

Determinación de la frecuencia alélica del SNP19 del gen Calpaína 10 (CAPN10) y factores de riesgo de diabetes 2 en población peruana

Dra. Mónica Paredes Anaya¹, Dr. Frank Lizaraso Soto¹, Eduardo Rodríguez Zárate¹, Dra. Rosa Lissón Abanto², Dra. Elba G. Rodríguez³, Dr. Jorge R. Calderón³ y Dr. Ricardo Fujita Alarcón¹.

RESUMEN

La diabetes tipo 2 es una enfermedad compleja que tiene un componente genético. Se ha comprobado que calpaína 10 (CAPN10) localizado en 2q37.3, constituye un gen de susceptibilidad para esta enfermedad. La asociación alélica y haplotípica con diabetes, observada en poblaciones amerindias (mexico-americana, pima, surui y maya), y algunas europeas (finlandesa y alemana), confirmarían estos resultados. El origen ancestral amerindio nos hace suponer que CAPN10 constituiría un gen de susceptibilidad en población peruana nativa y mestiza.

Para utilizar los alelos del CAPN10 como factores de riesgo genético necesitamos establecer la frecuencia en la población normal. En el presente trabajo se observa la frecuencia de los alelos SNP19 en 116 controles normales de Lima, mayormente de origen mestizo. La frecuencia alélica analizada es similar a la descrita en las poblaciones mexico-americanas.

ABSTRACT

Type 2 diabetes is a complex disorder where genetic factors play an important role. Several studies suggest that some genetic variants of calpain 10 (CAPN10) increase susceptibility to type 2 diabetes. Some allelic and haplotype combinations are associated with increased risk in Amerindian populations (Mexican American, Pima and Surui) and Finnish and German groups. The ancestral Amerindian origin suggests that CAPN10 is a susceptibility gene in native and admixed Peruvian populations.

To use CAPN10 alleles as genetic risk factors, we need to establish their baseline frequencies in normal populations. Allele frequencies of SNP19 in 116 individuals of Lima (admixed population) are similar to those reported for Mexican American groups.

INTRODUCCIÓN

La diabetes tipo 2 o no dependiente de insulina (NIDDM) es la forma más común de esta enfermedad y corresponde aproximadamente al 90% del total de casos, caracterizándose por una resistencia a la insulina acompañada de una deficiencia relativa en la acción y secreción de insulina.

Seclén et al.^{1,2} realizaron estudios de tasa de incidencia y prevalencia de diabetes tipo 1 y 2, respectivamente, en población peruana. La incidencia de diabetes tipo 1 es de 0,4/100, 000. En tanto, la prevalencia de diabetes tipo 2 es mucho mayor; observándose un sesgo altitudinal en la población urbana de la costa (7.6%) vs. población urbana de la sierra (1.3%).

Al igual que en otras enfermedades complejas, la tasa de prevalencia de la diabetes tipo 2 es dependiente del grupo étnico en estudio. A su vez, esta tasa depende de los genes causales de la diabetes tipo 2 en la población. Los resultados observados para diabetes tipo 2 en la población peruana confirman lo observado en otros estudios, relacionando prevalencia de diabetes tipo 2 y componente genético de la población, 20% en mexico-americanos, 15% en personas de origen africano y 11.9% en las poblaciones de origen caucásico³. Actualmente, el riesgo genético constituye un importante factor de pronóstico, diagnóstico y prevención de la enfermedad.

Para la búsqueda de genes candidatos en diabetes tipo 2, se utilizan marcadores moleculares y los estudios comparativos de asociación y/o ligamiento entre grupos de pacientes y controles. En el caso de diabetes 2, se han encontrado aproximadamente 13 regiones cromosómicas asociadas a la enfermedad.

¹ Facultad de Medicina Humana, USMP.

² Hospital Edgardo Rebagliati Martins.

³ Hospital Arzobispo Loayza.

Entre los marcadores más útiles se encuentran los polimorfismos de un solo nucleótido (single nucleotide polymorphism-SNP). Aunque se encuentran por decenas en todos los genes, solo algunos SNP se encuentran más representados en pacientes con estas enfermedades que en la población control. Esto se debe a que están muy cerca al gen causal o constituyen una mutación que otorga una predisposición genética.

De los estudios realizados a la fecha para ubicar a los genes candidatos de diabetes tipo 2, el más prometedor fue el realizado por Hanis et al.,⁴ que encontraron evidencias de ligamiento con un gen de susceptibilidad en una región del cromosoma 2. Este locus fue designado como el gen número 1 de diabetes mellitus no dependiente de insulina (NIDDM1), y fue detectado en una población mexicana.

Horikawa et al.,⁵ basándose en este estudio, delimitaron aún más la región de NIDDM1. Encontrándose que de los tres genes candidatos observados en esta región, sólo calpaína 10 presentó asociación entre las frecuencias haplotípicas de sus SNP43, 19 y 63 y diabetes tipo 2. Esto se comprobó en población pima y mexico-americana en un

20 a 30%, y un 3% en población finlandesa y alemana (Horikawa et al.⁵; Fullerton et al.⁶). Considerando la cercanía filogenética entre las poblaciones pima, mexico-americana y peruana, así como los antecedentes anteriormente presentados, nosotros proponemos estudiar al gen CAPN10, que sería una región cromosómica y un gen de susceptibilidad "mayor" en la población peruana.

Otros estudios a nivel celular y molecular realizados por Horikawa et al.⁵ comprobaron que CAPN10 interviene en la regulación de varias funciones celulares incluyendo señales intracelulares, proliferación y diferenciación. Así como un mediador en la acción de la insulina, corroborando que este es un gen candidato involucrado en la etiología de diabetes tipo 2. Así, los resultados genéticos y celulares indican a CAPN10 como un gen de susceptibilidad para diabetes tipo 2. Considerando la fisiología molecular de CAPN10 y el parentesco ancestral en las poblaciones pima y mexico-americana se realizó el análisis del SNP19 de calpaína 10 (CAPN10) en población control peruana, esto permitirá realizar posteriores comparaciones con pacientes diabéticos y determinar factores de riesgo genético de esta enfermedad.

MAPA DEL GEN CAPN10 Y SNPS 19, 43 y 63

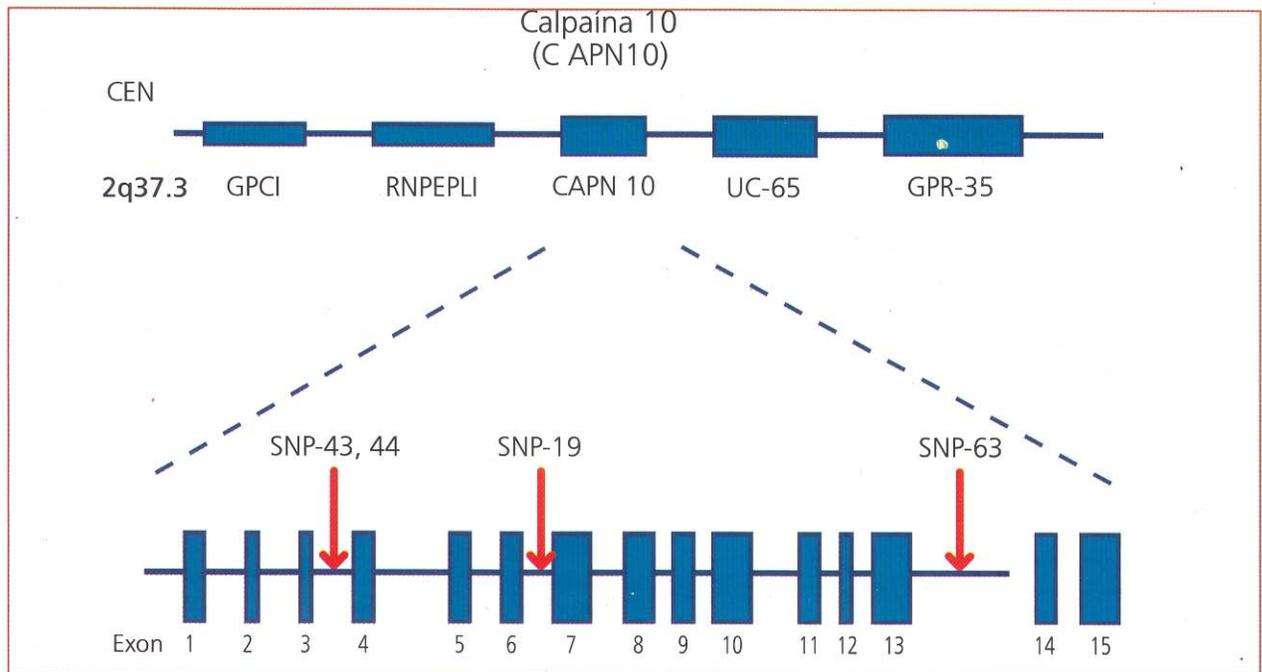


Figura 1: Esquema de la región cromosómica 2q37.3, que contiene el gen calpaína 10 (CAPN10). Este gen tiene 15 exones y 14 intrones. Los SNPs 43 y 44 se ubican en el intrón 3, el SNP19 en el intrón 6, y el SNP63 en el intrón 13, respectivamente. (Horikawa et al., (5)).

MATERIALES Y MÉTODOS

Población en estudio

Se analizaron 116 individuos voluntarios de una población urbana de Lima, mayormente de origen mestizo, que no presentaron antecedentes clínicos de diabetes 2, obesidad, hipertensión, problemas cardiovasculares e hipercolesterolemia.

Análisis molecular

Se obtuvo el DNA a partir de linfocitos de sangre periférica, por medio de la técnica descrita por Fujita R.⁷. A partir de estas muestras se realizó la amplificación por PCR del SNP19, utilizando los partidores (primers) y los protocolos de amplificación descritos por Evans et al.⁸, y que se indican a continuación:

SNP-19 (CAPN10g. 7920 indel 32bp)

La mezcla de PCR se realizó en un volumen de 10 ul que contiene Buffer de PCR 1x, 200umol de cada dinucleótido trifosfato (dNTP's)/lt, 1.5 mmol de MgCl2/lt, 5% de dimetil sulfoxido, 250 nmol de cada primer /lt, 0.25 U de Amplitaq gold y 40 ng de ADN genómico. Las condiciones del protocolo de PCR son 94°C por 12 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30S, 60°C por 30S y 72°C por 30S y 72°C por 10 minutos. Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa al 2%. La figura 2 representa al alelo 1 con 2 repeticiones y de un tamaño de 155 pb, y el alelo 2 presenta 3 repeticiones con 187 pb⁸.

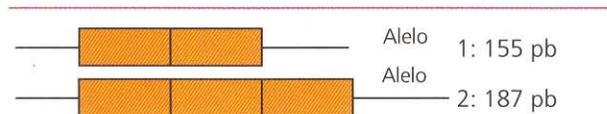


Figura 2

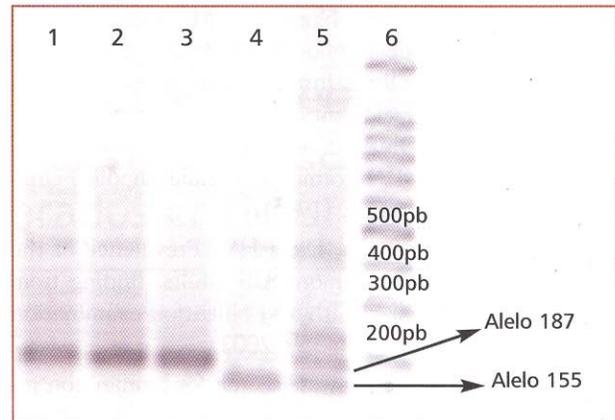
RESULTADOS

Se han analizado 116 individuos control para el SNP-19, encontrándose una frecuencia de 41.38% del alelo 155 y 58.62% del alelo 187.

DISCUSIÓN

Los resultados preliminares presentados en los párrafos anteriores son necesarios para un posterior estudio de asociación tipo caso-control, siendo por tanto adecuado, el análisis molecular en controles sanos de la población peruana.

En estudios familiares, el SNP19 marcador localizado en el intron 6 del gen Calpaína 10 (CAPN10) presentó asociación con diabetes 2 (Horikawa et al., 2000). Estos resultados sugirieron que los haplotipos de los SNP 43, 19, y 63 serían los



La Fig. 3 es un ejemplo de una corrida electroforética en gel de agarosa al 2%, y se señala con una flecha el tamaño de los alelos del SNP19 que son de 155 y 187pb, respectivamente.

que estarían asociados a diabetes tipo 2 en población mexicano-americana. El SNP19 presentó una frecuencia del alelo más común (187pb) de un 57% en una muestra normalizada (n=112), y de un 50% en pacientes diabéticos (n=110).

Otros antecedentes señalan que la frecuencia del alelo más común es de 62% en población Maya (n=94) y de 73% para población Surui (n=94) (Fullerton et al.⁶).

En tanto que, los resultados observados en población control peruana para el alelo más frecuente (187pb) es de 58.62% que es similar al 57% observado por Horikawa et al.⁵ en una muestra normalizada.

Considerando lo descrito en los párrafos anteriores, se corrobora que la población control peruana, presenta una frecuencia alélica similar a la observada en otras poblaciones de origen amerindio, como la mexicano-americana.

Es importante destacar que estos son los primeros resultados para el SNP19 en población peruana, y serán utilizados como antecedentes para determinar la frecuencia de este marcador asociado a diabetes tipo 2. Actualmente, nos encontramos realizando los análisis moleculares de los SNP43 y 63 en la población diabética y la población control peruana.

*Dra. Mónica Paredes Anaya
Facultad de Medicina Humana
Universidad de San Martín de Porres*

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 Seclen, S., Leey, J., Villena, A., Herrera, B., Menacho, J., Carrasco, A., Vargas, R. Prevalencia de Diabetes Mellitus, hipertensión arterial, hipercolesterolemia, y obesidad como factor de riesgo coronario y cerebrovascular en población adulta de la costa, sierra y selva del Perú. Informe del Premio Roussel, Lima-Perú, pp 32. (1997).

- 2 Seclen, S., Rojas, MI., Nuñez, O., Millones, B., Valdivia, H. Registro de 10 años de incidencia (1985-1994) de diabetes mellitus insulino dependiente tipo 1 (IDDM) en población mestiza infantil peruana y estudio molecular (DNA) de sus alelos y genotipos HLA-DR, DQA y DQB. Informe del Premio Hipólito Unanue, Lima-Perú, 62 pp. (1996).
- 3 Ford, EA; Giles, WH., Dietz HW. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: finding from the third national Health and Nutrition examination survey. *JAMA* 287: 356-359. 2002
- 4 Hanis, CL A genome -wide search for human non-insulin dependent (type 2) diabetes genes reveals a major susceptibility locus on chromosome 2. *Nature genet.* 13: 161-166. 1996
- 5 Horikawa, Y., Oda N., Li X., Orho-Melander, M., Hara M., Hinokio, Y., Lindner, TH., Mashima, H., Schwarz, PEH., Bosque-Plata, L., Horikawa, Y., Oda, Yukie., Yoshieuchie, I., Colilla, S. et al Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nature genetics* 26: 163-175. 2000
- 6 Fullerton, SM; Bartoszewicz, A; Ybazeta, G; Horikawa, Y; Graeme, IB; Keneth KK; Cox, NJ; and RR Hudson. Geographic and haplotype structure of candidate type 2 diabetes susceptibility variants at the calpain-10 locus. *Am. J. Hum. Genet.* 70: 1096-1196, 2002.
- 7 Fujita R. Localisation du gen de l'ataxie de Friedreich par sa liaison génétique et physique avec les loci D9S5 et D9S15. These de Docteur de l'Universite Louis Pasteur de Strasbourg, France, 80p. 1991
- 8 Evans JC., Frayling, TM., Cassell PG., Saker, PJ., Hitman, GA., Walker, M., Levy, JC., O'rahilly. Pami-dighhatam, VS., Bennett AJ., Jones, EC., Menzel S et al. Studies of association between the gene for Calpain-10 and Type 2 Diabetes Mellitus in the United Kingdom. *Am. J. Hum. Genet* 69: 544-552. 2001