

---

# Variación y distribución genética de los SNP's 19, 43 Y 63 del gen de susceptibilidad de diabetes tipo 2 Calpaina 10 (Capn10) en la población peruana

## VARIATION AND GENETIC DISTRIBUTION OF SNPS 19, 43 AND 63 OF THE SUSCEPTIBILITY GENE CALPAIN 10 (CAPN10) FOR TYPE 2 DIABETES IN THE PERUVIAN POPULATION

---

Mónica Paredes Anaya<sup>1</sup>, Frank Lizaraso Soto<sup>2</sup>, Rosa Lissón Abanto<sup>3</sup>, Dra. E. Giovanna Rodríguez<sup>4</sup>, Jorge R. Calderón<sup>4</sup>, Eduardo Rodríguez Zárata<sup>1,1</sup>, Gabriela García Nores<sup>1,1</sup> y Ricardo Fujita Alarcón<sup>5</sup>

### RESUMEN

La diabetes tipo 2 es una enfermedad compleja que tiene un componente genético. Calpaina 10 (CAPN10) es un gen de susceptibilidad para este gen y está localizado en 2q37.3. Pacientes de algunas poblaciones de origen amerindio presentan las frecuencias alélicas de los SNP19, 43 y 63 del gen CAPN10, que sugiere una relación causal entre este gen y la diabetes tipo 2. El origen filogenético común, nos permite suponer que CAPN10 también sería un gen de susceptibilidad en la población peruana nativa y mestiza, lo cual nos motivó a investigar esta relación en nuestra población.

Se obtuvieron resultados de la frecuencia alélica de los SNP19, 43 y 63 de CAPN10 en 129 controles normales de Lima, la mayoría de origen mestizo.

Además de la prueba del equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W) para determinar si la población tiene una distribución genéricamente homogénea en dichos marcadores.

Se puede concluir que la prueba de H-W sugiere fuertemente que nuestra población control es adecuada para un estudio de asociación y desequilibrio de ligamiento en pruebas caso-control. Esto a su vez es la base para futuros estudios de asociación y desequilibrio de ligamiento, postulando a CAPN10 como gen de susceptibilidad de diabetes tipo 2 en la población peruana.

**Palabras claves:** frecuencia alélica, frecuencia haplotípica, equilibrio de Hardy-Weinberg, desequilibrio de ligamiento.

### ABSTRACT

Type 2 diabetes is a complex genetic disorder, where the gene calpain 10 (CAPN10) located in 2q37.3, plays an important role. Allele frequencies of SNP19, 43 and 63 are present in affected Amerindian populations and might suggest a possible relationship between CAPN10 and type 2 diabetes.

The fact that Amerindian populations has a common phylogenetic origin was our main motivation for studying this possible relation, because it would suggest that CAPN10 is a susceptibility gene for native and admixed Peruvian populations.

Allelic frequencies of SNP19, 43 and 63 of calpain 10 was obtained of 129 normal controls from Lima, most of them admixed population. Hardy-Weinberg test (H-W) was used in order to determine if the population had a genetically homogenous distribution for the employed molecular markers.

It can be concluded that the H-W test strongly suggests that the control population is adequate for an association and linkage disequilibrium in case-control studies. Furthermore, this would mean be the

1 Doctor en Ciencias Biomédicas, Docente-Investigador del Centro de Genética y Biología Molecular de la Facultad de Medicina Humana, USMP.

1.1 Estudiante de la Facultad de Medicina Humana, USMP.

2 Doctor en Ciencias Médicas, Docente de la Facultad de Medicina Humana, USMP.

3 Médico Endocrinólogo del Hospital Edgardo Rebagliati Martins y Docente de Fisiología y Fisiopatología de la Facultad de Medicina Humana, USMP.

4 Médico Endocrinólogo y Asistente del Hospital Arzobispo Loayza.

5 Ph. D, Docente-Investigador, Jefe del Centro de Genética y Biología Molecular de la Facultad de Medicina Humana, USMP.

start of future association and linkage disequilibrium studies where CAPN10 would be considered as a susceptibility gene for type 2 diabetes in Peruvian population.

**Key Words:** allele frequency, haplotype frequency, Hardy-Weinberg equilibrium, linkage disequilibrium.

## INTRODUCCION

La diabetes tipo 2 es una enfermedad que amenaza con convertirse en una pandemia. Esta enfermedad compleja es causada por factores genéticos y medioambientales.

Calpain 10 (CAPN10) es un gen con actividad de cistein-proteasa que regula la proliferación y diferenciación celular, se localiza en 2q37.3 y algunas variantes de este gen están asociadas a susceptibilidad a diabetes tipo 2<sup>1</sup>.

La asociación de variantes alélicas y haplotípicas de este gen con diabetes tipo 2, ha sido observada en poblaciones amerindias (mexico-americana, pima, surui y maya), y algunas europeas 2. Por ejemplo, había variantes fuertemente asociados con incidencia y ligamiento en los SNP19, 43, y 63 localizados en las regiones intrónicas de CAPN10. Otro resultado interesante fue, que el genotipo 1/1 del SNP-43 presento ligamiento con el gen, pero no estaba asociado a un incremento de diabetes en paciente méxico-americanos.

Cuando se estudió los polimorfismos agrupados en haplotipos, se observó un incremento del riesgo de diabetes tipo 2 en diferentes combinaciones haplotípicas de SNP's (polimorfismos de 1 base) localizados en CAPN10, incluyendo el SNP-43. Se han definido los haplotipos de riesgo para los SNP's 43 19 y 63 en población méxico-americana. Análisis haplotípicos de estos marcadores moleculares sugieren que los genotipos 1-1, 1-2 y 2-1 de los SNP 43 y 19 confieren un incremento en el riesgo de desarrollar la enfermedad.

Esto fue posteriormente confirmado en 2 grupos independientes de méxico-americanos (Odds ratio (OR) 2.8 y 3.58), finlandeses (OR 2.55) y alemanes (OR 4.97). Considerando lo anteriormente expuesto se postuló a CAPN10 como gen de susceptibilidad que explica un 14% del riesgo a desarrollar diabetes tipo 2 en méxico-americanos y 4% en población europea<sup>1</sup>.

La interpretación de estos resultados se encuentra en la variabilidad intraespecífica del gen y la variación haplotípica y alélica de CAPN10 en diferentes grupos étnicos<sup>1,3</sup>. Por tanto, otro antecedente a considerar es el origen del hombre peruano. Recientes estudios a nivel de ADN mitocondrial y nuclear explican el poblamiento del continente americano, indican la existencia de 3 oleadas migratorias correspondientes a 3 lenguajes diferentes: amerindio, nadene y eskaleut<sup>4,5,6</sup>, que corresponden a las poblaciones sudamericanas, centroamericanas y del sur de Norteamérica.

Estos resultados y los análisis antropométricos dentales sustentan el modelo de migración tripartita<sup>6</sup>. Dicho de otro modo la población nativa peruana, habría llegado en la primera corriente migratoria de la que provienen las poblaciones méxico-americana y pima.

Los resultados observados hasta el momento, aparentemente contradictorios indicarían que para algunas poblaciones CAPN10 es importante en la etiología de diabetes tipo 2 y en otras no<sup>1,8,9</sup>.

Resultados preliminares del SNP 19 en población peruana<sup>10</sup>, mayormente de origen mestizo, nos sugirieron que la frecuencia alélica de este SNP es similar a la descrita en la población méxico-americana. En esta publicación, presentamos las frecuencias alélicas y el equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W) de los SNP 43, 19 y 63 en población peruana. Estos análisis permitirán determinar la distribución de los marcadores y si la población peruana es genéticamente homogénea para los marcadores en estudio. Esto será la base de posteriores estudios caso-control utilizando estos marcadores moleculares en la población peruana.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Población en estudio**

Se analizaron 129 individuos voluntarios de una población urbana de Lima, mayormente de origen mestizo, que no presentan diabetes tipo 2, obesidad, hipertensión, problemas cardiovasculares e hipercolesterolemia. De ellos, se amplificaron 124 controles en los SNP's 19 y 63, y 129 controles en el SNP-43.

### **Análisis molecular**

A partir de estos individuos, se realizó la amplificación del SNP-19, SNP-43 y SNP-63, utilizando los partidores (primers) y los protocolos de amplificación descritos<sup>1,1</sup>, y que se indican a continuación:

#### **SNP-19 (CAPN10-g.7920 indel 32bp)**

La mezcla de PCR se realizó en un volumen de 10 µl y contiene Buffer de PCR 1x, 200 µmol de cada dNTP, 1.5mmol de MgCl<sub>2</sub>, 5% de dimetil sulfóxido, 250 nmol de cada primer, 0.25 U de Amplitaq Gold (Applied biosystem) y 40ng de ADN genómico. Las condiciones del protocolo de PCR fueron 94°C por 12 min, 35 ciclos de 94°C por 30S, 60°C por 30S y 72°C por 30S y 72°C por 10 min. Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa al 2%, El alelo 1 tiene 2 repeticiones de una secuencia de 32 pb y el amplificado tiene un tamaño de 155 pb, y el alelo 2 presenta 3 repeticiones que suman 187 pb.

#### **SNP-43 (CAPN10-g.4852G/A)**

El protocolo de PCR se realizó a un volumen total de 10 µl que contiene Buffer de PCR 1x, 200 µmol de cada dNTP, 1.5 mmol de MgCl<sub>2</sub>, 0.25 U de Amplitaq Gold (Applied biosystem) y 40ng de ADN genómico. Las condiciones de PCR fueron 96°C por 12 min, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 57°C por 30 segundos y 72°C para 30S y 72°C por 10 minutos. Los productos de PCR fueron separados en un gel de agarosa al 2%. El alelo 1 (G) es de 134 pb y el alelo 2(A) es 152 pb.

#### **SNP-63 (CAPN10-g.16378 C/T)**

Las condiciones de PCR fueron similares al del SNP-19, excepto que la temperatura de alineamiento es de 62°C. Los productos de PCR se digirieron con 2U de HhaI (NEB) en buffer plus NE4 1x y albúmina de suero bovino al 1x, a 37°C por 2h. Luego, estos productos de digestión fueron separados en gel de agarosa al 2%. El alelo 1 (C) es de 162 pb y el alelo 2(T) es 192 pb.

### **Equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W)**

Esta prueba permite determinar si la población en estudio es genéticamente homogénea, detectándose algún sesgo de homocigosidad o heterocigosidad de los alelos en una población. Se considera que una población está en equilibrio de H-W cuando se encuentra estratificada en subpoblaciones. Una adecuada inclusión de los pacientes y controles en subpoblaciones es necesaria para posteriores estudios caso-control.

Se utilizó el programa STATA 7.0 en la prueba de H-W; este análisis fue validado con un chi-cuadrado de Pearson y un chi-cuadrado de razón de verosimilitud. Se considera que la población es genéticamente homogénea, cuando la probabilidad de ambos chi-cuadrados es mayor a 0,05.

## RESULTADOS

La figura 1 es un ejemplo de una corrida electroforética del SNP 19 en un gel de agarosa al 2 % y se señala con una flecha el tamaño de los alelos de este marcador que son de 155 y 187pb, respectivamente.

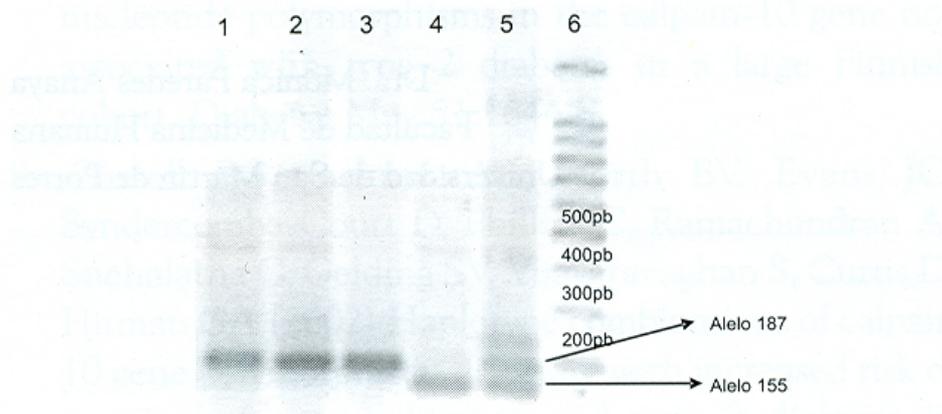


Figura 1: Los carriles 1, 2 y 3 son ejemplos de individuos homocigotos para el alelo de 187 pb, el carril 4 es la corrida de un homocigoto para el alelo de 155 pb. Se observa un heterocigoto 187-155 pb en el carril 5, y en el carril 6 el marcador de peso molecular, que va de 100 a 1000 pb. En los individuos heterocigotos siempre se observan bandas que son artefactos, mayores a 187 pb.

La tabla 1 presenta las frecuencias alélicas de los SNP's 19, 43 y 63 en 124 controles de la población peruana. Encontrándose en el SNP-19, una frecuencia de 43.1 del alelo 1 (155 pb) y 56.9 del alelo 2 (187 pb), respectivamente. El SNP-43 tiene una frecuencia de 48.8 en el alelo 1 (134 pb) y de 51.2 en el alelo 2 (152 pb). En tanto que, el SNP-63 presenta una frecuencia de 37.9 en el alelo 1 (162 pb) y 62.1 en el alelo 2 (192 pb).

**TABLA N° 1**

**Distribución de las frecuencias alélicas de los SNP 19, 43 y 63 en 124 controles de la población peruana**

SNP-19 n=124		SNP-43 n=129		SNP-63 N=124	
Alelo	Frecuencia	Alelo	Frecuencia	Alelo	Frecuencia
1 (155pb)	43.1	1 (134pb)	48.8	1 (162pb)	37.9
2 (187pb)	56.9	2 (152pb)	51.2	2 (192pb)	62.1

pb= Pares de Bases

Frecuencia= Frecuencia alélica de controles

n= número de controles

En la tabla 2 se observa la frecuencia de los alelos más comunes en población México-americana y se compara con la frecuencia del mismo alelo en la población peruana. Encontrándose que sólo el alelo 2 del SNP-19 tiene una frecuencia similar en ambas poblaciones y que el alelo 1 del SNP 43 varía de 48.8 en la población peruana a 75.0 en la México-americana. Del mismo modo, la frecuencia del alelo 1 varía de 37.9 (peruana) a 75.0 (México-americana).

**TABLA N° 2**  
**Comparación de la frecuencia alélica entre población**  
**méxico-americana y peruana**

<b>POBLACIONES</b>		
Marcador Molecular	PERUANA	MEXICO - AMERICANA
SNP -19 ALELO 2	56.9	57.0
SNP -43 ALELO 1	48.8	75.0
SNP -63 ALELO1	37.9	75.0

Adaptado de Song y col., 2004<sup>12</sup>

En la tabla N° 3 se observan los resultados de la prueba de equilibrio de H-W para los SNP's 19, 43 y 63 en la población control peruana. Encontrándose que el SNP-19 ( $p=0.758$ ; 0.672), el SNP-43 ( $p=0.093$  y 0.092), Y el SNP-63 ( $p=0.061$ ; 0.061), están en equilibrio de H-W

Estos resultados indican que la población es genéticamente homogénea para los SNP's 19, 43 y 63.

**TABLA N° 3**  
**Equilibrio de Hardy-Weinberg en la población control**  
**peruana de los SNP's 19, 43 y 63**

<b>EQUILIBRIO DE HARDY - WEINBERG</b>		
Marcador Molecular	$X^2$ de Pearson	Razón de Verosimilitud*
SNP -19	1.176 ( $p=0.758$ )	1.545 ( $p=0.672$ )
SNP -43	2.822 ( $p=0.093$ )	2.833 ( $p=0.092$ )
SNP -63	7.156 ( $p=0.061$ )	7.472 ( $p=0.061$ )

\* Versión STATA 7.0

## DISCUSIÓN

Se considera que es importante realizar la prueba de equilibrio de H-W porque permite determinar si la población es genéticamente homogénea, si no lo es, identifica subpoblaciones que se pueden caracterizar por factores genéticos, étnicos, socioeconómicos, y culturales entre otros.

Una población genéticamente heterogénea y estratificada en subpoblaciones que no han sido adecuadamente identificadas, puede variar en la distribución de las frecuencias alélicas de un polimorfismo y dar como resultado falsos positivos en los estudios caso-control<sup>13</sup>. En consecuencia, el marcador molecular analizado puede no estar realmente asociado o estar en desequilibrio de ligamiento con el gen causal de la enfermedad.

Inicialmente, las publicaciones de los estudios caso-control no tenían mayores objeciones y sólo se consideraba que los controles fueran pareados con respecto al grupo de afectados. A partir del año 2002, comenzaron una serie de pautas a considerarse para la publicación de los estudios caso-control.

Varios investigadores<sup>14</sup> coinciden en que una adecuada estratificación de la población a estudiarse, evita los efectos de la heterogeneidad genética que, por error pueden ser atribuidos a un efecto genético asociado al fenotipo en estudio. Estos autores recomiendan evitar estos posibles "ruidos", utilizando diferentes métodos genéticos como los estudios familiares (tríos caso-progenitores, por ejemplo, utilizando el programa Transmission Disequilibrium Test (TDT).

Para evitar que esta situación ocurra, es esencial tomar en cuenta el efecto de la estratificación en la población, y en caso necesario la identificación de subpoblaciones. Los resultados de homogeneidad genética obtenidos para los SNP's 19, 43, y 63 en la prueba de H-W sugieren que la población control peruana es adecuada para un estudio de asociación y desequilibrio de ligamiento en caso-control. Considerando los resultados obtenidos a la fecha, el siguiente paso a seguir es analizar los SNP's 19,43 y 63 en los pacientes diabéticos y sus familiares utilizando las dos metodologías antes mencionadas.

El aporte de esta publicación está en que es el primer trabajo que determina la frecuencia alélica de los SNP's 19, 43 y 63 del gen CAPN10 en la población peruana y que esto a su vez es la base para los estudios genéticos de asociación y desequilibrio de ligamiento, postulando a CAPN10 como gen de susceptibilidad de diabetes tipo 2 en nuestra población.

## GLOSARIO

1. Frecuencia alélica: frecuencia de 1 de las opciones alternativas que tiene un gen y que puede ocupar un locus determinado.
2. Frecuencia haplotópica: frecuencia de un grupo de alelos de marcadores diferentes que segregan juntos y que se heredan como una unidad.
3. Equilibrio de Hardy-Weinberg: Es el equilibrio que relaciona la frecuencia alélica con la frecuencia haplotópica, se utiliza en genética de poblaciones para determinar ambas frecuencias cuando la incidencia de la enfermedad es conocida.
4. Desequilibrio de ligamiento: La presencia de una combinación específica de alelos que segregan juntos para dos o más loci ligados más frecuentemente que lo esperado.

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

## BIBLIOGRAFIA

---

1. Horikawa, Y., Oda N., Li X., Orho-Melander, M., Hara M., Hinokio, Y., Lindner, TH., Mashima, H., Schwarz, PEH., del Bosque-Plata, L., Horikawa, Y., Oda, Yukie., Yoshieuchie, I., Colilla, S and et ar (2000) Genetic variation in the gne encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nature genetics* 26: 163-175.
2. Horikawa, Y., Oda, N., Yu, L., Imamura, S., Fujiwara, K., Makino, M., Seino, Y., Itoh, M., and Jun Takeda (2003). Genetics variations in calpain 10 gene are not a major factor in ihe occurrence of type 2 diabetes in Japanese. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88: 244-247.
3. Vander Molen, J., Frisse, L.M., Fullerton, S.M., Qian, L., del Bosque-Plata, R., Hudson, R and Di Rienzo (2005) Population Genetics of CAPN10 and GPR35: Implications for the Evolution of Type 2 Diabetes Variants. *Am. J.Hum. Genet.* 76: 548-560.
4. Wallace, DC., Torrini, A (1992) American Indian Prehistory as written in the mitochondrial DNA A review. *Hum Bio*164: 403-416.
5. Ward, RH., Edd, A, Valencia, D., Frazier, B and Paabo, V (1993) Genetic and linguistic differentiation in the americas. *Proc. Nad. Aca. Sci. USA* 90: 10663-10667.
6. Schurr, TG. (2000) Mitochondrial DNA and the peopling of the new world. *American scientist* 88: 246-253.
7. Fullerton, S.M., Bartoszewics, A, Ybazewta, G., Horikawa, Y., Bell., GI., Kidd, KK., Cox, NJ., Hudson, RR., and Di Rienzo. (2002) Geographic and haplotype structure of candidate type 2 diabetes susceptibility variants at the calpain-10 Locus. *Am. J. Hum. Genet.* 70: 1096: 1106.

8. Fingerlin TE, Erdos MR, Watanabe RM, Wiles KR, Stringham HM, Mohlke KL, Silander K, Valle TI; Buchanan TA, Tuornilehto J, Bergman RN, Boehnke M, Collins FS., (2002) Variation in three single nucleotide polymorphisms in the calpain-10 gene not associated with type 2 diabetes in a large Finnish cohort. *Diabetes May*51: 1644-8.
9. Cassell PG, Jackson AE, North BY, Evans JC, Syndercombe-Court D, Phillips C, Ramachandran A, Snehalatha C, Gelding SY, Vijayaravaghan S, Curtis D, Hitman GA (2002) Haplotype combinations of calpain 10 gene polymorphisms associate with increased risk of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes in South Indians. *Diabetes* 51:1622-8.
10. Paredes, M., Lizaraso, F., Rodríguez, E., Lissón R., Rodríguez, E.G., Calderón, J., y R. Fujita (2005). Determinación de la frecuencia alélica del SNP-19 del gen calpaína 10 (CAPN10) y factores de riesgo de diabetes 2 en población peruana. *Revista Horizonte Médico* 5: 13-16.
11. Evans J.c., Frayling, T.M.; Cassell .PG., Saker, P.J., Hitman, G.A, Walker, M., Levy, J.C., O'rahilly., Parnidighatam, V.S., Bennett AJ., Jones, E.C., Menzel S et al (2001). 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.
12. Song, Y., Niu, T., Manson, JA, Kwiatkowski, D., and Sirnin Liu (2004). Are variants in the CAPN10 gene related to risk of type 2 diabetes? A quantitative assesment of population and family-based association studies. *Am. J. Hum. Genet.* 74: 208-222.
13. Sham Pak (1999). Association between a complex disorder and a marker. In: *Statistics in Human Genetics*, edited by Nicki Dennis, London: Arnold Publishers Co, pp: 161-183.
14. Cooper, D.; Nussbaum, R. (2002) Proposed guidelines for papers describing DNA polymorphism-disease associations. *Hum Genet* 110: 107-208.

**Agradecimiento:**

*Esta investigación se está realizando gracias a los fondos provenientes de la Universidad de San Martín de Porres*