consideradas las más importantes, como lo son; la habilidad para remover el colesterol de los macrófagos en la pared arterial, en el primer paso del transporte reverso del colesterol (TRC), en este mecanismo la ApoA1 es la apolipoproteína más importante en este proceso al igual que ABCA1. Además la esterificación del C-HDL por la LCAT también pueden hidrolizar los fosfolípidos de las LDL. Los monocitos al entrar en el espacio subendotelial promueven la aterosclerosis, en la circulación estas células deben ser arrastradas, en el espacio subendotelial se adhieren a las paredes de los vasos sanguíneos. La expresión de las moléculas de adhesión depende de las citocinas inflamatorias y del daño vascular que es estimulado en la aterosclerosis. Modelos animales han demostrado que las HDL inhiben la expresión de estas moléculas de adhesión. Las HDL también pueden inhibir directamente la migración de estos monocitos al espacio subendotelial. En el endotelio, el óxido nítrico protege contra la inflamación. Las HDL promueven la vasoprotección por estimulando la producción de la óxido nítrico sintasa incrementando a su vez la producción del óxido nítrico. Otra propiedad de las HDL es la protección endotelial a través de la activación de las plaquetas, las HDL inhiben la cascada de coagulación a través de la proteína proteasa C, la cual inactiva a los factores Va y VIIa (Natarajan, Ray et al. 2010) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Propiedades de las HDL

Función	Mecanismo
Transporte reverso del colesterol	Eflujo de colesterol a través de ABCA1, ABCG1 y ABCG4
Antioxidación de LDL	Activación de LCAT
Protección endotelial	Inhibición y adhesión endotelial de la expresión molecular, prevención de la quimiotaxis de monocitos y estimulación de la síntesis de óxido nítrico
Actividad antiplaquetaria	Protección contra lesiones endoteliales
Anticoagulación	Inhibición de los factores de la coagulación Va y VIIa

ABC transportadores ATP binding cassette, LCAT Lecitina-colesterol acil transferasa, LDL lipoproteína de baja densidad. Modificada de (Natarajan, Ray et al. 2010)

El colesterol es uno de los compuestos más importantes en estos mecanismos, el cual es una sustancia muy poco soluble en agua, esencial para distintas funciones vitales en las células mamíferas, forma parte de la membrana celular y es sustrato para la producción de otras sustancias, tales como los esteroides (Yokoyama 2006). La acumulación de colesterol en las células puede alterar las membranas celulares y causar citotoxicidad (Feng, Yao et al. 2003), por lo que las células tienen un proceso complejo de homeostasis para modular la disponibilidad del colesterol. La acumulación de colesterol a nivel celular se ha relacionado con algunas enfermedades crónico degenerativas en el humano, como lo son: la aterosclerosis (Guyton and Klemp 1996), la enfermedad de Alzheimer a edad temprana (Wellington 2004), la disfunción renal (Abrass 2004) y recientemente se asoció con la diabetes en modelos animales (Brunham, Kruit et al. 2008).

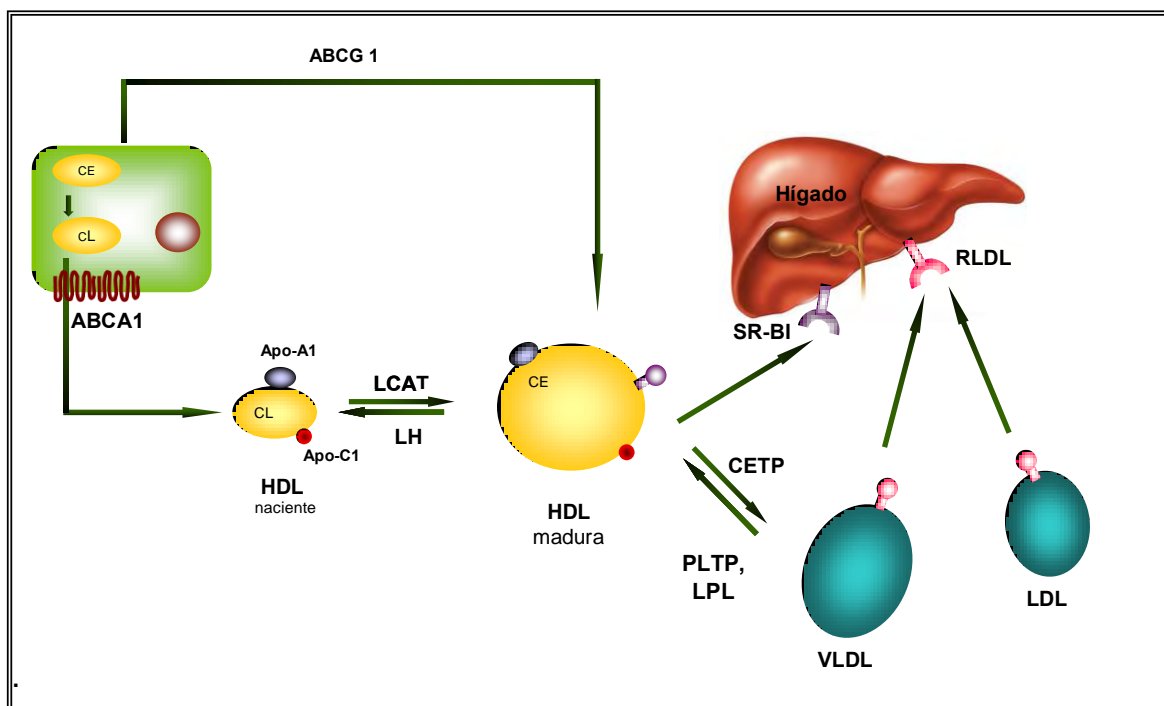


### **3.2 TRC**

El TRC es uno de los mecanismos más estudiado y utilizado para explicar la homeostasis del colesterol (Figura 4). Es a través de este mecanismo, por el cual el colesterol libre de las células periféricas, pasa mediante distintas reacciones enzimáticas, hacia el hígado para su reciclaje o excreción. Es en el primer paso del TRC, en el eflujo de colesterol, donde se forman las lipoproteínas de alta densidad (HDL), que son las encargadas de transportar el colesterol libre y llevarlo hacia el hígado para su reciclaje o excreción. El TRC es un mecanismo complejo en el cual intervienen distintas proteínas, entre ellas las apolipoproteínas y algunos transportadores de la familia ABC (ATP Binding cassette, por sus siglas en inglés), como son ABCA1 y ABCG1 (ATP-binding cassette transporter G1, por sus siglas en inglés), así como distintas enzimas, tales como: LCAT, LH, CETP, etc. (Rader and Maugeais 2000; Schmitz and Grandl 2009). Se han propuesto dos mecanismos para explicar el eflujo de colesterol:

- El eflujo de colesterol inespecífico, que sucede desde la superficie celular por un intercambio físico entre la membrana celular y moléculas aceptoras extracelulares.
- El eflujo de colesterol mediado por la proteína transmembranal ABCA1, que inicia con la interacción de ABCA1 y las ApoA1. Esta apolipoproteína funciona como aceptora de colesterol, promoviendo el eflujo de colesterol y fosfolípidos hacia las HDL nacientes. El colesterol es rápidamente esterificado por la enzima LCAT, la cual transforma al colesterol en moléculas menos solubles. Con esto, los esteres de colesterol pasan de la superficie, al interior de la molécula, lo que lleva al aumento del tamaño y formación de las partículas HDL maduras. El colesterol esterificado puede ser intercambiado por triglicéridos presentes en las lipoproteínas que contienen ApoB-100, principalmente las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y de densidad intermedia (IDL). Este intercambio es facilitado por la proteína transferidora de esteres de colesterol (CETP). Las partículas HDL pueden unirse al receptor

basurero B-1 (SRB1), el cual reconoce a las HDL maduras. Estas partículas son captadas por el hígado para su posterior excreción (Tall and Wang 2000).



**Figura 4.** Transporte Reverso del Colesterol. El TRC inicia con la interacción de ABCA1 y ApoA1 (molécula aceptora de colesterol), promoviendo el eflujo de colesterol libre (CL) y fosfolípidos hacia las HDL nacientes. La enzima lecitina-colesterol acil transferasa (LCAT) convierte el CL en colesterol esterificado (CE), el cual es más hidrofóbico y se sitúa en el interior de la partícula formando HDL maduras. La proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP) permitirá el intercambio de CE por triacilglicéridos en lipoproteínas que contienen ApoB-100 como las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y de densidad intermedia (IDL). Las partículas HDL pueden unirse al receptor basurero SR-BI en el hígado, el cual reconoce a las HDL maduras y permite su excreción por vía digestiva. Otras enzimas hidrolizan triglicéridos y/o fosfolípidos en diferentes partículas lipoproteicas, transfiriendo o intercambiando estos lípidos con otras lipoproteínas (LPL lipasa lipoproteica, PLTP proteína transferidora de fosfolípidos, LH lipasa hepática, LE lipasa endotelial). (Modificado de Modificado de (Rader and Maugeais 2000)

Se ha observado que la modulación de los niveles plasmáticos de C-HDL es un proceso complejo, en el cual intervienen tanto factores ambientales como factores genéticos. Explicando estos últimos hasta un 70 % de la variación plasmática del C-HDL (Heller, de Faire et al. 1993). Se han aplicado distintas metodologías para la búsqueda de genes relacionados con los niveles plasmáticos de C-HDL, entre las más utilizadas está la búsqueda de genes candidatos, conocidos por participar en el metabolismo de las HDL y también el escrutinio del genoma completo donde se localizan loci de rasgos cuantitativos relacionados con éste fenotipo. Estas estrategias han señalado distintos genes, la mayoría de ellos desempeñan un papel relevante en el TRC. Entre estos genes se encuentran los transportadores ABCA1 y ABCG1, ApoA1, LCAT, CETP, LPL, etc. (Villarreal-Molina 2008). La mayoría de estos estudios se han realizado en poblaciones caucásicas y son pocos los estudios reportados en población mexicana o México-Americana (Arya, Duggirala et al. 2002; Mahaney, Almasy et al. 2003).

### **3.2.1 ABCA1**

En los mamíferos la familia de las proteínas ABC (ATP binding cassette, por sus siglas en inglés), consisten en 49 proteínas de transportadores que conforman 7 subfamilias que van desde el ABCA hasta el ABC. Estas proteínas están involucradas en las translocación de diversas sustancias (lípidos, esteroides, productos metabólicos y drogas), a través de ambas membranas intracelular y extracelular. Las proteínas ABC generalmente se encuentran localizadas en la membrana plasmática, pero algunas también son expresadas en membrana intracelular del aparato de Golgi, mitocondrias o retículo endoplásmico (Singaraja, Brunham et al. 2003; Aye, Singh et al. 2009).

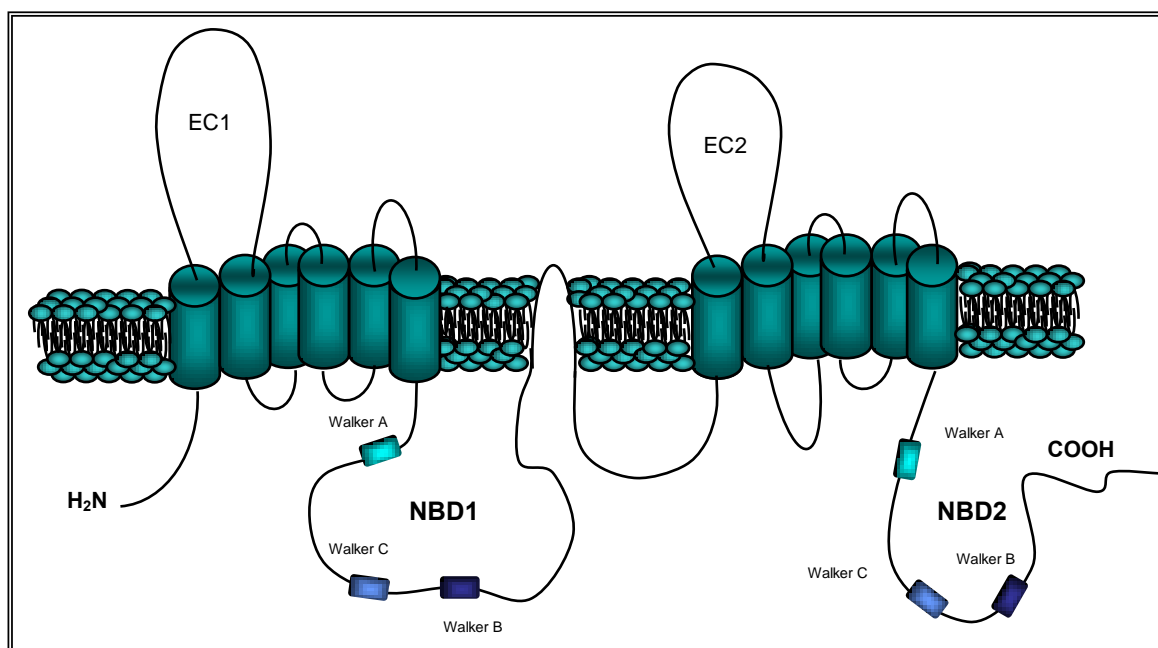
Debido a la estrecha relación que presenta el transportador de colesterol ABCA1 con las concentraciones plasmáticas de C-HDL, se ha convertido en una de las proteínas del TRC más estudiadas. Mutaciones en el gen que codifica para esta proteína han sido asociadas a la enfermedad de Tangier, la cual es una enfermedad autosómica

recesiva, que se caracteriza por presentar concentraciones plasmáticas muy bajas o casi nulas de C-HDL, y por la presencia de células espumosas (Kolovou, Mikhailidis et al. 2006). El gen que codifica para la proteína ABCA1 se encuentra en el cromosoma 9q31, contiene 50 exones que codifican para una proteína de 2261 aminoácidos (Remaley, Rust et al. 1999). Estudios *in vitro* han reportado que la vida media de la proteína ABCA1 es corta (~2 horas) y es estabilizada en la membrana por la apolipoproteína ApoA1 (Bowden and Ridgway 2008).

El transportador ABCA1 es una proteína integral de membrana que comprende dos fracciones de estructuras similares. Cada fracción tiene un dominio transmembranal, conteniendo 6 hélices y un dominio de unión a nucleótidos (NBD), que a su vez contienen dos motivos de péptidos conservados, conocidos como Walker A y Walker B (característica de algunas proteínas que utilizan ATP como fuente de energía para el transporte de moléculas) y también tiene un Walker C, el cual es exclusivo del transportador ABC (Dean, Hamon et al. 2001) (Figura 5). Se ha sugerido que la proteína ABCA1 tiene la terminación amino (NH<sub>3</sub>) orientada hacia el citosol y hacia el exterior celular presenta dos asas largas que están altamente glicosiladas y podrían estar ligadas por puentes de azufre provenientes de las cisteína (Oram and Heinecke 2005). ABCA1 regula el transporte del colesterol, de fosfolípidos y otras moléculas lipofílicas a través de la membrana celular, donde son removidas de las células por las apolipoproteínas (ApoA1, ApoAII, ApoAIII, ApoB, ApoC1, etc.) de las HDL pobres en lípidos (Oram and Heinecke 2005). También, se ha reportado que el transportador ABCA1, exporta otros tipos de sustratos como: el  $\alpha$ -tocoferol (Oram, Vaughan et al. 2001), ApoE (Von Eckardstein, Langer et al. 2001) y algunas citocinas como: la interleucina-1 $\beta$  (Zhou, Engel et al. 2002) y MIF (factor de inhibición de la migración de macrófagos), estas últimas juegan un papel importante en los procesos inflamatorios e infecciosos (Ietta, Bechi et al. 2010).

En la célula la proteína se encuentra formado predominantemente homodímeros ensamblados en el retículo endoplásmico, en los que los extremos C- terminales se

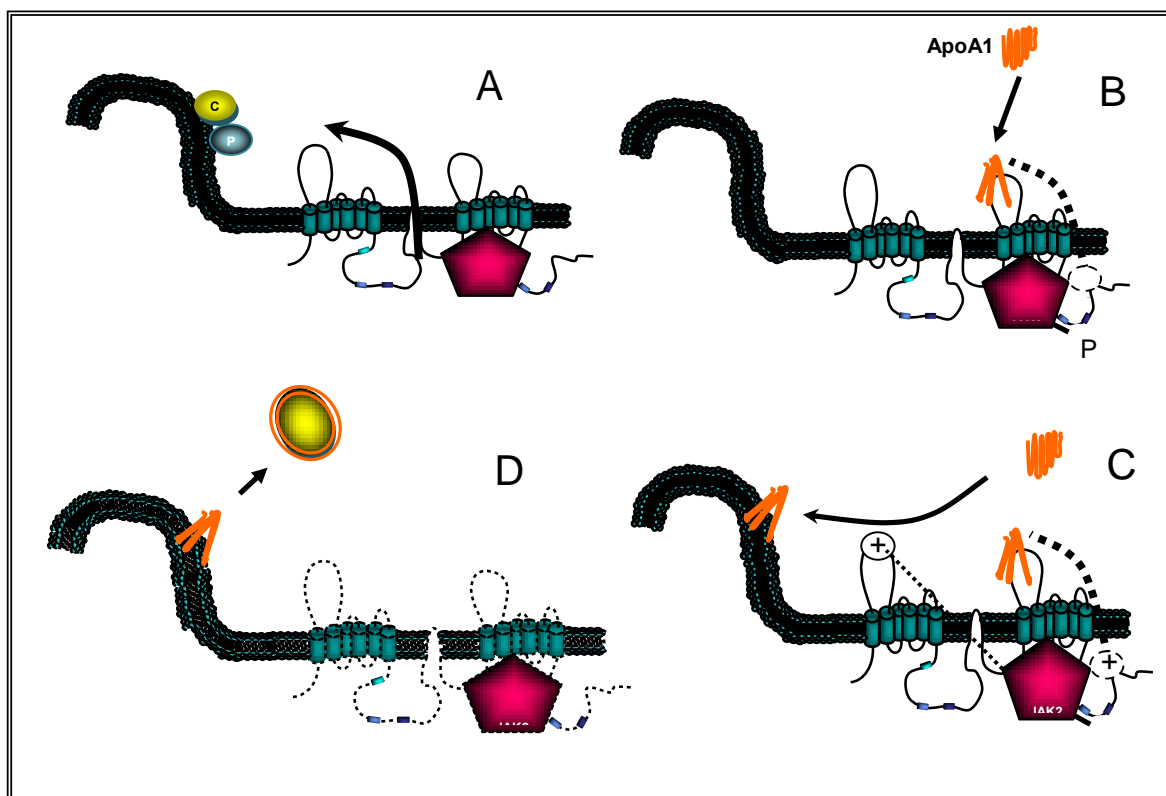
encuentran muy cercanos. Estas estructuras diméricas pueden transformarse a estructuras de mayor orden como tetrámeros durante el ciclo catalítico de ATP de la proteína. Se ha sugerido que los tetrámeros de ABCA1 son la estructura funcional mínima requerida para la lipídación de la partícula de ApoA1 (Denis, Haidar et al. 2004).



**Figura 5.** Proteína ABCA1. EC asa extracelular, NBD dominio de unión a nucleótidos. La proteína ABCA1 se encuentra formada por dos estructuras similares, cada una con un dominio transmembranal compuesto por seis hélices y un NBD. Cada NBD contiene dos regiones peptídicas llamadas Walker A y Walker B, conservadas en muchas proteínas una que utilizan ATP y una región Walker C que es propia de las proteínas ABC. (Modificada de (Brunham, Singaraja et al. 2006; Tang and Oram 2009).

### **3.2.2 Participación de ABCA1 en la biogénesis de las HDL**

El mecanismo por el cual ABCA1 y otros transportadores de la familia ABC translocan las sustancias a través de la membrana celular, aún no es del todo claro. Se ha sugerido que existe una serie de cambios conformacionales en las proteínas ABC, que son regulados por la hidrólisis de ATP en el dominio de unión a nucleótidos NBD (Tang and Oram 2009). Con base en distintos estudios se ha propuesto el siguiente modelo celular para explicar cómo el transportador ABCA1 expulsa los lípidos a través de la membrana celular (Figura 6). Cuando la carga de la membrana celular es alterada por un aumento en la cantidad de colesterol, la proteína ABCA1 genera dominios de membrana ricos en colesterol y fosfolípidos, aún en la ausencia de las apolipoproteínas (Vaughan and Oram 2003) (Figura 6A). Estos dominios en la membrana plasmática sirven para liberar la tensión, curvando la membrana, forma dobleces y dominios lipídicos exovesiculados para relajar dicha tensión, lo que favorece la interacción con las apolipoproteínas, como lo es ApoA1 (Figura 6B). (Lin and Oram 2000; Vedhachalam, Ghering et al. 2007). Durante los primeros minutos de la exposición a las apolipoproteínas, la tirosina cinasa (JAK2) se activa por autofosforilación, incrementando la unión de ABCA1 con las apolipoproteínas (ApoA1) (Figura 6B). Las exovesiculaciones crean espacios entre los grupos polares de fosfolípidos por los que pueden penetrar las hélices alfa de las apolipoproteínas, permitiendo la unión de ApoA1 a estos dominios con una afinidad muy alta (Figura 6C). La acumulación de moléculas de ApoA1 en los defectos formados por espacios en la superficie de la bicapa de lípidos causa desestabilización y rearrreglo en la membrana llevando a la formación de complejos ApoA1-lípidos HDL nacientes proceso conocido como “solubilización” de la membrana (Figura 6D)(Hassan, Denis et al. 2007; Vedhachalam, Duong et al. 2007; Vedhachalam, Ghering et al. 2007). Esta vía de liberación de energía es un proceso eficiente para compensar el exceso de colesterol de las células y posiblemente modular otras vías (Tang and Oram 2009). Las partículas de HDL discoidales formadas pueden tener 2,3 o 4 moléculas de ApoA1, diferentes tipos de fosfolípidos membranales y colesterol.



**Figura 6.** Participación de la proteína ABCA1 en la formación de las HDL. (A) Cuando la carga de la membrana celular es alterada por un aumento en la cantidad de colesterol, ABCA1 genera dominios de membrana ricos en colesterol y fosfolípidos (exovesiculaciones). Estos dominios en la membrana plasmática sirven para liberar la tensión de los fosfolípidos densos, curvando la membrana lipídica, lo que favorece la interacción con las apolipoproteínas. (B) Durante los primeros minutos de la exposición a las apolipoproteínas, la tirosina cinasa (JAK2) se activa por autofosforilación, (C) incrementando la unión de ABCA1 con las apolipoproteínas como la ApoA1. (D) Estas uniones facilitan la interacción de ApoA1 con los lípidos sobresalientes de las exovesiculaciones, promoviendo la solubilización de estos lípidos y liberándolos de la célula mediante la formación de las HDL.

### **3.2.3 Regulación transcripcional de ABCA1**

La expresión del gen ABCA1 es regulada principalmente por las concentraciones de colesterol, ya que el aumento de éste compuesto incrementa la cantidad de RNAm de ABCA1 y los niveles de proteína (Jiang, Paultre et al. 2000). La transcripción del gen es regulada por el receptor nuclear del hígado X (LXR $\alpha$  y LXR $\beta$ ) (Costet, Luo et al. 2000; Costet, Lalanne et al. 2003; Beyea, Heslop et al. 2007). Los agonistas de LXR, TO01317 y GW3965 han mostrado la capacidad de activar múltiples procesos que coordinan la excreción del exceso de colesterol en las células, mostrando un incremento en los niveles plasmáticos de HDL y reducción de la aterosclerosis en modelos murinos (Tontonoz and Mangelsdorf 2003; Miao, Zondlo et al. 2004). Los agonistas LXR inducen la síntesis de ácidos grasos y del factor transcripcional de la proteína C del elemento regulador de esteroides (SREBP-1c) que activan genes de enzimas que participan en distintas vías de la biosíntesis de ácidos grasos (Osborne 2000). El receptor retinoide X (RXR), que es un heterodímero de LXR, también estimulan la transcripción del gen ABCA1 (Costet, Luo et al. 2000).

El mecanismo por el cual el aumento de colesterol intracelular promueven la transcripción del gen ABCA1 es mediante la activación de los receptores LXR y RXR (Costet, Luo et al. 2000; Schwartz, Lawn et al. 2000). Las proteínas LXR y RXR forman heterodímeros que se unen principalmente a elementos de respuesta localizados en el promotor y el primer intrón del gen ABCA1. Los oxisteroides y el ácido retinoico se unen a los receptores LXR y RXR (Repa and Mangelsdorf 1999). La unión de uno o ambos ligandos puede activar la transcripción. Otros metabolitos lipídicos también pueden modular la expresión de ABCA1 a través del sistema LXR, como por ejemplo los ácidos grasos poliinsaturados que antagonizan la unión de oxisteroides a elementos de respuesta presentes en el gen LXR $\alpha$ , potencialmente interfiriendo con el efecto inductor de los esteroides sobre ABCA1 (Uehara, Engel et al. 2002)



### 3.2.4 Regulación post-transcripcional de ABCA1

La ausencia de inductores de ABCA1 y de apolipoproteínas provoca la degradación del RNAm y de la proteína (Wang and Oram 2002). La apolipoproteína ApoA1 incrementa la estabilidad de la proteína ABCA1 en la membrana, por disminución de la fosforilación en los residuos de treonina en la posición 1286 y 1305 de ABCA1, mediante la proteólisis directa de calpaina (Silver, Wang et al. 2000; Martinez, Agerholm-Larsen et al. 2003) y por actividad de la proteína cinasa C (Yamauchi, Hayashi et al. 2003) (Halayem-Dhouib, Zaghdoudi et al. 2010). De igual manera, las proteínas cinasa A, cinasa C y JAK2, han mostrado regular la actividad de la proteína ABCA1 (See, Caday-Malcolm et al. 2002; Roosbeek, Peelman et al. 2004; Eisner, Porten et al. 2010; Marquette, Lorber et al. 2010). Los ácidos grasos insaturados aceleran el recambio de la proteína ABCA1 a través de las vías de señalización que involucran la activación de fosfolipasa D2 (PLD2) (Wang and Oram 2002) y la proteína cinasa delta C (PKC $\delta$ ) (Wang and Oram 2002).

Por otro lado, estudios *in vitro* mostraron que la acumulación de colesterol libre en el retículo endoplásmico induce apoptosis (Feng, Yao et al. 2003). Esta condición también desestabiliza la proteína ABCA1, posiblemente por el incremento en la degradación por los proteosomas (Feng and Tabas 2002). De igual manera, los productos terminales de la glicosilación avanzada, que son generados durante el metabolismo de la glucosa y la glucooxidación de proteínas, afectan de manera importante la función de la proteína ABCA1. En trastornos como la diabetes mellitus, estos productos se producen en exceso, pudiendo disminuir los niveles séricos de C-HDL en estos pacientes (Passarelli, Tang et al. 2005)

### 3.2.5 ABCA1 en las enfermedades cardiovasculares

Estudios genéticos y biológicos sugieren que niveles bajos de C-HDL son frecuentes en individuos con deficiencias en la ruta de ABCA1, lo cual podría causar una acumulación de colesterol en los macrófagos y desencadenar un proceso inflamatorio. Esto conlleva a la formación de las células espumosas, que son

macrófagos con acumulación de esteroides que se localizan en las paredes arteriales, causando la inflamación de las arterias. Este mecanismo es un evento previo en la formación de lesiones ateroscleróticas (Tang and Oram 2009). Sujetos homocigotos o heterocigotos de mutaciones de Tangier en el gen ABCA1 han mostrado de 4 a 6 veces mayor predisposición a padecer enfermedades cardiovasculares (Serfaty-Lacroisniere, Civeira et al. 1994)

### **3.2.6 ABCA1 en la obesidad**

La obesidad se define como el aumento de peso corporal, debido a la pérdida del equilibrio entre la ingesta calórica y el gasto energético. Esto conlleva a una acumulación excesiva de grasa en el cuerpo, la cual se ha asociado frecuentemente a patrones anormales de distribución y metabolismo de las partículas HDL, como lo son las concentraciones bajas de C-HDL (Despres, Moorjani et al. 1990; Robins 2001). Estudios *in vitro* han demostrado que el tejido adiposo contiene grandes depósitos de colesterol libre que participan en el eflujo de colesterol (Angel, Yuen et al. 1981; Prattes, Horl et al. 2000). Estudios recientes han demostrado que tanto el transportador ABCA1 como SR-B1 se expresan en adipocitos maduros y regulan el eflujo de colesterol en los adipocitos. Además, mostraron que la disfunción inflamatoria en el adipocito en estados de resistencia a la insulina podría inhibir la lipidación de las HDL y reducir la circulación de los niveles de C-HDL a nivel plasmático (Zhang, McGillicuddy et al. 2010).

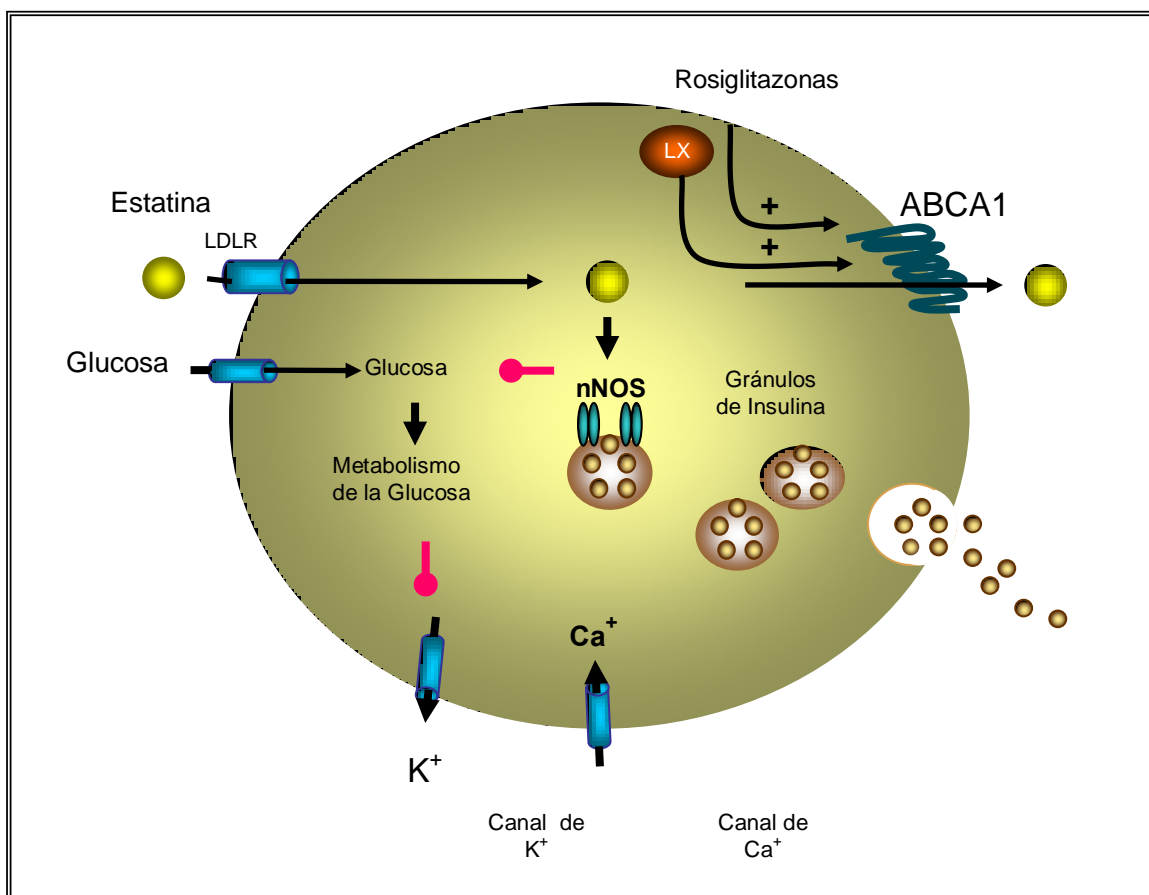
### **3.2.7 ABCA1 en la diabetes tipo 2**

La DT2, es una enfermedad multifactorial, que se caracteriza por la presencia de hiperglucemia en ayuno (concentraciones plasmáticas > a 126 mg/dL, OMS), la cual es resultado del defecto en la secreción y/o acción de la insulina. Existe evidencia de que el transportador de colesterol ABCA1 participa en la homeostasis de la glucosa. El gen ABCA1 se expresa en células  $\beta$ -pancreáticas y es regulado por proteínas, fármacos y sustancias relacionadas con el metabolismo de la glucosa y los lípidos (Gerin, Dolinsky et al. 2005; Schmitz and Langmann 2005). La expresión del gen ABCA1 disminuye por acción de la insulina *in vitro* (Sartipy and Loskutoff

2003), mientras que la glucosa aumenta la expresión del gen *in vivo* en leucocitos (Albrecht, Simon-Vermot et al. 2004).

Un estudio reciente mostró que la expresión del gen *Abca1* está disminuida en ratones diabéticos y la delección específica del gen en este modelo provocó intolerancia a la glucosa, sensibilidad normal a la insulina y disfunción de las células  $\beta$ -pancreáticas. Además, se mostró en estas células un incremento en el contenido de colesterol. Los islotes pancreáticos presentaron una reducción de la secreción de insulina dependiente de glucosa, sugiriendo que el incremento de colesterol a nivel celular podría causar lipotoxicidad en las células  $\beta$ -pancreáticas y disminuir la función en la secreción de insulina (Brunham, Kruit et al. 2007).

Se ha sugerido que la sobreexpresión de ABCA1 tiene un efecto protector en el desarrollo de la DT2, esto se ha mostrado en estudios donde administran tiazolidonas en modelos murinos. En humanos estas drogas se utilizan para el tratamiento de la resistencia a la insulina y mejoramiento de la función de las células  $\beta$ -pancreáticas. Las rosiglitazonas (tiazolidonas) son fármacos que activa el factor transcripcional  $PPAR\gamma$ , el cual a su vez activa a distintos genes en células sensibles a la insulina.  $PPAR\gamma$ , también activa transcripcionalmente a ABCA1 a través de LXR (Lehmann, Moore et al. 1995; Chawla, Boisvert et al. 2001).



**Figura 7.** Mecanismo sugerido de ABCA1 en la secreción de insulina. La glucosa entra a la célula  $\beta$  por el transportador de glucosa GLUT2, ésta a su vez se modifica por la glucocinasa (GK) (paso limitante de la ruta de la detección de glucosa). El siguiente paso en el metabolismo de la glucosa es el cierre de los canales de potasio sensibles de ATP, la despolarización de la membrana, el influjo de calcio hacia la célula por la vía de los canales de calcio tipo L y con ello la exocitosis de los gránulos de insulina. El colesterol ingresa a las células por el receptor LDL. ABCA1 regula el eflujo de colesterol celular, en ausencia de ABCA1 en las células  $\beta$ , el colesterol celular aumenta. LXR es uno de los principales activadores transcripcionales de ABCA1, y la delección de LXR, conlleva a un fenotipo similar al observado por la ausencia de ABCA1. El aumento de colesterol celular podría impedir la secreción de insulina, al promover la dimerización de la oxido nítrico sintasa neuronal (nNOS), la cual inhibe a la GK, alterando la detección de la glucosa. Es posible que el colesterol también inhiba pasos distales en la exocitosis de la insulina y que ABCA1 presente

otros efectos independientes en la secreción de insulina. Fármacos para la disminuir de colesterol como la pravastatina podría reducir la incidencia de diabetes, protegiendo a la célula  $\beta$ , mediante la disminución de colesterol extracelular. La rosiglitazona, que es un miembro de la tiazolidinas requiere de ABCA1 como parte de este efecto benéfico en las células  $\beta$ , sugiriendo que terapias dirigidas a activar ABCA1 en las células  $\beta$ , podría tener un efecto favorable en el tratamiento de la DT2. Modificado (Brunham, Kruit et al. 2008)

## **4. Antecedentes directos del estudio**

### **4.1 Variantes genéticas de ABCA1**

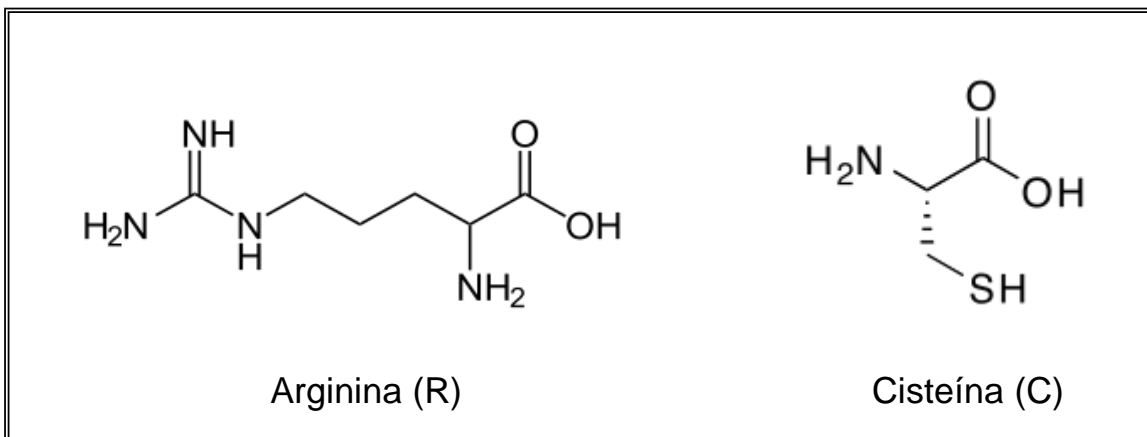
En los últimos años han sido reportados más de 100 mutaciones en el gen ABCA1, identificadas en pacientes con la enfermedad de Tangier o en sujetos con fenotipos intermedios de deficiencia de C-HDL (Singaraja, Brunham et al. 2003). También se han reportado numerosos cambios de un solo nucleótido (SNP) ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?locusId=19](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?locusId=19)), los cuales se encuentran localizados tanto región codificante como no codificante. Varios de estos SNPs (R219K, V771, V825, R1587K, etc.), han sido asociados con los niveles plasmáticos de C-HDL en distintas poblaciones (Anton, Achim et al. 1999; Yost, Denis et al. 2004; Salnikov, Aisenbrey et al. 2010), algunos de ellos han mostrando inconsistencias en las distintas poblaciones analizadas, sugiriendo como motivo las diferencias étnicas (Brousseau 2004; Yost, Denis et al. 2004).

Una de las variantes mas estudiadas ha sido la variante R219K, ya que ha sido asociación a niveles plasmáticos altos de C-HDL (Clee, Zwinderman et al. 2001; Tan, Low et al. 2003; Cohen, Kiss et al. 2004) y con ello a reducir la predisposición a aterosclerosis. Estos resultados no han sido replicados en otras poblaciones (Frikke-Schmidt, Nordestgaard et al. 2004), sugiriendo que otros factores pueden alterar el efecto de la variante, como lo son el IMC, DL con otros SNP, o las diferencias étnicas.

## **4.2 R230C**

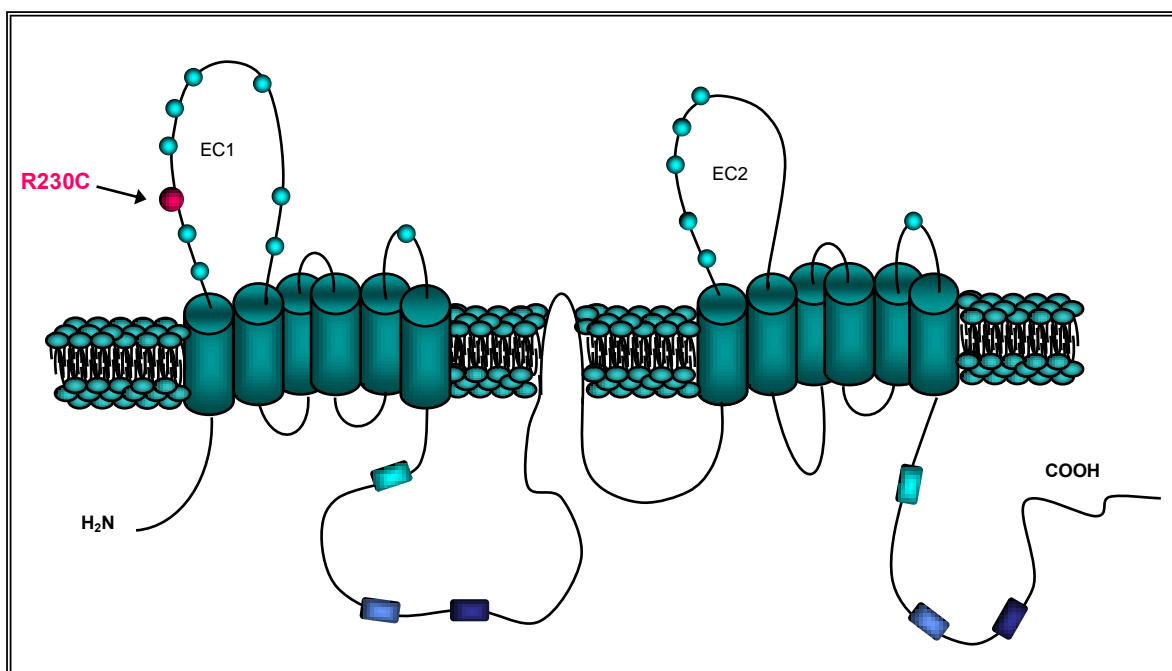
La variante R230C, consiste en un cambio de aminoácidos no sinónimos de una arginina (Arg, R), por una cisteína (Cys, C) en la posición 230 de la proteína (exón 7), localizada en la primer asa extracelular de la proteína. Estos aminoácidos son de características distintas, de acuerdo a su cadena lateral, la arginina es un aminoácido básico, y la cisteína es un aminoácido polar que contiene grupos sulfhidrilo en su cadena lateral (Figura 8). La función principal de estos grupos sulfuros se sugiere, es la de formar puentes disulfuro para estabilizar las proteínas. Estos puentes son esenciales en el mantenimiento de la estructura terciaria y cuaternaria de la mayoría de las proteínas (Leninger 2002).

La variante R230C fue reportada inicialmente en un grupo indígena de Canadá, llamado Oji Cree. Esta población se encuentra ubicada en una reserva de la parte norte de Ontario Canadá (Wang, Burnett et al. 2000)(Wang, Burnett et al. 2000). Debido a la baja frecuencia presentada por la variante R230C, se consideró como mutación, ya que sólo se encontró en tres individuos de una pequeña población con hipoalfalipoproteinemia familiar (concentraciones plasmáticas de HDL menores a 5 mg/dL). En este estudio, se sugirió que la baja frecuencia de la variante R230C, se debía posiblemente a que la mutación era relativamente reciente y que podría ser exclusiva de la población Oji Cree (Wang, Burnett et al. 2000).



**Figura 8** .Comparación de la estructura química de la arginina vs. la estructura de la cisteína. La arginina es un aminoácido básico, y la cisteína es un aminoácido polar que contiene grupos sulfhidrilo en su cadena latera.

La proteína ABCA1 tiene 2261 aminoácidos, contiene sólo 39 cisteínas a lo largo de la cadena y se concentran en su mayoría en las asas extracelulares, presentando en la primer asa extracelular 8 cisteína (Figura 9). Recientemente un estudio señaló que las cisteínas de la proteína se encuentran en su mayoría en las asas extracelulares y que son esenciales para el correcto funcionamiento de la proteína y en especial para la formación de las HDL. En especial las cisteínas que se encuentran localizadas en la posición 75, 309, 1463, 1465 y 14677, ya que forman dos puentes disulfuro (Hozoji, Kimura et al. 2009). La inclusión de una cisteína en la posición 230 podría afectar el funcionamiento ideal de la proteína (Figura 9).



**Figura 9.** Proteína ABCA con las cisteínas en las aspas extracelulares y la variante R230C. La proteína contiene 39 cisteínas a lo largo de la cadena, las cuales son esenciales para el correcto funcionamiento de la proteína y en especial para la formación de las HDL. Modificado (Hozoji, Kimura et al. 2009).

Estudios *in silico* (PANTHER) de los posibles efectos funcionales de distintas mutaciones y variantes del gen ABCA1, mostraron que la variante R230C presentó un subPSEC de -4.27, indicando que la probabilidad de que la proteína sea disfuncional es de 0.78, estos datos son mayores a los mostrados por mutaciones de Tangier, como la M1091T, cuyo subPSEC es -3.56 y cuya probabilidad de ser disfuncional es de 0.64 (Brunham, Singaraja et al. 2005). Por otro lado, el programa Poly-Phen clasificó a la variante R230C, como una variante de riesgo (Villarreal-Molina, Aguilar-Salinas et al. 2007)

Nuestro grupo de investigación secuenció los primeros siete exones del gen ABCA1, uno de los transportadores más importantes en la homeostasis del colesterol. Es en el exón 7 donde se encontró la variante R230C, la cual mostró una marcada



asociación a niveles plasmáticos bajos de C-HDL, obesidad, síndrome metabólico y aun cuando la población de diabéticos dentro de la población de estudio era muy pequeña, también se mostró una marcada asociación a este padecimiento. Estos estudios se realizaron en población adulta mexicana mestiza y se incluyeron algunos grupos indígenas mexicanos que mostraron que la frecuencia de variante R230C era heterogénea (10-40 %) (Villarreal-Molina, Aguilar-Salinas et al. 2007).

## **5. Justificación**

La alta incidencia de las enfermedades crónico degenerativas (ECD) a nivel mundial y las consecuencias que conllevan, así como los factores que las desencadenan, son de principal interés de estudio. Las enfermedades cardiovasculares (ECV) entran dentro de este grupo de las ECD, éstas se han relacionado estrechamente con los niveles plasmáticos de C-HDL, ya que diversos estudios epidemiológicos han mostrado que existe una relación inversa con las enfermedades coronarias, pues a menor concentración plasmática de C-HDL la predisposición a padecer ECV aumenta. Las concentraciones plasmáticas bajas de C-HDL son comunes en la población hispana y en población mexicana mestiza. En México, la HA, la DT2, obesidad e Hipertensión, son enfermedades que de acuerdo a las encuestas de salud han ido en aumento y se pronostica un aumento exponencial en los próximos años.

El estudio inicial donde se evaluó el efecto de la variante R230C en la población mexicana mestiza adulta, mostró la importancia de esta variante a nivel metabólico, sobre todo en la modulación de los niveles plasmáticos de C-HDL, dislipidemia que caracteriza a esta población y que se ha sugerido se debe a la herencia amerindia. Este trabajo dejó varias interrogantes por resolver. Inicialmente mediante un estudio de caso-control se confirmará el efecto de la variante R230C con la DT2, ya que se trata de una enfermedad multifactorial y de gran incidencia en la población mexicana. Debido a que la población mexicana es heterogénea, principalmente conformada de indígenas americanos y españoles y debido a que uno de los principales confusores en los estudios de asociación caso-control es la mezcla étnica, será necesario realizar ensayos para el ajuste por mezcla étnica. Cuando las variantes se encuentran en DL, pueden no ser las causantes del efecto, por lo que será necesario evaluar si la variante R230C se encuentra en DL con alguna otra variante que se localice en bloques distintos.

El tiempo de exposición a ambientes obesogénicos puede influir en los niveles plasmáticos de C-HDL, es por ello que se analizará el efecto de la variante R230C

con los niveles de C-HDL en población pediátrica, ya que se trata de una población con un tiempo de exposición menor a factores obesogénicos. Debido a que las HDL son partículas heterogéneas y se encuentra reportado que mutaciones en la proteína ABCA1 alteran la estructura de las HDL, cambiando la distribución de las subfracciones, se evaluará en un subgrupo de la población pediátrica el efecto de la variante R230C, en la distribución de las subfracciones de las HDL.

El estudio en población mexicana adulta, al igual que estudios en otras poblaciones han sugerido la posible exclusividad de la variante R230C en la población amerindia y poblaciones derivadas de esta. En base a ello, en el presente trabajo mediante un estudio a gran escala que incluye poblaciones indígenas de América y de otros continentes, evaluamos la presencia y el efecto de la variante R230C en estas poblaciones. Por otro lado, debido al marcado efecto que la variante R230C ha presentado a nivel clínico en los distintos escenarios y los datos reportados por los distintos estudios *in silico*, donde se sugiere que R230C tiene un efecto funcional, se decidió realizar estudios funcionales *in vitro*, utilizando células transfectadas con la variante. Además, mediante secuenciación de la región codificante se buscarán variantes que pudieran estar en DL con R230C y que pudieran ser las responsables de los efectos clínicos. Por último, mediante herramientas bioinformáticas se realizaron análisis específicos para probar la evidencia de selección positiva de la variante R230C.

## **6. Hipótesis**

Existen variantes funcionales del gen ABCA1, que contribuyen a la modulación de los niveles plasmáticos de C-HDL y otras comorbilidades en la población mexicana.

## **7. Objetivo General**

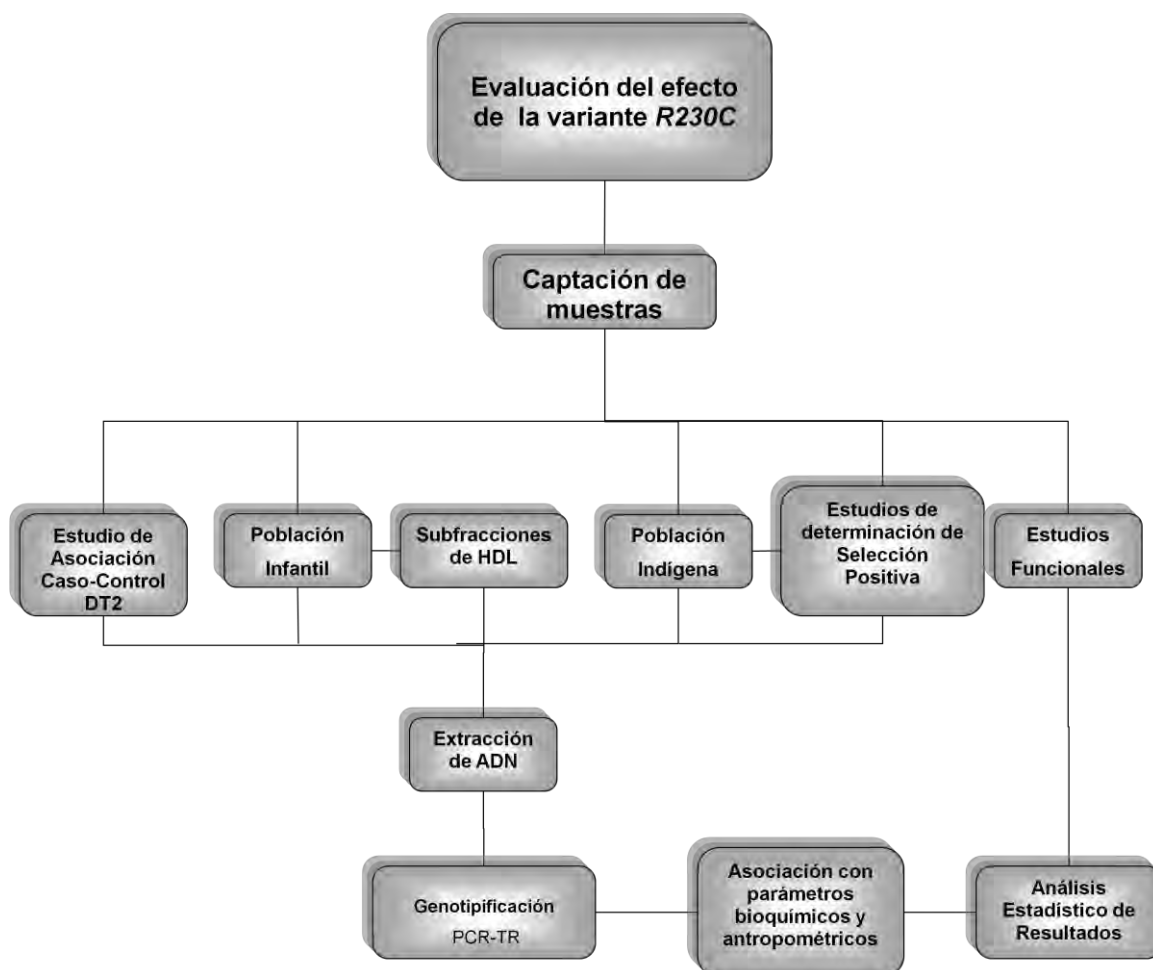
Evaluar los efectos de la variante R230C del gen ABCA1, sobre los niveles plasmáticos de C-HDL y otras comorbilidades, en distintos escenarios de la población mexicana.

### **7.1 Objetivos particulares**

1. Evaluar el efecto de la variante R230C del gen ABCA1 en la DT2.
  - a. Identificar variantes en DL con R230C, mediante el análisis de haplotipos ABCA1.
  
2. Evaluar el efecto de la variante R230C del gen ABCA1, en la modulación de los niveles plasmáticos de C-HDL en población pediátrica.
  - a. Evaluar el efecto de la variante R230C en el tamaño y distribución de las subfracciones de HDL.
  
3. Evaluar el efecto de la variante R230C del gen ABCA1, en la modulación de los niveles plasmáticos de C-HDL en población indígena
  - a. Evaluar el efecto funcional de la variante R230C mediante la generación de células transfectadas.
  - b. Identificar variantes en desequilibrio de ligamiento con R230C, mediante la secuenciación completa del gen ABCA1.
  - c. Evaluar el proceso de selección positiva de la variante R230C.

La evaluación de estos objetivos particulares se discutirá de manera independiente en tres secciones, ya que abarcaron la publicación de trabajos independientes.

## 8. Diseño experimental



## 9. Estudio de asociación con DT2

### 9.1 Sujetos

Los individuos incluidos en el presente estudio son mexicanos mestizos por lo menos en tres generaciones, no relacionados. Los participantes firmaron carta de consentimiento informado. Se aplicó un cuestionario estandarizado que incluye datos

de peso, altura, circunferencia de cintura y presión sanguínea. Las muestras fueron captadas por nuestro grupo de investigación multidisciplinario, que se conforma por personal especializado para cada área.

Este estudio fue aprobado por el comité de ética del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) y por los comités de ética de los grupos de estudio de los colaboradores.

## **9.2 Estudio caso-control de DT2**

El estudio inicial comprendió un grupo de 244 individuos diabéticos, los cuales fueron pacientes de tres instituciones médicas de la ciudad de México, con una edad de diagnóstico entre 20 y 80 años. El diagnóstico de DT2 se hizo de acuerdo al criterio de la Organización Mundial de Salud (Acosta, Affolder et al. 2003). El grupo de controles comprendió un grupo de 202 individuos, de los cuales 68 individuos fueron seleccionados de las muestras del estudio previo (Villarreal-Molina et al 2007). El rango de edad del grupo control fue de 50 a 80 años, se consideró la inclusión de personas mayores de 50 años con la finalidad de reducir la probabilidad de incluir individuos que desarrollen DT2 a una edad más temprana. Los criterios de inclusión fueron; no presentar DT2, no antecedentes familiares de DT2 en segundo grado y glucosa plasmática en ayunas  $\leq$  a 100 mg/dL.

Se realizó una réplica del estudio para comprobar la asociación en un grupo de muestras independientes. Este estudio consistió en 244 individuos con DT2 y 225 controles con edad de 45 a 65 años. Los parámetros de inclusión fueron los mismos que en el primer grupo de estudio. Estas muestras fueron previamente colectadas en el Centro Médico Siglo XXI, del Instituto Mexicano del Seguro Social (Parra, Cameron et al. 2007). Se usaron los mismos criterios de inclusión que en el primer grupo de análisis.

### **9.2.1 Mediciones antropométricas y bioquímicas**

Las mediciones bioquímicas de todas las muestras fueron realizadas en el Departamento de Endocrinología y Metabolismo de Lípidos del INCMNSZ, el cual cuenta con la certificación del Collage of American Pathologists. Se utilizaron métodos comerciales estandarizados. La determinación del perfil de lípidos (concentraciones plasmáticas de colesterol total y triglicéridos) se realizó con pruebas enzimáticas, al igual que para glucosa y creatinina. Las concentraciones de ApoA1 en plasma se midieron mediante nefelometría. La definición de DT2 e hipotalipoproteinemia se hizo de acuerdo a los criterios de la American Diabetes Association and National Cholesterol Program (NCEP, ECDCDM 2003, NCEP 2001).

### **9.2.2 Genotipificación de SNPs**

Se extrajo ADN genómico de leucocitos de sangre periférica mediante la técnica de fenol-cloroformo y el kit de Qiagen (Qiagen Inc., Chatsworth, CA, U.S.A.) para cada una de las muestras, se verificó la calidad del mismo mediante gel de agarosa, se cuantificó en NanoDrop® ND-100 v 3.5.2. Spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc., USA) y se diluyó la muestra a una concentración de 10 ng/μL. Una vez preparada la muestra a esta concentración se procedió al ensayo de PCR tiempo real.

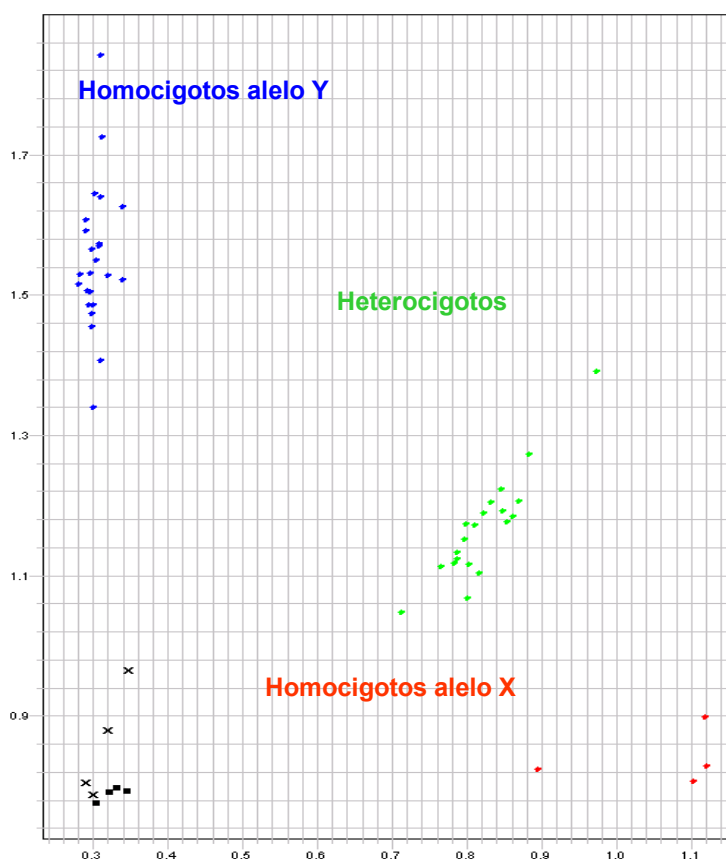
**Tabla 2.** SNPs analizados en la evaluación del efecto de la variante R230C en DT2.

Análisis	Población de análisis	SNP	Cromosoma	Posición
Efecto R230C	DT2	rs9282541 (R230C)	9	106660656
Análisis de Haplotipos (Haploview)	DT2	rs2000069	9	106675690
		rs2230806 (R219K)	9	106660688
		rs9282541 (R230C)	9	106660656
		rs2487037	9	106657158
		rs3818689	9	106634837
Análisis de Ancestría (ADMIXMAP)	DT2	rs4884	19	50501875
		rs2695	9	82074397
		rs17203	19	76407961
		rs2862	15	32932845
		rs3340	5	153812060
		rs722098	21	15607469
		rs203096	17	47366768
rs223830	16	56009472		
		rs1800498	11	112796798
		rs281478	2	46253915

El SNP rs9282541 (R230C) y los distintos polimorfismos utilizados en este trabajo (Tabla 2) fueron genotipificados usando sondas TaqMan o por el método KASPar. Estas sondas tienen la capacidad de medir la producción de productos de PCR mediante un sistema de sondas marcadas mediante dos fluoróforos que son identificados como VIC y FAM. Uno de los fluoróforos se localiza en el extremo 3' de la cadena de ADN y una molécula llamada quencher se localiza en el extremo 5' bloqueando la emisión de la fluorescencia. Las sondas híbridas son diseñadas de manera específicas para cada SNP. Durante la fase de extensión de la reacción de



PCR la ADN polimerasa, rompe la sonda hibridada en el ADN, separando el fluoróforo del quencher, emitiendo la fluorescencia de una de las sondas (homocigoto) o de ambas (heterocigoto). Si la fluorescencia detectada proviene del fluoróforo VIC, indicará que se trata de un homocigoto para el alelo X, si el fluoróforo fue FAM indicará que es un homocigoto para el alelo Y, y si fluorescen ambos fluoróforos se trata de un heterocigoto. Posteriormente mediante la discriminación alélica (proceso que detecta en una muestra dos variantes de la secuencia de un único nucleótido), se determinó el genotipo de la muestra (Figura 10) (Yvan-Charvet, Pagler et al. 2010). Estas reacciones se llevan a cabo en un equipo ABI Prism 7900HT de Applied Biosystem. Para cada grupo de estudio y SNP se realizaron genotipificaciones de 36 muestras por duplicado y la genotipificación excedió el 95 %. Se determinó que los SNPs analizados se encontraran en equilibrio de Hardy-Weinberg.



**Figura 10.**Imagen de discriminación alélica en PCR tiempo real.

El sistema KASPar se basa en la capacidad de la DNA Taq polimerasa para discriminar el polimorfismo de interés y sin necesidad de hibridar las sondas. Utiliza dos alelos específicos competitivos uno para el forward y un primer común en el reverso, el sistema consiste en el poder de discriminación de un nueva forma de alelo específico competitivo para el PCR que determina el alelo de un locus específico ([http://www.kbioscience.co.uk/reagents/KASP\\_manual.pdf](http://www.kbioscience.co.uk/reagents/KASP_manual.pdf))

### **9.2.3 Análisis de haplotipos**

Con la finalidad de evaluar el DL de variante R230C con otros SNPs. En la muestra inicial para el análisis de caso-control de DT2, se analizaron 4 SNPs (Tabla 2), los cuales se encuentran localizados en tres bloques distintos al que contiene la variante R230C. Para este análisis se utilizó el programa Haploview (versión 3.2).

### **9.2.4 Análisis de Ancestría**

Debido a que la heterogeneidad de la población mexicana, que consiste en una mezcla étnica principalmente entre indígenas americanos y españoles. Se utilizó un análisis para el ajuste por ancestría, con la finalidad de descartar el posible efecto de estratificación poblacional en la asociación del genotipo de R230C y DT2. Se analizaron 10 marcadores ancestrales para el primer grupo de estudio en DT2 (Tabla 2). Estos marcadores distinguen principalmente entre amerindios y descendientes de europeos ( $\delta > 0.44$ ) (Bonilla, Parra et al. 2004; Choudhry, Coyle et al. 2006). La genotipificación de estos SNPs se hizo en Kbiosciences (Hertfordshire, Reino Unido), utilizando un sistema KASP ([http://www.kbioscience.co.uk/reagents/KASP\\_manual.pdf](http://www.kbioscience.co.uk/reagents/KASP_manual.pdf)). El análisis se hizo con el programa ADMIXMAP (Hoggart, Parra et al. 2003; Parra, Cameron et al. 2007). El DL entre los SNPs fue calculado por correlación directa ( $r^2$ ) y los haplotipos fueron inferidos para cada individuo usando el programa Haploview (versión 3.2) (Barrett, Fry et al. 2005).

### **9.2.5 Análisis estadístico**

Se usó la prueba de t-student para comparar las diferencias fenotípicas entre dos grupos de análisis. Para los análisis se probaron distintos modelos (dominante, recesivo y aditivo), debido a que el número de homocigotos C230C fue reducido, se usó un modelo dominante. Las diferencias en los parámetros bioquímicos y antropométricos relacionados con el genotipo R230C fueron analizados mediante un análisis de regresión lineal múltiple. Se usó un análisis de regresión logística para evaluar la asociación del genotipo con la DT2, ajustando por edad, género, IMC o las variables apropiadas cuando fue apropiado. Estos análisis se hicieron con el paquete estadístico SPSS v15.0 (Chicago, IL, USA). Las variables que no siguieron una distribución normal fueron transformadas por un logaritmo para el análisis, como fue el caso de los triglicéridos y el colesterol total. Se consideró como diferencia significativa valores de  $P < 0.05$ . Los datos son presentados como media (desviación estándar).

### **9.3 Resultados**

En la tabla 3 se muestran las diferencias de los datos antropométricos y bioquímicos de casos (DT2) y controles del grupo de estudio inicial, como era de esperarse la diferencia fue evidente, sobre todo en los parámetros metabólicos (IMC, perfil lipídico, etc.).

**Tabla 3.** Datos bioquímicos y antropométricos del primer grupo de estudio.

Parámetros	Diabéticos	Controles	P
N	244	202	
Hombres (%)	31.6	30.2	NS
Edad (años)	53.9 ( 12.6)	60.5 (9.4)	$9.9 \times 10^{-10}$
Edad de diagnóstico (años)	45.8 (10.7)	NA	
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	28.4 ( 4.8)	27.4 ( 4.3)	0.017
Glucosa (mg/dL)	176.4 (77.4)	82.2 (10.8)	$5.1 \times 10^{-45}$
Insulina (pmol/L)	71.1 (54.6)	51.2 ( 40.6)	$3.7 \times 10^{-5}$
HbA1c (%)	8.9 (2.3)	NA	-
HOMA-IR	4.9 ( 5.1)	1.9 (1.5)	$5.5 \times 10^{-29}$
HOMA-β	60.9 (53.2)	140.3 (161.9)	$2.9 \times 10^{-21}$
C-HDL (mg/dL)	42.9 (11.7)	50.7 (15.6)	$4.8 \times 10^{-8}$
ApoA1	132.7(25.8)	147.4 (22.9)	$3.3 \times 10^{-6}$

Los datos presentados son medias (desviación estándar). Datos ajustados por edad e IMC, índice de masa corporal; C-HDL, colesterol de lipoproteínas de alta densidad; HOMA-IR y HOMA-β, modelo de homeostasis para la valoración de la resistencia a la insulina y de la función de las células β.

Al analizar el efecto de la variante R230C en la población diabética (Tabla 4), se observó que los individuos portadores de la variante R230C/C230C presentaron una edad de diagnóstico menor que los R230R, esta diferencia fue significativa [47.0 (10.9) vs. 42.6 (9.3),  $P= 0.005$ ]. Un dato interesante fue la diferencia significativa en las concentraciones plasmáticas de insulina y hemoglobina glucosilada (HbA1c), en los diabéticos portadores de la variante de forma heterocigota u homocigota (R230C/C230C) vs. los homocigotos R230R ( $P= 0.011$  y  $0.015$ , respectivamente ajustando por edad, género, IMC, duración de la diabetes y

tratamiento). La insulina presentó una menor concentración plasmática en los portadores de la variante R230C/C230C, sugiriendo que los portadores tienen una menor secreción de insulina. Por el contrario, la hemoglobina glicosilada fue mayor en los portadores de la variante R230C/C230C, lo cual podría deberse a un pobre control de la diabetes en estos sujetos. Otro dato interesante es que aún cuando la diferencia no alcanzó significancia, los niveles plasmáticos de C-HDL son menores en los individuos portadores de la variante R230C, efecto observado previamente en la población general adulta (Villarreal-Molina et al. 2007).

**Tabla 4.** Efecto de la variante R230C del gen ABCA1 en población diabética mexicana.

Parámetros	R230R	R230C/C230C	<i>P</i>
N	184	60	
Hombres (%)	29.9	36.7	0.329
Edad(años)	54.6 (12.4)	51.7 (13.1)	0.117
Edad de diagnóstico (años)	47.0 (10.9)	42.6 (9.3)	0.005
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	28.3 ( 4.8)	28.9 (4.7)	0.337
Glucosa (mg/dL)	176.4 (77.4)	176.4 (81.0)	0.891
Insulina (pmol/L)	75.2 (59)	58.3 ( 35.3)	0.011
HbA1c (%)	8.7 (2.2)	9.9 (2.5)	0.015
HOMA-IR	5.5 (5.9)	4.3 (2.9)	0.065
HOMA β	62.3 (53.9)	57.1 (51.4)	0.226
HDL-C mg/dL	42.9 (11.7)	39.0 (11.7)	0.941
ApoA1	134 (27.1)	125 (22.3)	0.924
Tratamiento (%)			
Sin tratamiento	18 (13.4)	9 (20.9)	
Dieta más ejercicio	7 (5.2)	1 (2.3)	
Hipoglucemiante oral	95 (70.1)	29 (67.4)	
HGO más insulina	11 (8.2)	3 (6.9)	
Insulina	3 (2.2)	1 (2.3)	

Los datos presentados son medias (desviación estándar) o (%). Los datos de *P* fueron ajustados por edad, género, IMC, duración de diabetes y tipo de tratamiento, cuando fue necesario. IMC, índice de masa corporal; C-HDL, colesterol de lipoproteínas de alta densidad; HOMA-IR y HOMA-β, modelo de homeostasis para la valoración de la resistencia a la insulina y de la función de las células β; HGO hipoglucemiante oral.

El análisis caso vs. control para DT2 del estudio inicial, mostró que la frecuencia de los genotipos R230C/C230C fue mayor en los individuos diabéticos (24.6%) que en los controles, donde la frecuencia fue del 11.4 % (RM 2.501, 95% IC 1.476-4.238, *P* = 0.001) (Tabla 5). Esta asociación se mantuvo aún después del ajuste por mezcla

étnica ( $P = 0.008$ ), descartando este posible confusor y confirmando la asociación con la DT2. Con base en la marcada disminución en la edad de diagnóstico de los portadores de la variante R230C/C230C, decidimos estratificar la muestra basándonos en la edad de diagnóstico, sugiriendo: DT2 de inicio temprano y DT2 de inicio tardío. La clasificación de DT2 de inicio temprano abarcó aquellos individuos cuya edad de diagnóstico fuera  $\leq$  a 45 años ( $n = 121$ ). Esta clasificación se determinó de acuerdo a la media de edad de diagnóstico de los individuos con genotipo R230C/C230C y por lo reportado en estudios previos donde han tomado 45 años, como corte de edad para clasificar DT2 de inicio temprano (Frayling, Wiltshire et al. 2003; Flavell, Ireland et al. 2005). En la tabla 5 se muestran los resultados, se observó una ligera tendencia ( $P = 0.149$ ) de la variante R230C con la DT2 de inicio tardío (mayores de 45 años,  $n = 123$ ). Por el contrario, se observó una marcada asociación de la variante R230C con la DT2 de inicio temprano (RM 3.766, 95% IC 2.121 -6.748  $P = 3.3 \times 10^{-6}$ ). El efecto se conservó aún después del ajuste por mezcla étnica ( $P = 8.1 \times 10^{-6}$ ).

**Tabla 5.** Análisis inicial del efecto de la variante R230C en la DT2.

Análisis inicial	Genotipo n (%)		OR	P
	R230R	R230C/C230C		
Individuos con DT2 (n=244)	184 (75.4)	60 (24.6)	2.501	0.001
DT2 Inicio Temprano (n=121)	81 (66.9)	40(33.1)	3.776	3.3 x 10 <sup>-6</sup>
DT2 Inicio Tardío (n=123)	103 (83.7)	20 (16.3)	1.619	0.149
Sujetos No Diabéticos (n=202)	179 (88.6)	23 (11.4)		

Los datos presentados son n (%). Los valores de  $P < 0.001$  y ORs fueron calculados con un análisis de regresión logística usando un modelo dominante (R230R vs. R230C/C230C) ajustando por edad e IMC. La edad de diagnóstico de DT2 de inicio temprano fue  $\leq 45$  años; la edad de diagnóstico para DT2 de inicio tardío fue  $> 45$  años.

Debido a la marcada asociación de la variante R230C/C230C con la DT2, se decidió hacer una réplica del estudio en una muestra independiente, con la finalidad de comprobar la asociación. Esta réplica incluyó población que había sido previamente colectada en el IMSS (Parra, Cameron et al. 2007). Como se puede observar en la tabla 6, los resultados fueron similares a los reportados en el primer grupo de estudio. La frecuencia de la variante R230C al igual que en el análisis inicial, fue más alta en los individuos con DT2 (24.8 %), que en los controles (13.8 %), (RM 2.098, 95% IC 1.255-3.507,  $P = 0.005$ ). Sin embargo, la asociación con DT2 de inicio temprano fue menos evidente que en el primer estudio (OR 2.190, 95% IC 1.258 - 3.732,  $P = 0.004$ ) y también se observó asociación con la DT2 de inicio tardío (RM 1.935, 95% IC 1.258 -3.732,  $P = 0.032$ )



**Tabla 6.** Réplica del análisis del efecto de la variante R230C en la DT2

Réplica (IMSS)	Genotipo n (%)		OR	P
	R230R	R230C/C230C		
Individuos con DT2 (n=242)	182 (75.2)	60(24.8)	2.098	0.005
DT2 Inicio Temprano (n=119)	88 (73.9)	31(26.1)	2.190	0.004
DT2 Inicio Tardío (n=123)	94 (76.4)	29(23.6)	1.935	0.032
Sujetos No Diabéticos (n=225)	194 (86.2)	31(13.8)		

Los datos presentados son n (%). Los valores de P <0.001 y RMs fueron calculados con un análisis de regresión logística usando un modelo dominante (R230R vs. R230C/C230C) ajustando por edad e IMC. La edad de diagnóstico de DT2 de inicio temprano fue ≤ 45 años: la edad de diagnóstico para DT2 de inicio tardío fue > 45 años.

Debido a que el efecto de la variante R230C en los estudios de muestras independientes fue el mismo, se decidió hacer un análisis combinado (Tabla 7). Se observó que la asociación tanto a la DT2 (RM 2.097, 95% IC,  $P= 7.6 \times 10^{-6}$ ) como a la DT2 de inicio temprano fue más evidente (RM 2.757, 95% IC,  $P= 9.4 \times 10^{-8}$ ). Los resultados muestran que los individuos que presentan la variante R230C tienen aproximadamente 2 veces mayor riesgo de padecer DT2 y 2.8 veces más de que sea DT2 de inicio temprano.

**Tabla 7.** Análisis combinado del Efecto de la variante R230C en la DT2.

Análisis Combinado	Genotipo n (%)		OR	P
	R230R	R230C/C230C		
Individuos con DT2 (n=244)	366 (75.3)	120(24.7)	2.097	7.6 x10 <sup>-6</sup>
DT2 Inicio Temprano (n=121)	169 (70.4)	71(29.6)	2.757	9.4 x10 <sup>-8</sup>
DT2 Inicio Tardío (n=123)	197 (80.1)	49(19.9)	1.826	0.010
Sujetos No Diabéticos (n=202)	373 (87.4)	54(12.6)		

Los datos presentados son n (%). Los valores de P <0.001 y ORs fueron calculados con un análisis de regresión logística usando un modelo dominante (R230R vs. R230C/C230C) ajustando por edad e IMC. La edad de diagnóstico de DT2 de inicio temprano fue ≤ 45 años; la edad de diagnóstico para DT2 de inicio tardío fue > 45 años.

Por otro lado, debido a la relevancia del efecto de la variante R230C se decidió hacer un análisis de haplotipos, para evaluar si la variante R230C es la responsable de dicho efecto o si presenta DL con 4 SNPs, 3 de ellos localizados en tres bloques distintos al que contiene R230C. Las frecuencias de los alelos menos frecuentes de los SNPs utilizados para este análisis, así como los datos de ubicación se muestran en la tabla 8.

**Tabla 8.** Frecuencia de los alelos menos frecuentes de los SNPs utilizados para el análisis de DL con R230C

SNP	Posición	Región ABCA1	Alelo Mayor/Menor	Frecuencia del alelo menor
rs2000069	106675690	Intrón 5	C/T	0.380
rs2230806 (R219K)	106660688	Exón 7	G/A	0.327
rs9282541 (R230C)	106660656	Exón 7	C/T	0.097
rs2487037	106657158	Intrón 7	C/T	0.261
rs3818689	106634837	Intrón 18	G/C	0.054

La posición es de acuerdo a NT\_008470.18

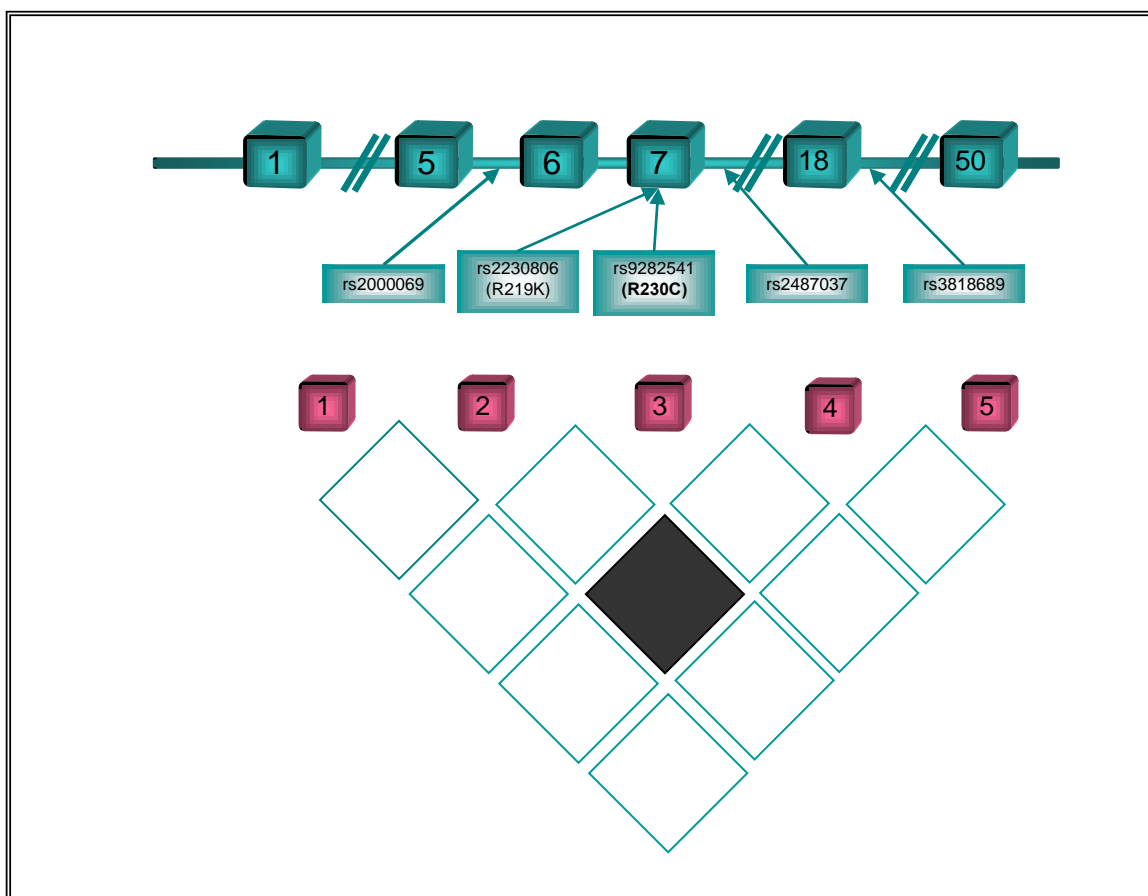
Las frecuencias alélicas del alelo menor, para todos los SNPs analizados no mostraron diferencia a excepción de R230C, ya que el alelo “C” es más frecuente en los individuos diabéticos que en los controles (0.131 vs. 0.056), esta diferencia fue significativa ( $P = 0.0002$ ) y se conserva aún después de la corrección por Bonferroni ( $P = 0.001$ )(Tabla 9).

**Tabla 9.** Frecuencias de alelo menor para los SNPs analizados en diabéticos y controles.

SNP	Frecuencias Alélicas		*P	†P
	DT2	Controles		
rs2000069	0.372	0.390	0.729	0.999
rs2230806 (R219K)	0.312	0.346	0.311	0.845
rs9282541 (R230C)	0.131	0.056	0.0002	0.001
rs2487037	0.256	0.267	0.585	0.998
rs3818689	0.056	0.052	0.772	0.999

Los valores de \*P son de DT2 con respecto al alelo de menor frecuencia; el valor de †P es después de la corrección de Bonferroni para los cinco SNPs.

El análisis de DL realizado con el programa Haploview mostró que la variante R230C no se encuentra en DL con los 4 SNP analizados (rs2000069, rs2230806 ó R219K, Rs2487037 y rs3818689), lo cual sugiere que la variante R230C es la responsable de la asociación con la DT2. Sin embargo, se encontró que el SNP rs2230806 ó R219K está en DL con rs2487037, ya que como se muestra en la figura 11, el rombo que correlaciona los dos SNP es más oscuro, indicado por un  $r^2 > 0.8$ .



**Figura 11.** Análisis para determinar bloques en desequilibrio de ligamiento (DL) con R230C, en el primer grupo de estudio. Localización genómica aproximada de cuatro SNPs (localizados en tres bloques distintos del gen ABCA1) analizados para determinar bloques en desequilibrio de ligamiento (DL) con R230C, en el primer grupo de estudio. No se encontró evidencia de DL de la variante R230C con los cuatro SNPs.

El análisis de haplotipos, mostró que el único haplotipo asociado a la DT2 es el que contiene la variante R230C (señalado más oscuro), ya que la diferencia fue significativa ( $P = 0.0004$ ), y aun después del ajuste por Bonferroni la asociación se conservó ( $P = 0.002$ ) (Tabla 10).

**Tabla 10.** Asociación de haplotipos con la DT2 en la muestra inicial.

Haplotipo	rs2230806 (R219K)	rs9282541 (R230C)	rs2487037	rs3818689	Proporción con DT2	Proporción sin DT2	<i>P</i>	<sup>†</sup> <i>P</i>
1	G	C	C	G	0.506	0.555	0.152	0.561
2	A	C	T	G	0.249	0.268	0.556	0.983
3	A	C	C	G	0.061	0.074	0.448	0.949
<b>4</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>G</b>	<b>0.128</b>	<b>0.056</b>	<b>0.0004</b>	<b>0.002</b>
5	G	C	C	C	0.052	0.047	0.767	0.999

DT2, diabetes tipo 2. El valor <sup>†</sup>*P* con corrección de Bonferroni.

## 9.4 Discusión

### 9.4.1 Efecto de R230C en la DT2

Es sabido que el colesterol juega un papel importante en la homeostasis de la glucosa, ya que es esencial para la exocitosis normal de la insulina. Recientemente se ha sugerido que la acumulación de colesterol en las células  $\beta$ -pancreáticas causa lipotoxicidad, impidiendo el correcto funcionamiento de las células para la liberación de insulina (Yao and Tabas 2001; Hao, Head et al. 2007). El tratamiento de células  $\beta$  con inhibidores de la síntesis de colesterol mostró una disminución en la secreción de insulina (Xia, Xie et al. 2008). Por otro lado, la disminución de colesterol en la membrana con metil- $\beta$ -ciclodextrina (absorbente selectivo para colesterol de la membrana), mostró efecto sobre la función y distribución de los canales de iones en la membrana plasmática, además de inhibir la exocitosis y promover la liberación de gránulos de insulina (Xia, Gao et al. 2004). Concentraciones altas del inhibidor metil- $\beta$ -ciclodextrina, han mostrado potenciar la exocitosis, lo cual sugiere que concentraciones óptimas de colesterol en la membrana son necesarias para la exocitosis normal de gránulos de insulina y liberación de nutrientes estimulados por la insulina (Xia, Gao et al. 2004). En base a esto, se han realizado distintos estudios en modelos animales con la finalidad de evaluar el papel que desempeña ABCA1,

uno de los transportadores de colesterol más importante y mediador de la biogénesis de las partículas HDL (Tang and Oram 2009). El modelo de ratón knockout para *Abca1* mostró al igual que en los individuos con la enfermedad de Tangier, una marcada disminución plasmática de C-HDL, pero un funcionamiento normal de las células  $\beta$ -pancreáticas y una secreción normal de insulina. A diferencia de ello, el ratón con la delección específica del gen *Abca1* en células  $\beta$  pancreáticas, no mostró disminución en los niveles de C-HDL, pero si una disminución marcada en el eflujo de colesterol en la células  $\beta$ -pancreáticas, una intolerancia marcada a la glucosa y una disminución en la secreción de insulina (Brunham, Kruit et al. 2007), lo cual coincide con los hallazgos reportados en el presente trabajo, donde los individuos diabéticos portadores de la variante R230C del gen ABCA1, presentan una concentración menor de insulina plasmática, que podría ser explicada por los mecanismos que se mencionan con anterioridad.

La variante R230C del gen ABCA1 ha mostrado asociación a distintos parámetros del síndrome metabólico, en especial a menores niveles plasmáticos de C-HDL (Villarreal-Molina, Aguilar-Salinas et al. 2007). Este fenotipo de C-HDL bajo es un evento frecuente en sujetos diabéticos, que desencadena en aterosclerosis, siendo una de las principales causas de muerte en esta enfermedad (von Eckardstein, Schulte et al. 2000; Semenkovich 2006). Se ha reportado que las partículas HDL presentan un efecto protector en las células  $\beta$ -pancreáticas (Roehrich, Mooser et al. 2003), al igual que lo hacen en los macrófagos (Yvan-Charvet, Pagler et al. 2010). Las partículas LDL inhiben la secreción de insulina e induce apoptosis de las células  $\beta$ -pancreáticas (Cnop, Hannaert et al. 2002), (Rutti, Ehses et al. 2009). En contraste, las partículas HDL inhiben la apoptosis inducida por la interleucina-1 $\beta$  o por la glucosa (Rutti, Ehses et al. 2009). Sin embargo, en la población diabética el efecto de la variante R230C sobre los niveles plasmáticos de C-HDL no fue tan evidente como en la población general (Villarreal-Molina, Aguilar-Salinas et al. 2007), aún cuando los portadores del cambio presentaron menor concentración plasmáticas de C-HDL que los homocigotos R230R la diferencia no fue significativa. Nuestros resultados coinciden con los observados en el modelo del ratón con la delección específica del

gen *Abca1* en células  $\beta$  pancreáticas, ya que las concentraciones plasmáticas de C-HDL fueron normales (Brunham, Kruit et al. 2007). Esto podría explicarse por la acción compensadora de otros transportadores de colesterol como lo es ABCG1 (Kennedy, Barrera et al. 2005), el cual se sobre expresa cuando ABCA1 es deficiente y se ha sugerido presentan un efecto sinérgico (Yvan-Charvet, Ranalletta et al. 2007).

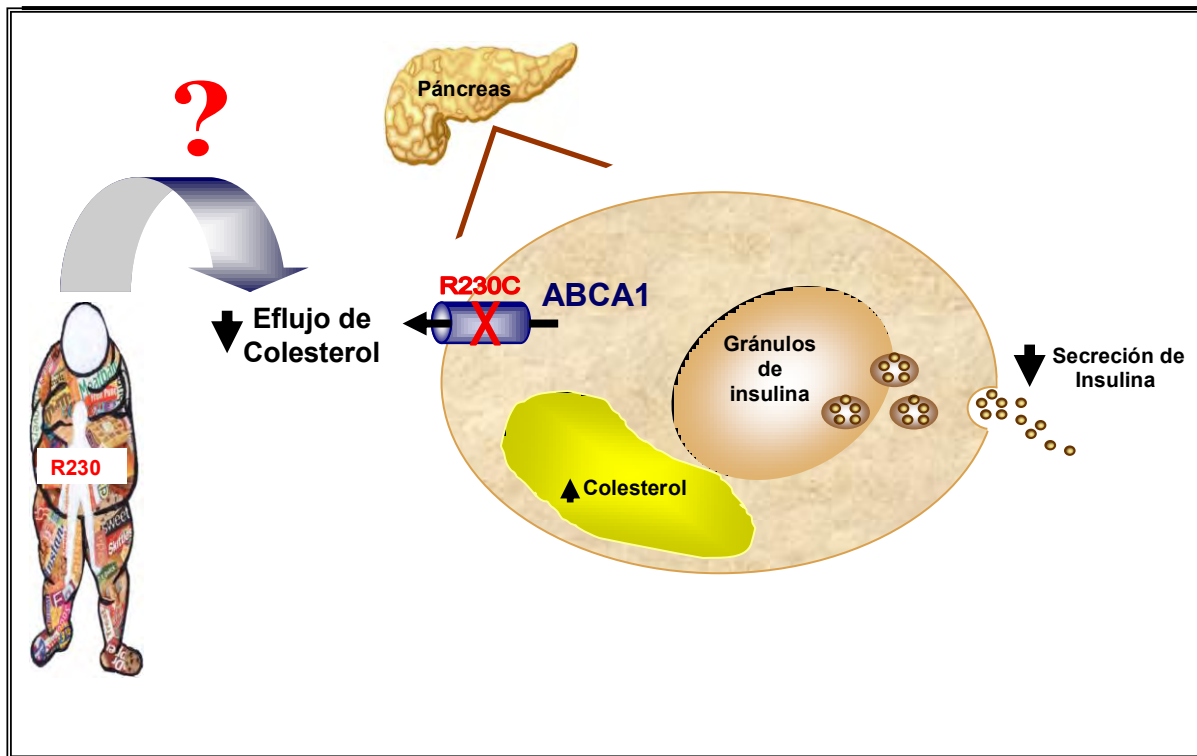
Recientemente un estudio en población Neerlandesa mostró mediante la prueba de tolerancia oral a la glucosa ó OGTT (por sus siglas en inglés), que en individuos no diabéticos con mutaciones de Tangier de manera heterocigota se ve afectada la secreción de insulina, sin presentar resistencia a la insulina, ubicando al gen ABCA1 como una parte importante en la funcionalidad de las células  $\beta$ -pancreáticas (Vergeer, Brunham et al. 2010). Estos estudios concuerdan con nuestros resultados del efecto de la variante R230C en la población mexicana sobre los individuos diabéticos, ya que tienen una marcada disminución de la insulina plasmática y la marcada asociación de los portadores de la variante a la DT2 y en especial con la DT2 de inicio temprano. Uno de los principales confusores en los estudios caso vs. control es la mezcla étnica, característica principal de la población mexicana mestiza. Es por ello, que realizamos un ajuste de mezcla étnica con el análisis de 10 marcadores ancestrales. El resultado de asociación de la variante R230C con la DT2 se conservó aún después del ajuste por mezcla étnica.

En este estudio fue posible descartar el posible DL de la variante R230C, con otras variantes del gen ABCA1 localizadas en tres bloques distintos al que contiene R230C. Por otro lado, los estudios de haplotipos señalaron como principal haplotipo asociado a la DT2, al haplotipo que contenía la variante R230C. Esto nos permitió sugerir inicialmente que la variante R230C era la responsable de la asociación y que tenía un efecto a nivel funcional. Si el efecto funcional de la variante R230C causara una disminución en la función de la proteína, posiblemente podría haber una acumulación de colesterol en células  $\beta$ -pancreáticas y podría causar por lipotoxicidad inhibición en la secreción de insulina (Figura 12), lo cual podría explicar



que los individuos portadores de la variante R230C de manera homocigota u heterocigota presentan una menor cantidad de insulina plasmática, al igual que el modelo de ratón con delección específica de Abca1 (Brunham, Kruit et al. 2007).

Estos estudios tanto *in vitro* como *in vivo* han demostrado que el transportador ABCA1 desempeña un papel importante en la homeostasis de la glucosa, además que variantes como R230C pueden tener un papel importante al interferir en el funcionamiento óptimo de la proteína, por lo que será necesario evaluar el papel de esta variante en células  $\beta$ -pancreáticas.



**Figura 12.** Mecanismos propuestos del efecto de R230C en la DT2. Basándonos en el modelo del ratón (Brunham, Kruit et al. 2007), se propone que la variante R230C podría afectar la capacidad de la proteína ABCA1 y disminuir el eflujo de colesterol en células  $\beta$  pancreáticas, con ello aumentar la cantidad interna de colesterol. Todo esto causaría lipotoxicidad en la célula, disminuyendo la secreción de insulina y llevando posteriormente al desarrollo de la DT2. Este mecanismo podría verse aumentado con la obesidad.

Estos resultados fueron publicados en la revista *Diabetes* (Villarreal-Molina, Flores-Dorantes et al. 2008).

## **10. Efecto de la variante R230C en población pediátrica**

### **10.1 Sujetos**

La captación de muestras en esta población, fue la misma que se señala en el inciso 8.1. Debido a que son individuos menores de edad, se contó con la autorización del padre o tutor para ser incluidos en este estudio. Esta población incluyó 1253 individuos pediátricos cuyo rango de edad fue de 6 a 15 años. Las muestras fueron colectadas en la Convivencia infantil 2008, de la Secretaría de Salud y en escuelas secundarias de la ciudad de México (esta población fue previamente analizada) (Medina-Urrutia, Juárez-Rojas et al. 2008). Ninguno de los participantes presentó evidencia clínica de problemas de diabetes, tiroides, o enfermedades renales o hepáticas.

#### **10.1.1 Mediciones antropométricas y bioquímicas**

Las mediciones bioquímicas de todas las muestras fueron de las muestras de la convivencia infantil se realizaron como se indica en el inciso 8.1. Las mediciones bioquímicas de la población colectada en escuelas secundarias de la ciudad de México fueron realizadas en el Departamento de Endocrinología del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez (INCICH) (Medina-Urrutia, Juárez-Rojas et al. 2008).

#### **10.1.2 Genotipificación de SNPs.**

La extracción de ADN y la genotipificación del SNP rs9282541 (R230C), se realizó como se indica en el inciso 8.2.2. .

#### **10.1.3 Clasificación para desarrollo de pubertad**

El desarrollo sexual se determinó con el método descrito por Tanner (Tanner 1962). En el caso de las niñas el dato de menarca también fue considerado.

#### **10.1.4 Población con mediciones de subfracciones de HDL**

Las subfracciones de las partículas HDL se midieron en una subpoblación de la población pediátrica que consistió en 81 individuos, agrupados por edad, género e

IMC, partiendo del genotipo (32 homocigotos R230R, 32 heterocigotos R230C y los 17 homocigotos disponibles para C230C).

#### **10.1.5 Medición de subfracciones de HDL**

Se separaron las HDL del plasma por ultra centrifugación. Posteriormente, se llevó a cabo una electroforesis en gradiente 4-30% de gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes. La cantidad de proteína total se cuantificó por una modificación del método de Lowry. Las bandas de proteína HDL se tiñeron con azul de Coomassie R-250 y el diámetro promedio se determinó con un densitómetro GS-670 Bio-Rad, utilizando el software de análisis molecular (Bio-Rad Labs., CA.). La distancia de migración en cada gel se calculó con una curva estándar de proteínas de alto peso molecular (tiroglobulina 17.0 nm, ferritina 12.2 nm, catalasa 10.4 nm, lactato deshidrogenasa 8.1 nm y albúmina 7.1 nm; Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK), con la función de distancia de migración relativa. La proporción relativa para cada subfracción de HDL se estimó de la siguiente manera:

**Tabla 11.** Subfracciones de HDL.

Subfracción HDL	Tamaño (nm)
HDL3 <sub>c</sub>	7.21 – 7.76
HDL3 <sub>b</sub>	7.76 – 8.17
HDL3 <sub>a</sub>	8.17 – 8.77
HDL2 <sub>a</sub>	8.77 – 9.71
HDL2 <sub>b</sub>	9.71 – 12.93

El coeficiente de variación de cada subfracción fue menor al 10 %. Los resultados se expresan como el porcentaje que representa el área bajo la curva de cada subfracción de apolipoproteína, tomando como referencia la sumatoria de las áreas de todas las apolipoproteínas-HDL. El tamaño de partícula se determinó por el promedio del tamaño de cada subclase (nm), multiplicado por el área relativa del

escaneo densitométrico. El coeficiente de variación de estas determinaciones fue menor al 1 %.

#### **10.1.6 Análisis estadístico**

Se usó la prueba de t-student para comparar las diferencias fenotípicas entre dos grupos de análisis. Para los análisis en los distintos escenarios se probaron distintos modelos (dominante, recesivo y aditivo), reportando mejores resultados el modelo aditivo. Las diferencias en los parámetros bioquímicos y antropométricos relacionados con el genotipo R230C fueron analizadas mediante un análisis de regresión lineal múltiple. Se usó un análisis de regresión logística para evaluar la asociación del genotipo con hipoalfalipoproteinemia, ajustando por edad, género, IMC o las variables apropiadas cuando fue apropiado. Estos análisis se hicieron con el paquete estadístico SPSS v15.0 (Chicago, IL, USA). Las variables que no siguieron una distribución normal fueron transformadas por un logaritmo para el análisis, como fue el caso de los triglicéridos y el colesterol total. La asociación del genotipo con la distribución de las subfracciones se hizo con un análisis de ANOVA para 3 grupos independientes. Se consideró como diferencia significativa valores de  $P < 0.05$ . Los datos son presentados como media (desviación estándar).

#### **10.1.7 Cálculos**

El IMC fue calculado como el peso en kilogramos dividido por la altura en metros cuadrados. El IMC z-score, fue calculado considerando edad y género específico para datos de referencia del IMC, como sugiere el Centro de Control y Prevención de enfermedades (Centers for Disease Control and Prevention) (Kuczmarski, Ogden et al. 2002). El porcentaje de grasa fue medido con el método de impedancia bioeléctrica (Quantum X impedance analyzer, RJL Systems, Detroit, MI).

### **10.2 Resultados**

Los datos antropométricos y bioquímicos de la población pediátrica se muestran en la tabla 14. No se observaron diferencias significativas.

**Tabla 12.** Datos antropométricos y bioquímicos de la población pediátrica.

Características	Población total	Niños	Niñas	*P
	(n = 1253)	(n = 595)	(n = 658)	
Edad (años)	11.5 (2.4)	11.4 (2.4)	11.5 (2.4)	0.458
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	21.6 (4.6)	21.5 (4.8)	21.7 (4.4)	0.393
IMC z-score	0.91 (0.94)	0.91 (1.0)	0.91 (0.87)	0.598
% grasa (n=596)	31.0 (11.1)	29.8 (12.4)	32.1 (9.6)	0.092
CT (mg/dL)	159.8 (30.7)	158.2 (30.7)	161.3 (30.7)	0.075
Triglicéridos(mg/dL)	113.6 (73.5)	111.3 (79.9)	115.7 (67.1)	0.279
C-HDL (mg/dL)	45.6 (11.0)	45.3 (11.0)	45.9 (10.9)	0.364
Relación CT/HDL-C	3.68 (1.06)	3.67 (1.08)	3.68 (1.04)	0.808
HA (%)	15.1	15.0	15.2	0.937 <sup>†</sup>

Los datos presentados son medias (desviación estándar) o (%). Los valores de \*P fueron calculadas con una prueba de t-student. <sup>†</sup>P se utilizó una prueba de X<sup>2</sup> de Pearson. IMC, índice de masa corporal; C-HDL, colesterol de lipoproteínas de alta densidad; CT, colesterol total; HA, hipoalfalipoproteinemia.

### 10.2.1 Asociación de la variante R230C con los niveles de C-HDL y otros rasgos metabólicos

La frecuencia del alelo ("C") o alelo de riesgo de la variante R230C en la población pediátrica fue de 0.10. Los individuos portadores de la variante R230C presentaron menor concentración plasmática en los niveles plasmáticos de C-HDL ( $P = 2.9 \times 10^{-8}$ ), observando un efecto de dosis, ya que los homocigotos (C230C) tuvieron menor concentración plasmática que los heterocigotos (R230C) y estos a su vez que los homocigotos comunes (R230R) [38.2 (9.4), 42.9 (11.0), 46.4 (10.9), respectivamente]. Este mismo efecto había sido previamente reportado en población adulta mexicana (Villarreal-Molina, Aguilar-Salinas et al. 2007). El colesterol total plasmático presentó el mismo comportamiento que los niveles de C-HDL, disminuyendo de acuerdo a la cantidad de copias del alelo de riesgo, la diferencia

fue significativa ( $P = 0.019$ ). Por lo contrario, los portadores del alelo de riesgo mostraron un incremento en los siguientes parámetros: factor de riesgo aterogénico (TC/C-HDL), IMC, IMC z-score y porcentaje de grasa ( $P = 0.001, 0.049, 0.032$  y  $0.039$ , estos datos fueron respectivamente ajustados por edad, género, IMC y Tanner).

También se evaluó el efecto de la variante R230C en la hipoalfalipoproteinemia (HA), observando nuevamente un efecto de dosis, ya que los portadores la variante de manera homocigota, es decir C230C, tiene mayor frecuencia de HA que los heterocigotos R230C, y a su vez los heterocigotos tienen una frecuencia mayor que los homocigotos comunes o R230C (24.9, 35.0 y 12.6 %, respectivamente, OR = 2.19, IC 95 % 1.60-2.99,  $P = 9.4 \times 10^{-7}$ ). Se observó que presentar la variante aumenta 2 veces el riesgo de presentar HA (Tabla 13).

**Tabla 13.** Efecto de la variante R230C sobre los parámetros bioquímicos y antropométricos en la población pediátrica.

Parámetro	Genotipo			*P
	R230R	R230C	C230C	
	<i>n</i> = 1012	<i>n</i> =221	<i>n</i> =20	
Frecuencia (%)	80.8	17.6	1.6	
Edad (años)	11.5(2.4)	11.2(2.4)	11.6(2.0)	0.271
IMC (Kg./m <sup>2</sup> )	21.4(4.4)	21.8(4.9)	22.5 (4.5)	0.049
IMC z-score	0.88(0.95)	1.02(0.88)	1.10(0.98)	0.032
Grasa (%) (n=596)	30.6(10.8)	32.1(11.7)	35.9 (12.9)	0.039
CT (mg/dL)	160.5(31.1)	157.6(28.1)	149.1(36.5)	0.019
TG (mg/dL)	114.9(77.6)	108.6 (52.9)	95.1(36.7)	0.137
C-HDL (mg/dL)	46.4(10.9)	42.9(11.0)	38.2 (9.4)	2.9x10 <sup>-8</sup>
Radio TC/C-HDL	3.62 (1.05)	3.87(1.08)	4.19 (1.12)	0.001
HA (%)	12.6	24.9	35.0	9.4x10 <sup>-7†</sup>

Los datos presentados son medias (desviación estándar) o %. Para los valores de \*P se utilizó un modelo aditivo ajustado por edad, género, IMC y escala de Tanner. Para †P se usó una análisis de regresión múltiple bajo un modelo aditivo ajustado por edad, género, IMC y escala de Tanner, cuando fue necesario. IMC, índice de masa corporal; C-HDL, colesterol de lipoproteínas de alta densidad; CT, colesterol total; HA, hipoalfalipoproteinemia.

Se ha sugerido que el género es un factor que influye en los niveles plasmáticos de C-HDL, debido a ello se decidió estratificar la población de acuerdo al género. Observamos que el efecto de la variante R230C sobre los niveles plasmáticos de C-HDL e HA es independiente del género, ya que se conservó el efecto a menor concentración plasmática de C-HDL y mayor frecuencia de HA, mostrando el mismo efecto de dosis. Además, el porcentaje de grasa, colesterol total y de la relación TC/C-HDL, mostraron la misma tendencia en ambos grupos. En el grupo de niños el porcentaje de grasa y la relación TC/C-HDL alcanzaron significancia ( $P= 0.024$  y  $0.001$ , respectivamente). En las niñas sólo los niveles de colesterol total mostraron diferencias significativas ( $P= 0.020$ ). (Tabla 14).



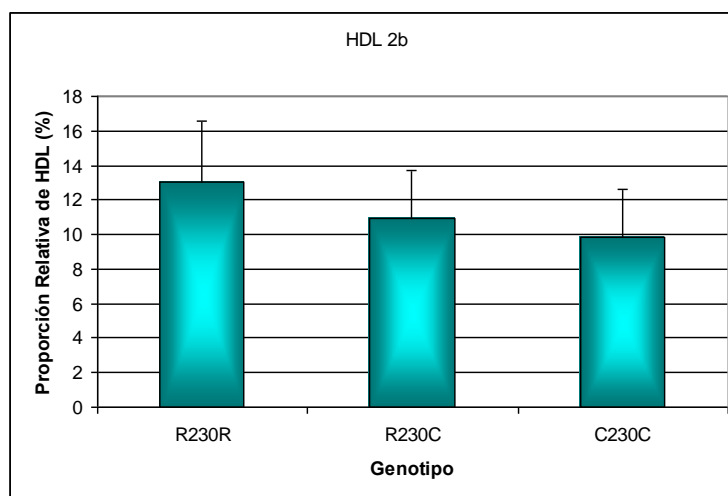
**Tabla 14.** Efecto de la variante R230C en la población pediátrica estratificada por género.

Parámetro	Niños			*P	Niñas			*P
	R230R	R230C	C230C		R230R	R230C	C230C	
	<i>n</i> = 471	<i>n</i> =112	<i>n</i> =12		<i>n</i> = 471	<i>n</i> =109	<i>n</i> =8	
Frecuencia (%)	79.2	18.8	2		82.2	16.6	1.2	
Edad (años)	11.5(2.4)	11.2(2.4)	11.6(2.0)	0.587	11.6(2.4)	11.3(2.4)	11.7(1.5)	0.328
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	21.3(4.7)	21.8(4.9)	22.5 (4.5)	0.131	21.6(4.7)	21.7(4.0)	24.5 (5.7)	0.257
IMC z-score	0.87(1.02)	1.02(0.88)	1.10(0.98)	0.120	0.89(0.88)	0.99(0.78)	1.30(1.04)	0.140
Grasa (%) (n=596)	30.6(10.8)	32.1(11.7)	35.9(12.9)	0.024	32.0(9.6)	32.3(9.4)	37.2(11.6)	0.287
CT (mg/dL)	160.5(31.1)	157.6(28.1)	149.(36.5)	0.226	162.2(31.6)	157.3(25.9)	146.8(25.3)	0.020
TG (mg/dL)	114.9(77.6)	108.6 (52.9)	95.1(36.7)	0.676	117.9(70.7)	105.8 (25.9)	100.5(20.6)	0.074
C-HDL (mg/dL)	46.4(10.9)	42.9(11.0)	38.2 (9.4)	6.9x10 <sup>-5</sup>	46.4(10.9)	43.1(11.5)	37.8 (4.7)	1.1 x10 <sup>-4</sup>
Radio TC/C-HDL	3.62 (1.05)	3.87(1.08)	4.19 (1.12)	0.007	3.64 (1.03)	3.87(1.07)	3.93 (0.82)	0.069
HA (%)	12.6	24.9	35.0	0.001	12.6	27.5	37.5	1.8 x 10 <sup>-4</sup>

Los datos presentados son medias (desviación estándar) o %. Para los valores de \*P se utilizó un modelo aditivo ajustado por edad, género, IMC y escala de Tanner. Para †P se usó una análisis de regresión múltiple bajo un modelo aditivo ajustado por edad, género, IMC y escala de Tanner, cuando fue necesario. IMC, índice de masa corporal; C-HDL, colesterol de lipoproteínas de alta densidad; CT, colesterol total; HA, hipoalfalipoproteinemia.

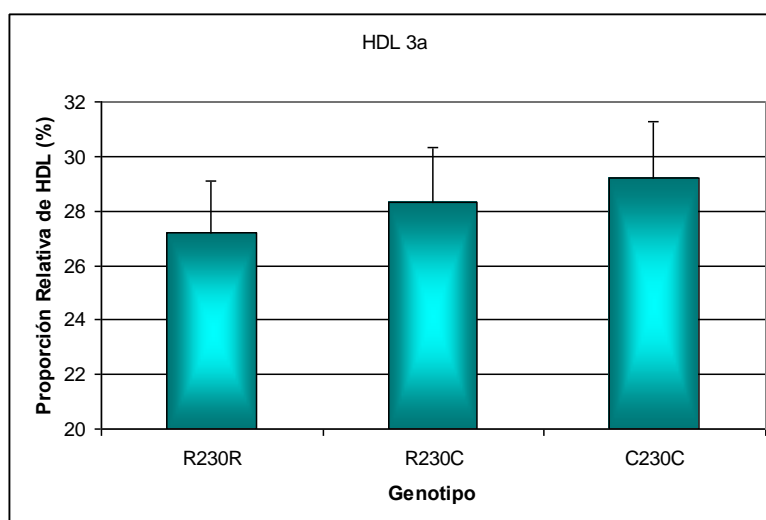
### 10.2.2 Efecto de R230C en la distribución de las subfracciones de las HDL

Por otro lado, en un subgrupo de 81 individuos de la población pediátrica fue posible medir subfracciones de las partículas HDL. Estas muestras fueron seleccionadas de acuerdo al genotipo, edad, género e IMC. Como era de esperarse se observó una diferencia significativa en los niveles plasmáticos de C-HDL ( $P = 0.011$ ). Una de las subfracciones que presentó diferencia significativa ( $P = 0.002$ ) con respecto al genotipo, fueron las subfracción HDL<sub>2b</sub>, la cual disminuyó, mostrando un efecto de dosis con respecto a las copias del alelo raro o alelo "C", ya que los portadores de manera heterocigota, es decir, R230C, tienen menor cantidad de HDL<sub>2b</sub> que los homocigotos R230R y a su vez los homocigotos poco frecuentes C230C, presentan menor proporción de la subfracción HDL<sub>2b</sub> que los R230C y R230C [(13.0(3.6), 10.9(2.8), 9.8(2.8)], representado en la gráfica de la figura 13.

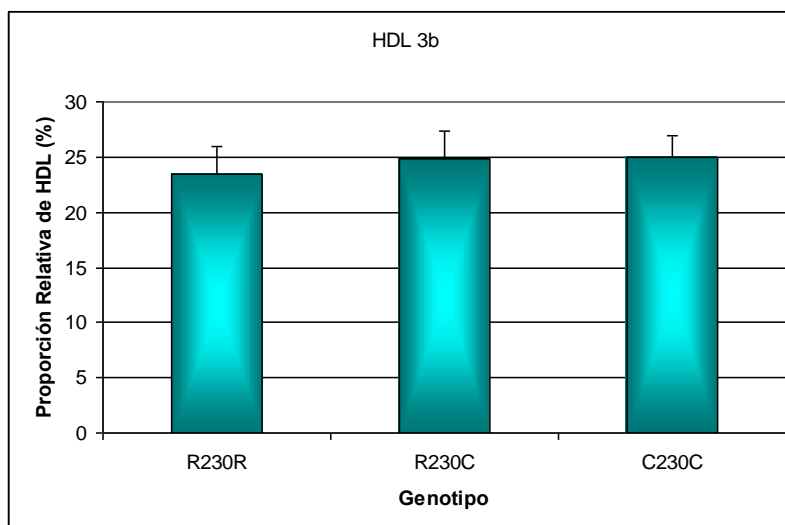


**Figura 13.** Distribución de la subfracción HDL<sub>2b</sub> de acuerdo al genotipo para R230C. El gráfico muestra la proporción relativa de las HDL en (%) para cada genotipo y la desviación estándar.

Por el contrario, las subfracciones HDL<sub>3a</sub> y HDL<sub>3b</sub>, presentaron un aumento y un efecto de dosis, como se observa en los gráficos de las figura 14 y 15, ya que los portadores de manera heterocigota, es decir, R230C, tienen mayor cantidad de HDL<sub>3a</sub> y HDL<sub>3b</sub> que los homocigotos R230R y a su vez los homocigotos poco frecuentes C230C, presentan mayor proporción de las subfracciones HDL<sub>3a</sub> y HDL<sub>3b</sub> que los R230C [27.2(1.9), 28.3(2.0), 29.2(2.1),  $P = 0.004$  y 23.4(2.6), 24.8 (2.5), 25.0(2.0),  $P= 0.029$ , respectivamente ]



**Figura 14.** Distribución de la subfracción HDL<sub>3a</sub> de acuerdo al genotipo para R230C. El gráfico muestra la proporción relativa de las HDL en (%) para cada genotipo y la desviación estándar.



**Figura 15.** Distribución de la subfracción HDL<sub>3b</sub> de acuerdo al genotipo para R230C. El gráfico muestra la proporción relativa en (%) de las HDL para cada genotipo y la desviación estándar.

Las subfracciones HDL<sub>2a</sub> y HDL<sub>3c</sub> no mostraron diferencias significativas con respecto a la variante R230C. Por otro lado, la variante R230C también mostró asociación con un menor tamaño de partícula. Los homocigotos C230C presentaron un menor tamaño de partícula que los heterocigotos R230C y estos a su vez menor tamaño que los homocigotos R230R [8.77 (0.17), 8.65 (0.16), 8,64 (0.16),  $P = 0.014$ ].

.

### 10.3 Discusión

Se ha demostrado que los factores ambientales influyen considerablemente en los niveles plasmáticos de C-HDL, además de igual manera la influencia genética juega un papel importante en la modulación de los niveles plasmáticos de C-HDL (Hamsten, Iselius et al. 1986; Gordon, Probstfield et al. 1989). Un ejemplo claro de la influencia de la carga genética es la población española, la cual ha cambiado de manera importante su dieta, y a pesar de ello desde la infancia las concentraciones plasmáticas de C-HDL son mayores que la de otros países europeos. Esto se ha atribuido principalmente a la factores genéticos (Lopez-Simon, de Oya et al. 2009). A

diferencia de esta población, la población infantil mestiza mexicana, que es una mezcla principal entre población indígena americana y española (Lisker, Ramirez et al. 1990), presentan concentraciones de C-HDL bajas, y aproximadamente entre un 20 y 30 % presenta hipoalfalipoproteinemia, al igual que las poblaciones adultas mestizas de América latina (Aguilar-Salinas, Olaiz et al. 2001; Rodriguez-Moran, Salazar-Vazquez et al. 2004; Yamamoto-Kimura, Posadas-Romero et al. 2006; Medina-Urrutia, Juarez-Rojas et al. 2008). Este efecto se ha observado en distintos estudios prospectivos donde comparan distintas etnias en América del norte como son: caucásicos, negros y latinos. Donde la población con menor concentración plasmática de C-HDL han sido los latinos (Hickman, Briefel et al. 1998; Winkleby, Robinson et al. 1999). Un gen involucrado en la homeostasis de las HDL, es el gen ABCA1, y distintas mutaciones o variantes han sido asociadas a este fenotipo de C-HDL bajo. La variante R230C fue asociada a niveles bajos de C-HDL en población adulta mexicana (Villarreal-Molina, Aguilar-Salinas et al. 2007), explicando alrededor del 4 % de la modulación de los niveles de C-HDL. Es en este trabajo donde demostramos que el efecto que presenta R230C en la edad adulta sobre los niveles plasmáticos de C-HDL (Villarreal-Molina, Aguilar-Salinas et al. 2007), es independiente de los factores ambientales, ya que en la población pediátrica, la cual tiene un tiempo menor de exposición a ambientes obesogénicos y dañinos presentan el mismo patrón de niveles plasmáticos bajos de C-HDL en los portadores de la variante R230C. Además se observó que el efecto es independiente del género, aún cuando existen estudios que señalan al género como un factor relevante en la modulación de los niveles plasmáticos de C-HDL (Bertrais, Balkau et al. 2000), en esta población se mostró el mismo comportamiento tanto en varones como en mujeres. Estos datos son relevantes epidemiológicamente, ya que se ha reportado que detectar concentraciones bajas de C-HDL desde la infancia es importantes, pues además de ser un factor de riesgo, se ha comprobado que se conservan hasta la edad adulta (Bao, Srinivasan et al. 1997), asociándose a problemas ateroscleróticos, e incluso se ha demostrado que desde la infancia es posible observar placas ateromatosas, que pueden desencadenar en problemas graves de enfermedades cardiovasculares a edad temprana (Stary 1989; Fisher, Van Horn et

al. 1997; McGill, McMahan et al. 1997). La variante R230C es la primera variante asociada a niveles plasmáticos de C-HDL en población mexicana desde edades tempranas.

Las partículas HDL son heterogéneas y pueden dividirse de acuerdo a su estructura y función, clasificándolas en distintas subpoblaciones que varían de acuerdo al tamaño, forma, densidad, cambios en la superficie y composición (Blanche, Gong et al. 1981). Debido a la marcada asociación de la variante R230C con los niveles de C-HDL, evaluamos el efecto de la variante en la distribución de las subfracciones de las HDL en una subpoblación de la población pediátrica. Encontramos que la variante R230C disminuye el tamaño de partícula de las HDL y afecta la distribución de las subfracciones de las HDL, ya que la subfracciones grande se ven disminuidas y por contrario las subfracciones pequeñas se ven aumentadas. Este comportamiento en la distribución de las subfracciones de HDL ha sido observada en pacientes con Tangier y en portadores de mutaciones de manera heterocigota de Tangier (Brousseau, Eberhart et al. 2000; Asztalos, Brousseau et al. 2001; Kuivenhoven, Hovingh et al. 2003). Aun no es claro el mecanismo por el cual la distribución de las subfracciones es distinta, pero es sabido que existen distintos factores plasmáticos que pueden alterar el tamaño, la forma, la carga de la superficie y la composición de las lipoproteínas, remodelando las HDL. Entre estos factores se encuentran distintas enzimas como: LCAT, CETP, PLTP, HL, EL, etc. (Rye, Bursill et al. 2009). Es sabido que la esterificación del C-HDL por LCAT genera más partículas HDL maduras incluyendo las partículas pequeñas y densas HDL<sub>3</sub> así como las partículas grandes y esféricas HDL<sub>2</sub> (Barter 2002). Se ha observado una disminución de la actividad de LCAT en individuos con mutaciones de manera heterocigota de ABCA1, además de una disminución en el tamaño de partículas HDL (Kuivenhoven, Hovingh et al. 2003). Aun cuando no fue posible medir las concentraciones plasmáticas de esta enzima en nuestra población, es posible sugerir que una disminución en la actividad LCAT podría explicar el efecto observado en los portadores de la variante R230C sobre la distribución de las HDL población pediátrica mexicana.

Por otro lado, este mismo patrón de niveles plasmáticos bajos de C-HDL y de la distribución de las subfracciones de mayor proporción de HDL<sub>2</sub> y menor proporción que HDL<sub>3</sub>, observado en los portadores de la variante R230C, se ha reportado en individuos obesos (Laakso and Pyorala 1990) y con resistencia a la insulina (Tilly-Kiesi, Knudsen et al. 1996). Recientemente también se reportó el mismo patrón en población infantil mexicana obesa con resistencia a la insulina o DT2 (Perez-Mendez, Torres-Tamayo et al. 2007). Estos datos son relevantes especialmente por tratarse de población pediátrica, en la cual es posible implementar medidas preventivas que ayuden a disminuir el riesgo a padecer enfermedades metabólicas, las cuales son cada vez son más frecuentes en la población mexicana, ya que como hemos reportado la variante R230C está asociada en esta población pediátrica a distintos rasgos metabólicos de riesgo como son: niveles bajos de C-HDL, mayor IMC, mayor proporción de grasa corporal y mayor z-score en la población pediátrica, al igual que en la población adulta, además esta variante ha sido asociada a DT2, por lo que sería importante mantener un estudio prospectivo de esta población.

Estos resultados se publicaron en la revista *Clinica Chimica Acta* (Flores-Dorantes, Arellano-Campos et al. 2010)

## **10. Efecto de la variante R230C en población indígena**

### **10.4 Sujetos**

La captación de muestras se realizó de acuerdo a lo señalado en el inciso 8.1. El estudio incluyó 4405 individuos adultos, pertenecientes a 36 grupos indígenas americanos distintos y 863 europeos y asiáticos. Tanto los indígenas mexicanos como los indígenas sudamericanos tenían al menos dos generaciones nacidas en la misma comunidad y hablaban su propio lenguaje. Se contó con el apoyo de traductores en los casos necesarios y se cumplió con lo establecido en la declaración de Helsinki.

#### **10.4.1 Mediciones antropométricas y bioquímicas**

Las mediciones bioquímicas de todas las muestras fueron de las muestras de los 1050 indígenas mexicanos y Kitchwas (de Ecuador) se realizaron como se indica en el inciso 8.1. Los parámetros bioquímicos de los indígenas Parkatajés fueron previamente descritos (Vieira-Filho, Reis et al. 2004). En el caso de las poblaciones indígenas americanas, se obtuvieron datos antropométricos de 2563 Pimas, 1016 indígenas mexicanos y 157 indígenas sudamericanos. La población Pima fue incluida previamente en un estudio longitudinal de la etiología de DT2 en la comunidad Gila River Indian en el centro de Arizona (Knowler, Bennett et al. 1978).

#### **10.4.2 Genotipificación de SNPs.**

La extracción de ADN y la genotipificación del SNP rs9282541 (R230C) y de los SNPs que se muestran en la tabla 15 se realizaron como se indica en el inciso 8.2.2.



**Tabla 15.** SNPs analizados para el estudio de R230C y estudios de selección positiva en población indígena.

Análisis	Población de análisis	SNP	Cromosoma	Posición		
Efecto R230C	Indígena	rs9282541 (R230C)	9	106660656		
		rs2900366	9	106226621		
		rs7030820	9	106307125		
		rs4742917	9	106474224		
		rs4149338	9	106585724		
		rs3818689	9	106624837		
		rs2066714	9	106626574		
		rs2487037	9	106657158		
		rs2487039	9	106657254		
		rs2472384	9	106658502		
		rs2253304	9	106658884		
		rs2253182	9	106659945		
		Análisis de Selección Positiva (REHH, EHH)	Indígena y mestizos	rs2253175	9	106660120
				rs2253174	9	106660153
rs2253172	9			106660208		
rs9282541 (R230C)	9			106660656		
rs2230806	9			106660688		
rs2472433	9			106663147		
rs2230805	9			106663850		
rs2249891	9			106664063		
rs4149281	9			106666210		
rs2575875	9			106702315		
rs1800977	9	106730271				
rs2937359	9	106879662				
rs384924	9	107025913				

#### 10.4.3 Población para secuenciación

Se secuenciaron 6 muestras de adultos, 2 para cada uno de los genotipos de la variante R230C, es decir; 2 muestras homocigotas comunes R230R, 2 muestras heterocigotas R230C y dos muestras homocigotas poco frecuentes C230C.

#### 10.4.4 Secuenciación del gen ABCA1

Se extrajo ADN genómico de leucocitos de sangre periférica mediante la técnica de fenol-cloroformo. Se amplificaron los 50 exones y 1 Kb de la región del promotor proximal del gen ABCA1. Se utilizaron los diseños de oligonucleótidos previamente reportados (Wang, Burnett et al. 2000), con las condiciones que se muestran en la tabla 16. Para los exones 5, 6, 8, 31, 24, 36 y 40 se utilizó una Tm de 58 °C. Los

amplificados fueron purificados con ExoSAP-It (USB, USA) incubando a 37 °C por 15 min, quitando los remanentes de la reacción y posteriormente se incubó a 80 °C por 15 min inactivando el exceso de ExoSAP-It. Una vez purificados, los amplicones se secuenciaron usando el kit de ABI PRISM Big Dye Terminators versión 3.1 en un ABI 7000 bajo las condiciones que sugiere el proveedor (Applied Biosystem, Foster City, Ca, USA). La localización de posibles cambios en las secuencias se hizo con ayuda del programa Phred-Prap (versión 0.020425.c).

**Tabla 16.** Condiciones de reacción para los amplificados de los 50 exones del gen ABCA1.

Reactivo		Volumen (µl)
Buffer de amplificación 10x		2
dNTPs 25mM		0.20
ClMg <sub>2</sub> 50 mM		0.65
Oligonucleótidos 10µM		1.50
ADN (100 ng)		0.30
Platinum Pf x DNAPolymerasa		0.35
H <sub>2</sub> O		15.48
Temperatura (°C)	Tiempo	
92°C	4.30 min	
94°C	30 s	} 37 Ciclos
60°C	30 s	
72°C	30 s	
72°C	8 min	
4°C	∞	

## **10.5 Generación del constructo con la variante R230C y líneas celulares**

### **10.5.1 Generación del fragmento de DNA con el cambio R230C**

Inicialmente se realizaron dos reacciones de PCR por separado para generar el fragmento de amplificado que contendría la variante R230C a partir del vector de ABCA1 previamente utilizado (Singaraja, Visscher et al. 2006), con las condiciones que se señalan en la tabla 4. Se utilizaron los siguientes pares de oligonucleótidos: Blp-F 5'CAGCTGAGGTTGCTGCTG3'; R230C-R 3'CATGT-TGGAACAAAGTACTCGCTC5' y R230C-F 5'GAGCGAGTACTTTGTTCCAA-CATG3'; Xho-R3'ACCACATCC'TGCAAGTAGGCG 5'. Una vez amplificados los fragmentos mediante reacciones de PCR y purificados (Kit Qiagen Inc., Chatsworth, CA, U.S.A.), se realizó una amplificación más bajo las mismas condiciones con 1 µl de cada uno de los purificados y los siguientes oligonucleótidos: Blp-F 5'CAGCTGAGG-TTGCTGCTG y Xho-R 3'ACCACATCC'TGCAAGTAGGCG 5'. Posteriormente 40 µl del amplificado purificado se sometido a digestión al igual que 40 µl del vector de ABCA1 en tubos separados con 2.5 µl de las enzimas de restricción BlnI y XhoI (New England BioLabs, Ipswich, MA), 0.6 µl de BSA y 5 µl de buffer NEB 4 (New England BioLabs, Ipswich, MA) a 37 °C por 1.5 h (estas enzimas cortaron el fragmento que contiene R230R y R230C) y se purificaron las reacciones por separado (Figura 16).

**Tabla 17.** Condiciones de reacción para PCR para generación del fragmento con R230C.

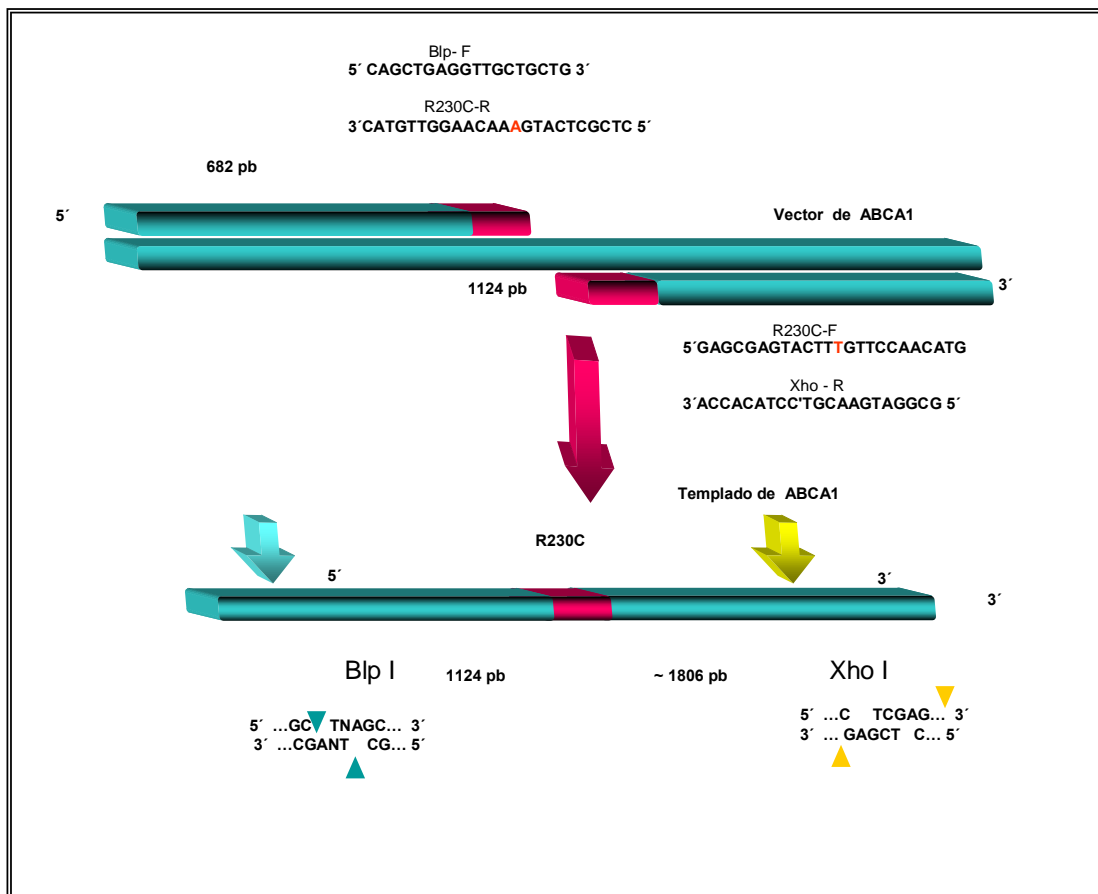
Primer reacción de PCR	
Reactivo	Volumen (µl)
Buffer de amplificación 10x	5
dNTPs 10mM	1.5
MgSO <sub>4</sub> 50 mM	1
Oligonucleótidos 10µM	1.5
Templado ADN (10-200 ng)	2
Platinum Pf x DNAPolymerasa	0.5
H <sub>2</sub> O	37

Segunda reacción de PCR	
Reactivo	Volumen (µl)
Buffer de amplificación 10x	5
dNTPs 10mM	1.5
MgSO <sub>4</sub> 10 mM	1
Oligonucleótido 10µM	1.5
Amplificados c/u	1
Polimerasa Platinum	0.5
H <sub>2</sub> O	38.5

Temperatura (°C)	Tiempo	
94°C	2 min	} 35 Ciclos
94°C	15 s	
62°C	30 s	
68°C	1 min	
68°C	7 min	
4°C	∞	

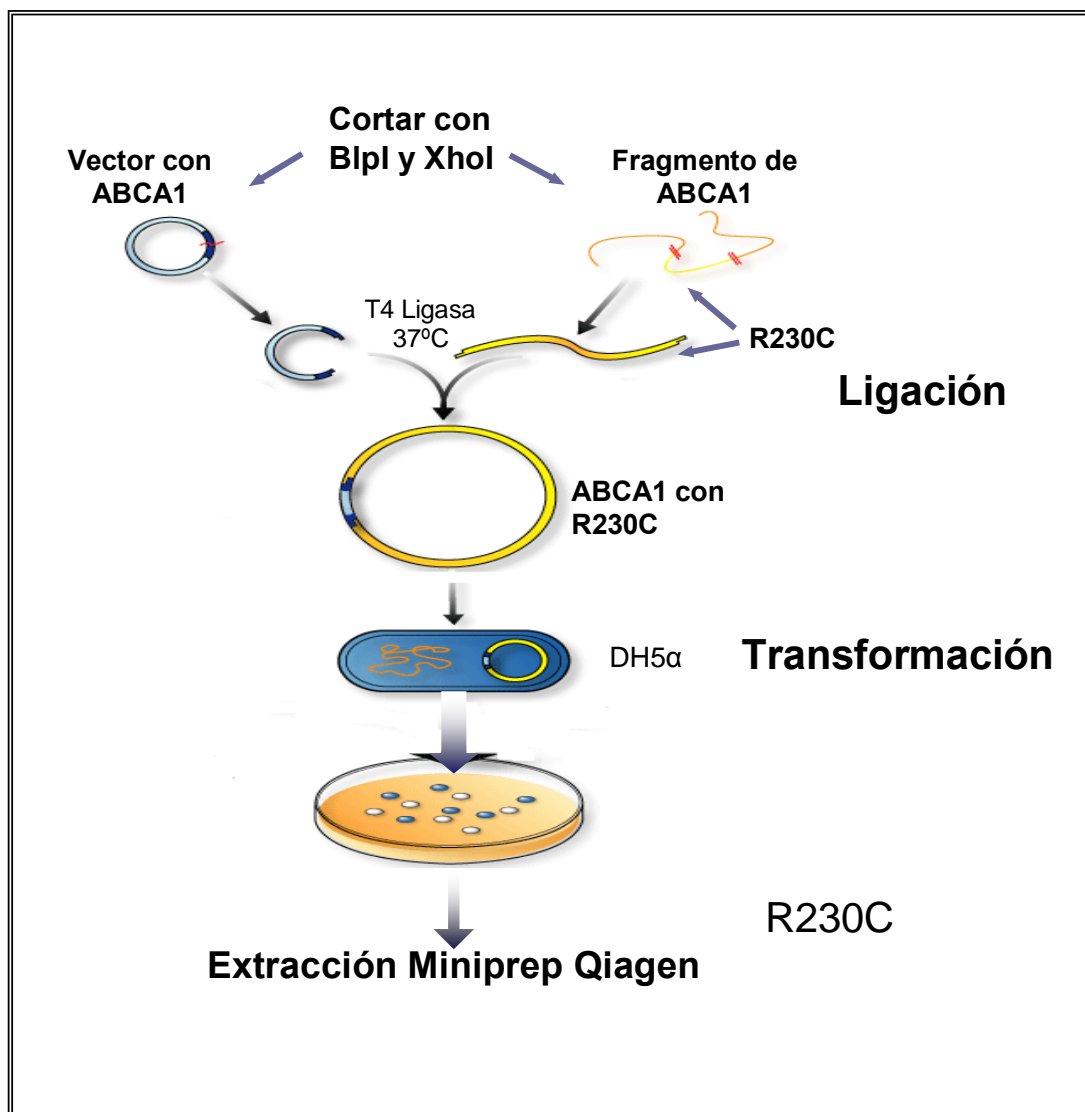


**Figura 16.** Representación de la generación del fragmento con la variante R230C.

### 10.5.1.1 Generación del plásmido con R230C

Una vez obtenido el vector sin el fragmento que correspondía a R230R y el fragmento de R230C (inserto), se incubaron con 2 µl de la enzima ligasa T4 a 37 °C por media hora (ligación). Posteriormente, se tomó 1 µl de esta reacción y se siguió el protocolo para la transformación de células MAX Efficiency® DH5Alpha™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), incubando toda la noche. (Figura 17). Al día siguiente con un hisopo se tomaron las colonias de *E. coli* y se colocaron en tubos con 5 ml de medio LBT (con 5 µl de ampicilina 100 µg/ml) y se incubaron a 37 °C con agitación de 225 rpm toda la noche (Transformación). Posterior a las 24 horas se extrajo el plásmido con ayuda del Kit Minipret de Qiagen (Qiagen Inc., Chatsworth, CA, U.S.A.), de acuerdo a las indicaciones del proveedor y se midió la concentración del plásmido en un NanoDrop (Thermo Scientific) (Figura 18).

Posteriormente se secuenció el plásmido para comprobar la presencia del cambio y ausencia de otras variantes o mutaciones, de acuerdo a las condiciones previamente reportadas (Clee, Kastelein et al. 2000).

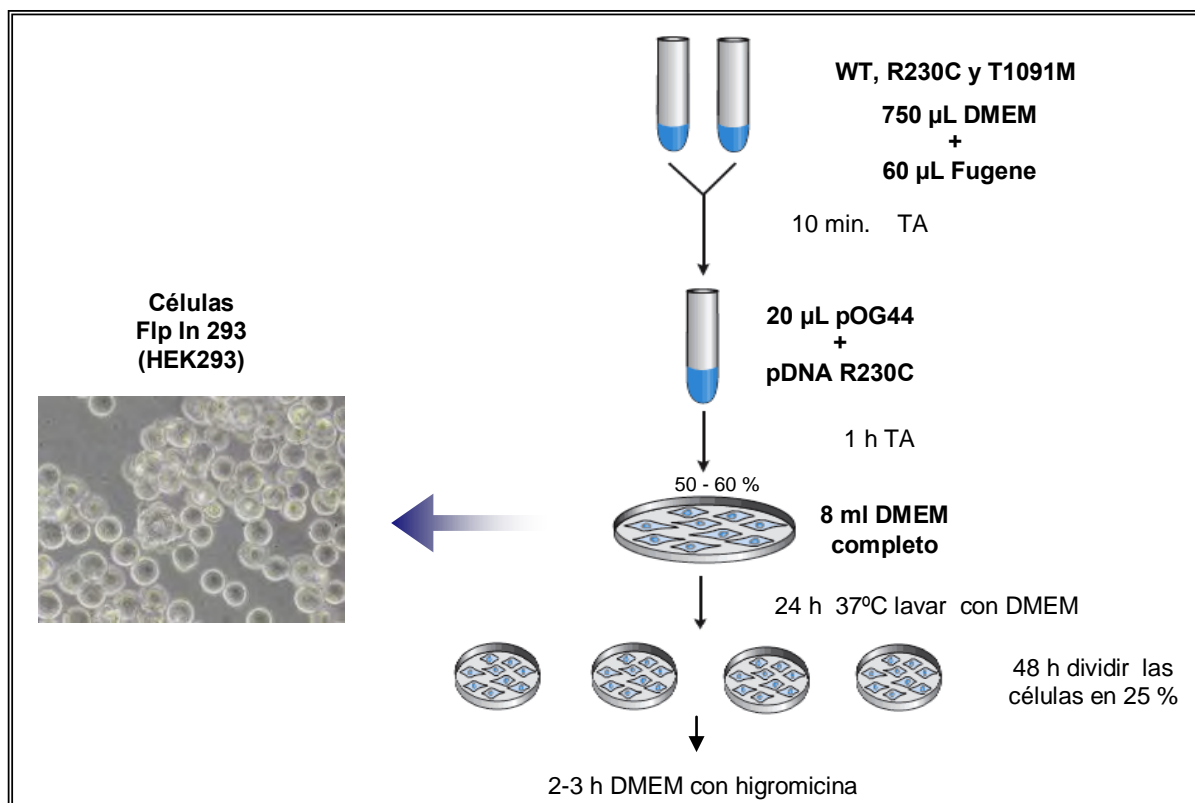


**Figura 17.** Generación del plásmido con la variante R230C.

#### 10.5.1.2 Obtención de células transfectadas

Una vez comprobado mediante secuenciación el cambio R230C en el plásmido, se procedió hacer la transfección en células Flp In 293 (HEK293) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Cuando la afluencia celular de las células Flp In 293 fue del 40-50 % se procedió hacer la transfección. Al mismo tiempo se transfectaron células con los

vectores: silvestre (R230R), R230C y T1091M (mutación de Tangier). Por separado, en tres tubos Falcon de 50 ml se colocaron 750  $\mu$ l de DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) más 60  $\mu$ l de Fugene (Roche Applied Science, Indianapolis, IN), el cual fue agregado lentamente, cuidando no tocar las paredes del tubo. Estos tubos se dejaron reposar a temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente, se agregaron 20  $\mu$ l de pOG44 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y 3.5  $\mu$ g del plásmido en el caso de las mutantes y 0  $\mu$ g para el wild type. Se agitaron ligeramente los tubos y se dejaron reposar nuevamente por 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se les agregaron 8 mL de DMEM completo (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y se vertió el contenido sobre las células Flp In 293, incubando toda la noche a 37 °C. Al día siguiente las células se lavaron con DMEM completo y se incubaron nuevamente a 37 °C toda la noche. A las 24 h (48 h) se desprendieron las células con tripsina (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y se dividió el contenido celular en 4 cajas petri y se dejaron incubando de 3 h a 37 °C. Posteriormente, se les agregaron 10 ml de DMEM completo con higromicina (75  $\mu$ g/ml) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), medio con el que se conservaron hasta la afluencia adecuada para hacer los experimentos *in vitro* (Figura 18).



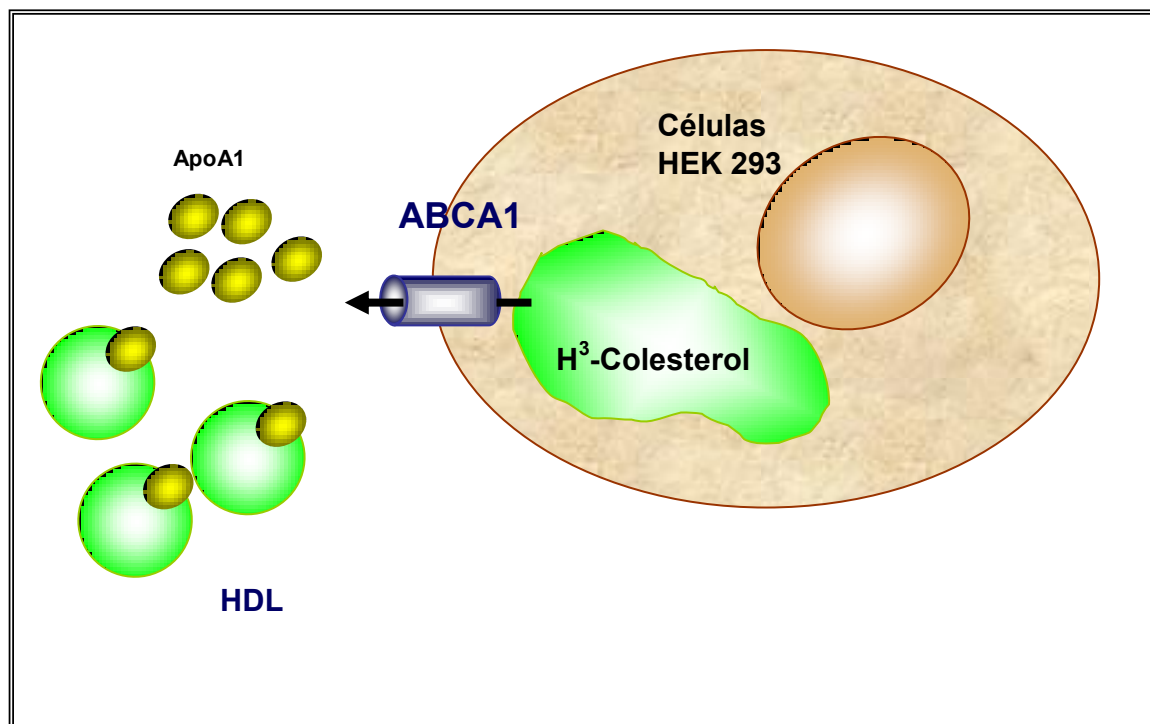
**Figura 18.** Procedimiento para la transfección de las células HEK293 con el constructo de la variante R230C.

### 10.5.2 Eflujo de colesterol

A las células Flp In 293 transfectadas se les agregó 1 µCi de [<sup>3</sup>H]-colesterol (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckingham, UK) y se dejaron incubando a 37°C por 24 horas. Al día siguiente, el medio fue removido y remplazado con DMEM libre de suero fetal bovino (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), el cual contenía 5 mg/dl de albúmina de suero bovino deslipidado (Sigma, St Louis, Mo, USA). Después de una hora de incubación se agregaron 20 µg/ml de ApoA1 humana, y se dejó incubando nuevamente a 37°C por 4 h. Posteriormente, el medio fue colectado y las células fueron lisadas con NaOH 0.1 % SDS. (Figura 19). La radioactividad se cuantificó en un contador de centelleo (Packard Tricarb 2700TR). El eflujo de colesterol es expresado como porcentaje de conteo en medio total (medio +



células). Este ensayo se realizó en las tres líneas celulares wild type, R230C y T1091M por triplicado.



**Figura 19.** Eflujo de colesterol, formación de las partículas HDL por estímulo con ApoA1.

### 10.5.3 Eflujo de fosfolípidos

Una vez que las líneas celulares Flp In 293 transfectadas alcanzaron la afluencia adecuada, se agregó 1  $\mu$ Ci de [<sup>3</sup>H]-colina (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckingham, UK) a las células Flp In 293, dejando incubando por 24 horas a 37°C. Al día siguiente, el medio se removió y reemplazó con medio de cultivo libre de suero fetal bovino, el cual contenía 5 mg/dL de albúmina de suero bovino deslipidado (Sigma, St Louis, Mo, USA). Después de una hora de incubación se le agregaron 20  $\mu$ g/ml de fosfolípidos/ApoA1 humana y se dejó incubando a 37°C por 4 horas. Se colectó la [<sup>3</sup>H]-colina/fosfolípidos/ApoA1 del medio por inmunoprecipitación con anticuerpos ApoA1, posteriormente fueron digeridos para ensayos de proteínas. Los

datos fueron expresados como el porcentaje de ApoA1 dependiente del eflujo de fosfolípidos inducido, entre el eflujo de la línea celular wild type de ABCA1. La radioactividad se cuantificó por contadores de centelleo (Packard Tricarb 2700TR). El eflujo de fosfolípidos es expresado como el conteo de [<sup>3</sup>H] colina/fosfolípidos/ApoA1 por inmunocolección, normalizado por las proteínas celulares. Los datos fueron expresados como el porcentaje de ApoA1 dependiente del eflujo de fosfolípidos inducido entre el eflujo de la línea celular wild type de ABCA1.

#### **10.5.4 Expresión de ABCA1**

La línea celular wild type y las líneas celulares con las variantes (R230C y T1091M), fueron tratadas por separado, se lavaron con 10 ml de PBS (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y se desprendieron de las cajas petri con tripsina (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) al 10 %. La solución se colocó en un tubo falcon y se centrifugó a 4 °C a una velocidad menor de 1000 rpm. Se le retiró el PBS del concentrado celular y se conservó en hielo (aprox. 4°C), hasta que se lisaron las células con 500 µl de buffer de lisis e inhibidores de proteasas (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), se homogenizó y se dejó en hielo por 10 min. Se transfirieron las muestras a tubos de 1.5 ml y se centrifugaron a 4 °C a velocidad máxima por 5 min, se transfirió el sobrenadante en un nuevo tubo de 1.5 ml y se midió la concentración de las proteínas de acuerdo al protocolo de BioRad DC Assay (BioRad Laboratories, Marnes-La-Coquette, France). Las muestras se incubaron a 100 °C por 10 min. y se centrifugaron, se colocaron en los carriles del gel y se utilizaron 20 µl de marcador de peso molecular (BioRad Precision Plus Protein Kaleidoscope), se corrió el gel de acrilamida a 120 V por 1.5 h y se siguió el procedimiento para inmunoblots utilizando anticuerpos anti-ABCA1 (Chemicon, Temecula, CA, USA) y anti-gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (Chemicon, Temecula, CA, USA).

#### **10.5.5 Análisis estadístico**

Se utilizó el mismo análisis que para la población infantil, inciso 9.1.6

#### **10.5.5.1 Eflujo de colesterol y fosfolípidos**

Se utilizó un análisis de ANOVA para determinar la significancia, y un análisis de Newman-Keuls, usando el programa GraphPad Prims 4 (San Diego, CA, USA).

#### **10.5.5.2 Genética de poblaciones**

Las frecuencias alélicas, genotípicas y el equilibrio de Hardy-Weimberg, fueron calculados mediante una AMOVA usando el programa Arlequin 3.11 (Excoffier, Laval et al. 2005). El análisis de haplotipos de mexicanos mestizos e indígenas americanos se hizo con un análisis de Network usando una unión-mediana y el método de parsimonia máxima (Network 5.510 software)(Bandelt, Forster et al. 1999)

#### **10.5.5.3 Pruebas para evaluar selección positiva.**

Se usó un análisis de haplotipo de rango amplio (LRH) para evaluar la disminución de desequilibrio de ligamiento (DL) (Sweep software) (Sabeti, Reich et al. 2002). Se utilizaron 20 SNPs en muestras de tríos de indígenas americanos y mestizos para abarcar una región de 800 Kb que flanquearon a R230C (Tabla 3). El DL decayó cuando se compararon los datos generados por el LRH, quedando sólo 24 Mb del genoma para la población indígena americana.

### **10.6 Resultados**

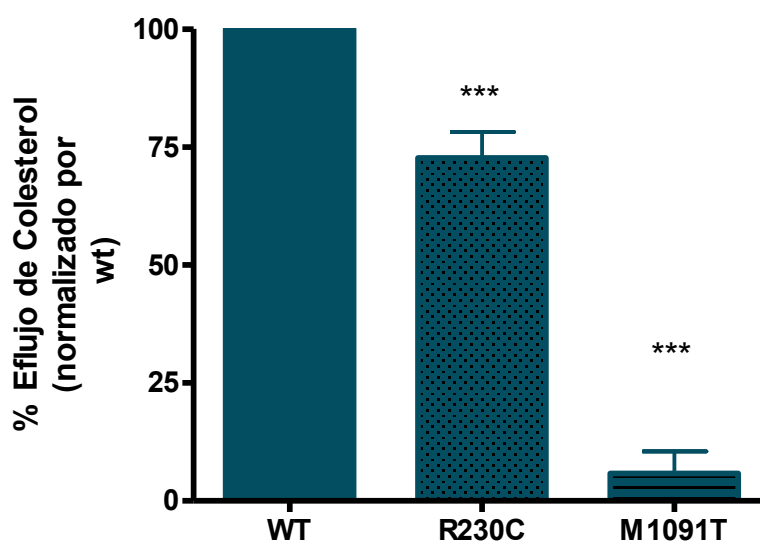
#### **10.6.1 Secuenciación**

La secuenciación de los 50 exones y de 1 Kb de la región promotora del gen ABCA1 de 6 muestras, dos para cada genotipo, (2 R230R, 2R230C y 2 de C230C) no mostraron variantes o SNP que presentaran DL con la variante R230C.

## 10.6.2 Estudios Funcionales

### 10.6.2.1 Eflujo de Colesterol

La línea celular de HEK 293 transfectada con la variante R230C presentó una disminución del 27 % en el eflujo de colesterol al compararla con la wild type. Se tomó como línea celular control una línea celular con una mutación de la enfermedad de Tangier M1091T. El comportamiento de M1091T fue el mismo al previamente reportado (Howard, Davis et al. 1983). El análisis se realizó por triplicado y la diferencia fue significativa ( $P < 0.01$ ) (Figura 20).



**Figura 20.** R230C disminuye el eflujo de colesterol en un 27 %.

### 10.6.3 Eflujo de Fosfolípidos

La línea celular HEK 293 transfectada con la variante R230C no presentó diferencia del eflujo de fosfolípidos al compararla vs. la wild type. Por el contrario, fue evidente el efecto en la disminución del eflujo de fosfolípidos en la mutante M1091T, ya que mostró el mismo comportamiento (Howard, Davis et al. 1983). El análisis se realizó por triplicado (Figura 21).

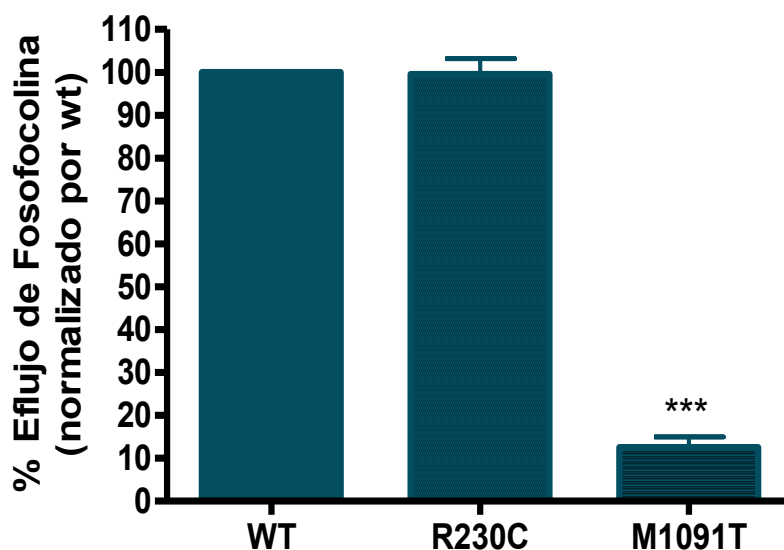


Figura 21. La variante R230C no disminuye el eflujo de Fosfolípidos.

### 10.6.3.1 Expresión de la proteína ABCA1

Se realizó el inmunoblot para observar la expresión de la proteína ABCA1. Se encontró que variante R230C no disminuye la expresión de la proteína, al comparar con la wild type y la mutante M1091T. Se utilizó como proteína constitutiva la proteína GAPDH (Figura 22).

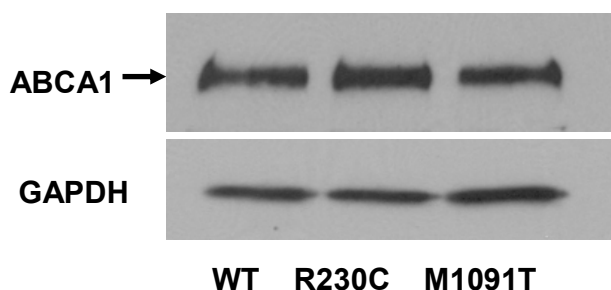


Figura 22. La variante R230C no afecta la expresión de la proteína ABCA1

#### **10.6.4 Asociación de la variante R230C con los niveles de C-HDL y otros rasgos metabólicos.**

Uno de los efectos más relevantes que presentó la variante R230C en la población indígena, fue la disminución en los niveles plasmáticos de C-HDL, lo cual coincide con efecto previamente observado tanto en este trabajo, como en nuestro trabajo previo (Villarreal-Molina, Aguilar-Salinas et al. 2007) (Tabla 18). En todas las poblaciones indígenas el efecto de la variante R230C es el mismo, los portadores de la variante presentan menor concentración plasmática de C-HDL y la significancia varía de acuerdo al tamaño de muestra de las poblaciones. Es evidente el efecto de dosis con respecto a las copias del alelo poco frecuente. Debido a que el comportamiento es las distintas poblaciones indígenas mexicanas era el mismo, se realizó un análisis combinado abarcando todas las poblaciones indígenas mexicanas, el cual mostró un valor altamente significativo ( $P = 5.3 \times 10^{-8}$ ). Al hacer el análisis con todas las poblaciones americanas, el efecto fue aun más evidente ya que el valor de significancia aumentó ( $P = 1.77 \times 10^{-11}$ ). Los resultados obtenidos fueron ajustados por edad, género, IMC y estatus de diabetes.

**Tabla 18.** Efecto de la variante R230C en los niveles plasmáticos de C-HDL en la población indígena.

Poblaciones	Genotipo			P
	R230R	R230C	C230C	
<b>Norte América</b>				
<b>USA</b>				
Pimas (2563)	46.2 (13.3)	42.6 (12.3)	37.0 (11.5)	6.4 x 10 <sup>-5</sup>
<b>México</b>				
Teeneks (67)	40.2 (10.9)	35.3 ( 8.3)	27.5 (2.1)	0.057
Coras (123)	39.4 (9.8)	33.9 ( 9.1)	30.1 (2.6)	0.021
Purépechas (15)	45.9 (12.1)	38.8 ( 8.6)		0.603
Mazahuas (83)	40.7 (10.6)	35.9 ( 8.2)		0.281
Nahuas (267)	43.1 (15.4)	37.9 ( 9.9)	37.4 (5.1)	0.014
Totonacas (113)	41.9 (9.4)	39.7 (11.0)	33.7 (9.6)	0.180
Zapotecos (106)	42.3 (13.5)	37.6 ( 9.1)	26.0	0.038
Mayas (110)	50.2 (11.2)	45.5 ( 9.8)	39.7 (2.5)	0.023
<b>Análisis</b>				
<b>combinado</b> (884)	42.9 (12.8)	38.3 (10.1)	33.4 (5.9)	7.5 x 10 <sup>-8</sup>
<b>Sudamérica</b>				
Kichwas (79)	44.1 (13.5)	41.6 (9.8)	23.0	0.153
Parkatejé (78)	39.4 (7.8)	38.7 (8.5)	29.0	0.270

Los datos presentados son medias (desviación estándar). La regresión lineal se realizó ajustando por edad, género, IMC y estatus de diabetes.

De igual manera que en la población infantil, en la población indígena la variante R230C está asociada a menores concentración plasmáticas de colesterol total. En los portadores de la variante las concentraciones plasmáticas de colesterol total disminuyeron (Tabla 19). El comportamiento fue el mismo en todas las poblaciones, siendo más evidente en la población Pima ( $P = 1.8 \times 10^{-7}$ ), lo cual podría explicarse posiblemente debido al tamaño de muestra. En las poblaciones indígenas mexicanas, sólo en la población Totonaca y Maya fue significativa la diferencia ( $P = 0.042$  y  $0.004$ , respectivamente). De igual manera el análisis combinado de la población indígena mexicana mostró un resultado significativo ( $P = 0.027$ ). Y por último el análisis considerando todas las poblaciones indígenas mostró mayor significancia ( $7.15 \times 10^{-5}$ ).



**Tabla 19.** Efecto de la variante R230C en los niveles plasmáticos de colesterol total en la población indígena.

Poblaciones	Genotipo			P
	R230R	R230C	C230C	
<b>Norte América</b>				
<b>USA</b>				
Pimas (2563)	178.8 (39.5)	166.1 (34.1)	146.4 (20.3)	1.8x10 <sup>-7</sup>
<b>México</b>				
Teeneks (67)	167.4(42.2)	167.1 (32.3)	153.0 (26.9)	0.671
Coras (123)	175.1 (34.2)	173.9 (37.7)	173.0 (29.5)	0.681
Purépechas (15)	171.2 (30.5)	155.5 (12.5)		0.333
Mazahuas (83)	166.2 (51.6)	152.7 (41.9)		0.444
Nahuas (267)	185.0 (87.6)	173.3 (64.7)	164.1 (58.9)	0.470
Totonacas (113)	184.6 (32.8)	183.0 (30.9)	144.0 (33.5)	0.042
Zapotecos (106)	203.9 (57.3)	204.8 (48.0)	206	0.723
Mayas (110)	205.8 (38.3)	189.6 (34.6)	157.0 (15.0)	0.004
<b>Análisis combinado (884)</b>	184.7 (61.9)	179.9 (48.8)	165.1 (39.1)	0.027
<b>Sudamérica</b>				
Kichwas (79)	149.8 (28.8)	151.3 (28.9)	139	0.791
Parkatejé (78)	160.4 (36.3)	166.8 (25.9)	172	0.945

Los datos presentados son medias (desviación estándar). La regresión lineal se realizó ajustando por edad, género, IMC y estatus de diabetes.

Por otro lado, el efecto de la variante R230C sobre el IMC en esta población fue el mismo que el observado en la población pediátrica y adulta (Villarreal-Molina,

Aguilar-Salinas et al. 2007). Los portadores de la variante R230C tienen un mayor IMC (Tabla 20).

**Tabla 20.** Efecto de la variante R230C en el IMC en la población indígena.

Poblaciones	Genotipo			P
	R230R	R230C	C230C	
<b>Norte América</b>				
<b>USA</b>				
Pimas(2563)	35.5 (8.4)	35.9 (8.8)	36.9 (7.7)	0.586
<b>México</b>				
Yaquis (45)	25.8 (4.9)	28.6 (4.4)	30.1 (2.9)	0.012
Teeneks (67)	23.6 (3.9)	22.6 (2.6)	27.0 (0.1)	0.978
Coras (123)	25.0 (4.8)	27.5 (5.0)	28.3 (5.8)	0.006
Purépechas (15)	21.1 (2.0)	23.5 (1.9)		0.097
Mazahuas (83)	27.5 (4.1)	27.6 (3.8)		0.758
Nahuas (267)	26.3 (4.1)	25.8 (4.3)	26.9 (3.2)	0.615
Totonacas (113)	26.5 (4.2)	28.5 (5.3)	28.6 (0.4)	0.085
Zapotecos (106)	26.6 (4.8)	27.2 (4.4)	29.4	0.605
Mayas (110)	29.8 (4.9)	29.2 (2.4)	29.2 (8.2)	0.554
<b>Análisis</b>	26.3 (4.4)	26.8 (4.3)	27.8 (4.4)	0.012
<b>Combinado (929)</b>				
<b>Sudamérica</b>				
Kichwas (79)	24.2 (3.2)	25.1 (2.7)	30.6	0.050
Parkatejé (78)	25.8 (2.6)	29.4 (3.6)	31.5	0.0003

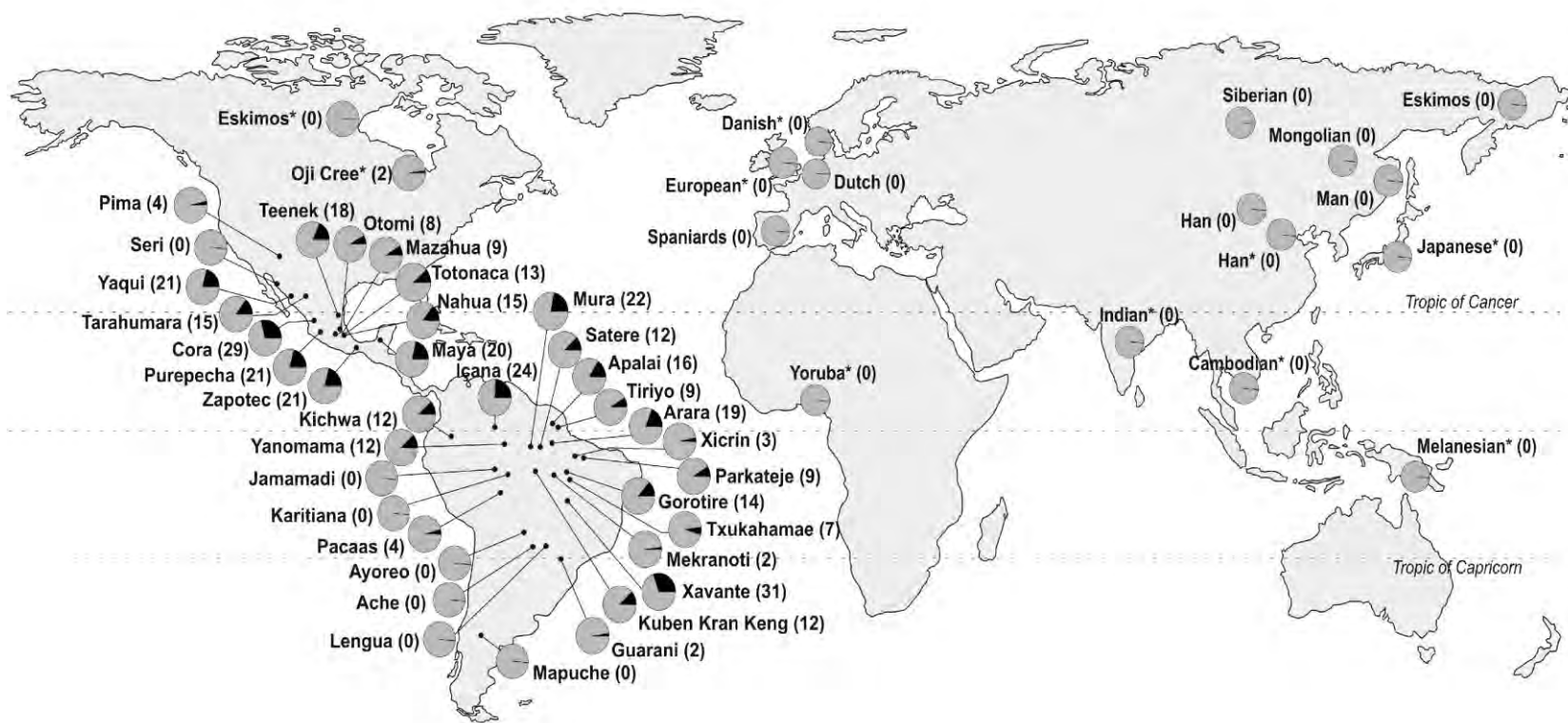
Los datos presentados son medias (desviación estándar). La regresión lineal se realizó ajustando por edad, género y estatus de diabetes.

En la asociación con el IMC, en la población Pima no fue tan evidente este efecto a pesar de ser una muestra de tamaño considerable, por lo contrario fue evidente en muestras más pequeñas como la población Yaqui y Cora, donde la diferencia fue significativa (0.012 y 0.006, respectivamente). Nuevamente debido a que en todos los grupos indígenas el efecto de la variante R230C fue el mismo sobre el IMC, hicimos un estudio combinado para los grupos indígenas mexicanos, observando una diferencia significativa ( $P = 0.012$ ). Al combinar todos los grupos americanos la significancia fue mayor ( $P = 0.0001$ )

#### **10.6.4.1 Distribución geográfica de la variante R230C**

La distribución geográfica del alelo menos frecuente (“C”) de la variante R230C se muestra en la Figura 23. El alelo menos frecuente o alelo “C” se encontró en la mayoría de las poblaciones indígenas analizadas, su frecuencia varía del 0 al 31 %. Este alelo no se encontró en los 863 europeos analizados (Españoles y Neerlandeses), ni tampoco en los grupos asiático que se analizaron (Chinos Han, Manchu, Mongoles, Siberianos y Esquimales). De igual manera, no ha sido reportada en otras poblaciones (Frikke-Schmidt, Nordestgaard et al. 2004; Kooner, Chambers et al. 2008; Hu, Zhong et al. 2009). En este estudio mostramos que la distribución geográfica del alelo “C” es mayor en la zona localizada entre el trópico de cáncer y el trópico de capricornio, y se ve disminuida en las altas latitudes, mostrando una correlación significativa ( $r^2 = 0.328$ ;  $P = 0.02$ ).

En la figura 23 se representa mediante círculos la frecuencia de los genotipos de la variante R230C. El segmento gris oscuro corresponde a la frecuencia de la variante R230C. Los datos mostrados en esta imagen corresponden a los datos obtenidos en el presente trabajo, además de información previamente reportada (Wang, Burnett et al. 2000; Frikke-Schmidt, Nordestgaard et al. 2004; Kooner, Chambers et al. 2008; Hu, Zhong et al. 2009)

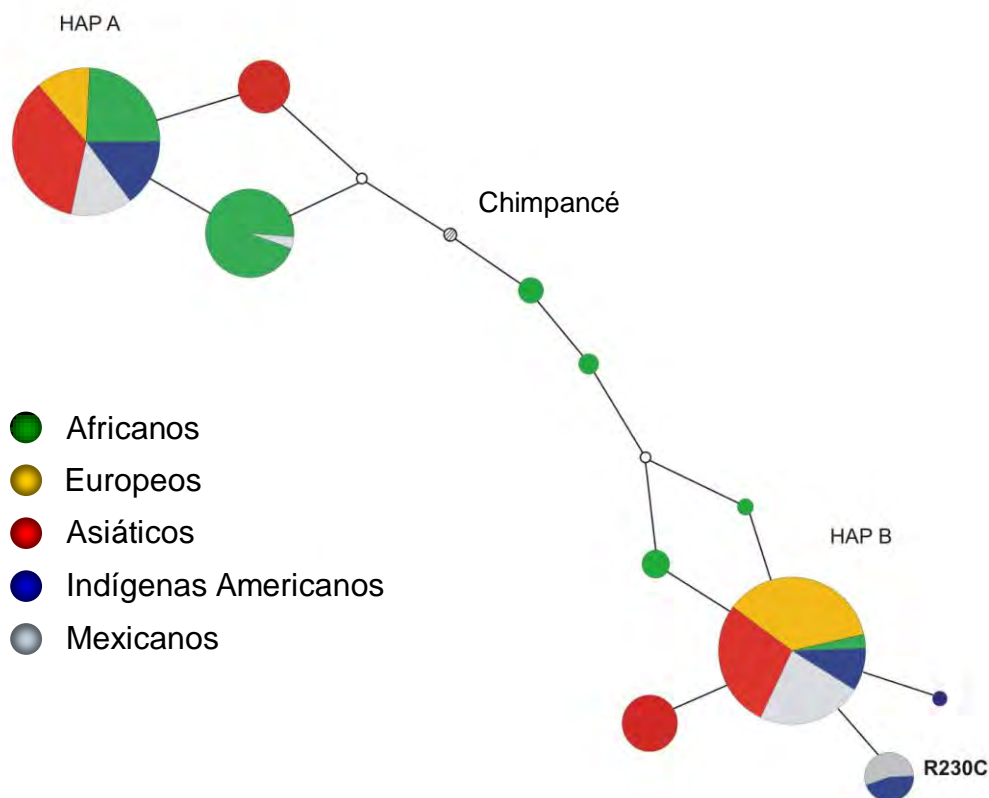


**Figura 23.** Distribución geográfica del alelo menos frecuente de la variante R230C.

#### **10.6.4.2 El alelo C de la variante R230C se encuentra en un solo haplotipo**

Se hizo una reconstrucción filogenética, con el análisis de 15 SNPs (Tabla 15) para inferir la relación evolutiva de la variante R230C. Estos SNPs abarcaron un bloque de 50 Kb y fueron genotipificados en 20 muestras de indígenas americanos y 25 tríos de mexicanos mestizos. También se tomaron datos del HapMap para otras poblaciones y se estudiaron 58 haplotipos. Se identificaron siete haplotipos en indígenas americanos y sólo se encontró un bloque genético que contiene al alelo “C” (haplotipo 32), tanto en mexicanos mestizos como en indígenas americanos. El análisis de Máxima Parsimonia mostrado en la figura 24 muestra la reconstrucción filogenética de dos linajes mayores (Haplogrupo A y B) definidos por el polimorfismo no sinónimo R219K del gen ABCA1. El alelo “C” de la variante R230C se encontró en el haplogrupo B caracterizado por el alelo ancestral 219R.

En la figura 24 se representan mediante círculos cada uno de los haplotipos formados, y el tamaño del mismo representa la frecuencia de cada uno de los haplotipos. Cada color representa a una población como se especifica en la misma figura. La variante R230C mostró ser exclusiva de la población indígena y mexicana mestiza.



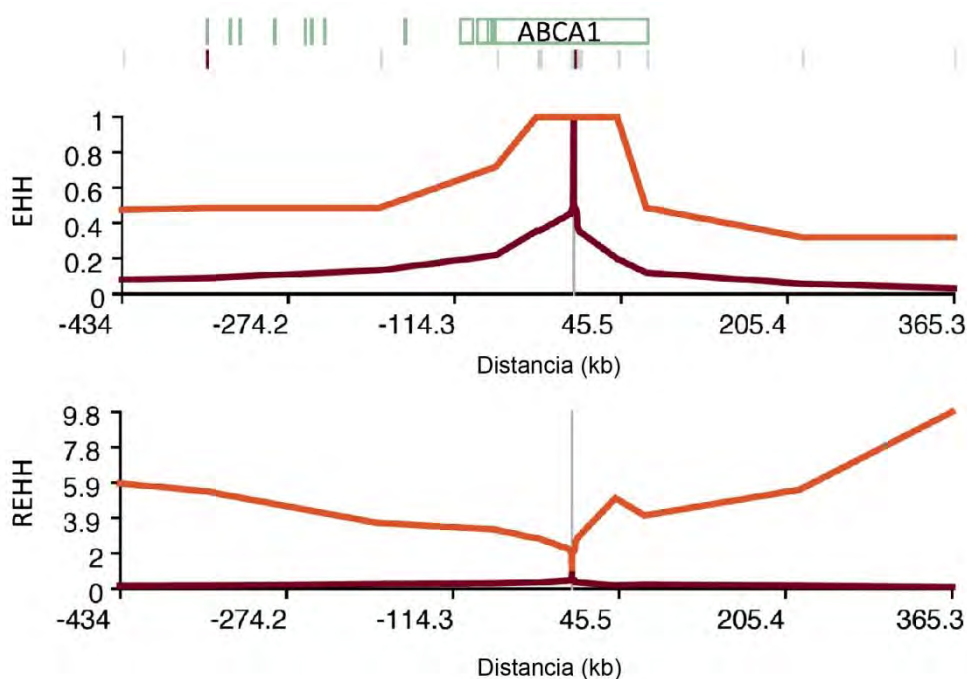
**Figura 24.** Pruebas de Máxima Parsimonia para la variante R230C del gen ABCA1.

#### 10.6.4.3 Pruebas de selección positiva para la variante R230C

Por último se realizaron distintas pruebas que evidencian la selección positiva de la variante R230C. Inicialmente la prueba de haplotipos de largo alcance (LRH) mostró DL que se extiende en un rango más amplio para el alelo C que en los cromosomas que no tenían el alelo C [homocigocidad haplotípica relativa extendida (REEH = 9.8 y 5.9 de 365 a -434 Kb del núcleo respectivamente)] (Figura 25). El valor continuó siendo significativo comparado con el valor de REEH en otras partes de otras regiones genotipificadas en un grupo similar de población indígena americana ( $P = 0,036$  con un core de 300 Kb y  $P = 0,021$  en un marcador de  $H$  de

0.04). Los valores de REHH fueron significativos para la población Kitchwa ( $P = 0.018$  con una distancia de 300 Kb y  $P = 0.007$  en un marcador de  $H$  de 0.04) y Nahua ( $P = 0.043$  con una distancia de 300 Kb y  $P = 0.021$  de un marcador de  $H$  de 0.04). Sólo se encontraron dos haplotipos más que dieron significancia en río arriba del gen ABCA1.

Las imágenes de la figura 25 muestran en la línea más clara al cromosoma portador de la variante R230C, mientras que la línea oscura representa al cromosoma sin el cambio, es decir R230R, tanto para EHH como para REHH.



**Figura 25.** Pruebas de EHH y REHH para la variante R230C del gen ABCA1

## 10.7 Discusión

El efecto de la variante R230C sobre los niveles plasmáticos de C-HDL en las distintas poblaciones indígenas americanas que se analizaron, fue el mismo que en los escenarios anteriores, pues los portadores de la variante mostraron menor concentración plasmática de C-HDL. Con esto mostramos que R230C es una variante funcional que influye en la modulación de los niveles plasmáticos de C-HDL tanto en la población indígena como en las poblaciones derivadas de esta. Esto podría explicar que la prevalencia de niveles bajos de C-HDL varía geográficamente, siendo alta particularmente en países latinoamericanos, donde la prevalencia es mayor al 46 % en hombres (2001). En México la Hipoalfalipoproteinemia es una de las principales dislipidemias en población adulta (Aguilar-Salinas, Olaiz et al. 2001). Este fenotipo y otros rasgos metabólicos los cuales son frecuentes en la población latina han sido atribuidos al factor genético, ya que se ha sugerido son consecuencia de la carga genética amerindia (Lorenzo, Serrano-Rios et al. 2001). Estudios previos han mostrado que la población indígena americana tiene una menor concentración plasmática de C-HDL (Howard, Davis et al. 1983). Es en este trabajo donde demostramos mediante un estudio a gran escala que incluyó distintos grupos étnicos tanto de América como de otros continentes, que la variante R230C podría explicar en parte esta característica de niveles bajos de C-HDL y otros rasgos metabólicos, ya que en esta población también se observó un aumento de el IMC en los portadores del cambio.

En este estudio fue posible descartar el posible DL de la variante R230C, con otras variantes del gen ABCA1 localizadas en bloques distintos al que contiene R230C. La secuenciación de los 50 exones del gen ABCA1 y 1 Kb de la región promotora en muestras específicas, no mostró aparentemente alguna variante que pudiera estar en DL con la variante R230C. Esto nos permitió sugerir que la variante R230C era la responsable de la asociación. Posteriormente, en base a la relevancia clínica de la variante R230C, que sugería un efecto funcional aunado a los estudios *in silico* y a las características fisicoquímicas del cambio, realizamos estudios funcionales *in vitro*, mediante la clonación de la variante en las líneas celulares HEK293.



Comprobamos que la variante R230C del gen ABCA1 disminuye el eflujo de colesterol en un 27 %, por lo que esto podría provocar alteraciones en la homeostasis de colesterol a nivel celular, desencadenar en lipotoxicidad por acumulación de colesterol. Si esto sucediera en células  $\beta$ -pancreáticas, podría ser la causa de la inhibición en la secreción de insulina (Figura 26), lo cual podría explicar la asociación de la variante R230C con la DT2.

En nuestro estudio previo mostramos que la variante R230C fue más frecuente en algunas poblaciones indígenas que en los mestizos (Villarreal-Molina, Aguilar-Salinas et al. 2007). Además esta variante fue originalmente reportada como una mutación del gen ABCA1 en la población indígena Canadiense llamada Oji Cree, en una población de individuos con hipoalfalipoproteinemia familiar (Wang, Burnett et al. 2000). Estos resultados, aunados a los distintos estudios en poblaciones de otros continentes que reportaron la ausencia de la variante R230C (Wang, Burnett et al. 2000; Frikke-Schmidt, Nordestgaard et al. 2004; Gonzalez-Jose, Bortolini et al. 2008; Kooner, Chambers et al. 2008), sugerían que esta variante podría ser exclusiva de la población amerindia y poblaciones derivadas. Es por ello que nos dimos a la tarea de evaluar la distribución geográfica de la variante R230C mediante este estudio de poblaciones a gran escala, el cual incluyó no sólo poblaciones del continente Americano, sino que también gracias a la colaboración con distintos grupos de investigación fue posible la inclusión de distintas poblaciones de otros continentes. Una de las poblaciones evaluadas fue la población española, ya que es sabido que es una de las poblaciones que contribuyó en mayor proporción al mestizaje. Lo que mostramos el presente estudio es que la variante R230C sólo se encontró en las poblaciones localizadas en el continente americano. Con lo cual es posible sugerir que la variante R230C es la primera variante funcional exclusiva de la población amerindia y poblaciones derivadas relacionada con los niveles plasmáticos de C-HDL. Además la reconstrucción filogenética obtenida por los datos de Network que nos da el análisis de parsimonia máxima mostró que la variante R230C se encontró sólo en población indígena y poblaciones derivadas.

Por otro lado, los estudios de selección positiva (REHH y EHH) de la variante R230C muestran que es una variante que se ha conservado por selección positiva, sin embargo ha sido asociada a distintos rasgos metabólicos de riesgo, por lo que la pregunta que se formula, es ¿porque si es una variante de riesgo, se ha conservado?. Una de las posibles respuestas podría apoyarse en la teoría del gen ahorrador propuesta por Neel (Neel 1962), la cual propone que durante periodos de hambruna en las poblaciones sucedieron cambios genéticos por adaptación que le permitieron conservar energía, para los periodos más difíciles. Debemos recordar que la población que colonizó América fue una población nómada, por lo que esta teoría podría explicar el cambio de R230C. Otra posible respuesta es que este cambio pudo proteger contra enfermedades infecciosas, como se ha reportado para otros cambios, en especial para la malaria (Sabeti 2008; Schaffner and Sabeti 2008). Esto concuerda con la distribución geográfica de la variante R230C, que parece desplegarse de norte a sur, indicando que posiblemente la estaba en el estrecho de Bering de la población que colonizó América fue suficiente para que sucedieran cambios genéticos de adaptación (Fagundes, Kanitz et al. 2008; Gonzalez-Jose, Bortolini et al. 2008; Kitchen, Miyamoto et al. 2008), siendo R230C uno de ellos. La distribución de la variante es que es más frecuente entre el trópico de Cáncer y de Capricornio, coincidiendo con zonas endémicas de enfermedades infecciosas, como lo son la malaria, el dengue, la fiebre amarilla, etc.(Rogers and Randolph 2000). Por lo que podríamos sugerir que la variante R230C podría proteger contra este tipo de enfermedades. Lo cual coincide con los estudios que ubican al colesterol como parte importante en la replicación de algunos virus, como la malaria, dengue(Lee, Lin et al. 2008) y VIH (Manes, del Real et al. 2000). Además actualmente se sabe que el transportador ABCA1 tiene un papel importante en la distribución de distintas citocinas (MIF y Nef) esenciales para los procesos infecciosos virales (Assuncao-Miranda, Amaral et al. 2010; Morrow, Grant et al. 2010).

Estos resultados fueron publicados en la revista *Human Molecular Genetic* (Acuna-Alonzo, Flores-Dorantes et al. 2010).

## 11. Conclusiones generales

La variante R230C mostró asociación con la diabetes tipo 2 y específicamente a la diabetes de inicio temprano. Este efecto fue independiente de la mezcla étnica que caracteriza a la población mestiza mexicana.

El efecto de la variante R230C sobre los niveles plasmáticos de C-HDL fue el mismo en los distintos escenarios [población pediátrica e indígena y previamente en población adulta (Villarreal-Molina, Aguilar-Salinas et al. 2007)].

La presencia de la variante R230C explica el 4 % de las variaciones de la modulación de los niveles plasmáticos de HDL.

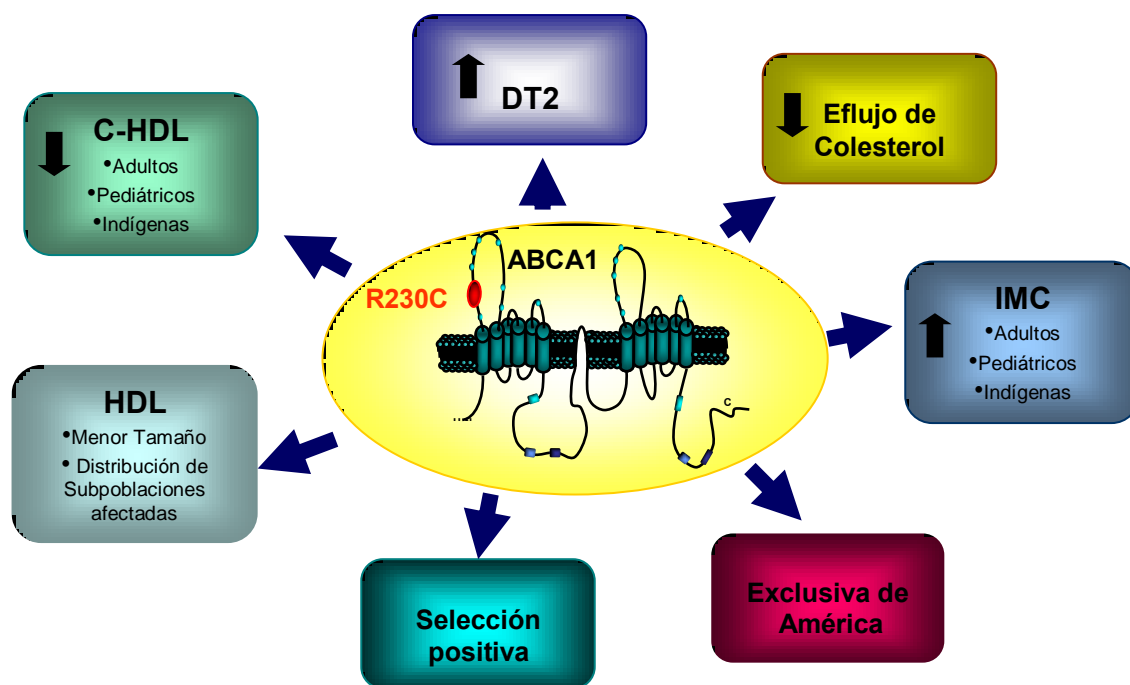
El efecto de la variante R230C sobre los niveles plasmáticos de C-HDL es el mismo a edades tempranas, siendo independiente del tiempo de exposición a ambientes obesogénicos, además es independiente del género, ya que tanto en niños como en niñas se observó el mismo comportamiento

La variante R230C tiene un efecto sobre la distribución de las subfracciones de las HDL, y disminuye en el tamaño de la partícula en los portadores del cambio R230C [perfil reportado para niños obesos con resistencia a la insulina o DT2 (Perez-Mendez, O. et al 2007)]

El estudio en poblaciones indígenas americanas y de otros continentes, sugiere que la variante R230C es la primera variante funcional reportada exclusiva de América. . La variante R230C fue conservada por selección positiva.

De acuerdo a los estudios funcionales *in vitro*, la variante R230C es una variante funcional, ya que su presencia disminuye el 27 % el eflujo de colesterol, sin afectar la expresión de la proteína ABCA1.

Por último de manera general, concluimos que la variante R230C es una variante funcional exclusiva de la población amerindia y poblaciones derivadas que a nivel epidemiológico podría tener una gran contribución, ya que está asociada a distintos rasgos metabólicos, presentándose algunos de ellos desde la infancia, y son independientes del tiempo de exposición a ambientes obesogénicos y del género (Figura 26).



**Figura 26.** Efectos de la variante funcional R230C del gen ABCA1 en los distintos escenarios de la población mexicana.

## 12. Expectativas

Los datos obtenidos en el presente trabajo nos permitieron entender más acerca el efecto de la variante R230C del gen ABCA1 sobre los niveles plasmáticos de C-HDL en distintos escenarios. Gracias a estos resultados se sabe que la variante se origino recientemente, que se ha conservado por selección positiva y que es exclusiva de la población amerindia y poblaciones derivadas de estas. También se comprobó mediante estudios funcionales *in vitro* que la variante disminuye el eflujo de colesterol, uno de los principales mecanismos de la proteína ABCA1. Estos datos han dado pie a la generación de más preguntas, pues será necesario evaluar el efecto de la variante R230C en distintos tejidos celulares, mediante estudios tanto *in vitro* como *ex vivo*. Una de las principales preguntas por resolver es la función que presenta esta variante en las células  $\beta$  pancreáticas, para entender cuál es el papel funcional en el desarrollo de la DT2.

Otro tejido importante para evaluar es el adiposo, actualmente sabemos que R230C está asociada al IMC en población pediátrica, indígena y adulta. En la población adulta también se asoció a la obesidad, por lo que sería interesante evaluar mediante estudios funcionales cual es el papel que desempeña esta variante en los adipocitos, y con ello saber si el eflujo de colesterol también se ve afectado, pudiendo ser la posible explicación de la asociación con estos parámetros.

Se ha sugerido que la alta frecuencia de hígado graso en hispanos, podría deberse a la herencia amerindia (Browning, Szczepaniak et al. 2004). La variante R230C que es una variante relacionada con la modulación de los niveles de C-HDL, podría jugar un papel importante en el eflujo de colesterol en células del hígado, como lo son los hepatocitos, por lo que será necesario evaluar el efecto de la variante en el desarrollo del hígado graso mediante estudios funcionales.

Por último, se ha sugerido que la distribución geográfica de la variante corresponde a las zonas endémicas de enfermedad infecciosas, como lo son: el dengue, la malaria y la fiebre amarilla. Este tipo de enfermedades son causadas por virus. Se

ha reportado que ABCA1 desempeña un rol importante en el desarrollo de distintas infecciones virales, ya que los algunos virus como lo es el VIH utilizan este transportador para el transporte de citocinas esenciales en la replicación viral. Es por ello, que será necesario ampliar mediante estudios funcionales el efecto de la variante R230C en el desarrollo de enfermedades infecciosas como el dengue y la malaria, ya que se ha propuesto que es un genotipo que se conservó por selección positiva, por lo que se sugiere los portadores de la variante podrían tener el beneficio de resistencia a este tipo de enfermedades.

## **13. Glosario**

**ANOVA.** Análisis de la Varianza, es una colección de modelos estadísticos y procedimientos asociados, en el cual la varianza está particionada en ciertos componentes debidos a diferentes variables explicativas

**AMOVA.** Análisis de Varianza Molecular, es un método para el estudio de variaciones moleculares en especies. Se basa en un análisis de permutación que involucra varias suposiciones acerca de las propiedades estadísticas de los datos.

**DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO (DL).** Es la propiedad de algunos genes de segregar de manera conjunta, manteniendo una frecuencia de recombinación menor del 50 %.

**DIABETES TIPO 2.** es una enfermedad multifactorial, que se caracteriza por la presencia de hiperglucemia en ayuno (concentraciones plasmáticas > a 126 mg/dL, OMS), la cual es resultado del defecto en la secreción y/o acción de la insulina.

**ENFERMEDAD DE TANGIER.** Enfermedad autosómica recesiva, caracterizada por concentraciones muy bajas o la ausencia total de C-HDL en el plasma, que origina la acumulación de ésteres de colesterol en numerosos tejidos. La enfermedad parece debida a un defecto genético autosómico que afecta el metabolismo de las HDL. Se caracteriza por hipertrofia amigdalal, con coloración anaranjada, esplenomegalia, hepatomegalia, adenopatías, opacidades corneales, polineuritis y depósito de ésteres de colesterol en la mucosa intestinal.

**ESCALA DE TANNER.** Escala que permite evaluar los estadios del desarrollo físico en niños, adolescentes y adultos. Los estadios definen las mediciones físicas del desarrollo de los caracteres primarios y secundarios, como lo son las mamas, genitales y el vello púbico.

**GEN.** Segmento de DNA relacionado con la producción de cadenas de polipéptidos, que incluye regiones que preceden y que anteceden a la región codificantes (exones) y no codificantes (intrones).

**HIPOALFALIPOPROTEINEMIA.** Se define por la presencia de concentraciones bajas de C\_HDL (menores a 35 mg/dL)

**HETEROCIGOTO.** Cuando los alelos del gen son diferentes en cada cromosoma.

**HOMOCIGOTO.** Cuando los alelos del gen son idénticos en ambas cromosomas.

**MUTACION.** Describe un cambio en la secuencia del DNA genómico.

**R230C.** Cambio en de base del aminoácido arginina por una cisteína en la posición 230 de la proteína.

**SNP.** Single Nucleotide Polymorphism, por sus siglas en inglés, Polimorfismo de un solo nucleótido, es una variación en la secuencia de ADN que afecta sólo una base de una secuencia del genoma. Estas variaciones deben suceder al menos en el 1 % de la población.



## **14. Recursos de la web**

Las URLs utilizadas fueron las siguientes:

NCBi, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?locusId=19](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?locusId=19)

HapMap database, <http://www.hapmap.org/>

SNP500CANCER, <http://snp500cancer.nci.nih.gov>

HGDP-CEPH database, <http://hgdp.uchicago.edu/cgi-bin/gbrowse/HGDP>

Arlequin 3.11 software, <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3/>

Network 4.510 software, <http://www.fluxus-engineering.com>

Sweep software, <http://www.broad.mit.edu/mpg/sweep/index.html>

[http://www.kbioscience.co.uk/reagents/KASP\\_manual.pdf](http://www.kbioscience.co.uk/reagents/KASP_manual.pdf)

## **15. Referencias**

- (2001). "Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III)." JAMA **285**(19): 2486-2497.
- Abrass, C. K. (2004). "Cellular lipid metabolism and the role of lipids in progressive renal disease." Am J Nephrol **24**(1): 46-53.
- Acosta, D., T. Affolder, et al. (2003). "Measurement of prompt charm meson production cross sections in pp collisions at square root  $s = 1.96$  TeV." Phys Rev Lett **91**(24): 241804.
- Acuna-Alonzo, V., T. Flores-Dorantes, 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**(14): 2877-2885.
- Aguilar-Salinas, C. A., F. J. Gomez-Perez, et al. (2010). "Prevalence of dyslipidemias in the Mexican National Health and Nutrition Survey 2006." Salud Publica Mex **52 Suppl 1**: S44-53.
- Aguilar-Salinas, C. A., G. Olaiz, et al. (2001). "High prevalence of low HDL cholesterol concentrations and mixed hyperlipidemia in a Mexican nationwide survey." J Lipid Res **42**(8): 1298-1307.
- Angel, A., R. Yuen, et al. (1981). "Exchange of free cholesterol between low density lipoproteins and human adipocytes." Can J Biochem **59**(8): 655-661.
- Anton, G., R. Achim, et al. (1999). "Is the human papillomavirus DNA present in penile warts?" Rom J Virol **50**(1-4): 91-97.
- Arya, R., R. Duggirala, et al. (2002). "Linkage of high-density lipoprotein-cholesterol concentrations to a locus on chromosome 9p in Mexican Americans." Nat Genet **30**(1): 102-105.
- Assuncao-Miranda, I., F. A. Amaral, et al. (2010). "Contribution of macrophage migration inhibitory factor to the pathogenesis of dengue virus infection." FASEB J **24**(1): 218-228.

- Asztalos, B. F., M. E. Brousseau, et al. (2001). "Subpopulations of high density lipoproteins in homozygous and heterozygous Tangier disease." *Atherosclerosis* **156**(1): 217-225.
- Aye, I. L., A. T. Singh, et al. (2009). "Transport of lipids by ABC proteins: interactions and implications for cellular toxicity, viability and function." *Chem Biol Interact* **180**(3): 327-339.
- Bandelt, H. J., P. Forster, et al. (1999). "Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies." *Mol Biol Evol* **16**(1): 37-48.
- Bao, W., S. R. Srinivasan, et al. (1997). "Longitudinal changes in cardiovascular risk from childhood to young adulthood in offspring of parents with coronary artery disease: the Bogalusa Heart Study." *JAMA* **278**(21): 1749-1754.
- Barrett, J. C., B. Fry, et al. (2005). "Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps." *Bioinformatics* **21**(2): 263-265.
- Barter, P., J. Kastelein, et al. (2003). "High density lipoproteins (HDLs) and atherosclerosis; the unanswered questions." *Atherosclerosis* **168**(2): 195-211.
- Barter, P. J. (2002). "Hugh sinclair lecture: the regulation and remodelling of HDL by plasma factors." *Atheroscler Suppl* **3**(4): 39-47.
- Bertrais, S., B. Balkau, et al. (2000). "Puberty-associated differences in total cholesterol and triglyceride levels according to sex in French children aged 10-13 years." *Ann Epidemiol* **10**(5): 316-323.
- Beyea, M. M., C. L. Heslop, et al. (2007). "Selective up-regulation of LXR-regulated genes ABCA1, ABCG1, and APOE in macrophages through increased endogenous synthesis of 24(S),25-epoxycholesterol." *J Biol Chem* **282**(8): 5207-5216.
- Blanche, P. J., E. L. Gong, et al. (1981). "Characterization of human high-density lipoproteins by gradient gel electrophoresis." *Biochim Biophys Acta* **665**(3): 408-419.
- Bonilla, C., E. J. Parra, et al. (2004). "Admixture in the Hispanics of the San Luis Valley, Colorado, and its implications for complex trait gene mapping." *Ann Hum Genet* **68**(Pt 2): 139-153.

- Bowden, K. and N. D. Ridgway (2008). "OSBP negatively regulates ABCA1 protein stability." J Biol Chem **283**(26): 18210-18217.
- Brousseau, M. E. (2004). "Common variation in genes involved in HDL metabolism influences coronary heart disease risk at the population level." Rev Endocr Metab Disord **5**(4): 343-349.
- Brousseau, M. E., G. P. Eberhart, et al. (2000). "Cellular cholesterol efflux in heterozygotes for tangier disease is markedly reduced and correlates with high density lipoprotein cholesterol concentration and particle size." J Lipid Res **41**(7): 1125-1135.
- Browning, J. D., L. S. Szczepaniak, et al. (2004). "Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity." Hepatology **40**(6): 1387-1395.
- Brunham, L. R., J. K. Kruit, et al. (2007). "Beta-cell ABCA1 influences insulin secretion, glucose homeostasis and response to thiazolidinedione treatment." Nat Med **13**(3): 340-347.
- Brunham, L. R., J. K. Kruit, et al. (2008). "Cholesterol in islet dysfunction and type 2 diabetes." J Clin Invest **118**(2): 403-408.
- Brunham, L. R., R. R. Singaraja, et al. (2006). "Variations on a gene: rare and common variants in ABCA1 and their impact on HDL cholesterol levels and atherosclerosis." Annu Rev Nutr **26**: 105-129.
- Brunham, L. R., R. R. Singaraja, et al. (2005). "Accurate prediction of the functional significance of single nucleotide polymorphisms and mutations in the ABCA1 gene." PLoS Genet **1**(6): e83.
- Clee, S. M., J. J. Kastelein, et al. (2000). "Age and residual cholesterol efflux affect HDL cholesterol levels and coronary artery disease in ABCA1 heterozygotes." J Clin Invest **106**(10): 1263-1270.
- Clee, S. M., A. H. Zwinderman, et al. (2001). "Common genetic variation in ABCA1 is associated with altered lipoprotein levels and a modified risk for coronary artery disease." Circulation **103**(9): 1198-1205.

- Cnop, M., J. C. Hannaert, et al. (2002). "Low density lipoprotein can cause death of islet beta-cells by its cellular uptake and oxidative modification." Endocrinology **143**(9): 3449-3453.
- Cohen, J. C., R. S. Kiss, et al. (2004). "Multiple rare alleles contribute to low plasma levels of HDL cholesterol." Science **305**(5685): 869-872.
- Costet, P., F. Lalanne, et al. (2003). "Retinoic acid receptor-mediated induction of ABCA1 in macrophages." Mol Cell Biol **23**(21): 7756-7766.
- Costet, P., Y. Luo, et al. (2000). "Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor." J Biol Chem **275**(36): 28240-28245.
- Chawla, A., W. A. Boisvert, et al. (2001). "A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis." Mol Cell **7**(1): 161-171.
- Choudhry, S., N. E. Coyle, et al. (2006). "Population stratification confounds genetic association studies among Latinos." Hum Genet **118**(5): 652-664.
- Dean, M., Y. Hamon, et al. (2001). "The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily." J Lipid Res **42**(7): 1007-1017.
- Denis, M., B. Haidar, et al. (2004). "Characterization of oligomeric human ATP binding cassette transporter A1. Potential implications for determining the structure of nascent high density lipoprotein particles." J Biol Chem **279**(40): 41529-41536.
- Despres, J. P. (1991). "Lipoprotein metabolism in visceral obesity." Int J Obes **15 Suppl 2**: 45-52.
- Despres, J. P., S. Moorjani, et al. (1990). "Regional distribution of body fat, plasma lipoproteins, and cardiovascular disease." Arteriosclerosis **10**(4): 497-511.
- Eisner, B. H., S. P. Porten, et al. (2010). "Diabetic kidney stone formers excrete more oxalate and have lower urine pH than nondiabetic stone formers." J Urol **183**(6): 2244-2248.
- Excoffier, L., G. Laval, et al. (2005). "Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis." Evol Bioinform Online **1**: 47-50.

- Fagundes, N. J., R. Kanitz, et al. (2008). "A reevaluation of the Native American mtDNA genome diversity and its bearing on the models of early colonization of Beringia." PLoS One **3**(9): e3157.
- Feng, B. and I. Tabas (2002). "ABCA1-mediated cholesterol efflux is defective in free cholesterol-loaded macrophages. Mechanism involves enhanced ABCA1 degradation in a process requiring full NPC1 activity." J Biol Chem **277**(45): 43271-43280.
- Feng, B., P. M. Yao, et al. (2003). "The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages." Nat Cell Biol **5**(9): 781-792.
- Fisher, E. A., L. Van Horn, et al. (1997). "Nutrition and children. A statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee, American Heart Association." Circulation **95**(9): 2332-2333.
- Flavell, D. M., H. Ireland, et al. (2005). "Peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene variation influences age of onset and progression of type 2 diabetes." Diabetes **54**(2): 582-586.
- Flores-Dorantes, T., O. Arellano-Campos, 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**(17-18): 1214-1217.
- Frayling, T. M., S. Wiltshire, et al. (2003). "Young-onset type 2 diabetes families are the major contributors to genetic loci in the Diabetes UK Warren 2 genome scan and identify putative novel loci on chromosomes 8q21, 21q22, and 22q11." Diabetes **52**(7): 1857-1863.
- Frikke-Schmidt, R., B. G. Nordestgaard, et al. (2004). "Genetic variation in ABC transporter A1 contributes to HDL cholesterol in the general population." J Clin Invest **114**(9): 1343-1353.
- Gerin, I., V. W. Dolinsky, et al. (2005). "LXRbeta is required for adipocyte growth, glucose homeostasis, and beta cell function." J Biol Chem **280**(24): 23024-23031.

- Gonzalez-Jose, R., M. C. Bortolini, et al. (2008). "The peopling of America: craniofacial shape variation on a continental scale and its interpretation from an interdisciplinary view." Am J Phys Anthropol **137**(2): 175-187.
- Gordon, D. J., J. L. Probstfield, et al. (1989). "High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies." Circulation **79**(1): 8-15.
- Guyton, J. R. and K. F. Klemp (1996). "Development of the lipid-rich core in human atherosclerosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **16**(1): 4-11.
- Halayem-Dhouib, S., L. Zaghdoudi, et al. (2010). "[Burnout among mental health professionals: A Tunisian experience]." Rev Epidemiol Sante Publique **58**(6): 403-408.
- Hamsten, A., L. Iselius, et al. (1986). "Genetic and cultural inheritance of serum lipids, low and high density lipoprotein cholesterol and serum apolipoproteins A-I, A-II and B." Atherosclerosis **60**(3): 199-208.
- Hao, M., W. S. Head, et al. (2007). "Direct effect of cholesterol on insulin secretion: a novel mechanism for pancreatic beta-cell dysfunction." Diabetes **56**(9): 2328-2338.
- Hassan, H. H., M. Denis, et al. (2007). "Identification of an ABCA1-dependent phospholipid-rich plasma membrane apolipoprotein A-I binding site for nascent HDL formation: implications for current models of HDL biogenesis." J Lipid Res **48**(11): 2428-2442.
- Heller, D. A., U. de Faire, et al. (1993). "Genetic and environmental influences on serum lipid levels in twins." N Engl J Med **328**(16): 1150-1156.
- Hickman, T. B., R. R. Briefel, et al. (1998). "Distributions and trends of serum lipid levels among United States children and adolescents ages 4-19 years: data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey." Prev Med **27**(6): 879-890.
- Howard, B. V., M. P. Davis, et al. (1983). "Plasma and lipoprotein cholesterol and triglyceride concentrations in the Pima Indians: distributions differing from those of Caucasians." Circulation **68**(4): 714-724.

- Hozoji, M., Y. Kimura, et al. (2009). "Formation of two intramolecular disulfide bonds is necessary for ApoA-I-dependent cholesterol efflux mediated by ABCA1." J Biol Chem **284**(17): 11293-11300.
- Hu, S., Y. Zhong, et al. (2009). "Novel rare alleles of ABCA1 are exclusively associated with extreme high-density lipoprotein-cholesterol levels among the Han Chinese." Clin Chem Lab Med **47**(10): 1239-1245.
- Ietta, F., N. Bechi, et al. (2010). "17 $\beta$ -Estradiol modulates the macrophage migration inhibitory factor secretory pathway by regulating ABCA1 expression in human first-trimester placenta." Am J Physiol Endocrinol Metab **298**(3): E411-418.
- Jiang, X. C., F. Paultre, et al. (2000). "Plasma sphingomyelin level as a risk factor for coronary artery disease." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(12): 2614-2618.
- Jonas, A. (2000). "Lecithin cholesterol acyltransferase." Biochim Biophys Acta **1529**(1-3): 245-256.
- Karhapaa, P., M. Malkki, et al. (1994). "Isolated low HDL cholesterol. An insulin-resistant state." Diabetes **43**(3): 411-417.
- Kennedy, M. A., G. C. Barrera, et al. (2005). "ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation." Cell Metab **1**(2): 121-131.
- Kitchen, A., M. M. Miyamoto, et al. (2008). "A three-stage colonization model for the peopling of the Americas." PLoS One **3**(2): e1596.
- Knowler, W. C., P. H. Bennett, et al. (1978). "Diabetes incidence and prevalence in Pima Indians: a 19-fold greater incidence than in Rochester, Minnesota." Am J Epidemiol **108**(6): 497-505.
- Kolovou, G. D., D. P. Mikhailidis, et al. (2006). "Tangier disease four decades of research: a reflection of the importance of HDL." Curr Med Chem **13**(7): 771-782.
- Kooner, J. S., J. C. Chambers, et al. (2008). "Genome-wide scan identifies variation in MLXIPL associated with plasma triglycerides." Nat Genet **40**(2): 149-151.
- Kuczmarski, R. J., C. L. Ogden, et al. (2002). "2000 CDC Growth Charts for the United States: methods and development." Vital Health Stat **11**(246): 1-190.



- Kuivenhoven, J. A., G. K. Hovingh, et al. (2003). "Heterozygosity for ABCA1 gene mutations: effects on enzymes, apolipoproteins and lipoprotein particle size." *Atherosclerosis* **171**(2): 311-319.
- Laakso, M. and K. Pyorala (1990). "Adverse effects of obesity on lipid and lipoprotein levels in insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes." *Metabolism* **39**(2): 117-122.
- Lee, C. J., H. R. Lin, et al. (2008). "Cholesterol effectively blocks entry of flavivirus." *J Virol* **82**(13): 6470-6480.
- Lehmann, J. M., L. B. Moore, et al. (1995). "An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma)." *J Biol Chem* **270**(22): 12953-12956.
- Lin, G. and J. F. Oram (2000). "Apolipoprotein binding to protruding membrane domains during removal of excess cellular cholesterol." *Atherosclerosis* **149**(2): 359-370.
- Lisker, R., E. Ramirez, et al. (1990). "Gene frequencies and admixture estimates in four Mexican urban centers." *Hum Biol* **62**(6): 791-801.
- Lopez-Simon, L., M. de Oya, et al. (2009). "Genetic determinants of plasma HDL-cholesterol levels in prepubertal children." *Clin Chim Acta* **403**(1-2): 203-206.
- Lorenzo, C., M. Serrano-Rios, et al. (2001). "Was the historic contribution of Spain to the Mexican gene pool partially responsible for the higher prevalence of type 2 diabetes in mexican-origin populations? The Spanish Insulin Resistance Study Group, the San Antonio Heart Study, and the Mexico City Diabetes Study." *Diabetes Care* **24**(12): 2059-2064.
- Mahaney, M. C., L. Almasy, et al. (2003). "A quantitative trait locus on chromosome 16q influences variation in plasma HDL-C levels in Mexican Americans." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**(2): 339-345.
- Manes, S., G. del Real, et al. (2000). "Membrane raft microdomains mediate lateral assemblies required for HIV-1 infection." *EMBO Rep* **1**(2): 190-196.
- Marquette, A., B. Lorber, et al. (2010). "Reversible liposome association induced by LAH4: a peptide with potent antimicrobial and nucleic acid transfection activities." *Biophys J* **98**(11): 2544-2553.

- Martinez, L. O., B. Agerholm-Larsen, et al. (2003). "Phosphorylation of a pest sequence in ABCA1 promotes calpain degradation and is reversed by ApoA-I." J Biol Chem **278**(39): 37368-37374.
- McGill, H. C., Jr., C. A. McMahan, et al. (1997). "Effects of serum lipoproteins and smoking on atherosclerosis in young men and women. The PDAY Research Group. Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth." Arterioscler Thromb Vasc Biol **17**(1): 95-106.
- Medina-Urrutia, A., J. G. Juarez-Rojas, et al. (2008). "High-density lipoprotein subclasses distribution and composition in Mexican adolescents with low HDL cholesterol and/or high triglyceride concentrations, and its association with insulin and C-reactive protein." Atherosclerosis **201**(2): 392-397.
- Miao, B., S. Zondlo, et al. (2004). "Raising HDL cholesterol without inducing hepatic steatosis and hypertriglyceridemia by a selective LXR modulator." J Lipid Res **45**(8): 1410-1417.
- Morrow, M. P., A. Grant, et al. (2010). "Stimulation of the liver X receptor pathway inhibits HIV-1 replication via induction of ATP-binding cassette transporter A1." Mol Pharmacol **78**(2): 215-225.
- Natarajan, P., K. K. Ray, et al. (2010). "High-density lipoprotein and coronary heart disease: current and future therapies." J Am Coll Cardiol **55**(13): 1283-1299.
- Neel, J. V. (1962). "Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"?" Am J Hum Genet **14**: 353-362.
- Oram, J. F. and J. W. Heinecke (2005). "ATP-binding cassette transporter A1: a cell cholesterol exporter that protects against cardiovascular disease." Physiol Rev **85**(4): 1343-1372.
- Oram, J. F., A. M. Vaughan, et al. (2001). "ATP-binding cassette transporter A1 mediates cellular secretion of alpha-tocopherol." J Biol Chem **276**(43): 39898-39902.
- Osborne, T. F. (2000). "Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): key regulators of nutritional homeostasis and insulin action." J Biol Chem **275**(42): 32379-32382.

- Parra, E. J., E. Cameron, et al. (2007). "Association of TCF7L2 polymorphisms with type 2 diabetes in Mexico City." Clin Genet **71**(4): 359-366.
- Passarelli, M., C. Tang, et al. (2005). "Advanced glycation end product precursors impair ABCA1-dependent cholesterol removal from cells." Diabetes **54**(7): 2198-2205.
- Perez-Mendez, O. (2004). "[High density lipoproteins (HDL). A therapeutic objective in the atherosclerosis prevention?]." Arch Cardiol Mex **74**(1): 53-67.
- Perez-Mendez, O., M. Torres-Tamayo, et al. (2007). "Abnormal HDL subclasses distribution in overweight children with insulin resistance or type 2 diabetes mellitus." Clin Chim Acta **376**(1-2): 17-22.
- Prattes, S., G. Horl, et al. (2000). "Intracellular distribution and mobilization of unesterified cholesterol in adipocytes: triglyceride droplets are surrounded by cholesterol-rich ER-like surface layer structures." J Cell Sci **113 ( Pt 17)**: 2977-2989.
- Rader, D. J. and C. Maugeais (2000). "Genes influencing HDL metabolism: new perspectives and implications for atherosclerosis prevention." Mol Med Today **6**(4): 170-175.
- Remaley, A. T., S. Rust, et al. (1999). "Human ATP-binding cassette transporter 1 (ABC1): genomic organization and identification of the genetic defect in the original Tangier disease kindred." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(22): 12685-12690.
- Repa, J. J. and D. J. Mangelsdorf (1999). "Nuclear receptor regulation of cholesterol and bile acid metabolism." Curr Opin Biotechnol **10**(6): 557-563.
- Robins, S. J. (2001). "Targeting low high-density lipoprotein cholesterol for therapy: lessons from the Veterans Affairs High-density Lipoprotein Intervention Trial." Am J Cardiol **88**(12A): 19N-23N.
- Rodriguez-Moran, M., B. Salazar-Vazquez, et al. (2004). "Metabolic syndrome among children and adolescents aged 10-18 years." Diabetes Care **27**(10): 2516-2517.
- Roehrich, M. E., V. Mooser, et al. (2003). "Insulin-secreting beta-cell dysfunction induced by human lipoproteins." J Biol Chem **278**(20): 18368-18375.

- Rogers, D. J. and S. E. Randolph (2000). "The global spread of malaria in a future, warmer world." Science **289**(5485): 1763-1766.
- Roosbeek, S., F. Peelman, et al. (2004). "Phosphorylation by protein kinase CK2 modulates the activity of the ATP binding cassette A1 transporter." J Biol Chem **279**(36): 37779-37788.
- Rutti, S., J. A. Ehses, et al. (2009). "Low- and high-density lipoproteins modulate function, apoptosis, and proliferation of primary human and murine pancreatic beta-cells." Endocrinology **150**(10): 4521-4530.
- Rye, K. A., C. A. Bursill, et al. (2009). "The metabolism and anti-atherogenic properties of HDL." J Lipid Res **50 Suppl**: S195-200.
- Sabeti, P. (2008). Natural selection: Uncovering mechanisms of evolutionary adaptation to infectious disease.
- Salnikov, E., C. Aisenbrey, et al. (2010). "Solid-state NMR approaches to measure topological equilibria and dynamics of membrane polypeptides." Biochim Biophys Acta **1798**(2): 258-265.
- Sartipy, P. and D. J. Loskutoff (2003). "Expression profiling identifies genes that continue to respond to insulin in adipocytes made insulin-resistant by treatment with tumor necrosis factor-alpha." J Biol Chem **278**(52): 52298-52306.
- Schaffner, S. and P. Sabeti (2008). Evolutionary adaptation in the human lineage.
- Schmitz, G. and M. Grandl (2009). "The molecular mechanisms of HDL and associated vesicular trafficking mechanisms to mediate cellular lipid homeostasis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **29**(11): 1718-1722.
- Schmitz, G. and T. Langmann (2005). "Transcriptional regulatory networks in lipid metabolism control ABCA1 expression." Biochim Biophys Acta **1735**(1): 1-19.
- Schwartz, K., R. M. Lawn, et al. (2000). "ABC1 gene expression and ApoA-I-mediated cholesterol efflux are regulated by LXR." Biochem Biophys Res Commun **274**(3): 794-802.
- See, R. H., R. A. Caday-Malcolm, et al. (2002). "Protein kinase A site-specific phosphorylation regulates ATP-binding cassette A1 (ABCA1)-mediated phospholipid efflux." J Biol Chem **277**(44): 41835-41842.

- Semenkovich, C. F. (2006). "Insulin resistance and atherosclerosis." J Clin Invest **116**(7): 1813-1822.
- Serfaty-Lacrosniere, C., F. Civeira, et al. (1994). "Homozygous Tangier disease and cardiovascular disease." Atherosclerosis **107**(1): 85-98.
- Silver, D. L., N. Wang, et al. (2000). "Defective HDL particle uptake in ob/ob hepatocytes causes decreased recycling, degradation, and selective lipid uptake." J Clin Invest **105**(2): 151-159.
- Singaraja, R. R., L. R. Brunham, et al. (2003). "Efflux and atherosclerosis: the clinical and biochemical impact of variations in the ABCA1 gene." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(8): 1322-1332.
- Singaraja, R. R., H. Visscher, et al. (2006). "Specific mutations in ABCA1 have discrete effects on ABCA1 function and lipid phenotypes both in vivo and in vitro." Circ Res **99**(4): 389-397.
- Strydom, H. C. (1989). "Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults." Arteriosclerosis **9**(1 Suppl): I19-32.
- Tall, A. R. and N. Wang (2000). "Tangier disease as a test of the reverse cholesterol transport hypothesis." J Clin Invest **106**(10): 1205-1207.
- Tan, J. H., P. S. Low, et al. (2003). "ABCA1 gene polymorphisms and their associations with coronary artery disease and plasma lipids in males from three ethnic populations in Singapore." Hum Genet **113**(2): 106-117.
- Tang, C. and J. F. Oram (2009). "The cell cholesterol exporter ABCA1 as a protector from cardiovascular disease and diabetes." Biochim Biophys Acta **1791**(7): 563-572.
- Tanner, J. M. (1962). The development of the reproductive system. Oxford, UK.
- Tilly-Kiesi, M., P. Knudsen, et al. (1996). "Hyperinsulinemia and insulin resistance are associated with multiple abnormalities of lipoprotein subclasses in glucose-tolerant relatives of NIDDM patients. Botnia Study Group." J Lipid Res **37**(7): 1569-1578.
- Tontonoz, P. and D. J. Mangelsdorf (2003). "Liver X receptor signaling pathways in cardiovascular disease." Mol Endocrinol **17**(6): 985-993.

- Uehara, Y., T. Engel, et al. (2002). "Polyunsaturated fatty acids and acetoacetate downregulate the expression of the ATP-binding cassette transporter A1." Diabetes **51**(10): 2922-2928.
- Vaughan, A. M. and J. F. Oram (2003). "ABCA1 redistributes membrane cholesterol independent of apolipoprotein interactions." J Lipid Res **44**(7): 1373-1380.
- Vedhachalam, C., P. T. Duong, et al. (2007). "Mechanism of ATP-binding cassette transporter A1-mediated cellular lipid efflux to apolipoprotein A-I and formation of high density lipoprotein particles." J Biol Chem **282**(34): 25123-25130.
- Vedhachalam, C., A. B. Ghering, et al. (2007). "ABCA1-induced cell surface binding sites for ApoA-I." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(7): 1603-1609.
- Vergeer, M., L. R. Brunham, et al. (2010). "Carriers of loss-of-function mutations in ABCA1 display pancreatic beta-cell dysfunction." Diabetes Care **33**(4): 869-874.
- Vieira-Filho, J. P., A. F. Reis, et al. (2004). "Influence of the polymorphisms Tpr64Arg in the beta 3-adrenergic receptor gene and Pro12Ala in the PPAR gamma 2 gene on metabolic syndrome-related phenotypes in an indigenous population of the Brazilian Amazon." Diabetes Care **27**(2): 621-622.
- Villalpando, S., T. Shamah-Levy, et al. (2010). "Trends for type 2 diabetes and other cardiovascular risk factors in Mexico from 1993-2006." Salud Publica Mex **52 Suppl 1**: S72-79.
- Villarreal-Molina, M. T. (2008). "Bases genéticas de la variación en los niveles plasmáticos de HDL-colesterol." Revista de Endocrinología y Nutrición **16**(1): 32-41.
- Villarreal-Molina, M. T., C. A. Aguilar-Salinas, 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**(7): 1881-1887.
- Villarreal-Molina, M. T., M. T. Flores-Dorantes, 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**(2): 509-513.

- Von Eckardstein, A., C. Langer, et al. (2001). "ATP binding cassette transporter ABCA1 modulates the secretion of apolipoprotein E from human monocyte-derived macrophages." FASEB J **15**(9): 1555-1561.
- von Eckardstein, A., J. R. Nofer, et al. (2001). "High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport." Arterioscler Thromb Vasc Biol **21**(1): 13-27.
- von Eckardstein, A., H. Schulte, et al. (2000). "Risk for diabetes mellitus in middle-aged Caucasian male participants of the PROCAM study: implications for the definition of impaired fasting glucose by the American Diabetes Association. Prospective Cardiovascular Munster." J Clin Endocrinol Metab **85**(9): 3101-3108.
- Wang, J., J. R. Burnett, et al. (2000). "Common and rare ABCA1 variants affecting plasma HDL cholesterol." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(8): 1983-1989.
- Wang, Y. and J. F. Oram (2002). "Unsaturated fatty acids inhibit cholesterol efflux from macrophages by increasing degradation of ATP-binding cassette transporter A1." J Biol Chem **277**(7): 5692-5697.
- Wellington, C. L. (2004). "Cholesterol at the crossroads: Alzheimer's disease and lipid metabolism." Clin Genet **66**(1): 1-16.
- Winkleby, M. A., T. N. Robinson, et al. (1999). "Ethnic variation in cardiovascular disease risk factors among children and young adults: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994." JAMA **281**(11): 1006-1013.
- Xia, F., X. Gao, et al. (2004). "Disruption of pancreatic beta-cell lipid rafts modifies Kv2.1 channel gating and insulin exocytosis." J Biol Chem **279**(23): 24685-24691.
- Xia, F., L. Xie, et al. (2008). "Inhibition of cholesterol biosynthesis impairs insulin secretion and voltage-gated calcium channel function in pancreatic beta-cells." Endocrinology **149**(10): 5136-5145.
- Yamamoto-Kimura, L., C. Posadas-Romero, et al. (2006). "Prevalence and interrelations of cardiovascular risk factors in urban and rural Mexican adolescents." J Adolesc Health **38**(5): 591-598.

- Yamauchi, Y., M. Hayashi, et al. (2003). "Apolipoprotein A-I activates protein kinase C alpha signaling to phosphorylate and stabilize ATP binding cassette transporter A1 for the high density lipoprotein assembly." J Biol Chem **278**(48): 47890-47897.
- Yao, P. M. and I. Tabas (2001). "Free cholesterol loading of macrophages is associated with widespread mitochondrial dysfunction and activation of the mitochondrial apoptosis pathway." J Biol Chem **276**(45): 42468-42476.
- Yokoyama, S. (2006). "ABCA1 and biogenesis of HDL." J Atheroscler Thromb **13**(1): 1-15.
- Yost, C. C., M. M. Denis, et al. (2004). "Activated polymorphonuclear leukocytes rapidly synthesize retinoic acid receptor-alpha: a mechanism for translational control of transcriptional events." J Exp Med **200**(5): 671-680.
- Yvan-Charvet, L., T. A. Pagler, et al. (2010). "ABCA1 and ABCG1 protect against oxidative stress-induced macrophage apoptosis during efferocytosis." Circ Res **106**(12): 1861-1869.
- Yvan-Charvet, L., M. Ranalletta, et al. (2007). "Combined deficiency of ABCA1 and ABCG1 promotes foam cell accumulation and accelerates atherosclerosis in mice." J Clin Invest **117**(12): 3900-3908.
- Zhang, Y., F. C. McGillicuddy, et al. (2010). "Adipocyte modulation of high-density lipoprotein cholesterol." Circulation **121**(11): 1347-1355.
- Zhou, X., T. Engel, et al. (2002). "The ATP binding cassette transporter A1 contributes to the secretion of interleukin 1beta from macrophages but not from monocytes." Biochem Biophys Res Commun **291**(3): 598-604.



# Association of the ATP-Binding Cassette Transporter A1 R230C Variant With Early-Onset Type 2 Diabetes in a Mexican Population

M. Teresa Villarreal-Molina,<sup>1</sup> M. Teresa Flores-Dorantes,<sup>1</sup> Olimpia Arellano-Campos,<sup>2</sup> Marisela Villalobos-Comparan,<sup>1</sup> Maricela Rodríguez-Cruz,<sup>3</sup> Angel Miliar-García,<sup>4</sup> Adriana Huertas-Vazquez,<sup>1</sup> Marta Menjivar,<sup>5</sup> Sandra Romero-Hidalgo,<sup>6</sup> Niels H. Wachter,<sup>7</sup> M. Teresa Tusie-Luna,<sup>1</sup> Miguel Cruz,<sup>7</sup> Carlos A. Aguilar-Salinas,<sup>2</sup> Samuel Canizales-Quinteros,<sup>1</sup> and the Metabolic Study Group

**OBJECTIVE**—The ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) R230C variant is associated with low HDL cholesterol levels, obesity, and the metabolic syndrome in Mexican-Mestizos. Because a pivotal role for ABCA1 in pancreatic  $\beta$ -cell function was recently observed in the mouse model, we assessed the association of this variant with type 2 diabetes in this population.

**RESEARCH DESIGN AND METHODS**—The initial group included 446 unrelated Mexican individuals: 244 with type 2 diabetes aged 20–69 years (121 with onset  $\leq 45$  years), and 202 nondiabetic control subjects aged  $>50$  years. An independent study group included 242 type 2 diabetic case subjects and 225 control subjects with similar characteristics.

**RESULTS**—R230C/C230C genotypes were significantly more frequent in type 2 diabetic individuals (24.6%) than in control subjects (11.4%) in the initial study group (OR 2.501;  $P = 0.001$ ). After stratifying by age at diagnosis, the association was significant only in the early-onset group (age at diagnosis  $\leq 45$  years) (OR 3.776,  $P = 3.3 \times 10^{-6}$ ). Both associations remained significant

after adjusting for admixture ( $P = 0.0008$  and  $P = 8.1 \times 10^{-6}$ , respectively). Similar trends were observed in the independent study group, and the combined analysis of both populations showed a highly significant association of the R230C variant with type 2 diabetes, particularly with that of early onset ( $P = 7.6 \times 10^{-6}$  and  $9.4 \times 10^{-8}$ , respectively).

**CONCLUSIONS**—The R230C ABCA1 variant is associated with type 2 diabetes, particularly of early onset, in the Mexican-Mestizo population. *Diabetes* 57:509–513, 2008

The identification of ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) as the defective gene in Tangier disease has contributed substantially to the understanding of its role as a key transporter of cholesterol and phospholipids across cell membranes to acceptor molecules such as apolipoprotein (Apo) A-I (1–3). While the role of ABCA1 in HDL formation is well known, it may have multiple and diverse functions in other tissues (4,5). ABCA1 is expressed in pancreatic  $\beta$ -cells and is regulated by a transcriptional regulatory network including several proteins and drugs involved in lipid and glucose metabolism (6,7). Moreover, insulin downregulates ABCA1 expression in vitro, while glucose upregulates ABCA1 expression in leukocytes in vivo (8,9). Very recently, mice with specific inactivation of ABCA1 in  $\beta$ -cells showed accumulation of cellular cholesterol, marked insulin secretion reduction in vivo, and progressive glucose tolerance impairment, establishing a pivotal role for ABCA1 in pancreatic  $\beta$ -cell function (10).

Although there is solid evidence of the role of ABCA1 in glucose metabolism, the association of ABCA1 with type 2 diabetes in humans has not been thoroughly studied. Daimon et al. (11) reported an ABCA1 diplotype associated with type 2 diabetes in the Japanese population, suggesting this gene may have influence on the pathophysiology of type 2 diabetes independently of serum HDL cholesterol levels. In a previous study, we found an apparently functional ABCA1 variant significantly associated not only with low HDL cholesterol levels, but also with obesity and the metabolic syndrome, that is apparently exclusive to Amerindian and Amerindian-derived populations such as Mexican-Mestizos. We also observed an association of this variant with type 2 diabetes in a reduced number of diabetic individuals recruited from general population (12). Based on this evidence, we sought to confirm and further investigate the role of the ABCA1 R230C variant in type 2 diabetes in this population.

From the <sup>1</sup>Unit of Molecular Biology and Genomic Medicine, Salvador Zubiran National Institute of Medical Sciences and Nutrition (INCMSZ), Institute of Biomedical Research, National Autonomous University of Mexico, Mexico City, Mexico; the <sup>2</sup>Department of Endocrinology and Metabolism, INCMSZ, Mexico City, Mexico; the <sup>3</sup>Unit of Medical Research in Nutrition, Pediatrics Hospital, National Medical Center XXI Century, Mexican Institute of Social Security, Mexico City, Mexico; <sup>4</sup>Postgraduate Studies and Research Section, Postgraduate Studies and Research Section, School of Medicine, National Polytechnic Institute, Mexico City, Mexico; the <sup>5</sup>Department of Biology, Faculty of Chemistry, National Autonomous University of Mexico, Mexico City, Mexico; <sup>6</sup>National Coordination of Genetic Medicine, Institute of Social Security and Services for Government Employees, Mexico City, Mexico; and the <sup>7</sup>Units of Medical Research in Clinical Epidemiology and Biochemistry, Specialties Hospital, National Medical Center XXI Century, Mexican Institute of Social Security, Mexico City, Mexico.

M.T.V.-M. is currently affiliated with the National Institute of Genomic Medicine.

Address correspondence and reprint requests to Samuel Canizales-Quinteros, PhD, Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga #15 Colonia Sección 16, Tlalpan 14000, México D.F. E-mail: cani@servidor.unam.mx.

Received for publication 6 April 2007 and accepted in revised form 7 November 2007.

Published ahead of print at <http://diabetes.diabetesjournals.org> on 14 November 2007. DOI: 10.2337/db07-0484.

Additional information for this article can be found in an online appendix at <http://dx.doi.org/10.2337/db07-0484>.

M.T.V.-M. and M.T.F.-D. contributed equally to this work.

A complete list of individuals and institutions participating in the Metabolic Study Group appears in the APPENDIX.

ABCA1, ATP-binding cassette transporter A1; AIM, ancestry informative marker; Apo A-I, apolipoprotein A-I; LD, linkage disequilibrium; SNP, single nucleotide polymorphism.

© 2008 by the American Diabetes Association.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

TABLE 1  
Clinical and biochemical parameters of the initial study group

	Type 2 diabetic patients	Nondiabetic control subjects	Type 2 diabetic patients	
			R230R	R230C/C230C
<i>n</i>	244	202	184	60
Males (%)	31.6	30.2	29.9	36.7
Age (years)	53.9 ± 12.6	60.5 ± 9.4*	54.6 ± 12.4	51.7 ± 13.1
Age at diagnosis (years)	45.8 ± 10.7	—	47.0 ± 10.9	42.6 ± 9.3 <sup>§</sup>
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	28.4 ± 4.8	27.4 ± 4.3 <sup>†</sup>	28.3 ± 4.8	28.9 ± 4.7
Fasting glucose (mmol/l)	9.8 ± 4.3	4.9 ± 0.6*	9.8 ± 4.3	9.8 ± 4.5
Fasting insulin (pmol/l)	71.1 ± 54.6	51.2 ± 40.6*	75.2 ± 59.0	58.3 ± 35.3 <sup>‡</sup>
A1C (%) ( <i>n</i> = 141)	8.9 ± 2.3	ND	8.7 ± 2.2	9.9 ± 2.5 <sup>‡</sup>
HOMA-IR	4.9 ± 5.1	1.9 ± 1.5*	5.5 ± 5.9	4.3 ± 2.9
HOMA-β	60.9 ± 53.2	140.3 ± 161.9*	62.3 ± 53.9	57.1 ± 51.4
HDL cholesterol (mmol/l)	1.1 ± 0.3	1.3 ± 0.4*	1.1 ± 0.3	1.0 ± 0.3
Apo A-I (mg/dl)	132.7 ± 25.8	147.4 ± 22.9*	134 ± 27.1	125 ± 22.3
Treatment (%)		—		
Not treated	27 (15.3)		18 (13.4)	9 (20.9)
Diet plus exercise	8 (4.5)		7 (5.2)	1 (2.3)
OHA	124 (70.8)		95 (70.1)	29 (67.4)
OHA plus insulin	14 (8.2)		11 (8.2)	3 (6.9)
Insulin	4 (2.3)		3 (2.2)	1 (2.3)

Data are means ± SD unless otherwise indicated. \**P* < 0.001, †*P* < 0.05 comparing type 2 diabetic patients with nondiabetic subjects; ‡*P* < 0.05, R230C/C230C vs. R230R, adjusted for age, sex, BMI, duration of diabetes, and treatment (patients with insulin treatment were excluded); §*P* ≤ 0.005, adjusted for sex and BMI. HOMA-IR and -β, homeostasis model assessment of insulin resistance and β-cell function; OHA, oral hypoglycemic agent.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

**Subjects.** The initial study group included 244 unrelated Mexican-Mestizo diabetic patients attending three different reference centers in Mexico City, diagnosed between the ages 20 and 80 years. Type 2 diabetes was diagnosed according to World Health Organization criteria (13). To reduce the probability of including control individuals who may develop type 2 diabetes in later life, a group of 202 unrelated nondiabetic subjects with no family history of diabetes aged 50–80 years made up the control group: 68 control subjects from a previous study (12), and 134 additional control subjects who met the same criteria. Absence of diabetes was defined as no medical history of diabetes and fasting glucose levels ≤5.5 mmol/l. Only individuals born in Mexico whose parents and grandparents identified themselves as Mexican-Mestizos were included.

The association test was replicated in an independent group of type 2 diabetic patients (*n* = 242) and control subjects (*n* = 225, aged 45–65 years) recruited from the Siglo XXI Medical Center of the Mexican Institute of Social Security (IMSS) in Mexico City, as described previously (14). The project was approved by the Institutional Committee of Biomedical Research in Humans of the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) and Ethics Committee of the Siglo XXI Medical Center. All individuals gave written informed consent before their inclusion in the study. Descriptive characteristics of the replication group are given in online Appendix Table 1 (available online at <http://dx.doi.org/10.2337/db07-0484>). The biochemical measurements are described in supplementary information that is also available online.

**Single nucleotide polymorphisms genotyping.** R230C and four additional single nucleotide polymorphisms (SNPs) (rs3818689, rs2487037, rs2000069 and rs2230806) contained in three haplotype blocks within the ABCA1 gene were genotyped using Taqman assays (ABI Prism 7900HT Sequence Detection System, Applied Biosystems). Genotyping call exceeded 95% per SNP, and no discordant genotypes were observed in 36 duplicate samples. Deviation from Hardy-Weinberg equilibrium was not observed for any SNP. In addition, a panel of 10 ancestry informative markers (AIMs) was used to evaluate whether the association analysis was confounded by population stratification (12) (see online supplementary information).

**Statistical analyses.** Student's *t* test was used to compare phenotypic differences between case and control individuals. Although associations were tested under dominant, recessive, or additive models, because the number of C230C homozygotes was reduced, the dominant model (R230C/C230C vs. R230R) was considered the most appropriate. Covariance analysis was used to construct a model for quantitative traits where age, sex, and BMI were included as covariates (when appropriate) and genotype was included as a

fixed factor (GLM Univariate). Since fasting serum insulin/triglyceride levels and HOMA indices were not normally distributed, they were log transformed for analysis. Logistic regression analysis with adjustment for age, sex, and BMI was used to test for associations between genotype and type 2 diabetes (SPSS Version 10.0, Chicago, IL). The ADMIXMAP program (15) was used to test the possible effect of population stratification on associations with type 2 diabetes as previously described (12). Pairwise linkage disequilibrium between SNPs was calculated by direct correlation (*r*<sup>2</sup>), and haplotypes were inferred for each individual using Haploview (version 3.2) (16).

RESULTS

Table 1 compares anthropometric and biochemical measurements in diabetic and control individuals of the initial study group. Significantly lower fasting insulin and higher A1C levels were observed in R230C/C230C than in R230R diabetic subjects (*P* = 0.011 and 0.015, respectively; adjusted by age, sex, BMI, duration of diabetes, and treatment); however, differences in insulin levels according to genotype were not observed in nondiabetic subjects.

Overall, R230C/C230C genotypes were significantly more frequent in type 2 diabetic individuals (24.6%) than in control subjects (11.4%, OR 2.501, 95% CI 1.476–4.238, *P* = 0.001) (Table 2), even after adjusting for admixture (*P* = 0.0008). Interestingly, age at diagnosis was significantly lower in R230C/C230C than in R230R diabetic individuals (42.6 ± 9.3 years vs. 47.0 ± 10.9 years, respectively; *P* = 0.005, adjusted by sex and BMI) (Table 1). We then tested the association of R230C with early-onset type 2 diabetes (≤45 years, *n* = 121), based on the average age of diagnosis of R230C/C230C individuals and on the previous use of 45 years as the cutoff age in linkage and association studies for type 2 diabetes (17,18). While the association of R230C/C230C with late-onset type 2 diabetes (>45 years, *n* = 123) was not significant (*P* = 0.149), its association with early-onset type 2 diabetes was highly significant (OR 3.776, 95% CI 2.121–6.748, *P* = 3.3 × 10<sup>-6</sup>) even after adjusting for admixture (8.1 × 10<sup>-6</sup>) (Table 2).

TABLE 2

R230C genotype frequencies in type 2 diabetic patients and nondiabetic control subjects stratified according to age of onset of type 2 diabetes

	Genotype [ <i>n</i> (%)]		OR	<i>P</i> * vs. nondiabetic
	R230R	R230C/C230C		
Initial study group				
Type 2 diabetic patients ( <i>n</i> = 244)	184 (75.4)	60 (24.6)	2.501	0.001
Early-onset type 2 diabetes ( <i>n</i> = 121)	81 (66.9)	40 (33.1)	3.776	$3.3 \times 10^{-6}$
Late-onset type 2 diabetes ( <i>n</i> = 123)	103 (83.7)	20 (16.3)	1.619	0.149
Nondiabetic subjects ( <i>n</i> = 202)	179 (88.6)	23 (11.4)		
Replication group				
Type 2 diabetic patients ( <i>n</i> = 242)	182 (75.2)	60 (24.8)	2.098	0.005
Early-onset type 2 diabetes ( <i>n</i> = 119)	88 (73.9)	31 (26.1)	2.190	0.004
Late-onset type 2 diabetes ( <i>n</i> = 123)	94 (76.4)	29 (23.6)	1.935	0.032
Nondiabetic subjects ( <i>n</i> = 225)	194 (86.2)	31 (13.8)		
Combined analysis				
Type 2 diabetic patients ( <i>n</i> = 486)	366 (75.3)	120 (24.7)	2.097	$7.6 \times 10^{-6}$
Early-onset type 2 diabetes ( <i>n</i> = 240)	169 (70.4)	71 (29.6)	2.757	$9.4 \times 10^{-8}$
Late-onset type 2 diabetes ( <i>n</i> = 246)	197 (80.1)	49 (19.9)	1.826	0.010
Nondiabetic subjects ( <i>n</i> = 427)	373 (87.4)	54 (12.6)		

Data are *n* (%). \**P* values and ORs calculated by a logistic regression analysis using a dominant model (R230C/C230C vs. R230R) with adjustment for sex and BMI. Early-onset type 2 diabetes age of diagnosis  $\leq 45$  years; late-onset type 2 diabetes age of diagnosis  $> 45$  years.

Figure 1 shows the approximate genomic locations of the four additional SNPs tested and linkage disequilibrium (LD) estimates in the initial study group. There was no evidence for LD between R230C and the other four SNPs. Individually, all SNPs other than R230C failed to show association with type 2 diabetes ( $P > 0.311$ , Table 3). Moreover, of the five most frequent haplotypes ( $> 3\%$ ), only that including the 230C allele was associated with type 2 diabetes ( $P = 0.0004$ ,  $P = 0.002$  after Bonferroni correction) (online appendix Table 2), which is very similar to the association for the individual 230C allele ( $P = 0.0002$ ,  $P = 0.001$  after Bonferroni correction).

To further test this association, we analyzed an independent group of Mexican type 2 diabetic case and control subjects. The results were very similar, as 24.8% of type 2 diabetic individuals and 13.8% of control subjects had R230C/C230C genotypes (OR 2.098, 95% CI 1.255–3.507,  $P = 0.005$ ). However, although R230C remained significantly associated with early-onset type 2 diabetes (OR 2.190, 95% CI 1.258–3.732,  $P = 0.004$ ), the improvement in significance was less evident than that observed in the initial study group. We were not able to test the association of R230C with fasting insulin levels and A1C in the replication group, as this information was not available.

R230C/C230C type 2 diabetic individuals had a significantly lower age at diagnosis ( $44.1 \pm 9.2$  years vs.  $46.56 \pm 10.9$  years,  $P = 0.028$ ), and higher BMI ( $29.1 \pm 4.2$  vs.  $28.3 \pm 4.2$  kg/m<sup>2</sup>,  $P = 0.047$ ) than in R230R type 2 diabetes

subjects in both study populations (data not shown). The combined analysis of both groups revealed a highly significant association of R230C with type 2 diabetes (OR 2.097, 95% CI 1.483–2.960,  $P = 7.6 \times 10^{-6}$ ), particularly with early-onset type 2 diabetes (OR 2.757, 95% CI 1.869–3.917,  $P = 9.4 \times 10^{-8}$ ). Interestingly, all 10 C230C homozygotes identified had type 2 diabetes (8 were obese and 2 were overweight). To test whether the association of the R230C variant with type 2 diabetes is independent of its previously reported association with obesity (12), we tested the association including only obese individuals. R230C/C230C genotypes were significantly more frequent in obese diabetic than in obese nondiabetic individuals ( $P = 0.001$ ).

## DISCUSSION

The ABCA1 R230C variant was significantly associated with type 2 diabetes in the Mexican population. Because the association remained significant after adjusting for admixture, it is unlikely that population stratification confounded our analysis. Moreover, R230C was not in LD with any other SNP tested in neighboring haplotype blocks within the ABCA1 gene, suggesting that the R230C variant is functional and is a significant risk allele for type 2 diabetes in the Mexican population. Interestingly, the association with type 2 diabetes was highly significant in the early-onset group. This is epidemiologically relevant in

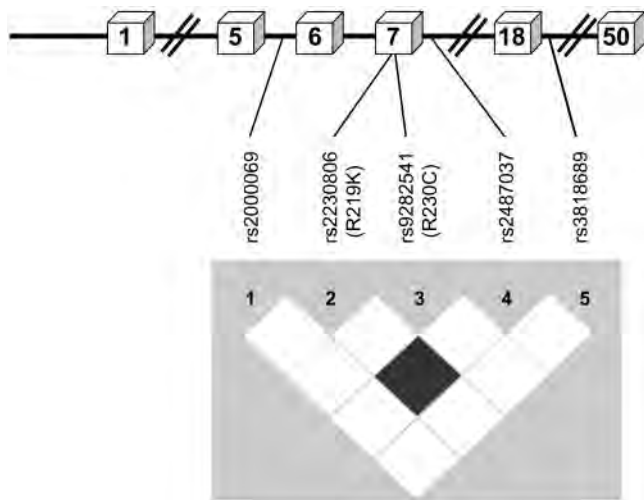
TABLE 3

Allelic association analyses results of individual SNPs in the ABCA1 gene in case-control samples of the initial study group

dbSNP ID	Position*	ABCA1 region	Major/minor allele	MAF	Allele frequencies		<i>P</i> †	<i>P</i> ‡
					Type 2 diabetes	Nondiabetic		
rs2000069	106675690	Intron 5	C/T	0.380	0.372	0.390	0.729	0.999
rs2230806 (R219K)	106660688	Exon 7	G/A	0.327	0.312	0.346	0.311	0.845
rs9282541 (R230C)	106660656	Exon 7	C/T	0.097	0.131	0.056	0.0002	0.001
rs2487037	106657158	Intron 7	C/T	0.261	0.256	0.267	0.585	0.998
rs3818689	106634837	Intron 18	G/C	0.054	0.056	0.052	0.772	0.999

\*Position is in contiguous NT\_008470.18; †*P* values for type 2 diabetes with respect to the minor allele; ‡*P* values after Bonferroni correction for the five different SNPs tested. MAF, minor allele frequency.





**FIG. 1. Pairwise LD among five SNPs within the ABCA1 gene. Drawing is not to scale. Exons are represented by boxes. Figure depicts the measured  $r^2$  between SNP pairs, represented by box shade intensity. There is no evidence for LD between the R230C variant and the other four SNPs. However, SNPs rs2230806 (R219K) and rs2487037 were in high LD ( $r^2 > 0.8$ ).**

the Mexican population because type 2 diabetes is highly prevalent (8.2%) (19), ~15% are diagnosed before age 40 years (20), and early onset leads to longer exposure to risk factors related to complications of diabetes (21).

It is important to point out that this study was conducted based on a previous observation in a reduced group of diabetic individuals who showed a very high frequency of R230C/C230C genotypes (41.2%) (12). These individuals were recruited from the general population, and most were unaware of their condition when interviewed. In contrast, the 486 diabetic individuals analyzed here were attending specialized clinics and were significantly older than the previously published group of diabetic individuals (mean age  $54.0 \pm 11.7$  vs.  $49.6 \pm 11.8$  years,  $P = 0.03$ ). This age difference or other population stratification factors may explain the higher R230C/C230C genotype frequency reported in first group.

Obesity is known to lead to insulin resistance and is implicated as one of the main determinants of type 2 diabetes (22). Because R230C was previously found to be associated with obesity and obesity-related comorbidities (12), it could be speculated that it confers susceptibility to type 2 diabetes through obesity and insulin resistance. However, 10–40% of diabetic individuals are not insulin resistant (23). Aguilar-Salinas et al. (24) reported a high frequency of insulin secretion deficiency (85%) coexisting with insulin resistance in 35% of the cases in a group of early-onset type 2 diabetic Mexican individuals. Even though the mechanisms by which ABCA1 deficiency could lead to type 2 diabetes in humans have not been studied, Brunham et al. (10) recently reported that cholesterol accumulation in the pancreatic  $\beta$ -cell leads to insulin secretion failure in the mouse model, which may be an important component of lipotoxicity in pancreatic islets. They also found that selective loss of ABCA1 in pancreatic  $\beta$ -cells leads to age-related progressive impairment in glucose tolerance even in heterozygous mice. Moreover, Hao et al. (25) found that excess cholesterol inhibits insulin secretion, opening a novel set of mechanisms that may contribute to  $\beta$ -cell dysfunction and the onset of diabetes in obese patients. Detailed in vivo studies of the

$\beta$ -cell function are required to assess the effect of this variant on  $\beta$ -cell function.

In addition to its effect on insulin secretion, R230C may also be associated with type 2 diabetes through an increased risk of obesity. However, the R230C/C230C genotypes were significantly more frequent in obese diabetic than in obese nondiabetic individuals, suggesting that both associations may be independent. Thus, the consequences of this probably functional variant on pancreatic  $\beta$ -cell and adipocyte function could lead to increased risk of type 2 diabetes by more than one mechanism remaining to be elucidated.

In conclusion, our findings suggest there is an association of the R230C variant with early-onset type 2 diabetes in Mexican-Mestizos, which is in accordance with recent findings on  $\beta$ -cell physiology and the effects of cholesterol lipotoxicity on insulin secretion. This variant is epidemiologically relevant because of its high frequency and its association with type 2 diabetes. Functional analyses are required to further elucidate the role of ABCA1 variation in the pathogenesis of type 2 diabetes.

**APPENDIX**

The Metabolic Study Group includes the following:

From the Unit of Molecular Biology and Genomic Medicine, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico: Salvador Ramírez-Jimenez, Leonor Jacobo, Margarita Zavala.

From the Department of Endocrinology and Metabolism, INCMNSZ, Mexico City, Mexico: Ivette Cruz-Bautista, Daniela Riaño, Cristina García-Ulloa, Lorena Robles, Francisco J. Gómez-Pérez.

From the Subdirección Médica, Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE), Mexico City, Mexico: Rubén Ramírez-Cam-puzano, Rebeca Sandoval-Silva.

From the Laboratory of Endocrinology, Unit of Investigation, Hospital Juárez de México, Mexico City, Mexico: Guadalupe Ortíz-López, María de los Angeles Granados.

From the Unit of Medical Research in Human Genetics, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional, Siglo XXI-IMSS, Mexico City, Mexico: Ramon Coral-Vazquez.

From the Unit of Medical Research in Clinical Epidemiology, Hospital de Especialidades No.2, CMNNO, Ciudad Obregón, Sonora, Mexico: Olga Brito-Zurita.

From the Laboratory of Reproductive Biology, Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi, Universidad Autónoma de Yucatán, Yucatán, Mexico: Thelma Canto-de Cetina.

From the Unidades de Investigación Médica en Epidemiología Clínica y Bioquímica, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Mexico City, Mexico: Catarina Mun-guía and Maria Elena Sánchez Contreras.

**ACKNOWLEDGMENTS**

This research was supported by grant 47414 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) and was partially supported by grant IN227007 from DGAPA. The authors wish to thank Rosa María Cerezo, Maribel Rodríguez, Olga Gaja, and Luz E. Guillén-Pineda for their technical assistance and Dr. Graeme I. Bell for the critical review of the manuscript.

Electronic database information: Kbiosciences (<http://www.kbioscience.co.uk>), ADMIXMAP (<http://www.ucd.ie/genepi/software.html>).

## REFERENCES

- Rust S, Rosier M, Funke H, Real J, Amoura Z, Piette JC, Deleuze JF, Brewer HB, Duverger N, Deneffe P, Assmann G: Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat Genet* 22:352–355, 1999
- Bodzioch M, Orso E, Klucken J, Langmann T, Bottcher A, Diederich W, Drobnik W, Barlage S, Buchler C, Porsch-Ozcurumez M, Kaminski WE, Hahmann HW, Oette K, Rothe G, Aslanidis C, Lackner KJ, Schmitz G: The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat Genet* 22:347–351, 1999
- Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee SM, Zhang LH, Roomp K, van Dam M, Yu L, Brewer C, Collins JA, Molhuizen HO, Loubser O, Ouellette BF, Fichter K, Ashbourne-Excoffon KJ, Sensen CW, Scherer S, Mott S, Denis M, Martindale D, Frohlich J, Morgan K, Koop B, Pimstone S, Kastelein JJ, Genest J Jr, Hayden MR: Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat Genet* 22:336–345, 1999
- Oram JF, Heinecke JW: ATP-binding cassette transporter A1: a cell cholesterol exporter that protects against cardiovascular disease. *Physiol Rev* 85:1343–1372, 2005
- Le Lay S, Robichon C, Le Liepvre X, Dagher G, Ferre P, Dugail I: Regulation of ABCA1 expression and cholesterol efflux during adipose differentiation of 3T3-L1 cells. *J Lipid Res* 44:1499–1507, 2003
- Schmitz G, Langmann T: Transcriptional regulatory networks in lipid metabolism control ABCA1 expression. *Biochim Biophys Acta* 1735:1–19, 2005
- Gerin I, Dolinsky VW, Shackman JG, Kennedy RT, Chiang SH, Burant CF, Steffensen KR, Gustafsson JA, MacDougald OA: LXRbeta is required for adipocyte growth, glucose homeostasis, and beta cell function. *J Biol Chem* 280:23024–31, 2005
- Sartipy P, Loskutoff DJ: Expression profiling identifies genes that continue to respond to insulin in adipocytes made insulin-resistant by treatment with tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem* 278:52298–306, 2003
- Albrecht C, Simon-Vermet I, Elliott JI, Higgins CF, Johnston DG, Valabhji J: Leukocyte ABCA1 gene expression is associated with fasting glucose concentration in normoglycemic men. *Metabolism* 53:17–21, 2004
- Brunham LR, Kruit JK, Pape TD, Timmins JM, Reuwer AQ, Vasanji Z, Marsh BJ, Rodrigues B, Johnson JD, Parks JS, Verchere CB, and Hayden MR: Beta-cell ABCA1 influences insulin secretion, glucose homeostasis and response to thiazolidinedione treatment. *Nat Med* 13:340–7, 2007
- Daimon M, Kido T, Baba M, Oizumi T, Jimbu Y, Kameda W, Yamaguchi H, Ohnuma H, Tominaga M, Muramatsu M, Kato T: Association of the ABCA1 gene polymorphisms with type 2 DM in a Japanese population. *Biochem and Biophys Res Com* 329:205–210, 2005
- Villarreal-Molina MT, Aguilar-Salinas CA, Rodriguez-Cruz M, Riano D, Villalobos-Companan M, Coral-Vazquez R, Menjivar M, Yescas-Gomez P, Konisberg-Fainstein M, Romero-Hidalgo S, Tusie-Luna MT, Canizales-Quinteros S: The ABCA1 R230C variant affects hdl-cholesterol levels and body mass index in the Mexican population: association with obesity and obesity-related comorbidities. *Diabetes* 56:1881–1887, 2007
- The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus: Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 26 (Suppl. 1):S5–S20, 2003
- Parra EJ, Cameron E, Simmonds L, Valladares A, McKeigue P, Shriver M, Wacher N, Kumate J, Kittles R, Cruz M: Association of TCF7L2 polymorphisms with type 2 diabetes in Mexico City. *Clin Genet* 71:359–366, 2007
- Hoggart CJ, Parra EJ, Shriver MD, Bonilla C, Kittles RA, Clayton DG, McKeigue PM: Control of confounding of genetic associations in stratified populations. *Am J Hum Genet* 72:1492–1504, 2003
- Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ: Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21:263–265, 2005
- Frayling TM, Wiltshire S, Hitman GA, Walker M, Levy JC, Sampson M, Groves CJ, Menzel S, McCarthy MI, Hattersley AT: Young-onset type 2 diabetes families are the major contributors to genetic loci in the Diabetes UK Warren 2 genome scan and identify putative novel loci on chromosomes 8q21, 21q22, and 22q11. *Diabetes* 52:1857–1863, 2003
- Flavell DM, Ireland H, Stephens JW, Hawe E, Acharya J, Mather H, Hurel SJ, Humphries SE: Peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene variation influences age of onset and progression of type 2 diabetes. *Diabetes* 54:582–586, 2005
- Dirección General de Información y Evaluación del Desempeño, Secretaría de Salud: Estadísticas de mortalidad en México: muertes registradas en el año 2001. *Salud Pública de México* 44:565–576, 2003
- Aguilar-Salinas CA, Velazquez Monroy O, Gomez-Perez FJ, Gonzalez Chavez A, Esqueda AL, Molina Cuevas V, Rull-Rodrigo JA, Tapia Conyer R, Encuesta Nacional de Salud 2000 Group. Characteristics of patients with type 2 diabetes in Mexico: results from a large population-based nationwide survey. *Diabetes Care* 26:2021–2026, 2003
- Garcia-Garcia E, Aguilar-Salinas CA, Tusie-Luna T, Rull-Rodrigo JA: Early-onset type 2 diabetes in Mexico. *Isr Med Assoc J* 4:444–448, 2002
- Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM: Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 444:840–846, 2006
- Haffner SM, Howard G, Mayer E, Bergman RN, Savage PJ, Rewers M, Mykkanen L, Karter AJ, Hamman R, Saad MF: Insulin sensitivity and acute insulin response in African-Americans, non-Hispanic whites, and Hispanics with NIDDM: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Diabetes* 46:63–69, 1997
- Aguilar-Salinas CA, Reyes-Rodriguez E, Ordonez-Sanchez ML, Torres MA, Ramirez-Jimenez S, Dominguez-Lopez A, Martinez-Francois JR, Velasco-Perez ML, Alpizar M, Garcia-Garcia E, Gomez-Perez F, Rull J, Tusie-Luna MT: Early-onset type 2 diabetes: metabolic and genetic characterization in the Mexican population. *J Clin Endocrinol Metab* 86:220–226, 2001
- 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* 56:2328–2338, 2007



## Association of *R230C ABCA1* gene variant with low HDL-C levels and abnormal HDL subclass distribution in Mexican school-aged children

Teresa Flores-Dorantes<sup>a</sup>, Olimpia Arellano-Campos<sup>b</sup>, Rosalinda Posadas-Sánchez<sup>c</sup>,  
Teresa Villarreal-Molina<sup>a</sup>, Aida Medina-Urrutia<sup>c</sup>, Sandra Romero-Hidalgo<sup>d</sup>, Petra Yescas-Gómez<sup>e</sup>,  
Oscar Pérez-Méndez<sup>f</sup>, Esteban Jorge-Galarza<sup>c</sup>, Teresa Tusié-Luna<sup>a</sup>, Marisela Villalobos-Comparán<sup>a</sup>,  
Léonor Jacobo-Albavera<sup>a</sup>, Hugo Villamil-Ramírez<sup>a</sup>, Blanca E. López-Contreras<sup>a</sup>, Carlos A. Aguilar-Salinas<sup>b</sup>,  
Carlos Posadas-Romero<sup>c</sup>, Samuel Canizales-Quinteros<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Unit of Molecular Biology and Genomic Medicine, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City, Mexico

<sup>b</sup> Department of Endocrinology and Metabolism, INCMNSZ, Mexico City, Mexico

<sup>c</sup> Department of Endocrinology, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez (INCICh), Mexico City, Mexico

<sup>d</sup> Department of Computational Genomics, Instituto Nacional de Medicina Genómica, Mexico City, Mexico

<sup>e</sup> Department of Neurogenetics, Instituto Nacional de Neurología, Mexico City, Mexico

<sup>f</sup> Department of Molecular Biology, INCICh, Mexico City, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 26 October 2009

Received in revised form 20 April 2010

Accepted 21 April 2010

Available online 26 April 2010

#### Keywords:

*ABCA1 R230C* variant

HDL-cholesterol

HDL subclasses

Mexican children

### ABSTRACT

**Background:** The effect of *ABCA1* genetic variation on HDL-C levels has been widely documented, although studies in children are scarce. We recently found a frequent non-synonymous *ABCA1* variant (*R230C*) exclusive to populations with Native American ancestry, associated with low HDL-C levels and other metabolic traits in adults.

**Methods:** We genotyped *R230C* variant in 1253 healthy unrelated Mexican school-aged children aged 6–15 years (595 boys and 658 girls) to seek associations with HDL-C levels and other metabolic traits. HDL subclass distribution was analyzed in a subgroup of 81 age, gender and BMI-matched children.

**Results:** Individuals carrying the *C230* allele showed a significantly lower HDL-C levels ( $P=2.9 \times 10^{-8}$ ), and higher TC/HDL-C ratio, BMI, BMI z-score and percent fat mass ( $P=0.001$ , 0.049, 0.032 and 0.039, respectively). HDL size was smaller in *R230C* heterozygotes as compared to *R230R* homozygotes ( $P<0.05$ ). Moreover, the proportion of HDL<sub>2b</sub> was lower, while the proportion of HDL<sub>3a</sub> and HDL<sub>3b</sub> particles was higher in *R230C* heterozygous and/or *C230C* homozygous individuals as compared to *R230R* homozygotes ( $P<0.05$ ).

**Conclusions:** Our data suggest that the *R230C ABCA1* gene variant plays an important role in HDL-C level regulation and HDL subclass distribution in healthy Mexican school-aged children.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Low high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) plasma levels are the most common dyslipidemia in Mexican adults [1]. Decreased levels of HDL-C have been consistently associated with an increased risk of coronary heart disease (CHD) [2]. HDL includes a heterogeneous group of lipoproteins known to have different antiatherogenic properties and capacity to promote cholesterol efflux from peripheral tissues [3,4]. Some studies have shown that small HDL particles (HDL<sub>3</sub>), but not larger subclasses (HDL<sub>2</sub>), are positively associated with CHD [5,6].

Prospective cohort studies have shown that lipoprotein levels not only track strongly from childhood and adolescence to adulthood [7–9], but that adverse lipoprotein levels in early life may induce arterial changes that contribute to adult atherosclerosis [10–13]. In addition, abnormal lipoprotein levels have been associated with preclinical atherosclerosis in children and adolescents [14,15].

The ATP-binding cassette transporter A1 (*ABCA1*) plays a crucial role in ApoA1-mediated cholesterol efflux, participating in the first step of reverse cholesterol transport [16]. The effect of *ABCA1* genetic polymorphisms on HDL-C levels has been widely documented mainly in adults [17], however the association of these variants with symptomatic or subclinical CHD is inconsistent [18,19]. This may be due to qualitative differences in HDL particles undetected by measuring total HDL-C levels [20]. We recently found a frequent non-synonymous *ABCA1* variant (*R230C*, rs9282541) exclusive to populations with Native American ancestry, associated with low HDL-C levels, and

\* Corresponding author. Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga # 15 Colonia Sección 16, Tlalpan 14000, México D.F., Mexico. Tel./fax: +52 55 56 55 00 11.

E-mail address: [cani@servidor.unam.mx](mailto:cani@servidor.unam.mx) (S. Canizales-Quinteros).



independently associated with obesity and type 2 diabetes (T2D) in Mexican adults [21,22]. We thus analyzed the possible effect of the *R230C ABCA1* gene variant on HDL-C levels, HDL subclasses and other metabolic traits in healthy Mexican school-aged children.

## 2. Material and methods

### 2.1. Subjects

We analyzed 1253 healthy unrelated school-aged Mexican-Mestizo children (595 boys and 658 girls) with age range of 6–15 years, recruited from a summer camp for children of employees of the Mexican Health Ministry (Convivencia Infantil 2008, Secretaria de Salud) and a public junior high school, both in Mexico City. A questionnaire was applied and weight, height, waist circumference and blood pressure were measured in all participants. Body mass index (BMI) was calculated as weight in kilograms divided by height in meter squared. BMI z-scores were calculated using age and sex specific BMI reference data, as recommended by the Centers for Disease Control and Prevention [23]. Fat mass percentage was measured using a bioelectric impedance method (Quantum X impedance analyzer, RJL Systems, Detroit, MI) in subjects recruited from the summer camp ( $n = 596$ ). None of the participants had clinical evidence of diabetes, thyroid, renal or liver disease. A parent of each child signed the consent form for participation. The project was approved by the Institutional Committee of Biomedical Research in Humans of the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ).

### 2.2. Pubertal development

Sexual development was assessed using the method described by Tanner [24]. Self-assessment is a valid method to assess sexual maturity in clinical evaluation and as a research tool [25]. In the case of girls, the date of menarche was also recorded. Children with Tanner score of 1 were considered as prepubertal.

### 2.3. Biochemical parameters

Plasma glucose, total cholesterol (TC), triglyceride (TG), and HDL-C measurements were performed at the INCMNSZ or the INCICh with commercially available standardized methods as described by Villarreal-Molina et al. [21] and Medina-Urrutia et al. [26], respectively. Low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) concentrations were estimated using Friedewald's formula [27]. The mean anthropometric and biochemical parameters according to gender are shown in Table 1. Hypoalphalipoproteinemia (HA) was defined as a HDL-C concentrations <35 mg/dl, hypercholesterolemia as TC levels >200 mg/dl; and hypertriglyceridemia as TG levels >150 mg/dl. LDL-C levels were considered high when measured >130 mg/dl [28].

### 2.4. HDL subclass distribution analysis

HDL subclass distribution was analyzed as described by Medina-Urrutia et al. [26] and compared in different *R230C* genotypes in a subgroup of 81 school-aged children matched by age, gender and BMI (32 *R230R* homozygotes, 32 *R230C* heterozygotes and the 17 available *C230C* homozygotes). Briefly, HDL separated from plasma by ultracentrifugation in density of 1.21 g/ml was loaded into a native 4–30% polyacrylamide gradient gel. Migration distance intervals of each gel were calculated by computing a standard curve of protein-stainable HMW standard. The relative proportion of each HDL subclass was estimated with the following size intervals: HDL<sub>3c</sub> 7.21–7.76 nm, HDL<sub>3b</sub> 7.76–8.17 nm, HDL<sub>3a</sub> 8.17–8.77 nm, HDL<sub>2a</sub> 8.77–9.71 nm, and HDL<sub>2b</sub> 9.71–12.93 nm. The coefficient of variation for each subclass was less than 10%. The average HDL particle size represents the overall distribution of HDL subclasses, and was

**Table 1**  
Anthropometric and biochemical parameters according to gender.

Characteristic	Total subjects $n = 1253$	Boys $n = 595$	Girls $n = 658$	$P^a$
Age (years)	11.5 ± 2.4	11.4 ± 2.4	11.5 ± 2.4	NS
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	21.6 ± 4.6	21.5 ± 4.8	21.7 ± 4.4	NS
BMI z-score	0.91 ± 0.94	0.91 ± 1.0	0.91 ± 0.87	NS
FM (%) ( $n = 596$ )	31.0 ± 11.1	29.8 ± 12.4	32.1 ± 9.6	NS
TC (mg/dl)	159.8 ± 30.7	158.2 ± 30.7	161.3 ± 30.7	NS
TG (mg/dl)	113.6 ± 73.5	111.3 ± 79.9	115.7 ± 67.1	NS
HDL-C (mg/dl)	45.6 ± 11.0	45.3 ± 11.0	45.9 ± 10.9	NS
TC/HDL-C ratio	3.68 ± 1.06	3.67 ± 1.08	3.68 ± 1.04	NS
HA (%)	15.1	15.0	15.2	NS <sup>b</sup>

Data are the means ± SD or n (%). BMI, body mass index; FM, percent fat mass; TC, total cholesterol; TG, triglyceride, HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; HA, hypoalphalipoproteinemia.

<sup>a</sup>  $P$ -values were calculated by  $t$ -test.

<sup>b</sup> Pearson's  $\chi^2$  test.

calculated as the average size of each HDL subclass interval, multiplied by its relative area under the densitometric scan. The coefficient of variation for this determination was less than 1%.

### 2.5. *R230C* genotyping

The *R230C* variant (rs9282541) was genotyped using TaqMan assays (ABI Prism 7900HT Sequence Detection System; Applied Biosystems, Foster City, CA). No discordant genotypes were observed in 37 duplicate samples. Deviation from Hardy–Weinberg equilibrium was not observed in any group.

### 2.6. Statistical analyses

Student's  $t$ -test was used to compare phenotypic differences between boys and girls. Because the number of *C230C* homozygotes was reduced, associations were tested under a dominant model. Differences in anthropometric and biochemical parameters according to *R230C* genotype were analyzed by multiple linear regression analyses, and logistic regression analysis was used to test for association with hypoalphalipoproteinemia, adjusting for age, sex, BMI and Tanner score when appropriate (SPSS ver10.0, Chicago, IL). Because fasting serum triglyceride levels were not normally distributed, they were log transformed for analysis. HDL subclass distribution according to genotype was compared using ANOVA with the Scheffé post hoc test. A  $P$ -value of less than 0.05 was considered statistically significant.

## 3. Results

Hypoalphalipoproteinemia was the most frequent dislipidemia among the Mexican school-aged children here analyzed (15.1%), followed by hypertriglyceridemia (14.7%), hypercholesterolemia (9.1%) and high LDL-C levels (8.2%). The overall frequency of the *C230* risk allele was 0.10. Table 2 compares the anthropometric and biochemical measurements according to genotype. Individuals carrying the *C230* allele showed significantly lower HDL-C and total cholesterol levels ( $P = 2.9 \times 10^{-8}$  and 0.019, respectively), and higher TC/HDL-C ratio, BMI, BMI z-score and percent fat mass ( $P = 0.001, 0.049, 0.032$  and 0.039, respectively adjusted by age, gender, BMI and Tanner as appropriate). Moreover, *C230C* and *R230C* genotypes were significantly more frequent in individuals with hypoalphalipoproteinemia (35 and 24.9%, respectively) than in those with HDL-C levels >35 mg/dl (12.6%, OR 2.19, 95% CI 1.60–2.99,  $P = 9.4 \times 10^{-7}$ ). Analysis according to gender showed that the effect of *R230C* on HDL-C levels and hypoalphalipoproteinemia was highly significant in both boys and girls. However, although the effect on fat mass percentage, total cholesterol, and the TC/HDL-C ratio showed the same tendency in both genders, the difference

**Table 2**

Clinical and biochemical parameters according to *R230C ABCA1* genotypes in Mexican school-aged children, and stratified by gender.

Characteristic	<i>R230R</i>	<i>R230C</i>	<i>C230C</i>	<i>P</i> <sup>a</sup>
Total subjects (%)	<i>n</i> = 1012 (80.8)	<i>n</i> = 221 (17.6)	<i>n</i> = 20 (1.6)	
Age (years)	11.5 ± 2.4	11.2 ± 2.4	11.6 ± 2.0	NS
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	21.4 ± 4.4	21.8 ± 4.9	22.5 ± 4.5	0.049
BMI z-score	0.88 ± 0.95	1.02 ± 0.88	1.10 ± 0.98	0.032
FM (%) ( <i>n</i> = 596)	30.6 ± 10.8	32.1 ± 11.7	35.9 ± 12.9	0.039
TC (mg/dl)	160.5 ± 31.1	157.6 ± 28.1	149.1 ± 36.5	0.019
TG (mg/dl)	114.9 ± 77.6	108.6 ± 52.9	95.1 ± 36.7	NS
HDL-C (mg/dl)	46.4 ± 10.9	42.9 ± 11.0	38.2 ± 9.4	2.9 × 10 <sup>-8</sup>
TC/HDL-C ratio	3.62 ± 1.05	3.87 ± 1.08	4.19 ± 1.12	0.001
HA (%)	12.6	24.9	35.0	9.4 × 10 <sup>-7b</sup>
Boys (%)	<i>n</i> = 471 (79.2)	<i>n</i> = 112 (18.8)	<i>n</i> = 12 (2.0)	
Age (years)	11.5 ± 2.4	11.2 ± 2.3	11.6 ± 2.3	NS
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	21.3 ± 4.7	22.1 ± 5.6	21.7 ± 3.8	NS
BMI z-score	0.87 ± 1.02	1.05 ± 0.96	1.0 ± 0.98	NS
FM (%) ( <i>n</i> = 287)	29.1 ± 11.9	31.9 ± 13.7	35.2 ± 14.2	0.024
TC (mg/dl)	158.5 ± 30.5	157.9 ± 30.2	150.1 ± 3.8	NS
TG (mg/dl)	111.8 ± 85.0	111.5 ± 58.4	92.8 ± 42.2	NS
HDL-C (mg/dl)	46.1 ± 11.0	42.8 ± 10.7	38.3 ± 10.9	6.9 × 10 <sup>-5</sup>
TC/HDL-C ratio	3.61 ± 1.07	3.87 ± 1.09	4.33 ± 1.26	0.007
HA (%)	12.5	22.3	33.3	0.001 <sup>b</sup>
Girls (%)	<i>n</i> = 541 (82.2)	<i>n</i> = 109 (16.6)	<i>n</i> = 8 (1.2)	
Age (years)	11.6 ± 2.4	11.3 ± 2.4	11.7 ± 1.5	NS
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	21.6 ± 4.4	21.7 ± 4.0	24.5 ± 5.7	NS
BMI z-score	0.89 ± 0.88	0.99 ± 0.78	1.30 ± 1.04	NS
FM (%) ( <i>n</i> = 309)	32.0 ± 9.6	32.3 ± 9.4	37.2 ± 11.6	NS
TC (mg/dl)	162.2 ± 31.6	157.3 ± 25.9	146.8 ± 25.3	0.020
TG (mg/dl)	117.9 ± 70.7	105.8 ± 47.0	100.5 ± 20.6	NS
HDL-C (mg/dl)	46.6 ± 10.8	43.1 ± 11.5	37.8 ± 4.7	1.1 × 10 <sup>-4</sup>
TC/HDL-C ratio	3.64 ± 1.03	3.87 ± 1.07	3.93 ± 0.816	NS
HA (%)	12.6	27.5	37.5	1.8 × 10 <sup>-4b</sup>

Data are the means ± SD or *n* (%). BMI, body mass index; FM, percent fat mass; TC, total cholesterol; TG, triglyceride; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; HA, hypoalphalipoproteinemia.

<sup>a</sup> *P*-values using an additive model adjusted for age, sex, BMI and Tanner scores, when appropriate.

<sup>b</sup> *P*-value calculated by multiple regression analysis using an additive model adjusted for age, sex, BMI and Tanner score, when appropriate.

in fat mass percentage and TC/HDL-C ratio reached statistical significance only in boys, while the difference in total cholesterol levels reached significance only in girls (Table 2).

Mean HDL-C levels were lower in 926 pubertal than in 327 prepubertal children (44.8 ± 11.1 vs. 47.8 ± 10.5 mg/dl; *P* = 1.8 × 10<sup>-5</sup>). The *R230C* allele was associated with significantly lower HDL-C levels in pubertal children (45.6 ± 10.9 vs. 41.3 ± 10.9 mg/dl for *R230R* and *R230C/C230C* genotypes respectively; *P* = 3.7 × 10<sup>-6</sup>). The same tendency was observed in prepubertal children with marginal significance (48.3 ± 10.6 vs. 45.8 ± 10.4 mg/dl for *R230R* and *R230C/C230C* genotypes respectively; *P* = 0.077).

HDL subclass distribution differed according to *R230C* genotypes in 81 school-aged children matched by age, gender and BMI (Table 3). As expected, significant association was observed between HDL-C levels and the *R230C* variant (*P* = 0.011). HDL-C levels were significantly lower in individuals with heterozygous *R230C* and homozygous *C230C* genotypes as compared to those with the *R230R* homozygous genotype (*P* < 0.05 for both comparisons). Moreover, significant differences were observed between the proportion of HDL<sub>2b</sub>, HDL<sub>3a</sub> and HDL<sub>3b</sub> particles and the *R230C* variant (*P* = 0.002, 0.004 and 0.029, respectively). Overall, the proportion of large HDL particles decreased while the proportion of small HDL particles increased in individuals with *R230C* heterozygous and *C230C* homozygous genotypes as compared to those with the *R230R* homozygous genotype (Table 3). In addition, the *R230C* variant was associated with the mean HDL particle size (*P* = 0.014). In agreement with the shift toward small HDL particles, mean HDL particle size was significantly smaller in *R230C* heterozygotes as compared to *R230R* homozygotes (*P* < 0.05), and although homozygous *C230C* subjects showed smaller HDL particles, the difference with *R230R* homozygotes did not reach statistical significance.

**Table 3**

HDL size and subclass distribution according to *R230C ABCA1* genotype groups.

	<i>R230R</i> <i>n</i> = 32	<i>R230C</i> <i>n</i> = 32	<i>C230C</i> <i>n</i> = 17	<i>P</i> -value
Age (years)	12.2 ± 1.5	12.2 ± 1.6	11.8 ± 2.0	NS
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23.8 ± 5.5	24.2 ± 6.3	23.0 ± 4.6	NS
BMI z-score	1.17 ± 1.01	1.18 ± 0.98	1.15 ± 1.00	NS
HDL-C (mg/dl)	48.6 ± 11.0	42.2 ± 11.8	39.4 ± 9.2	0.011 <sup>a,b</sup>
HDL <sub>2b</sub> (%)	13.0 ± 3.6	10.9 ± 2.8	9.8 ± 2.8	0.002 <sup>a,b</sup>
HDL <sub>2a</sub> (%)	21.1 ± 3.5	19.7 ± 3.3	19.9 ± 3.2	NS
HDL <sub>3a</sub> (%)	27.2 ± 1.9	28.3 ± 2.0	29.2 ± 2.1	0.004 <sup>b</sup>
HDL <sub>3b</sub> (%)	23.4 ± 2.6	24.8 ± 2.5	25.0 ± 2.0	0.029
HDL <sub>3c</sub> (%)	15.2 ± 3.7	16.3 ± 3.8	16.2 ± 4.8	NS
HDL size (nm)	8.77 ± 0.17	8.65 ± 0.16	8.64 ± 0.16	0.014 <sup>a</sup>

Data are the means ± SD or *n* (%). *P*-values indicate overall significance of ANOVA among the 3 groups. BMI, body mass index; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol.

<sup>a</sup> *P* < 0.05 after Scheffé post hoc test comparing *R230R* vs. *R230C*.

<sup>b</sup> *P* < 0.05 after Scheffé post hoc test comparing *R230R* vs. *C230C*.

#### 4. Discussion

Epidemiological studies report that the onset of metabolic disease is occurring at increasingly earlier ages [29,30]. In the Mexican population, low HDL-C levels (<35 mg/dl) is the most common dyslipidemia both in adults and adolescents [1,31]. In the present study, we found that this dyslipidemia was also the most common in children aged 6–15 years (15.1%). Thus, in the Mexican population, low HDL-C levels are apparently present since childhood.

Mexican and other Latin American populations resulted from the admixture of mainly Spaniards and Native Americans [32]. While in Spaniard children mean HDL-C levels are high (55–60 mg/dl), Latin American children including Mexicans have low mean HDL-C levels (38–45 mg/dl) [31,33]. Although environmental factors clearly play a role in HDL-C levels, genetic factors are also known to modulate this trait [17,34]. Latin American mestizo populations with Amerindian ancestry may share genetic variants conferring an increased risk of highly prevalent metabolic traits such as low HDL-C levels. The only currently identified functional gene variant exclusive and common to Native American populations throughout the Americas is *R230C/ABCA1* [35].

The association of *R230C* with low HDL-C levels and hypoalphalipoproteinemia was highly significant while its association with BMI was marginal, in agreement with previous observations in Mexican adults [21]. However, although a differential effect of some *ABCA1* gene polymorphisms according to gender has been previously reported in adults [36], the effect of *R230C* was independent of gender in Mexican school-aged children. In the present study, all subjects were healthy children aged 6 to 15 years. Around 74% of these children were in puberty according to Tanner scores, a time when changes in serum sex hormone levels are known to affect serum lipid levels [37,38]. *R230C* was associated with lower HDL-C levels in both pubertal and prepubertal children, although only with marginal significance in the latter group probably because of the reduced sample size. Thus, the effect of *R230C* on HDL-C levels is observed since childhood both in boys and girls.

*R230C* affected HDL particle size distribution independently of age, gender and BMI, as the proportion of large HDL particles decreased and the proportion of small HDL particles increased in *C230C* carriers. This pattern has been previously reported in Tangier patients and heterozygous *ABCA1* mutation carriers, characterized by HDL particles that are small in size and poor in cholesterol [39–41]. Although the precise mechanisms by which these mutations affect HDL-C particle distribution are not fully understood, it has been postulated that reduced cellular cholesterol efflux in Tangier disease leads to smaller HDL particles that, in turn, are more rapidly cleared from the plasma compartment [40,42]. Smaller HDL particle size in these individuals may be related to reduced LCAT activity, which has been observed in both male and female *ABCA1* mutation heterozygotes [39]. Although



we did not measure LCAT activity, the HDL subclass distribution pattern observed in C230 carriers is compatible with that observed in ABCA1 mutation carriers.

The same HDL subclass distribution has been observed in Mexican overweight children with insulin resistance or T2D [26,43]. Although the association of obesity and insulin resistance with smaller HDL particles has been attributed to increased fractional clearance of HDL secondary to depletion of its cholesterol [44,45], in the present study the association of R230C with smaller HDL particles was independent of BMI. The influence of other factors potentially affecting HDL particle size (i.e. insulin resistance) should be considered in future studies. Moreover, whether diet and physical activity exert a differential effect on HDL-C levels according to genotype remains to be determined.

In conclusion, our data suggest that the R230C ABCA1 gene variant plays an important role in HDL-C level regulation and HDL subclass distribution in healthy Mexican school-aged children. Because these children are exposed to adverse lipid profiles since childhood, prospective studies are required to analyze whether lifelong exposure may favor the development of chronic metabolic disease in adult life.

### Acknowledgements

This research was supported by grant 69856 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Teresa Flores-Dorantes was supported by PhD fellowship from CONACYT, México. The authors wish to thank Salvador Ramírez-Jimenez, Victor Acuña-Alonzo and Luz E. Guillén-Pineda for their technical assistance.

### References

- [1] Aguilar-Salinas CA, Olaiz G, Valles V, et al. High prevalence of low HDL cholesterol concentrations and mixed hyperlipidemia in a Mexican nationwide survey. *J Lipid Res* 2001;42:1298–307.
- [2] Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, et al. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation* 1989;79:8–15.
- [3] Castro GR, Fielding CJ. Early incorporation of cell-derived cholesterol into pre-beta-migrating high-density lipoprotein. *Biochemistry* 1988;27:25–9.
- [4] 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.
- [5] Johansson J, Carlson LA, Landou C, Hamsten A. High density lipoproteins and coronary atherosclerosis. A strong inverse relation with the largest particles is confined to normotriglyceridemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1991;11:174–82.
- [6] Asztalos BF, Collins D, Cupples LA, et al. Value of high-density lipoprotein (HDL) subpopulations in predicting recurrent cardiovascular events in the Veterans Affairs HDL Intervention Trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:2185–91.
- [7] Lauer RM, Lee J, Clarke WR. Factors affecting the relationship between childhood and adult cholesterol levels: the Muscatine Study. *Pediatrics* 1988;82:309–18.
- [8] Porkka KV, Viikari JS, Taimela S, Dahl M, Akerblom HK. Tracking and predictiveness of serum lipid and lipoprotein measurements in childhood: a 12-year follow-up: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Am J Epidemiol* 1994;140:1096–110.
- [9] Webber LS, Srinivasan SR, Wattigney WA, Berenson GS. Tracking of serum lipids and lipoproteins from childhood to adulthood: the Bogalusa Heart Study. *Am J Epidemiol* 1991;133:884–99.
- [10] Mahoney LT, Burns TL, Stanford W, et al. Coronary risk factors measured in childhood and young adult life are associated with coronary artery calcification in young adults: the Muscatine Study. *J Am Coll Cardiol* 1996;27:277–84.
- [11] Davis PH, Dawson JD, Riley WA, Lauer RM. Carotid intimal-medial thickness is related to cardiovascular risk factors measured from childhood through middle age: the Muscatine Study. *Circulation* 2001;104:2815–9.
- [12] Li S, Chen W, Srinivasan SR, et al. Childhood cardiovascular risk factors and carotid vascular changes in adulthood: the Bogalusa Heart Study. *JAMA* 2003;290:2271–6.
- [13] Raitakari OT, Juonala M, Kahonen M, et al. Cardiovascular risk factors in childhood and carotid artery intima-media thickness in adulthood: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *JAMA* 2003;290:2277–83.
- [14] Berenson GS, Srinivasan SR, Bao W, Newman III WP, Tracy RE, Wattigney WA. Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults. The Bogalusa Heart Study. *N Engl J Med* 1998;338:1650–6.
- [15] Jarvisalo MJ, Jartti L, Nantö-Salonen K, et al. Increased aortic intima-media thickness: a marker of preclinical atherosclerosis in high-risk children. *Circulation* 2001;104:2943–7.
- [16] von Eckardstein A, Nofer JR, Assmann G. High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:13–27.
- [17] Klos KL, Kullo IJ. Genetic determinants of HDL: monogenic disorders and contributions to variation. *Curr Opin Cardiol* 2007;22:344–51.
- [18] Clee SM, Zwinderman AH, Engert JC, et al. Common genetic variation in ABCA1 is associated with altered lipoprotein levels and a modified risk for coronary artery disease. *Circulation* 2001;103:1198–205.
- [19] Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG, Stene MC, et al. Association of loss-of-function mutations in the ABCA1 gene with high-density lipoprotein cholesterol levels and risk of ischemic heart disease. *JAMA* 2008;299:2524–32.
- [20] Movva R, Rader DJ. Laboratory assessment of HDL heterogeneity and function. *Clin Chem* 2008;54:788–800.
- [21] Villarreal-Molina MT, Aguilar-Salinas CA, Rodríguez-Cruz 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.
- [22] Villarreal-Molina MT, Flores-Dorantes MT, Arellano-Campos O, 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.
- [23] Kuczmarski RJ, Ogden CL, Guo SS, et al. 2000 CDC growth charts for the United States: methods and development. *Vital Health Stat* 2002;246:1–190.
- [24] Tanner JM. The development of the reproductive system. 2nd ed. In: *Growth at adolescence*. Oxford, UK: Blackwell Scientific; 1962. p. 28–39.
- [25] Duke PM, Litt IF, Gross RT. Adolescents' self-assessment of sexual maturation. *Pediatrics* 1980;66:918–20.
- [26] Medina-Urrutia A, Juárez-Rojas JG, Martínez-Alvarado R, et al. High-density lipoprotein subclasses distribution and composition in Mexican adolescents with low HDL cholesterol and/or high triglyceride concentrations, and its association with insulin and C-reactive protein. *Atherosclerosis* 2008;201:392–7.
- [27] Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without the use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499–502.
- [28] Kavey RE, Daniels SR, Laver RM, et al. American Heart Association guidelines for primary prevention of atherosclerotic cardiovascular disease beginning in childhood. *Circulation* 2003;107:1562–6.
- [29] Saland JM. Update on the metabolic syndrome in children. *Curr Opin Pediatr* 2007;19:183–91.
- [30] Nathan BM, Moran A. Metabolic complications of obesity in childhood and adolescence: more than just diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2008;15:21–9.
- [31] Posadas-Sánchez R, Posadas-Romero C, Zamora-González J, Mendoza-Pérez E, Cardoso-Saldaña G, Yamamoto-Kimura L. Lipid and lipoprotein profiles and prevalence of dyslipidemia in Mexican adolescents. *Metabolism* 2007;56:1666–72.
- [32] Lisker R, Ramirez E, Briceño RP, Granados J, Babinsky V. Gene frequencies and admixture estimates in four Mexican urban centers. *Hum Biol* 1990;62:791–801.
- [33] López-Simón L, de Oya M, Lasunción MA, et al. Genetic determinants of plasma HDL-cholesterol levels in prepubertal children. *Clin Chim Acta* 2009;403:203–6.
- [34] Ordoñas JM. HDL genetics: candidate genes, genome wide scans and gene-environment interactions. *Cardiovasc Drugs Ther* 2002;16:273–81.
- [35] Acuña-Alonzo V, Flores-Dorantes T, Kruit JK, et al. A functional ABCA1 gene variant is associated with low HDL-cholesterol levels and shows evidence of positive selection in Native Americans. *Human Molecular Genetics Advance Access published on April 23, 2010*. doi:10.1093/hmg/ddq173.
- [36] Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG, Jensen GB, Tybjaerg-Hansen A. Genetic variation in ABC transporter A1 contributes to HDL cholesterol in the general population. *J Clin Invest* 2004;114:1343–53.
- [37] Tell GS, Mittelman MB, Vellar OD. Cholesterol, high density lipoprotein cholesterol and triglycerides during puberty: the Oslo Youth Study. *Am J Epidemiol* 1985;122:750–61.
- [38] Bertrais S, Balkau B, Charles MA, et al. Puberty-associated differences in total cholesterol and triglyceride levels according to sex in French children aged 10–13 years. *Ann Epidemiol* 2000;10:316–23.
- [39] Kuivenhoven JA, Hovingh GK, van Tol A, et al. Heterozygosity for ABCA1 gene mutations: effects on enzymes, apolipoproteins and lipoprotein particle size. *Atherosclerosis* 2003;171:311–9.
- [40] Brousseau ME, Eberhart GP, Dupuis J, et al. Cellular cholesterol efflux in heterozygotes for tangier disease is markedly reduced and correlates with high density lipoprotein cholesterol concentration and particle size. *J Lipid Res* 2000;41:1125–35.
- [41] Asztalos BF, Brousseau ME, McNamara JR, Horvath KV, Roheim PS, Schaefer EJ. Subpopulations of high density lipoproteins in homozygous and heterozygous Tangier disease. *Atherosclerosis* 2001;156:217–25.
- [42] Francis GA, Knopp RH, Oram JF. Defective removal of cellular cholesterol and phospholipids by apolipoprotein A-I in Tangier disease. *J Clin Invest* 1995;96:78–87.
- [43] Pérez-Méndez O, Torres-Tamayo M, Posadas-Romero C, et al. Abnormal HDL subclasses distribution in overweight children with insulin resistance or type 2 diabetes mellitus. *Clin Chim Acta* 2007;376:17–22.
- [44] Borggreve SE, De Vries R, Dullaart RP. Alterations in high-density lipoprotein metabolism and reverse cholesterol transport in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus: role of lipolytic enzymes, lecithin:cholesterol acyltransferase and lipid transfer proteins. *Eur J Clin Invest* 2003;33:1051–69.
- [45] Vajo Z, Terry JG, Brinton EA. Increased intra-abdominal fat may lower HDL levels by increasing the fractional catabolic rate of LpA-I in postmenopausal women. *Atherosclerosis* 2002;160:495–501.

# A functional *ABCA1* gene variant is associated with low HDL-cholesterol levels and shows evidence of positive selection in Native Americans

Víctor Acuña-Alonzo<sup>1,5,†</sup>, Teresa Flores-Dorantes<sup>1,†</sup>, Janine K. Kruit<sup>6</sup>, Teresa Villarreal-Molina<sup>1</sup>, Olimpia Arellano-Campos<sup>2</sup>, Tábita Hünemeier<sup>7</sup>, Andrés Moreno-Estrada<sup>8</sup>, Ma Guadalupe Ortiz-López<sup>9,10</sup>, Hugo Villamil-Ramírez<sup>1</sup>, Paola León-Mimila<sup>1</sup>, Marisela Villalobos-Comparan<sup>1</sup>, Leonor Jacobo-Albavera<sup>1</sup>, Salvador Ramírez-Jiménez<sup>1</sup>, Martin Sikora<sup>11</sup>, Lin-Hua Zhang<sup>6</sup>, Terry D. Pape<sup>6</sup>, Ma de Ángeles Granados-Silvestre<sup>9,10</sup>, Isela Montufar-Robles<sup>9,10</sup>, Ana M. Tito-Alvarez<sup>12</sup>, Camilo Zurita-Salinas<sup>12</sup>, José Bustos-Arriaga<sup>13</sup>, Leticia Cedillo-Barrón<sup>13</sup>, Celta Gómez-Trejo<sup>5</sup>, Rodrigo Barquera-Lozano<sup>5</sup>, Joao P. Vieira-Filho<sup>14</sup>, Julio Granados<sup>3</sup>, Sandra Romero-Hidalgo<sup>15</sup>, Adriana Huertas-Vázquez<sup>16</sup>, Antonio González-Martín<sup>17</sup>, Amaya Gorostiza<sup>5,17</sup>, Sandro L. Bonatto<sup>18</sup>, Maricela Rodríguez-Cruz<sup>19</sup>, Li Wang<sup>20</sup>, Teresa Tusié-Luna<sup>1</sup>, Carlos A. Aguilar-Salinas<sup>2</sup>, Ruben Lisker<sup>4</sup>, Regina S. Moises<sup>14</sup>, Marta Menjivar<sup>9</sup>, Francisco M. Salzano<sup>7</sup>, William C. Knowler<sup>21</sup>, M. Cátira Bortolini<sup>7</sup>, Michael R. Hayden<sup>6</sup>, Leslie J. Baier<sup>21</sup> and Samuel Canizales-Quinteros<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Unit of Molecular Biology and Genomic Medicine, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City 14000, Mexico, <sup>2</sup>Department of Endocrinology and Metabolism, <sup>3</sup>Department of Immunology and Rheumatology and <sup>4</sup>Direction of Research, INCMNSZ, Mexico City 14000, Mexico, <sup>5</sup>Molecular Genetics Laboratory, Escuela Nacional de Antropología e Historia (ENAH), Mexico City 14030, Mexico, <sup>6</sup>Department of Medical Genetics, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada V6T1Z4, <sup>7</sup>Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 91501-970, Brazil, <sup>8</sup>Department of Genetics, Stanford University, Stanford, CA 94305, USA, <sup>9</sup>Department of Biology, Faculty of Chemistry, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City 04510, Mexico, <sup>10</sup>Laboratory of Molecular Endocrinology, Hospital Juárez de México, Mexico City, Mexico, <sup>11</sup>Institute of Evolutionary Biology (UPF-CSIC), CEXS-UPF-PRBB, Barcelona 37-49 08003, Spain, <sup>12</sup>Laboratorios Zurita & Zurita, Quito N12-120, Ecuador, <sup>13</sup>Department of Molecular Biomedicine, Cinvestav, IPN, Mexico City 07360, Mexico, <sup>14</sup>Division of Endocrinology, Department of Medicine, Federal University of São Paulo, São Paulo 04034-970, Brazil, <sup>15</sup>Department of Computational Genomics, Instituto Nacional de Medicina Genómica, Mexico City 01900, México, <sup>16</sup>Cedars-Sinai Heart Institute, Cedars-Sinai Medical Center, Los Angeles, CA 90048-5909, USA, <sup>17</sup>Department of Zoology and Physical Anthropology, Faculty of Biology, Complutense University of Madrid, Madrid 28040, Spain, <sup>18</sup>Faculty of Biological Sciences, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre 90619-900 RS, Brazil, <sup>19</sup>Unit of Medical Research in Nutrition, Pediatrics Hospital, National Medical Center XXI Century, Mexican Institute of Social Security, Mexico City 06725, Mexico, <sup>20</sup>Key Laboratory of Molecular and Developmental Biology, Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China, <sup>21</sup>National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, National Institutes of Health, Phoenix, AZ 85014, USA

Received January 7, 2010; Revised March 19, 2010; Accepted April 21, 2010

\*To whom correspondence should be addressed at: Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga, No. 15 Colonia Sección 16, Tlalpan 14000, México D.F., Mexico. Tel/Fax: +52 5556550011; Email: cani@servidor.unam.mx

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work.

It has been suggested that the higher susceptibility of Hispanics to metabolic disease is related to their Native American heritage. A frequent cholesterol transporter *ABCA1* (ATP-binding cassette transporter A1) gene variant (*R230C*, rs9282541) apparently exclusive to Native American individuals was associated with low high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) levels, obesity and type 2 diabetes in Mexican Mestizos. We performed a more extensive analysis of this variant in 4405 Native Americans and 863 individuals from other ethnic groups to investigate genetic evidence of positive selection, to assess its functional effect *in vitro* and to explore associations with HDL-C levels and other metabolic traits. The *C230* allele was found in 29 of 36 Native American groups, but not in European, Asian or African individuals. *C230* was observed on a single haplotype, and *C230*-bearing chromosomes showed longer relative haplotype extension compared with other haplotypes in the Americas. Additionally, single-nucleotide polymorphism data from the Human Genome Diversity Panel Native American populations were enriched in significant integrated haplotype score values in the region upstream of the *ABCA1* gene. Cells expressing the *C230* allele showed a 27% cholesterol efflux reduction ( $P < 0.001$ ), confirming this variant has a functional effect *in vitro*. Moreover, the *C230* allele was associated with lower HDL-C levels ( $P = 1.77 \times 10^{-11}$ ) and with higher body mass index ( $P = 0.0001$ ) in the combined analysis of Native American populations. This is the first report of a common functional variant exclusive to Native American and descent populations, which is a major determinant of HDL-C levels and may have contributed to the adaptive evolution of Native American populations.

## INTRODUCTION

It has been suggested that genetic susceptibility of Hispanics to type 2 diabetes (T2D), obesity and dyslipidemia is related to their Native American heritage (1–3). We recently found a frequent non-synonymous variant (*R230C*, rs9282541) within the ATP-binding cassette transporter A1 gene (*ABCA1*) associated with low high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) levels (the most common dyslipidemia in populations with Native American ancestry), obesity and T2D in Mexican Mestizos (4,5). *ABCA1* plays a key role in cholesterol efflux and transfer from peripheral cells to lipid-poor apolipoprotein A1 (ApoA1), the first step in HDL particle formation (6,7).

The *R230C* variant was initially described in the Oji-Cree population (8). To date, it has been found only in Native American and Mexican-Mestizo populations (4). We performed a large-scale analysis including individuals from 36 Native North and South American groups and assessed the effect of this variant on anthropometric and metabolic traits. Because it was previously suggested that *R230C* may have conferred selective advantage as a thrifty gene and/or resistance against certain infectious diseases (4), we performed a more thorough analysis seeking evidence of positive selection.

## RESULTS

The *C230* allele was present in the majority of the Native American populations at an average frequency of 12% (range 0–31%) (Fig. 1; Supplementary Material, Table S1), but was absent from 863 additional individuals belonging to different European (Spaniard and Dutch) and Asian groups (Han Chinese, Manchu, Mongolian, Siberians and Eskimos) (Fig. 1). The distribution of this allele was not structured according to language or geographic groups (North versus South America), as evidenced by analysis of molecular variance (AMOVA) ( $P = 0.978$  and  $0.895$ , respectively). However, the *C230* allele frequency increased at tropical latitudes (between the tropics of Cancer and Capricorn) and gradually decreased

at higher latitudes both to the North and South (Fig. 1), showing a significant correlation ( $r^2 = 0.328$ ;  $P = 0.02$ ).

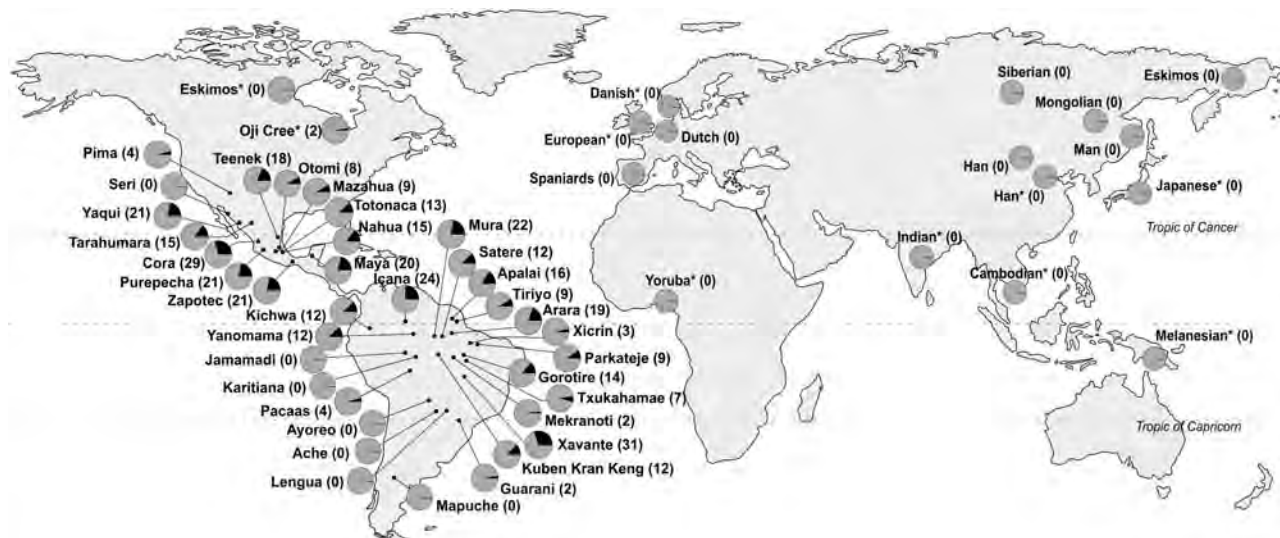
### The *C230* allele is located on a single genetic haplotype

To perform a phylogenetic reconstruction of the evolutionary relationships, 15 additional single-nucleotide polymorphisms (SNPs) within a 50 kb block were analyzed in 20 Native American and 25 Mexican-Mestizo trios to define haplotype blocks within the region. Together with data from HapMap populations, a total of 58 haplotypes were identified (Supplementary Material, Table S2). Seven haplotypes were found in Native Americans, and the *C230* allele was clearly found in only one genetic block (haplotype 32) in all Mexican-Mestizo, North and South American native individuals analyzed. Maximum parsimony (MP)-based network analysis is shown in Figure 2. The phylogenetic reconstruction uncovered two major lineages (haplogroups A and B) defined by the non-synonymous polymorphism *R219K* within the *ABCA1* gene. The *C230* allele occurred in haplogroup B characterized by the ancestral *R219* allele.

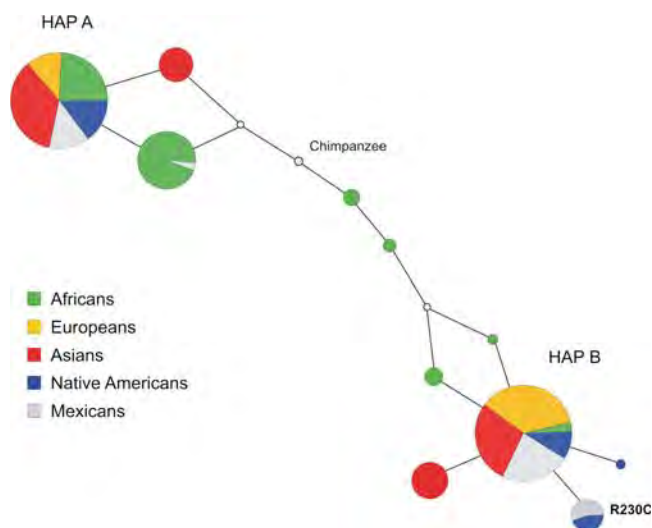
### Positive selection testing

The long-range haplotype (LRH) test showed that the extension of linkage disequilibrium (LD) was much longer in *C230* than in non-*C230* chromosomes [relative extended haplotype homozygosity (REHH) = 9.8 and 5.9 at 365 and –434 kb from the core, respectively; Fig. 3]. The former value remained significant compared with REHH values from additional regions elsewhere in the genome, genotyped in a similar set of Native American populations ( $P = 0.036$  at 300 kb from the core and  $P = 0.021$  at a marker *H* of 0.04). REHH values were significant in both Kichwa ( $P = 0.018$  at a distance of 300 kb and  $P = 0.007$  at a marker *H* of 0.04) and Nahua populations ( $P = 0.043$  at a distance of 300 kb and  $P = 0.021$  at a marker *H* of 0.04). The only other two significant core haplotypes were located upstream



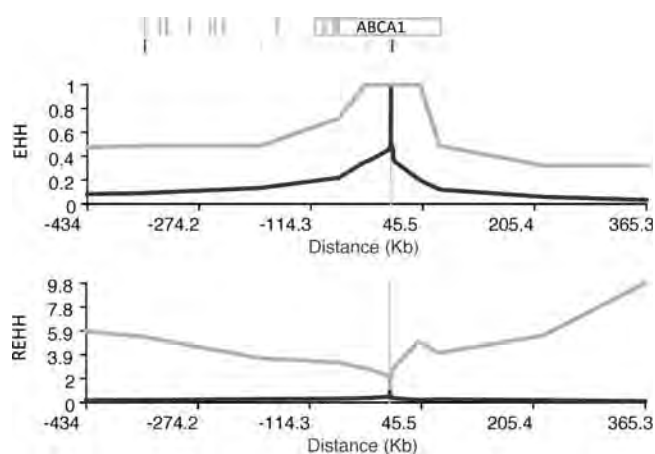


**Figure 1.** Frequency distribution of the *C230* allele [%] black-shaded area] in Native American, European, Asian and African populations. *C230* frequency data from populations with an asterisk were obtained from previous reports (8–11 and HapMap and SNP500CANCER databases).



**Figure 2.** MP-based network describing the evolutionary relationships of 11 distinct haplotypes. Native American and Mexican-Mestizo haplotypes were established in trios; the remainder were inferred from HapMap groups. Each haplotype is represented by a circle whose area reflects the overall number of copies observed and whose color-coding indicates the frequency of the haplotype in the HapMap groups and Native Americans and Mexican Mestizos. Line length is proportional to the number of differences between haplotypes. Non-filled circles represent non-sampled haplotypes reconstructed by the MP algorithm as evolutionary intermediaries between observed haplotypes. The phylogenetic reconstruction uncovered two major lineages (haplogroups A and B) defined by the non-synonymous polymorphism *R219K*. The *R230C* variant occurred on haplogroup B characterized by the ancestral *R219* allele, which is frequent in Europe, Asia and America but infrequent in African populations. The *C230* allele was found in only one genetic block in all Mexican-Mestizo and Native American individuals analyzed.

the *ABCA1* gene (Supplementary Material, Table S3). Furthermore, in Native Americans from the Human Genome Diversity Panel (HGDP) (*R230C* genotypes not available), the *ABCA1* 5' region (~75 kb upstream *R230C*) was clearly enriched for outliers of the integrated haplotype score (iHS)

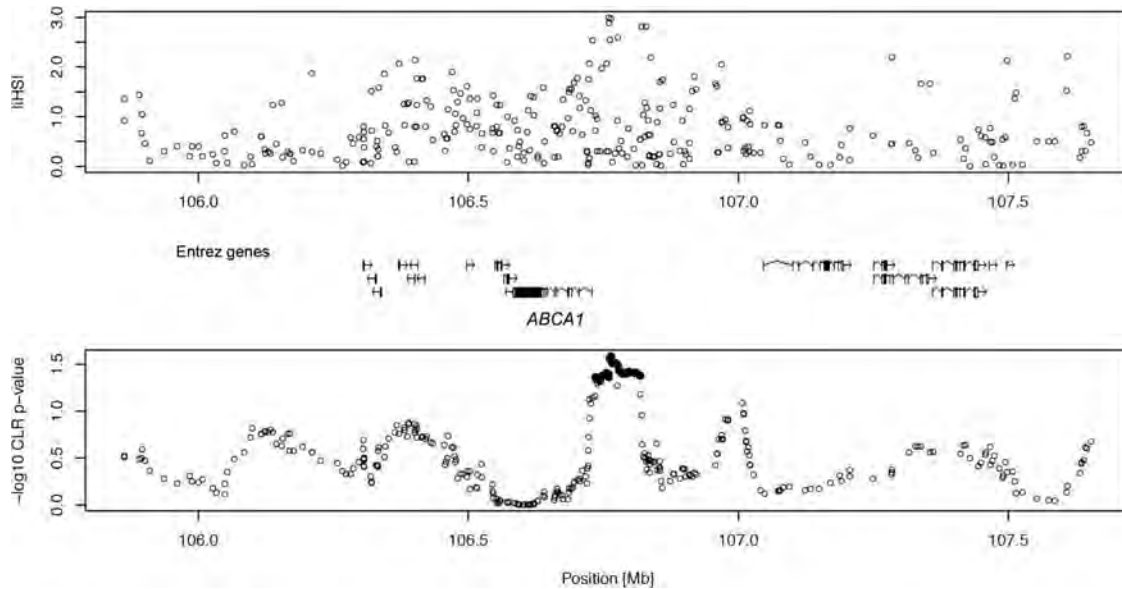


**Figure 3.** EHH and REHH of *ABCA1/R230C* and 23 additional SNPs  $\times$  physical distance in Native American individuals. *C230*-bearing chromosomes (in gray) appear to have greatly extended LD compared with non-*C230*-bearing chromosomes (in black). Gray vertical lines in the upper track represent genotyped SNPs, and boxes indicate annotated genes.

statistic genome-wide distribution (iHS > 2.5) (Fig. 4). In agreement with the REHH analysis, the highest iHS values are clustered upstream *ABCA1*.

#### Association of *R230C* with HDL-C levels and other metabolic traits

Overall, the prevalence of hypoalphalipoproteinemia (HA) was the most common dyslipidemia (65% in Mexican and South American natives; Supplementary Material, Table S4). Table 1 shows the effect of *R230C* on HDL-C and total cholesterol levels and body mass index (BMI). The *R230C/C230C* genotypes were significantly associated with low HDL-C levels in Pimas ( $P = 6.4 \times 10^{-5}$ ) and in the combined analysis of eight Mexican native groups ( $P = 5.3 \times 10^{-8}$ ). In South



**Figure 4.** iHS values for individual SNPs flanking the *ABCA1* region (2 Mb)  $\times$  physical distance (top panel) and  $P$ -values for the composite likelihood ratio (CLR) test based on a 31-SNP sliding window analysis to detect local regions enriched for high iHS values (bottom panel) in the combined Native American sample. Filled circles indicate  $P$ -values  $< 0.05$  genome-wide significance level.

**Table 1.** Association of *R230C* with lipid levels and BMI in Native American populations

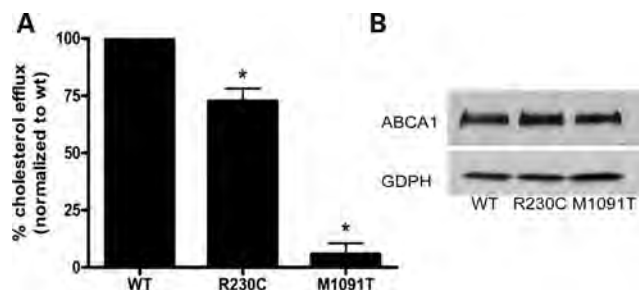
Native American population ( $n$ )	HDL-C levels Effect (SE)	$P$ -value	Total cholesterol Effect (SE)	$P$ -value	BMI Effect (SE)	$P$ -value
North America						
USA						
Pima (2563) <sup>a</sup>	-0.075 (0.019)	$6.4 \times 10^{-5}$	-0.071 (0.014)	$1.8 \times 10^{-7}$	0.008 (0.015)	0.586
Mexico						
Yaquis (45)	—	—	—	—	0.044 (0.018)	0.012
Teenek (67)	-0.051 (0.026)	0.057	-0.010 (0.024)	0.671	0.001 (0.016)	0.978
Coras (123)	-0.033 (0.014)	0.021	-0.006 (0.013)	0.681	0.032 (0.011)	0.006
Purepechas (15)	-0.040 (0.074)	0.603	-0.048 (0.046)	0.333	0.034 (0.019)	0.097
Mazahuas (83)	-0.039 (0.036)	0.281	-0.031 (0.041)	0.444	0.006 (0.019)	0.758
Nahuas (267)	-0.040 (0.014)	0.014	-0.014 (0.020)	0.470	-0.004 (0.008)	0.617
Totonacas (113)	-0.028 (0.021)	0.180	-0.031 (0.015)	0.042	0.022 (0.013)	0.085
Zapotecs (106)	-0.047 (0.022)	0.038	0.007 (0.019)	0.723	0.007 (0.013)	0.605
Mayans (110)	-0.040 (0.017)	0.023	-0.043 (0.015)	0.004	-0.007 (0.013)	0.554
Mexican natives combined	-0.038 (0.007)	$5.3 \times 10^{-8}$	-0.019 (0.007)	0.027	0.010 (0.004)	0.012
South America						
Kichwas (79)	-0.043 (0.030)	0.153	-0.005 (0.020)	0.791	0.024 (0.012)	0.050
Parkatejé (78)	-0.029 (0.026)	0.270	-0.002 (0.030)	0.945	0.046 (0.012)	0.0003
All Native Americans combined	-0.042 (0.006)	$1.77 \times 10^{-11}$	-0.021 (0.006)	$7.15 \times 10^{-5}$	0.011 (0.003)	0.0001

Effect values are presented as effect size per C230 allele copy, standard error (SE). Linear regression was performed on the basis of log-transformed values for HDL-C levels (mg/dl), total cholesterol levels (mg/dl) and BMI ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ), adjusting for age, gender and diabetes status. HDL-C and total cholesterol levels were also adjusted for BMI.

<sup>a</sup> $P$ -value adjusted by age, gender, birth year, diabetes status and family membership.

American native groups, biochemical data were available from two populations (Parkatejés and Kichwas), and although HDL-C levels were lower in *C230* carriers, the differences did not reach statistical significance. Altogether, the combined results of all Native American groups showed a highly significant effect of the *C230* allele ( $-4.2\%$  per copy,  $P = 1.77 \times 10^{-11}$ ). Interestingly, differences in the effect of *R230C* on lipid profiles were observed in some Native American populations. *R230C* was strongly associated with low total cholesterol and triglyceride levels in Pimas ( $P = 1.8 \times 10^{-7}$  and

$P = 7.0 \times 10^{-4}$ , respectively) and Mayans ( $P = 0.004$  and  $0.010$ , respectively). Although the combined analysis in Native American groups also showed a significant association with low total cholesterol levels ( $P = 7.15 \times 10^{-5}$ ), it was clearly not as significant as the association with low HDL-C levels ( $P = 1.77 \times 10^{-11}$ ). The *C230* allele was associated with higher BMI in the combined analysis of Mexican native groups ( $P = 0.012$ ), in Native South American populations ( $P = 0.0003$  and  $0.050$  for Parkatejé and Kichwas, respectively), but not in Pima Indians. Altogether, combined



**Figure 5.** Functional characterization of the ABCA1/R230C variant by lipid efflux assay. (A) Polyclonal stable cell lines expressing the ABCA1 wild-type (WT), variant R230C and mutant M1091T (known defective in lipid efflux) were generated, and efflux activity for cholesterol was performed as described in Materials and Methods. Data represent mean  $\pm$  SD of two to five experiments as a percent of the ApoA1-dependent efflux induced by wild-type ABCA1. Each assay was performed in triplicate. \* $P < 0.001$ . (B) The expression of WT, variant R230C and mutant M1091T ABCA1 protein in Flp-In cells was assessed by western immunoblotting.

results showed that the C230 allele was associated with higher BMI ( $P = 0.0001$ ), and this association was evidently more significant in male than in female individuals ( $P = 4.05 \times 10^{-6}$  versus  $P = 0.02$ ).

### Sequencing and *in vitro* functional analysis

To rule out the presence of another possible causal variant in LD with C230, all 50 exons and the promoter region of ABCA1 were sequenced in a limited number of individuals (2 of each genotype); however, no promoter or coding variant in LD with R230C was found. Cholesterol efflux from Flp-In cell lines expressing the ABCA1 C230 allele was significantly lower (27%) than that of cells expressing the wild-type R230 allele ( $P < 0.001$ ) (Fig. 5A), confirming that this variant has a functional effect *in vitro*. In contrast, the C230 and R230 cell lines showed no differences in phospholipid efflux. The C230 allele expressed ABCA1 protein at levels comparable with that of T1091 and wild-type alleles (Fig. 5B).

## DISCUSSION

### R230C, a private allele to the Americas

The R230C allele first identified in Oji-Crees and Mexican Mestizos was found in most Amerindian groups throughout the Americas, but not in any ethnic group from other continents (4,8). This is in agreement with previous studies that have not found this allele in 7717 Caucasian, Asian, African and South-Pacific Rim individuals (HapMap and SNP500CANCER databases) (8–11). This absence strongly suggests that C230 is a private allele (exclusive to Native American and Native American-derived populations), although it may be present in some non-Amerindian populations not included in this analysis. Its presence on the same haplotype in both North and South Americans suggests that it may have arisen among Native American founders in Beringia or North-East Asia. This is in agreement with recent studies suggesting that founder populations stayed in Beringia long enough to give rise to exclusive genetic variants (12–14). Although private alleles in the HLA system and

other genes have been previously reported in some Native American populations (15,16), there is only one previous report of a common private autosomal allele (microsatellite D9S1120 9RA) ubiquitous in the Americas (17). It is noteworthy that D9S1120 and R230C (ABCA1) are both located on chromosome 9q, although separated by a 19 Mb distance. We genotyped D9S1120 in 16 C230C Native American and Mestizo homozygotes and found no allele in LD, indicating that the two ancestry informative markers are independent.

The C230 allele distribution varied among different Amerindian populations (0–0.31). The complex demographic processes that these populations have gone through must have played a crucial role in this distribution. Initially, the moderate bottleneck in the out of Beringia process led to a relatively small effective population size, so genetic drift could have been one of the main causes of fluctuation (18,19). In groups that later expanded demographically to constitute societies formed by thousands of individuals such as Mesoamericans, genetic drift was less likely to cause differences in the distribution of C230 frequencies.

### Evidence suggesting R230C underwent positive selection

Understanding the impact of natural selection acting on particular genes in human populations can provide insights into the genetic etiology of human disease. Interestingly, ABCA1 has been recognized as one of the genes most likely to have been subject to positive selection in humans since the divergence from the common ancestor of our lineage and that of chimpanzees (20,21). The results of the REHH and iHS analyses for the ABCA1 gene region in Native Americans are not compatible with a simple neutral evolutionary model, but are consistent with the hypothesis that the R230C variant resides on a haplotype which is the target of an ongoing directional selective sweep. It must be acknowledged, however, that with the currently available genotyping data, it is not possible to define whether the R230C haplotype is also responsible for the signal resulting from the iHS test.

The geographical distribution of the C230 allele clearly differs from the North-to-South gradient described for genome-wide neutral markers (22), suggesting the possibility of a climate-related adaptive process, as has been previously described for other genes involved in energy metabolism (23). In the context of Neel's hypothesis (24), R230C carriers could have had a selective advantage. Because the C230 ABCA1 protein shows decreased cholesterol efflux, the presence of this variant could favor intracellular cholesterol and energy storage. Specifically, adipose tissue benefits various biological functions including the ability to accommodate fluctuations in energy supply such as severe famine, the regulation of reproductive function and providing energy for the immune system now known to have a significant energy cost (25,26). However, under current westernized lifestyle changes, this allele may have become a major susceptibility allele for low HDL-C levels and other metabolic traits, which is consistent with the association of the R230C variant with higher BMI in Native American populations, and with obesity, T2D and metabolic syndrome in Mexican Mestizos (4,5). However, other environmental factors may also be involved in C230 allele frequency distribution. For



instance, cholesterol plays an important role in various infectious processes such as the entry and replication of Dengue virus type 2 and flaviviral infection (27). The ABCA1 transporter is known to participate in infectious and/or thrombotic disorders involving vesiculation, since homozygous *ABCA1* gene deletions confer complete resistance against cerebral malaria in mice (28,29). Interestingly, areas with higher *C230* allele frequencies correspond to dengue, yellow fever and malaria distributions in the Americas (30). Altogether, these different lines of evidence suggest that the *ABCA1* *C230* allele may have been important for survival throughout the colonization of the Americas.

### Association of R230C with HDL-C levels and other metabolic traits

Overall, the prevalence of low HDL-C levels was not only higher in Native Americans than in European, Asian and African individuals (3), but also the most common dyslipidemia (65% in Mexican and South American natives). The Pima population is known to have much lower HDL-C and total cholesterol levels than US Caucasians (31). *R230C/C230C* genotypes were strongly associated with low HDL-C levels in Native American rural populations, Pimas and urban Mexican Mestizos (4,9). In fact, the sole presence of the *C230* allele explains ~4% of the HDL-C level variation in these populations, which is higher than the variation explained by any other SNP associated with HDL-C levels identified through genome-wide scans in Europeans and Indian Asians (9). This is consistent with both *in silico* (PANTHER subPSEC score -4.27) and *in vitro* evidence confirming that the *R230C* variant is functional (27% decrease in cholesterol efflux) (22). The functional effect is significant, but mild compared with the *T1091* allele previously identified in Tangier patients (32).

Environmental factors and further genetic variation (within *ABCA1* or other genes) may play a relevant role in the association of the *C230* allele with other metabolic traits. Lower total cholesterol and triglyceride levels were found in *C230* carriers only in Pimas and Mayans. In addition, the *C230* allele was associated with higher BMI in Mexican native groups, but not in the Pima Indians. Moreover, a gender effect was observed, as the association of *R230C* with higher BMI was more significant in males. Interestingly, in a previous study, a transcription factor 7-like 2 (*TCF7L2*) gene haplotype (HapA) with evidence of positive selection was also associated with higher BMI only in male individuals (33). Further studies are required to confirm the role of *R230C* in these metabolic and other fat storage-related traits such as non-alcoholic fatty liver disease, which is highly prevalent in Hispanic populations (34,35).

The *C230* allele has also been associated with T2D in the Mexican-Mestizo population (5). The overall frequency of T2D in most Mexican native groups was also high (11.3%); however, the study design was not appropriate for a case-control association in these groups. Interestingly, the *R230C* was only marginally associated with T2D in Pimas ( $P = 0.06$ ) despite the large sample size and the previous finding that HDL-C concentrations in non-diabetic Pima Indian women were negatively associated with the development of

T2D (36). Impaired *ABCA1* function causes cholesterol accumulation in beta cells in animal models, suggesting that beneficial reductions in plasma lipids may limit the extent of beta cell damage and could partially mask glucose homeostasis disturbances (37). The highly significant association of *R230C* with reduced total cholesterol and triglyceride serum levels observed in Pimas may be one of the factors explaining this marginal association. The role of *R230C* as a risk allele for T2D in Mexican native groups and its interaction with environmental factors requires further analysis.

In conclusion, to the best of our knowledge, this is the first report of a common functional variant exclusive to Native American and descent populations associated with low HDL-C levels and other metabolic traits. We present several lines of evidence in favor of positive selection for the *R230C* allele possibly contributing to the adaptive evolution of Native American populations and providing insight into the genetic etiology of currently prevalent metabolic disease.

## MATERIALS AND METHODS

### Subjects

The study included a total of 4405 adult individuals from 36 different Native American groups and 863 Europeans and Asians. All Mexican and South American natives and their ancestors (two generations) were born in the same community and spoke their own native language. Field research was conducted by multidisciplinary teams.

### Ethics statement

This study was conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethics Committees of all participant institutions. Participants provided written informed consent. Local authorities gave their approval to participate in the study, and a translator was used as needed.

### Anthropometric and biochemical analyses

Anthropometric and metabolic parameters were available for 2563 Pimas, 1016 Mexican and 157 South American native individuals (Supplementary Material, Table S4). The Pima subjects included are part of an ongoing longitudinal study of the etiology of T2D in the Gila River Indian community in Central Arizona (38). All biochemical measurements in 1050 Mexican natives and Kichwas (from Ecuador) were performed by the INCMNSZ with commercially available standardized methods as described by Villarreal-Molina *et al.* (4). Biochemical parameters of Parkatejé individuals have been previously described (39). T2D and HA were defined according to the American Diabetes Association and National Cholesterol Education Program (NCEP) criteria, respectively (40,41).

### DNA sequencing of the *ABCA1* gene

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes. The 50 exons and proximal promoter region of the

*ABCA1* gene were amplified in samples from six individuals (two *R230R*, two *R230C* and two *C230C*) as described previously (8). Amplicons were sequenced using ABI PRISM BigDye Terminators version 3.1 on an ABI 3100 automated sequencer according to the manufacturer's protocol (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

### SNP genotyping

The *R230C* variant and 23 SNPs spanning an 800 kb region were genotyped using TaqMan assays (ABI Prism 7900HT Sequence Detection System; Applied Biosystems). The 23 SNPs were selected from the HGDP for being informative in Native American populations and were genotyped in 10 Kichwa, 7 Nahua and 3 Zapotec trios (mother–father–offspring). The names and chromosomal position of all SNPs analyzed are given in Supplementary Material, Table S5. Genotyping call rate exceeded 95% per SNP, and no discordant genotypes were observed in 40 duplicate samples. Deviation from Hardy–Weinberg equilibrium was not observed for any SNP.

### Generation of *R230C* variant constructs and cell lines

Polyclonal stable cell lines expressing the *ABCA1 R230C* variant were generated using the Flp-In system (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) as described previously (42). The generation and detailed biochemical characterization of many of these cell lines are described elsewhere (43). Briefly, the *R230C* variant was generated by PCR-based site-directed mutagenesis using the primers 230F, 5'-GAGCGAGTACTT TGTTCACACATG and 230R, 5'-CATGTTGGAACAAAGT ACTCGCTC and cloned into pcDNA5/FRT (Invitrogen). The plasmid was completely sequenced prior to transfection into 293 Flp-In cells. The *MI091T ABCA1* mutation previously identified in Tangier patients was used as control (32).

### Cholesterol and phospholipid efflux assay

Efflux experiments were performed as described previously (42). Briefly, cells were loaded with 1  $\mu$ Ci of [ $^3$ H] cholesterol or 2  $\mu$ Ci of [ $^3$ H]-choline (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckingham, UK) for 24 h. The following day, the medium was removed and replaced with serum-free medium containing 5 mg/ml delipidated bovine serum albumin (Sigma, St Louis, MO, USA). After 1 h of incubation, 20  $\mu$ g/ml human ApoA1 (Athens Research and Technology, Athens, GA, USA) was added for 4 h. For cholesterol efflux, the medium was collected and cells were lysed in 0.1 N NaOH/0.1% SDS. For phospholipid efflux, the [ $^3$ H]-choline/phospholipids/ApoA1 in the medium was collected by immunoprecipitation with ApoA1 antibody and cells were digested for protein assay. The radioactivity in the samples was quantified by scintillation counting. Cholesterol efflux is expressed as a percent of counts in medium over total (medium + cells). Phospholipid efflux is expressed as counts of the immunocollected [ $^3$ H]-choline/phospholipid/ApoA1 normalized to cell protein. Data are expressed as percent of the ApoA1-dependent efflux induced by wild-type *ABCA1*. Significance was calculated using a one-way ANOVA test with a

Newman–Keuls post-test using GraphPad Prism 4 software (San Diego, CA, USA). *ABCA1* expression was determined by western blotting as described previously (44), using anti-*ABCA1* or anti-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) antibodies (Chemicon, Temecula, CA, USA).

### Statistical analyses

**Population genetics.** Allele and genotype frequencies, Hardy–Weinberg equilibrium and AMOVA were calculated using Arlequin 3.11 software (45). The linguistic classification of Native American languages was adopted from Campbell (46). Network analyses of haplotypes from HapMap, Mexican-Mestizo and Native American population data were performed using a median-joining and maximum-parsimony method (Network 4.510 software) (47).

**Positive selection tests.** The LRH test was applied to examine the decay of LD (Sweep software) (48) within an 800 kb region flanking *R230C* using data obtained from the 20 Native American trios described earlier. LD decay was then compared with LRH data generated elsewhere covering a total of 24 Mb of the genome in Native American populations (49). To further explore the presence of positive selection signatures in the *ABCA1* region, the iHS was estimated as described previously (50,51), using publicly available genotype data for ~650 000 SNPs genome-wide distributed in five Native American groups from the HGDP (52). With an approach similar to that described by Nielsen *et al.* (53) to detect regions with aberrant allele frequency spectra (test 1), we applied a composite likelihood test to detect regions with aberrant 'iHS spectra'. We first categorized |iHS| in bins of size 0.1 and then estimated the probability of observing an SNP in each bin, both in the whole-genome data set (background distribution) and in each 31-SNP sliding window over the whole genome. Two composite likelihoods were estimated for each window, multiplying the probability of observing each SNP in the window, by either the probability of observing the SNP in the genome-wide background or that estimated from the window. A log-likelihood ratio was then estimated comparing both likelihoods, where extreme values indicate unusual iHS patterns compared with the rest of the genome.

**Associations with HDL-C and metabolic traits.** Associations of *R230C* genotypes with HDL-C and other metabolic traits were tested using linear regression models (assuming an additive model) adjusting for covariates including age, sex and BMI (SPSS, version 15.0, statistical package; Chicago, IL, USA). All variables tested were log-transformed for the analysis. Combined association tests were conducted using a Mantel–Haenszel-like model (54). The combined estimated effect was computed as a weighted average of the individual estimated effects using weights proportional to the inverse of the standard errors squared (33).

### SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Material is available at *HMG* online.



## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the volunteers from all native populations of North and South America for their participation; Luz E. Guillén-Pineda for her technical assistance; Gastón Macián for his participation in sample collection in Nahua and Totonaca communities; and the staff of the Diabetes Epidemiology and Clinical Research Section, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK), NIH, for conducting the examinations of the Pima Indian participants.

*Conflict of Interest statement:* None declared.

## FUNDING

This research was supported by grant 69856 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) México, and partly supported by grant 660 from the Fundación Mexicana para la Salud-Silanes; by the Intramural Research Program of the National Institute of Digestive and Kidney Diseases (NIDDK), NIH; and by a grant of the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). V.A.-A., T.F.-D., M.V.-C. and L.J.-A. were supported by fellowships from CONACYT, México. J.K.K. was supported by fellowships of the Michael Smith Foundation for Health Research (MSFHR) and the CIHR. M.R.H. holds a Canada Research Chair in Human Genetics.

## WEB RESOURCES

The URLs for data presented herein are as follows:

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/>  
 HapMap database, <http://www.hapmap.org/>  
 SNP500CANCER, <http://snp500cancer.nci.nih.gov>  
 HGDP-CEPH database, <http://hgdp.uchicago.edu/cgi-bin/gbrowse/HGDP>  
 Arlequin 3.11 software, <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3/>  
 Network 4.510 software, <http://www.fluxus-engineering.com>  
 Sweep software, <http://www.broad.mit.edu/mpg/sweep/index.html>

## REFERENCES

- Lorenzo, C., Serrano-Rios, M., Martinez-Larrad, M.T., Gabriel, R., Williams, K., Gonzalez-Villalpando, C., Stern, M.P., Hazuda, H.P. and Haffner, S.M. (2001) Was the historic contribution of Spain to the Mexican gene pool partially responsible for the higher prevalence of type 2 diabetes in Mexican-origin populations? The Spanish Insulin Resistance Study Group, the San Antonio Heart Study, and the Mexico City Diabetes Study. *Diabetes Care*, **24**, 2059–2064.
- Cossrow, N. and Falkner, B. (2004) Race/ethnic issues in obesity and obesity-related comorbidities. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **89**, 2590–2594.
- Aguilar-Salinas, C.A., Canizales-Quinteros, S., Rojas-Martínez, R., Mehta, R., Villarreal-Molina, M.T., Arellano-Campos, O., Riba, L., Gómez-Pérez, F.J. and Tusié-Luna, M.T. (2009) Hypoalphalipoproteinemia in the populations with Native American origin: an opportunity to assess the interaction of genes and environment. *Curr. Opin. Lipidol.*, **20**, 92–97.
- Villarreal-Molina, M.T., Aguilar-Salinas, C.A., Rodríguez-Cruz, M., Riaño, D., Villalobos-Comparan, M., Coral-Vázquez, R., Menjivar, M., Yescas-Gomez, P., Königsoerg-Fainstein, M., Romero-Hidalgo, S. *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.
- Villarreal-Molina, M.T., Flores-Dorantes, M.T., Arellano-Campos, O., Villalobos-Comparan, M., Rodríguez-Cruz, M., Miliar-García, A., Huertas-Vázquez, A., Menjivar, M., Romero-Hidalgo, S., Wacher, N.H. *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.
- Attie, A.D., Kastelein, J.P. and Hayden, M.R. (2001) Pivotal role of ABCA1 in reverse cholesterol transport influencing HDL levels and susceptibility to atherosclerosis. *J. Lipid Res.*, **42**, 1717–1726.
- Oram, J.F. and Vaughan, A.M. (2006) ATP-binding cassette cholesterol transporters and cardiovascular disease. *Circ. Res.*, **99**, 1031–1043.
- Wang, J., Burnett, J.R., Near, S., Young, K., Zinman, B., Hanley, A.J., Connelly, P.W., Harris, S.B. and Hegele, R.A. (2000) Common and rare ABCA1 variants affecting plasma HDL cholesterol. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **20**, 1983–1989.
- Kooner, J.S., Chambers, J.C., Aguilar-Salinas, C.A., Hinds, D.A., Hyde, C.L., Wames, G.R., Gómez-Pérez, F.J., Frazer, K.A., Elliott, P., Scott, J. *et al.* (2008) Genome-wide scan identifies variation in MLXIPL associated with plasma triglycerides. *Nat. Genet.*, **4**, 149–151.
- Hu, S., Zhong, Y., Hao, Y., Luo, M., Zhou, Y., Guo, H., Liao, W., Wan, D., Wei, H., Gao, Y. *et al.* (2009) Novel rare alleles of ABCA1 are exclusively associated with extreme high-density lipoprotein-cholesterol levels among the Han Chinese. *Clin. Chem. Lab. Med.*, **47**, 1239–1245.
- Frikke-Schmidt, R., Nordestgaard, B.G., Jensen, G.B. and Tybjaerg-Hansen, A. (2004) Genetic variation in ABC transporter A1 contributes to HDL cholesterol in the general population. *J. Clin. Invest.*, **114**, 1343–1353.
- González-José, R., Bortolini, M.C., Santos, F.R. and Bonatto, S.L. (2008) The peopling of America: craniofacial shape variation on a continental scale and its interpretation from an interdisciplinary view. *Am. J. Phys. Anthropol.*, **137**, 175–187.
- Kitchen, A., Miyamoto, M.M. and Mulligan, C.J. (2008) A three-stage colonization model for the peopling of the Americas. *PLoS ONE*, **3**, e1596.
- Fagundes, N.J.R., Kanitz, R. and Bonatto, S.L. (2008) A reevaluation of the Native American mtDNA genome diversity and its bearing on the models of early colonization of Beringia. *PLoS ONE*, **3**, e3157.
- Williams, R.C. and McAuley, J.E. (1992) HLA class I variation controlled for genetic admixture in the Gila River Indian community of Arizona: a model for the Paleo-Indians. *Hum. Immunol.*, **33**, 39–46.
- Salzano, F.M. (2002) Molecular variability in Amerindians: widespread but uneven information. *An. Acad. Bras. Cienc.*, **74**, 223–263.
- Schroeder, K.B., Jakobsson, M., Crawford, M.H., Schurr, T.G., Boca, S.M., Conrad, D.F., Tito, R.Y., Osipova, L.P., Tarskaia, L.A., Zhadanov, S.I. *et al.* (2009) Haplotypic background of a private allele at high frequency in the Americas. *Mol. Biol. Evol.*, **26**, 995–1016.
- Fagundes, N.J.R., Ray, N., Beaumont, M., Neuenschwander, S., Salzano, F.M., Bonatto, S.L. and Excoffier, L. (2007) Statistical evaluation of alternative models of human evolution. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **104**, 17614–17619.
- Fagundes, N.J.R., Kanitz, R., Eckert, R., Valls, A.C., Bogo, M.R., Salzano, F.M., Smith, D.G., Silva, W.A. Jr, Zago, M.A., Ribeiro-dos-Santos, A.K. *et al.* (2008) Mitochondrial population genomics supports a single pre-Clovis origin with a coastal route for the peopling of the Americas. *Am. J. Hum. Genet.*, **8**, 583–592.
- Brunham, L.R., Singaraja, R.R., Pape, T.D., Kejariwal, A., Thomas, P.D. and Hayden, M.R. (2005) Accurate prediction of the functional significance of single nucleotide polymorphisms and mutations in the ABCA1 gene. *PLoS Genet.*, **1**, e83.
- Clark, A.G., Glanowski, S., Nielsen, R., Thomas, P.D., Kejariwal, A., Todd, M.A., Tanenbaum, D.M., Civello, D., Lu, F., Murphy, B. *et al.* (2003) Inferring nonneutral evolution from human–chimp–mouse orthologous gene trios. *Science*, **302**, 1960–1963.
- Wang, S., Lewis, C.M., Jakobsson, M., Ramachandran, S., Ray, N., Bedoya, G., Rojas, W., Parra, M.V., Molina, J.A., Gallo, C. *et al.* (2007) Genetic variation and population structure in native Americans. *PLoS Genet.*, **3**, e185.
- Hancock, A.M., Witonsky, D.B., Gordon, A.S., Eshel, G., Pritchard, J.K., Coop, G. and Di Rienzo, A. (2008) Adaptations to climate in candidate genes for common metabolic disorders. *PLoS Genet.*, **4**, e32.

24. Neel, J.V. (1962) Diabetes mellitus: a 'thrifty' genotype rendered detrimental by 'progress'? *Am. J. Hum. Genet.*, **14**, 353–362.
25. Prentice, A.M., Rayco-Solon, P. and Moore, S.E. (2005) Insights from the developing world: thrifty genotypes and thrifty phenotypes. *Proc. Nutr. Soc.*, **64**, 153–161.
26. Wells, J.C. (2009) Ethnic variability in adiposity and cardiovascular risk: the variable disease selection hypothesis. *Int. J. Epidemiol.*, **38**, 63–71.
27. Lee, C.J., Lin, H.R., Liao, C.L. and Lin, Y.L. (2008) Cholesterol effectively blocks entry of flavivirus. *J. Virol.*, **82**, 6470–6480.
28. Simons, K. and Toomre, D. (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **1**, 31–39.
29. Combes, V., Coltel, N., Alibert, M., van Eck, M., Raymond, C., Juhan-Vague, I., Grau, G.E. and Chimini, G. (2005) ABCA1 gene deletion protects against cerebral malaria: potential pathogenic role of microparticles in neuropathology. *Am. J. Pathol.*, **166**, 295–302.
30. Rogers, D.J. and Randolph, S.E. (2000) The global spread of malaria in a future, warmer world. *Science*, **289**, 1763–1766.
31. Howard, B.V., Davis, M.P., Pettiitt, D.J., Knowler, W.C. and Bennett, P.H. (1983) Plasma and lipoprotein cholesterol and triglyceride concentrations in the Pima Indians: distributions differing from those of Caucasians. *Circulation*, **68**, 714–724.
32. Clee, S.M., Kastelein, J.J., van Dam, M., Marcil, M., Roomp, K., Zwarts, K.Y., Collins, J.A., Roelants, R., Tamasawa, N., Stulc, T. *et al.* (2000) Age and residual cholesterol efflux affect HDL cholesterol levels and coronary artery disease in ABCA1 heterozygotes. *J. Clin. Invest.*, **106**, 1263–1270.
33. Helgason, A., Pálsson, S., Thorleifsson, G., Grant, S.F., Emilsson, V., Gunnarsdottir, S., Adeyemo, A., Chen, Y., Chen, G., Reynisdottir, I. *et al.* (2007) Refining the impact of TCF7L2 gene variants on type 2 diabetes and adaptive evolution. *Nat. Genet.*, **39**, 218–225.
34. Browning, J.D., Szczepaniak, L.S., Dobbins, R., Nuremberg, P., Horton, J.D., Cohen, J.C., Grundy, S.M. and Hobbs, H.H. (2004) Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology*, **40**, 1387–1395.
35. Guerrero, R., Vega, G.L., Grundy, S.M. and Browning, J.D. (2009) Ethnic differences in hepatic steatosis: an insulin resistance paradox? *Hepatology*, **49**, 791–801.
36. Fagot-Campagna, A., Narayan, K.M., Hanson, R.L., Imperatore, G., Howard, B.V., Nelson, R.G., Pettiitt, D.J. and Knowler, W.C. (1997) Plasma lipoproteins and incidence of non-insulin-dependent diabetes mellitus in Pima Indians: protective effect of HDL cholesterol in women. *Atherosclerosis*, **128**, 113–119.
37. Brunham, L.R., Kruit, J.K., Verchere, C.B. and Hayden, M.R. (2008) Cholesterol in islet dysfunction and type 2 diabetes. *J. Clin. Invest.*, **118**, 403–408.
38. Knowler, W.C., Bennett, P.H., Hamman, R.F. and Miller, M. (1978) Diabetes incidence and prevalence in Pima Indians: a 19-fold greater incidence than in Rochester, Minnesota. *Am. J. Epidemiol.*, **108**, 497–505.
39. Vieira-Filho, J.P., Reis, A.F., Kasamatsu, T.S., Tavares, E.F., Franco, L.J., Matioli, S.R. and Moisés, R.S. (2004) Influence of the polymorphisms Tpr64Arg in the beta 3-adrenergic receptor gene and Pro12Ala in the PPAR gamma 2 gene on metabolic syndrome-related phenotypes in an indigenous population of the Brazilian Amazon. *Diabetes Care*, **27**, 621–622.
40. The Expert Committee on the Diagnosis Classification of Diabetes Mellitus (2003) Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, **26**, S5–S20.
41. Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) (2001) Executive summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP). *JAMA*, **285**, 2486–2497.
42. See, R.H., Caday-Malcolm, R.A., Singaraja, R.R., Zhou, S., Silverston, A., Huber, M.T., Moran, J., James, E.R., Janoo, R., Savill, J.M. *et al.* (2002) Protein kinase A site-specific phosphorylation regulates ATP-binding cassette A1 (ABCA1)-mediated phospholipid efflux. *J. Biol. Chem.*, **277**, 41835–41842.
43. Singaraja, R.R., Van Eck, M., Bissada, N., Zimetti, F., Collins, H.L., Brunham, L.R., Kang, M.H., Zannis, V.L., Chimini, G. and Hayden, M.R. (2006) Specific mutations in ABCA1 have discrete effects on ABCA1 function and lipid phenotypes both *in vivo* and *in vitro*. *Circ. Res.*, **99**, 389–397.
44. Wellington, C.L. (2002) ABCA1 mRNA and protein distribution patterns predict multiple different roles and levels of regulation. *Lab. Invest.*, **82**, 273–283.
45. Excoffier, L., Laval, G. and Schneider, S. (2005) Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform. Online*, **1**, 47–50.
46. Campbell, L. (1997) *American Indian languages: the historical linguistics of Native America*. Oxford University Press, New York.
47. Bandelt, H.J., Forster, P. and Rohl, A. (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.*, **16**, 37–48.
48. Sabeti, P.C., Reich, D.E., Higgins, J.M., Levine, H.Z., Richter, D.J., Schaffner, S.F., Gabriel, S.B., Platko, J.V., Patterson, N.J., McDonald, G.J. *et al.* (2002) Detecting recent positive selection in the human genome from haplotype structure. *Nature*, **419**, 832–837.
49. Moreno-Estrada, A., Tang, K., Sikora, M., Marquès-Bonet, T., Casals, F., Navarro, A., Calafell, F., Bertranpetit, J., Stoneking, M. and Bosch, E. (2009) Interrogating 11 fast-evolving genes for signatures of recent positive selection in worldwide human populations. *Mol. Biol. Evol.*, **26**, 2285–2297.
50. Voight, B.F., Kudravalli, S., Wen, X. and Pritchard, J.K. (2006) A map of recent positive selection in the human genome. *PLoS Biol.*, **4**, e72.
51. Pickrell, J.K., Coop, G., Novembre, J., Kudravalli, S., Li, J.Z., Absher, D., Srinivasan, B.S., Barsh, G.S., Myers, R.M., Feldman, M.W. *et al.* (2009) Signals of recent positive selection in a worldwide sample of human populations. *Genome Res.*, **19**, 826–837.
52. Li, J.Z., Absher, D.M., Tang, H., Southwick, A.M., Casto, A.M., Ramachandran, S., Cann, H.M., Barsh, G.S., Feldman, M., Cavalli-Sforza, L.L. *et al.* (2008) Worldwide human relationships inferred from genome-wide patterns of variation. *Science*, **22**, 1100–1104.
53. Nielsen, R., Williamson, S., Kim, Y., Hubisz, M.J., Clark, A.G. and Bustamante, C. (2005) Genomic scans for selective sweeps using SNP data. *Genome Res.*, **15**, 1566–1575.
54. Mantel, N. and Haenszel, W. (1959) Statistical aspects of the analysis of data from retrospective studies of disease. *J. Natl Cancer Inst.*, **22**, 719–748.