

ARTÍCULOS ORIGINALES

Identificación de distintos loci de susceptibilidad relacionados al desarrollo de diabetes de inicio temprano y enfermedad cardiovascular en familias mexicanas

Samuel Canizales-Quinteros,* Adriana Huertas-Vázquez,* Laura Riba-Ramírez,* Adriana Monroy-Guzmán,* Aarón Domínguez-López,* Sandra Romero-Hidalgo,** Carlos Aguilar-Salinas,* Maribel Rodríguez-Torres,* Salvador Ramírez-Jiménez,* María Teresa Tusié-Luna*

Recibido: 9 de septiembre de 2004

aceptación: 5 de noviembre de 2004

Resumen

La enfermedad arterial coronaria y la diabetes mellitus figuran entre las primeras causas de mortalidad y morbilidad en México. Factores genéticos juegan un papel fundamental en el desarrollo de estas entidades. A partir del reconocimiento y estudio de familias con formas monogénicas de diabetes y distintas dislipidemias asociadas al desarrollo de ateroesclerosis, se han identificado en los últimos años distintos genes y loci relacionados con estos padecimientos a través de estudios de mapeo genético. Estos estudios han evidenciado la heterogeneidad genética que existe en cuanto al tipo de genes involucrados en los distintos grupos étnicos. El estudio de familias mexicanas con diabetes de inicio temprano e hiperlipidemia familiar combinada mostró la participación de distintos loci génicos asociados a estas entidades en la población mexicana. Esto muestra la utilidad de las estrategias de mapeo para la identificación del componente genético de estas entidades en nuestra población.

Palabras clave: Diabetes tipo 2, hiperlipidemia familiar combinada, mapeo genético, loci génicos

Introducción

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) o no insulino dependiente es una enfermedad de alta prevalencia a nivel mundial. En México de acuerdo a la Encuesta Nacional de Salud de 1999 la diabetes mellitus alcanzó una prevalencia de 8.2%.¹ Una de las características epidemiológicas más importantes de la diabetes en México es que 14.4% de los pacientes manifiestan la enfermedad antes de los 40 años de edad (diabetes de aparición o inicio temprano). Este grupo poblacional tiene el mayor riesgo al desarrollo de complicaciones crónicas debido

Summary

Coronary artery disease and diabetes mellitus are among the primary mortality and morbidity causes in Mexico. Genetic factors play a fundamental role in the development of these entities. In the past few years due to the recognition and study of families with monogenic forms of diabetes and dislipidemias associated with development of atherosclerosis, several genes and loci have been associated with these conditions through genetic linkage studies. These studies have provided evidence of the genetic heterogeneity that exists and the type of genes involved in different ethnic groups. The study of Mexican families with early-onset diabetes and combined familial hyperlipidemia showed the participation of different genetic loci associated with these conditions in the Mexican population. These findings show the value of gene mapping strategies in the identification of the genetic component in these entities in our population.

Key words: Type II diabetes, combined familial hyperlipidemia, genetic mapping, genetic loci

a los largos períodos de hiperglucemia a los que están expuestos y el deficiente control metabólico que se logra aun con tratamiento.

Las formas más comunes de la enfermedad presentan un tipo de herencia complejo, lo que implica la participación de múltiples genes (genes de susceptibilidad) y la influencia de factores ambientales en la expresión del padecimiento. Estudios de tamizaje completo del genoma en distintos grupos poblacionales han mostrado la participación de diferentes loci de susceptibilidad para la diabetes tipo 2 en distintos grupos étnicos.^{2,3} Esto sustenta el hecho de que la DM2 representa un

*Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán y del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

**Departamento de Endocrinología y Metabolismo del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dra. María Teresa Tusié-Luna. Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán y del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Apartado Postal 70228, Ciudad Universitaria, 04510, México, D. F.

conjunto de enfermedades de diversa etiología donde participan sus distintos genes y como combinaciones para las distintas poblaciones.⁴

Formas menos comunes de DM2 presentan herencia autosómica dominante (formas mendelianas). Este subtipo de diabetes, generalmente de diagnóstico o inicio temprano se denomina MODY (*Maturity Onset Diabetes of the Young*). MODY al igual que la diabetes de herencia compleja es genéticamente heterogénea. A la fecha se han descrito seis distintos genes causales de MODY: el gen que codifica para la enzima glucocinasa, regulador importante de la secreción de insulina por el páncreas y cinco genes más que codifican para factores transcripcionales involucrados en la expresión del gen de la insulina y otros genes pancreáticos (HNF-4 α , HNF-1 α , HNF-1 β , IPF-1 y Beta2/neuroD1).⁵ Mutaciones en esos genes resultan en un defecto severo en la secreción de insulina y la prevalencia de mutaciones en estos genes es variable de acuerdo a cada grupo étnico.^{6,7}

Existen también familias MODY donde ninguno de estos seis genes es el responsable, lo que indica la existencia de genes adicionales causantes de diabetes tipo MODY. A estas familias donde el gen responsable no ha sido identificado aún se les denomina en conjunto como MODY X.⁵

A partir de la identificación de los seis genes causales del fenotipo MODY, se ha demostrado que estos genes participan también como genes de susceptibilidad en las formas más comunes de diabetes de herencia compleja. Por ejemplo, se han identificado mutaciones en glucocinasa, HNF-1 α , IPF-1 y HNF-1 β en pacientes con diabetes gestacional y mutaciones en HNF-4 α , HNF-1 α e IPF-1 en pacientes con diabetes de aparición tardía.⁸⁻¹¹

A través de la identificación, captación y estudio de familias mexicanas con diabetes de inicio temprano incluyendo tanto familias con el subtipo MODY (formas monogénicas) como formas poligénicas de la enfermedad es posible identificar distintos loci involucrados en la expresión del padecimiento a través de ligamiento genético. Esto involucró en una etapa inicial el análisis de los genes reportados como causa de MODY en otras poblaciones a través del estudio directo de su secuencia o por ligamiento genético utilizando marcadores cercanos a cada uno de ellos.

Se captaron cerca de 23 familias con diabetes tipo 2 de inicio temprano, donde al menos cinco de ellas podrían corresponder al fenotipo MODY, porque muestran un patrón compatible con una herencia autosómico dominante. Tres de estas familias tienen la estructura y el número de miembros disponibles que las hacen idóneas para estudios de ligamiento genético. Se estudió en estas familias la posible participación de los seis genes descritos como responsables de la diabetes tipo MODY (por análisis de SSCP y por ligamiento genético). Este análisis no evidenció ligamiento positivo a ninguno de estos genes por lo que se procedió al escrutinio completo del genoma para identificar el o los posibles loci génicos involucrados en la expresión de la DM2 en estas familias.

Por su parte la enfermedad ateroesclerótica coronaria (EAC) es la causa de morbilidad más común en las sociedades occidentalizadas y se cree que también lo será en el resto del mundo para el año 2020.¹² En México, la EAC es la principal causa de muerte desde 1999.¹

La susceptibilidad genética tiene un papel primario en el desarrollo de este padecimiento contribuyendo no sólo al desarrollo de EAC sino al de otras patologías asociadas tales como distintas dislipidemias, diabetes e hipertensión arterial. Factores ambientales como el tabaquismo, la dieta, o la inactividad física tienen un papel modulador en la expresión de este padecimiento. Debido a que la aterosclerosis se presenta en la mayoría de los casos por la interacción de factores genéticos y ambientales se le considera una entidad compleja donde en la mayoría de las familias afectadas no es posible reconocer un patrón de herencia mendeliano que sugiera la participación de un único gen, por lo que se ha propuesto como un padecimiento poligénico.

Un modelo de estudio más sencillo lo constituyen familias con dislipidemias causadas por la alteración de un único gen (formas monogénicas o mendelianas). Tal es el caso de algunas formas de hiperlipidemia familiar combinada. El estudio de estas familias permite el reconocimiento de distintos genes implicados en el metabolismo de lípidos y otras posibles rutas bioquímicas que pudieran ser útiles para entender los distintos mecanismos que condicionan el desarrollo de la aterosclerosis. La identificación de estos genes y su función pueden traducirse en esquemas de detección y prevención primaria, así como en estrategias que permitan un tratamiento más específico a los pacientes.

La hiperlipidemia familiar combinada (HLFC) es la forma más común de las dislipidemias familiares, con una prevalencia calculada entre 1-2% en población general.¹³ Esta entidad se caracteriza por niveles elevados de colesterol total y/o triglicéridos en suero.^{14,15} Se observan además concentraciones elevadas de LDL, IDL y VLDL, y de manera importante una concentración elevada de apolipoproteína B-100.¹⁶ Esta entidad se asocia además a desarrollo prematuro de aterosclerosis.

Las bases moleculares de la HLFC no se han esclarecido totalmente. En distintos estudios se han analizado genes que codifican para proteínas involucradas en el metabolismo de lípidos, con un papel potencial en la fisiopatología de la HLFC. Hasta la fecha, los genes candidatos que se han estudiado más intensamente son: el gen de la lipasa lipoproteica¹⁷⁻²⁰ lipasa hepática y el cluster de genes de las apolipoproteínas AI/C-III/A-IV.²¹⁻²³

A través del tamizaje completo del genoma, se han identificado regiones ligadas en diferentes cromosomas para esta patología y algunos de sus rasgos particulares, para HLFC (10q1.2-10qter), para niveles altos de TG (10q1.2, 2q31, 1q21-q23), para niveles altos de CT (10q11.2-10qter), o para niveles altos de apoB (21 q21).²⁴

En nuestro laboratorio estudiamos cinco familias con HLFC con un aparente patrón de herencia autosómico dominante. A través de ligamiento genético se identificó un locus en el cromosoma 1q21-q23 relacionado al fenotipo de HLFC en estas familias.

Materiales y métodos

Familias con diabetes tipo 2

Las familias fueron seleccionadas en base a su aparente patrón de herencia autosómica dominante y el diagnóstico de diabetes a una edad temprana en miembros de al menos dos generaciones. La familia VHE consta de 22 miembros, 11 de ellos afectados; la familia BCJ tiene un total de 42 miembros, con 10 afectados;

mientras que de la familia CCE consta de 64 miembros, 21 de ellos afectados. Para la familia VHE el análisis de marcadores incluyó 20 muestras; para la familia BCJ, 31 y para la familia CCE, 45 muestras. La información clínica y genealógica de miembros para los cuales no se cuenta con muestra de sangre es útil en el análisis de ligamiento porque es posible inferir los alelos de los miembros fundadores con la información derivada de su progenie. Dado el número de muestras disponibles para la familia CCE, el análisis de ligamiento se realizó considerando la rama materna como dos familias independientes.

1. Caso índice CCE

Femenino con edad de diagnóstico de 10 años 11 meses, con infección de vías respiratorias altas de quince días de evolución que no cede a manejo, agregándose poliuria y fiebre. Al diagnóstico, IMC 20.35 kg/m², dextrostix >240 mg/dL, glucemia 326 mg/dL, hemoglobina glucosilada (HbA1c) 11.4%, examen general de orina con glucosuria +++ y cetonas negativas. Manejada inicialmente con insulina lográndose el control con 20 UI de insulina intermedia. Múltiples internamientos por infecciones de vías urinarias y descontrol metabólico debido a pobre apego al tratamiento. Actualmente, 18 años de edad sin datos de complicaciones tardías de la enfermedad. Se encontró deficiencia en la secreción de insulina sin datos de resistencia a través de estudio de modelo mínimo.

2. Caso índice VHE

Femenino con edad de diagnóstico de 15 años, dos años anteriores al diagnóstico poliuria y somnolencia, un año antes del diagnóstico se inicia polidipsia y polifagia, astenia y adinamia vespertinas. Al diagnóstico IMC 22.90 kg/m² glucemia 216 mg/dL, examen general de orina con glucosuria y leucocituria, cetonas negativas. Manejada con hipoglucemiantes orales de tipo combinado (metformina y glibenciamida) en dosis bajas. Control metabólico regular con HbA1c 7.9%. Actualmente con 22 años de edad sin datos de complicaciones tardías de la enfermedad, fondo de ojo normal. ICAS negativos. A través de modelo mínimo se determinó deficiencia en la secreción de insulina acompañada de discreta resistencia.

3. Caso índice BCJ

Masculino con edad de diagnóstico de 13 años con antecedente de parotiditis un mes antes, posterior a esto se presenta pérdida de peso no cuantificada, poliuria, nicturia, polidipsia. Al diagnóstico IMC 20.2, glucemia 360 mg/dL. Manejo inicial con dieta, posterior a cuadro de cetoacidosis se agrega insulina 20 UI repartidas en dos dosis 15-5. Cetoacidosis frecuentes. ICAS negativos determinados siete meses después del diagnóstico. A los 18 años se agrega cuadro de tiroiditis. Descontrol metabólico por pobre apego al tratamiento HbA1c 10.2%. Actualmente de 21 años de edad sin datos de complicaciones tardías. El modelo mínimo mostró deficiencia en la secreción de insulina sin resistencia.

Familias con HLFC

Se estudiaron cinco familias mexicanas con HLFC con 119 miembros, 47 de los cuales son individuos afectados (Cuadro III). Estas familias fueron seleccionadas a partir de 22 familias iniciales, debido a su estructura multigeneracional y el número de miembros afectados, así como un patrón de segregación compatible con herencia autosómico dominante. Las familias se captaron a través de la Clínica de Lípidos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. El diagnóstico de HLFC se realizó a través del estudio de familias con antecedentes de enfermedad coronaria prematura y la presencia de hipertrigliceridemia y/o hipercolesterolemia así como de valores elevados de apoB100. Todos los valores por arriba de la percentila 90 de acuerdo a edad y sexo en la población mexicana.²⁵ Los criterios de exclusión incluyeron la presencia de diabetes, xantomas tendinosos así como la presencia enfermedad renal o tiroidea.

De todas las familias se obtuvo consentimiento informado a través de su médico tratante. Los protocolos de investigación cuentan con la aprobación del comité de ética de las instituciones correspondientes.

Extracción de DNA a partir de sangre total

El aislamiento de DNA se hizo a partir de 1-3 mL de sangre total por el método descrito por Buffone and Darlington.²⁶

Búsqueda de posibles mutaciones en genes asociados a MODY a través de PCR-SSCP

El análisis de PCR-SSCP es un método de tamizaje rápido de posibles variantes de secuencia de fragmentos génicos de 200-400 bases generados por PCR. Se basa en la migración diferencial de fragmentos de cadena sencilla en geles no desnaturalizantes de acrilamida.²⁷ Con esta metodología se analizaron los exones y las uniones intrón-exón de cada uno de los seis genes MODY reportados, así como las regiones promotoras proximales de los genes HNF-1 α y HNF-4 α y la región promotora distal de HNF-4 α , utilizando para la amplificación de los diversos fragmentos los oligonucleótidos descritos previamente.²⁸⁻³³

Búsqueda de posibles mutaciones en el gen TXNIP, un gen candidato para el desarrollo de la HLFC

Los ocho exones correspondientes al gen TXNIP incluyendo las uniones intrón-exón, así como la región promotora proximal de 1Kb se amplificaron selectivamente por PCR a partir de DNA genómico total de pacientes con HLFC utilizando oligonucleótidos específicos diseñados a partir de la secuencia del gen en Genbank (NM-006472.1). Los productos de PCR fueron secuenciados utilizando el kit de Big Dye Terminator Kit v3 en un secuenciador automático 3100 (Applied Biosystems).

Cuadro I

Gen Candidato	Ubicación citogenética	Posición (cM)	Marcadores	Posición (cM)	Fam BCJ	Fam VHE	Fam CCE
LOD store $\theta = 0$							
MODY1		57.7	D2OS486	49.22	-5.76	-3.89	-2.28
HNF-4 α	20q12-q13		D2OS481	62.32	-8.8	-2.13	-0.02
MODY2		69.4	D7S2846	57.79	-3.5	-8.2	-1.28
GK	7p15-p13		D7S1818	69.56	-5.63	-2.93	-2.57
MODY3		135.1	D12S395	136.82	-6.8	-5.28	-0.1
HNF-1 α	12q22-q24		D12S2078	149.6	-4.4	-3.26	-1
MODY 4		17.3	D13S787	8.87	-5.62	-2.66	-5.26
IPF-1	13q 1 2.1		D13SI493	25.8	-9.5	-3.8	-1.97
MODY5		61.5	D17S2196	44.62	-5.66	-6.25	-2.04
HNF-1 β	17q11.2q12		D17SI299	62.01	-5.67	-2.6	-1.2
MODY6		188.2	D2SI391	186.21	-4.4	-4.89	-2.8
Beta2/Neuro D1	2q32						

Estudio de modelo mínimo

Es un método modificado de tolerancia a la glucosa. Se obtienen muestras al tiempo -15-10, -5 y 0 min para determinación de glucosa e insulina basal seguido de la administración de glucosa por vía oral (0.3g/kg glucosa) en un lapso de un minuto. Posteriormente se administra insulina intravenosa (0.05U/kg) disuelta en 30mL de solución salina 0.9% 19 minutos más tarde. Se obtienen 17 muestras a intervalos regulares para la medición de insulina y glucosa. El índice de sensibilidad a la insulina (SI) y el índice de secreción aguda de insulina (AIR) se estiman utilizando el programa descrito por Bergman.³⁴

Un SI < 4 indica resistencia y > 4 sensibilidad a la insulina normal, AIR < 60 indica deficiencia secretoria de insulina.

Estudio de ligamiento genético

El estudio de ligamiento genético se utiliza para determinar la posición cromosómica de un posible gen causante de la enfermedad en relación a uno o más marcadores genéticos. Este método está basado en el principio de que si dos loci en el mismo cromosoma se encuentran cercanos, hay una mayor probabilidad de que se segreguen juntos durante la meiosis. A medida que la distancia (definida como fracción de recombinación θ) entre dos loci aumenta, esta probabilidad de cosegregación disminuye. Se han desarrollado diversos métodos para realizar análisis de ligamiento genético, el más utilizado es el conocido como método de LOD Score.

El método de LOD Score consiste contrastar la hipótesis nula de no ligamiento contra la hipótesis alternativa de ligamiento. Esto se realiza mediante la determinación de la función de

probabilidad asociada a cada familia en estudio. Dicha función se obtiene considerando distintos parámetros que incluyen frecuencias alélicas en la población, la penetrancia de la enfermedad en cuestión y la fracción de recombinación, donde el único parámetro a estimar es este último. Se sugiere que un valor del LOD Score mayor o igual que 3 es suficiente evidencia para rechazar la hipótesis de NO ligamiento, cuando se trata de padecimientos claramente monogénicos. Sin embargo, para la búsqueda de genes de susceptibilidad asociados a enfermedades complejas, se consideran sugestivos de ligamiento los valores de LOD Score mayores a 1. Por último, cuando este método se utiliza para descartar la posible participación de regiones cromosómicas o bien genes conocidos, se consideran aquéllos de exclusión de ligamiento valores menores o iguales a -2.

Para los loci estudiados en las familias con diabetes, la frecuencia del gen se consideró como de 0.001, la penetrancia del padecimiento de 85% y se calcularon las frecuencias alélicas obtenidas de por lo menos 25 individuos sanos no relacionados de la población mexicana.

Para el análisis de ligamiento de dos puntos (para un solo marcador en relación a la enfermedad) se utilizaron los programas LINKAGE y FASTLINK.³⁵⁻³⁷ Para el análisis de múltiples puntos (considerando todos los marcadores de un cromosoma de manera conjunta) se utilizó el programa GENEHUNTER-PLUS (GHP).³⁷ GHP basa sus resultados considerando principalmente a los individuos afectados. Adicionalmente, GHP calcula un valor de LOD Score paramétrico (basado en el patrón de herencia considerado), así como un valor no-paramétrico (NPL). Este último se basa en el número de alelos idénticos por descendencia compartidos entre individuos afectados, independientemente del patrón de herencia considerado. Los resultados de NPL son importantes dado que pueden indicar la presencia de

Cuadro II

Familia	Cromosoma	LOD Score	NPL	P	Posición (cM)	Marcador cercano
VHE	1	-2.28144	1.153962	0.131348	89.49	GATA165C03
	1	1.43957	1.927225	0.053589	164.09	D1S1653
	2	-0.69942	2.084688	0.041992	147.4	D2S442
	2	-3.262495	3.110253	0.006104	152.04	D2S1399
	5	-2.950272	3.311617	0.004272	45.34	D5S1470
	6	-3.264238	1.770034	0.069336	63.28	D6S1017
	10	-2.2007	1.3885	0.1081	80.77	D1S1125
	13	-2.914399	1.633368	0.089233	25.8	D13S1493
	14	-2.7329	1.6903	0.06933	44.06	D14S306
	15	-3.383634	1.0646602	0.089233	43.48	D15S659
BCJ	1	-2.747772	1.279452	0.131348	29.93	D1S1612
	1	-2.032587	1.747803	0.069336	267.51	D1S547
	2	-1.381361	1.080904	0.162109	152.04	D2S1399
	2	0.903567	1.235922	0.131348	200.43	D2S1884
	5	-1.2166555	1.618576	0.089233	7.77	D5S2849
	7	-0.877129	2.233797	0.033203	104.48	D7S820-D7S1799
	10	-1.1462	1.8487	0.05358	28.31	D10S1412
	12	-1.974518	1.119532	0.131348	68.16	D12S398
	12	-2.016329	1.134571	0.13134	83.19	D12S1052
	14	1.63665	1.778125	0.069336	109.6	D14S617-D14S1426
	15	-2.72834	1.101988	0.131348	50.57	D15S559-D15S643
	16	0.8577	1.1339	0.1313	28.27	D16S464
	20	-4.887941	1.115794	0.131348	12.12	D20S482
	2	0.913138	0.73554	0.252495	215.78	D2S434
	5	1.21844	0.950888	0.188896	139.33	D5S816
	10	-0.4982	1.03223	0.16156	88.41	GATA121A08
	17	-0.963646	1.54836	0.076094	22.24	D17S974

genes o regiones de susceptibilidad para un padecimiento poligénico. Adicionalmente se realizó un análisis de heterogeneidad utilizando el programa GENEHUNTER (Heterogeneity test),³⁸ para evaluar la presencia de posibles regiones compartidas en más de una de las familias (HLOD).

Para el estudio de las familias con HLFC se utilizó el programa de FASTLINK para el análisis de heterogeneidad así como GHP. Para estas familias se asumió un patrón de herencia autosómico dominante con una frecuencia génica de 0.0001 y penetrancia de 90%. Se consideró para el análisis el fenotipo completo de HLFC o bien rasgos independientes como niveles elevados de colesterol o triglicéridos.

Genotipificación de marcadores

El análisis de marcadores genéticos para genes candidatos en esta familias se realizó a través de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) con uno de los oligonucleótidos marcados con γ -32ATP y separando los productos en geles desnaturizantes de poliacrilamida 6%, los cuales fueron expuestos a placas autoradiográficas.

Para el tamizaje del genoma en las familias con diabetes se analizaron 221 marcadores microsatélites en su mayoría tri y tetranucleótidos distribuidos en los 22 autosomas a intervalos de una distancia promedio de 20 a 25 cM, utilizando para su amplificación oligonucleótidos marcados con fluorescencia (set marca-

dores Weber Versión 2A, Research Genetics). Los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis en un secuenciador automático (ABI 377, Applied Biosystems).

Para las familias de HLFC se analizaron marcadores microsatélites cercanos a distintos genes candidato involucrados en el metabolismo de lípidos y lipoproteínas (Lipasa lipoproteica (LPL), LCAT, Lipasa hepática (LH) así como el cluster de genes APOA1/C3/A4/A5). También se analizaron marcadores en la región 1q21-q23 previamente relacionada al desarrollo de HLFC en otras poblaciones.²⁴

Resultados

Familias con diabetes de aparición temprana

A través del análisis por PCR-SSCP se descartaron posibles mutaciones en cada uno de los exones y uniones intrón-exón de los genes MODY reportados: glucocinasa, HNF-1 α , HNF-4 α , HNF-1 β , IPF-1 y Beta2NeuroD1 en estas tres familias. Este análisis incluyó también las regiones promotoras proximales de los genes HNF-1 α y HNF-4 α así como la región promotora distal (P2) del gen HNF-4 α . Adicionalmente, se descartó por ligamiento genético la posible participación de estos genes utilizando marcadores microsatélites cercanos a cada uno de ellos. En el cuadro I muestra los resultados de ligamiento negativo obtenidos en las tres familias.

Debido a que no se encontró ligamiento positivo para ninguno de los genes estudiados se realizó el escrutinio completo del genoma con marcadores microsatélites en cada uno de los 22 autosomas (Materiales y Métodos). No se analizaron marcadores en los cromosomas X y Y ya que el patrón de herencia exhibido por nuestras familias no es compatible con herencia ligada al sexo. El resultado de este análisis mostró la posible participación de más de un locus génico por familia.

En el cuadro II se muestran los resultados de múltiples puntos obtenidos del tamizaje del genoma en las familias con diabetes de aparición temprana.

Se obtuvieron resultados de ligamiento positivo paramétrico y no paramétrico (NPL) para los cromosomas 1, 2, 14 y 16. La región en el cromosoma 1 alrededor del cM 164 mostró el valor de significancia más alto de 0.05. Otras regiones mostraron también valores de ligamiento positivo únicamente en el análisis no paramétrico (NPL), (Cuadro II).

Familias con hiperlipidemia familiar combinada

Las características clínicas de los sujetos en estudio se resumen en el cuadro III. El análisis de ligamiento se hizo considerando el fenotipo completo de HLFC (elevación de triglicéridos y/o colesterol así como elevación de Apo B) o bien considerando la elevación de colesterol y triglicéridos como rasgos independientes. A través de ligamiento genético se estudió la posible participación de los genes ApoAI, CIII, ApoAIV, CETP, lipasa lipoproteica y lipasa hepática como posibles responsables de la HLFC en estas familias. El estudio de heterogeneidad mostró valores positivos de ligamiento de 0.6 en 40% de las familias para el marcador ligado al gen LCAT (D16S496) y de 0.25 para el gene LPL 25% de las familias estudiadas. Por el contrario no se evidenció ligamiento para el gen de la lipasa hepática o el cluster de los genes AP0A1/C3/A4/A5.

Cuadro III. Características clínicas de los individuos estudiados

Variable N	Afectados 52	No afectados 84
Edad (años)	34.16 ± 16.68	33.02 ± 16.17
IMC	24.69 ± 4.17	23.09 ± 5.99
TC (mg/dL)	241.25 ± 44.56	170.37 ± 31.47
TGs (mg/dL)	246.02 ± 134.60	110.08 ± 67.38
HDL-C (mg/dL)	39.17 ± 11.04	44.12 ± 10.49
LDL-C (mg/dL)	140.28 ± 41.49	106 ± 30.74
Apo B (mg/dL)	128.19 ± 25.61	79.63 ± 19.83

Además este análisis mostró una región de ligamiento positiva en el cromosoma 1 (región 1q21-q23) considerando el fenotipo completo de HLFC. El valor de HLOD score máximo en el análisis de dos puntos fue de 1.3 para el marcador D1S 2768 en 50% de las familias (Cuadro IV). El análisis de múltiples puntos arrojó un Lod score máximo de heterogeneidad de 1.58 para el marcador D1S1O4 en 65% de las familias estudiadas.

Discusión

Hallazgos en las familias con diabetes de inicio temprano

El escrutinio completo del genoma en las tres familias resultó en la identificación de distintas regiones con ligamiento positivo en cada una de las familias. Ninguno de los valores alcanzaron puntaje de LOD score mayor o igual a 3 a pesar de que cada una de las familias mostró valores iguales o mayores a 3 en estudios de simulación de ligamiento. Esto sugiere que las señales de ligamiento positivas podrían corresponder a loci de susceptibilidad para la diabetes de inicio temprano en familias mexicanas. En este sentido es interesante que tres de las regiones identificadas en nuestro estudio han sido previamente asociadas a la susceptibilidad al desarrollo de diabetes en otros grupos poblacionales. Una de ellas es la región en el cromosoma 2 (2q34), ubicada alrededor del cM 205, reportada en población japonesa,²³ la región en cromosoma 14 (14q32) que comprende los cM 114-118 reportada como locus de susceptibilidad en una población de judíos Ashkenazi,²³ y la región en el cromosoma 1q23.2 entre los cM 160-186 descrita previamente en la población de Indios Pima, anglosajona y china.^{23,39}

Por su parte, la región identificada en el cromosoma 16 en nuestro estudio, podría corresponder a una región nueva, no identificada previamente como loci de susceptibilidad en ningún otro grupo poblacional.

Es interesante que los loci de susceptibilidad identificados en estas familias son distintos a los reportados en población México Americana para la diabetes de inicio tardío, es decir, en familias con diagnóstico después de los 50 años.⁴⁰⁻⁴³ Este hallazgo sugiere que los loci y genes de susceptibilidad para la diabetes de inicio tardío pudieran ser distintos a los que confieren susceptibilidad para el

Cuadro IV. Análisis de heterogeneidad de 2 puntos para las familias de HLFC

Marcador	cm	HLOD Máximo (α%) ^a
D1S534	151.88	0.23 (31)
D1S2715	159.32	0.49 (42)
D1S1653	164.09	0.32 (28)
D1S2635	165.62	0.05 (5)
APOA2	170.84	0.65 (79)
D1S2768	172.93	1.30 (50)
D1S104	175.62	1.02 (59)
D1S400	175.62	0.01 (9)
D1S1677	175.62	-0.0003 (0)
D1S426	177.86	-0.0003 (0)

^a= Proporción de familias con ligamiento de este locus

desarrollo de diabetes de inicio temprano, o bien que los loci descritos en población México-Americana participan pero su contribución es menor. Esto ha sido demostrado por ejemplo, en población escandinava donde los loci de susceptibilidad para la diabetes de inicio temprano y tardío son distintos.^{44,45}

Los resultados obtenidos hasta el momento reflejan el análisis preliminar del tamizaje de los 22 autosomas a una densidad promedio de 20-25 cM. Para cada una de las regiones positivas, la siguiente fase es el análisis de marcadores adicionales necesarios para la confirmación del resultado positivo, así como en la definición del intervalo relacionado a la susceptibilidad para diabetes tipo 2 en cada familia. Existen para cada una de las familias, intervalos mayores a 25 cM que serán cubiertos con el análisis de aproximadamente 20 marcadores adicionales.

De acuerdo a nuestros resultados no es posible aún definir un *locus* como dominante en cada familia, no obstante el aparente patrón de herencia dominante. Sin embargo, de acuerdo a la prevalencia de diabetes en nuestro país es posible argumentar que el patrón de herencia observado en estas tres familias puede corresponder al efecto de un gen dominante dentro de un fondo de genes de susceptibilidad adicionales en cada familia. Por lo tanto, es posible que con una densidad mayor se identifique un valor positivo de ligamiento cercano 3, lo que sería compatible con esta hipótesis.

En cuanto a las regiones cromosómicas identificadas como positivas se determinará si corresponden a posibles loci de susceptibilidad para diabetes de inicio temprano en la población mexicana analizando dos grupos de estudio: familias nucleares y pares de hermanos donde se estudiarán marcadores en cada una de estas regiones, a fin de establecer su posible papel como loci de susceptibilidad para diabetes de aparición temprana en nuestra población.

Hallazgos de las familias con hiperlipidemia familiar combinada

A través del estudio de familias mexicanas con HLFC se evidenció ligamiento positivo en la región 1q21-q23. Los LOD score máximos en dos puntos y múltiples puntos para el análisis de heterogeneidad (HLOD) asumiendo un patrón de herencia autosómico dominante para el fenotipo completo de HLFC fueron de 1.3 y 1.58 respectivamente. En esta región se han mapeado distintos genes candidatos incluyendo APOA2 y RXR.^{46,47} Más recientemente se ubicó en esta región también el gen homólogo humano del gen Hyplip1 que en el ratón se asocia al fenotipo de HLFC.⁴⁸ Este gen codifica para Txnip (thioredoxin-interacting protein), una proteína citoplasmática que une e inhibe tioredoxina, clave en la regulación del estado redox. Por lo tanto este gen es un candidato obvio, posiblemente implicado en el rasgo de elevación de triglicéridos en nuestras familias. El análisis de la secuencia de este gen incluyendo los ocho exones, las uniones intrón-exón así como 1 Kb de la región promotora no mostró ningún cambio. Estos resultados sugieren la participación de un gen TXNIP.

A través de análisis de ligamiento genético no se demostró evidencia de la participación de los genes de la lipasa hepática y del cluster de los genes ApoAI-ApoCili-ApoAIV como responsables del fenotipo de hiperlipidemia familiar combinada en nuestras familias. Sin embargo, los resultados de ligamiento obtenidos para los genes LCAT y LPL no permiten excluir su participa-

ción en la expresión de la HLFC posiblemente como loci de susceptibilidad menores.

En conclusión, el hecho de que se haya evidenciado ligamiento positivo para la región 1q21-q23 en familias con HLFC de distinto origen étnico (caucásicos europeos y norteamericanos y población china),^{46,47} incluyendo familias mexicanas, apunta fuertemente a la participación de un gen de susceptibilidad mayor para esta patología ubicado en esta región cromosómica, distinto al gen TXNIP. Nuestros resultados muestran también que existe heterogeneidad genética de este padecimiento en nuestras familias y que es posible la identificación de otros loci génicos que participen en el desarrollo de esta patología en la población mexicana.

Este es el primer estudio en México para el mapeo e identificación de distintos loci de susceptibilidad relacionados al desarrollo de diabetes y de enfermedad cardiovascular en la población mexicana a través de estudios de genética. Esta información será indispensable para la mejor comprensión de estas entidades, y sentará las bases para el diseño de estrategias de diagnóstico y tratamiento específicas de acuerdo a las causas genéticas de estos padecimientos en nuestra población.

Agradecimientos

Agradecemos la participación de todos los miembros de las familias en estudio. Asimismo agradecemos el apoyo del CONACYT y de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM (DGAPA) por los recursos financieros para la realización de los distintos proyectos, así como al CONACYT por el otorgamiento de becas para los estudiantes de posgrado.

Referencias

1. Secretaría de Salud, Dirección General de Epidemiología. México. 1999
2. McCarthy MI. Growing evidence for diabetes susceptibility genes from genome scan data. *Curr Diab Rep* 2003;3:159-167.
3. Menzel S. Genetic and molecular analysis of complex metabolic disorders: genetic linkage. *Ann N Y Acad Sci* 2002;967:249-257.
4. Almind K, Doria A, Kahn CR. Putting the genes for type 11 diabetes on the map. *Nat Med* 2001;7(3):2779-2286.
5. Fajans SS, Bell GI, Bowden DW, Halter JB, Polonsky KS. Maturity onset diabetes of the young. *MODY Diabetes Med* 1996;13:S90-S95.
6. Stoffers DA, Ferrer J, Clarke WL, Habener JF. Early onset type 11 diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF-1. *Nature Genet* 1997; 17:138-139.
7. Schwarz, Peters EH, Selisko T, Vcelak J, Rietzsch H, Benlova B, Schuize J. Identification of mutations in HNF1-alpha in Gestational Diabetes.. *Diabetes* 2001; 50: supplement 2. ABSTRACT
8. Reis AF, Ye WZ, Dubois Laforgue D, Bellane-Chantelot C, Timsit J, Velho G. Mutations in the insulin promoter factor-1 gene in late onset type 2 diabetes mellitus. *European J. Endocrinol* 2000;143:511-513.
9. Hansen L, Urioste S, Petersen HV, Jensen JN, Eiberg H, Barbetti- F, Serup P, Hansen T, Pedersen O. Missense mutations in the human insulin promoter factor-1 gene and their relation to maturity-onset diabetes of the young and late-onset type 2 diabetes mellitus in Caucasians. *J Clin Endo Metab* 2000;85:1323-1326.
10. Hani EH, Stoffers DA, Chevre JC, Durand E, Stanojevic V, Dina C, Habener JF, Froguel P. Defective mutations in the insulin promoter factor (IPF-1) gene in late-onset type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1999;104:R41-R48.
11. Macfarlane WE, Frayling TM, Ellard S, Evans JC, Alien LI, Bulman MP, Ayres S, Shepard M, et al. Missense mutations in the insulin promoter factor 1 gene predispose to type 2 diabetes. *J Clin Invest* 1999;104:R33-R39.
12. Murray CJ, López AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1999-2020: Global burden of Disease Study. *Lancet* 1997;349:1489-1504.
13. Grundy SM et al. Familial combined hyperlipidemia workshop. *Arteriosclerosis* 1987;7:203-210.
14. Goldstein JL et al. Hyperlipidemia in coronary heart disease II. Genetic analysis of lipid levels in 176 families and delineation of a new inherited disorder, combined hyperlipidemia. *J Clin Invest* 1973;52:1544-1568.
15. Nikkila EA, Aro A. Family study of serum lipids and lipoproteins in coronary heart disease. *Lancet* 1973;1:9544-9549.
16. Brunzell JD et al. Plasma lipoproteins in familial combined hyperlipidemia and monogenic familial hypertriglyceridemia. *J Lip Res* 1983;24:147.

17. Gagne EJ, et al. Analysis of DNA changes in the LPL gene in patients with familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb* 1994;14:1250-1257.
18. Reymen PW, et al. A frequently occurring mutation in the lipoprotein lipase gene (Asn291 Ser) contributes to the expression of familial combined hyperlipidemia. *Hum Mol Genet* 1995;4:1543-1549.
19. Yang WS, et al. A mutation in the promoter of the lipoprotein lipase (LPL) gene in a patient with familial combined hyperlipidemia and low LPL activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:4462-4466.
20. Marcil M, et al. Lack of association of the apolipoprotein AI-Cili-AIV gene XmnI and SstI polymorphisms and of the lipoprotein lipase gene mutations in familial combined lipoproteinemia in French Canadian subjects. *J Lipid Res.* 1996;37:309-319.
21. Wojciechowski AP, et al. Familial combined hyperlipidemia linked to the apolipoprotein AI-Cili-AIV gene cluster on chromosome 11 q23-q24. *Nature* 1991;349:161-164.
22. Dallinga-Thie GM, et al. Complex genetic contribution of the apoAI-CIII-A gene cluster to familial combined hyperlipidemia. Identification of different susceptibility haplotypes. *J Clin Invest* 1997;99:953-961.
23. Wijsman EM, et al. Evidence against linkage of familial combined hyperlipidemia to the apolipoprotein AI-CIII-AIV gene complex. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:215-226.
24. Pajukanta P, et al. Genome-wide scan for familial combined hyperlipidemia genes in Finnish families, suggesting multiple susceptibility loci influencing triglyceride, cholesterol and apolipoprotein B levels. *Am J Hum Genet* 1999;64:1453-1463.
25. Del Rincón Jarero JP, Aquilar Salinas C, Guillen Pineda LE, Gómez Pérez FJ, Rull JA. Lack of agreement between the plasma lipid-based criteria and apolipoprotein B for the diagnosis of familial combined hyperlipidemia in members of familial combined hyperlipidemia kindreds. *Metabolism* 2002;51:218-224.
26. Buffone and Darlington. Isolation of DNA from biological specimens without extraction with phenol. 1985;31:164-165.
27. Orita M, Susuki Y, Sekida T, Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using polymerase chain reaction. *Genomics* 1989;5:874-879.
28. Yamagata K, Furuta H, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Cox NJ, Fajans SS, Stefano S, Stoffel M, Bell GI. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4a gene in maturity-onset diabetes of the young. *Nature* 1996;384:458-460.
29. Yamagata K, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Furuta H, Vaxillaire M, Southam L, Cox RD, Lathrop GM, et al. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4a gene in maturity-onset diabetes of the young. *Nature* 1996;384:455-458.
30. Horikawa Y, Iwasaki N, Hara M, Furuta H, Hinokio Y, Cockburn BN, Lindner T, Yamagata K, et al. Mutations in the hepatocyte nuclear factor 1b gene (TCF2) associated with MODY. *Nature Genet* 1997;17:384-386.
31. Maleki MT, Jhala US, Antonellis A, Fields L, Doria A, Orban T, Saad M, Warram JH, Montminy M, Kroiewski AS. Mutations in NEUROD1 are associated with the development of type 2 diabetes mellitus. *Nature Genet* 1999;23:323-328.
32. Froguel P, Zouali H, Vionnet N, Velho G, Vaxillaire M, Sun F, Lesage S, Stoffel M, Takeda J, et al. Familial hyperglycemia due to mutations in glucokinase: definition of a subtype of diabetes mellitus. *New Engl J Med* 1993;328:697-702.
33. Hara M, Lindner TH, Paz VP, Wang X, Iwasaki N, Ogata M, Iwamoto Y, Bell GI. Mutations in the coding region of the insulin promoter factor 1 gene are not a common cause of maturity-onset diabetes of the young in Japanese subjects. *Diabetes* 1998; 47:845-847.
34. Bergman RN, Prager R, Volund A, Olefsky JM. Equivalence of the insulin sensitivity index in man derived by the minimal model method and the euglycemic glucose clamp. *J Clin Invest* 1987;79(3):790-800.
35. Ott J, Donis-Keller H. Statistical methods in genetic mapping. *Genomics* 1994;22(2):496-497.
36. Shaffer LG, Jackson-Cook CK, Meyer JM, Brown JA, Spence JE. A molecular genetic approach to the identification of isochromosomes of chromosome 21. *Hum. Genet.* 1991;86(4):375-382.
37. Kong A, Cox NJ. Allele-sharing models: LOD scores and accurate linkage tests. *Am. J. Hum. Genet* 1997; 61(5):1179-1188.
38. Kruglyak L, et al. Parametric and nonparametric linkage analysis: a unified multipoint approach. *Am J Hum Genet* 1996;58 (5):1092-1093.
39. Xiang K, Wang Y, Zheng T, Sehn K, Jia W, Li J, Lin X, Wu S, Zhang G, Wang S and Lu H. Genome-Wide Scan Search for Type 2 Diabetes Susceptibility Loci in Chinese. *Diabetes* 2001;51(Suppl 2):A262.
40. Hanis CL, Boerwinkle E, Chakraborty R, Eilsworth DL, Concannon P, Stirling VA, et al. A genome-wide search for human non-insulin dependent (type 2) diabetes genes reveals a major susceptibility locus on chromosome 2. *Nature Genet* 1996;13:161-166.
41. Duggirala R, Blangero J, Almásy L, Dyer TD, Williams KL, Leach RJ, O'Connell P, Stern MP. Linkage of type 2 diabetes mellitus and of age at onset to a genetic location on chromosome 10q in Mexican Americans. *Am J Hum Genet* 1999;64:1127-1140.
42. Ehm MG, Karnoub MC, Sakul H, Gottschalk K, Holt DC, Weber JL, Vaske D, Briley D, Briley L, et al. Genome-wide search for type 2 diabetes susceptibility genes in four American populations. The American Diabetes Association GENNID Study Group. *Am J Hum Genet* 2000;66:1871-1881.
43. Cox NJ, Frigge M, Nicolae DL, Concannon P, Hanis CL, Bell GI, Kong A. Loci on chromosome 2 (NIDDM) and 15 interact to increase susceptibility to diabetes in Mexican Americans. *Nature Genet* 1999;21:213-215.
44. Parker A, Mayer J, Lewitzki S, Rennich JS, Chan G, Thomas JD, Orth-Melander M, Lehtovirta M, et al. A gene conferring susceptibility to type 2 diabetes in conjunction with obesity is located on chromosome 18p11. *Diabetes* 2001;50:675-680.
45. Lindgren CM, Mahtani MM, Widén E, McCarthy MI, Daly MJ, Kirby A, Reeve MP, Kruglyak L, Parker A, et al. Genome-wide search for type 2 diabetes mellitus susceptibility loci in Finnish families: The Botnia Study. *Am J Hum Genet* 2002;70:509-516.
46. Pajukanta P, et al. Genome-wide scan for familial combined hyperlipidemia genes in Finnish families, suggesting multiple susceptibility loci influencing triglyceride, cholesterol and apolipoprotein B levels. *Am J Hum Genet* 1999;64:1453-1463.
47. Pei W, et al. Support for linkage of familial combined hyperlipidemia to chromosome 1q21-q23 in Chinese and German families. *Clinical Genetics* 2000;57:29-34.
48. Bodnar JS, et al. Positional cloning of the combined hyperlipidemia gene Hyplipl. *Nature Genet* 2002;18:110-116.