

El polimorfismo (CAG)_n del gen *ATXN2*, nuevo marcador de susceptibilidad para diabetes mellitus tipo 2

Luis J. Flores-Alvarado¹, Nory O. Dávalos-Rodríguez¹, Diana García-Cruz¹,
Perla M. Madrigal-Ruiz¹, Rosalba Ruiz-Mejía¹, María E. Aguilar-Aldrete,
Nemesio Villa-Ruano³, Sergio Alberto Ramírez-García³

Forma de citar

Flores-Alvarado LJ, Dávalos-Rodríguez NO, García-Cruz D, Madrigal-Ruiz PM, Ruiz-Mejía R, Aguilar-Aldrete ME, et al. El polimorfismo (CAG)_n del gen *ATXN2*, nuevo marcador de susceptibilidad para diabetes mellitus tipo 2. Rev Panam Salud Publica. 2016;40(5):318–24.

RESUMEN

Objetivo. Estimar si hay asociación del repetido (CAG)_n del gen *ATXN2* en población mexicana con diabetes mellitus (DM) tipo 2.

Métodos. Estudio epidemiológico de casos y controles. Se incluyeron personas sanas y personas diabéticas. La detección de la expansión (CAG)_n se realizó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)-punto final. Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis (PAGE al 8%) y tinción con nitrato de plata.

Resultados. La distribución de alelos del trinucleótido (CAG)_n en la población analizada resultó similar a la reportada en el centro del país. El alelo más frecuente es el de 22 repetidos; sin embargo, hay asociación con los portadores de los repetidos largos dentro del rango normal con diabetes.

Conclusiones. Los resultados sugieren que el repetido (CAG)_n del gen de *ATXN2* podría ser un factor causal de DM tipo 2.

Palabras clave

Ataxina-2; diabetes mellitus tipo 2; obesidad; receptor de insulina; esteatosis hepática no alcohólica.

La diabetes mellitus tipo 2 (DM tipo 2) es una enfermedad pandémica y se debe a la interacción entre factores de riesgo ambientales y genéticos. Identificar la heterogeneidad de estos factores es un reto para los salubristas en países

latinoamericanos como México, ya que presentan una gran diversidad de grupos étnicos así como de zonas geográficas y barreras físicas (valles, montañas, cerros, ríos, entre otros) que, en combinación con factores de riesgo como la actividad física sedentaria, alimentación de mala calidad con alto contenido energético, estado socioeconómico bajo, se traduce en las variaciones de las tasas de prevalencia e incidencia (1, 2). También existe una sobreposición en las poblaciones de la DM tipo 2 con otras variantes genéticas de diabetes (del adulto mayor, la del joven maduro, mitocondrial, autoinmune tipo 1) cuya prevalencia no ha sido descrita; su discriminación es un

desafío, ya que representa un sesgo de selección e influyen en la edad de inicio y presentación clínica (1, 3).

Se debe tener en cuenta también que los efectos epidemiológicos de un gen pueden variar en la prevalencia de la DM tipo 2; se ha reportado el efecto de un gen mayor (el gen es la causa principal de riesgo, como en los indios pima). En otros casos, hay evidencia de genes menores (el riesgo de desarrollo está dado por el efecto aditivo entre los genes), lo cual es coherente con el componente poligénico de la diabetes. A nivel mundial, se han reportado más de 50 genes asociados que codifican para proteínas involucradas en diferentes vías metabólicas,

¹ Departamento de Biología Molecular y Genómica, Centro Universitario de Ciencias de la Salud (CUCS), Benemérita Universidad de Guadalajara, Jalisco, México.

² Departamento de Salud Pública, Centro Universitario de Ciencias de la Salud (CUCS), Benemérita Universidad de Guadalajara, Jalisco, México.

³ Instituto de Investigaciones sobre la Salud Pública, Universidad de la Sierra Sur, Miahuatlán de Porfirio Díaz, Oaxaca, México. La correspondencia se debe dirigir a: Sergio Ramírez-García. Correo electrónico: sergio7genetica@hotmail.com

entre ellas la señalización de la insulina, la morfogénesis de las células beta pancreáticas, el balance energético y la secreción de insulina (4, 5). En México, se han explorado estos genes en estudios de casos y controles, los resultados muestran una heterogeneidad de mecanismos moleculares; para la población del Norte del país se ha encontrado asociado al gen *CPN10* (codifica para una proteasa muscular). En el Occidente del país se identificaron *APOE* (codifica para la apolipoproteína E), *BGLAP* (codifica para la osteocalcina), *SCARB1* (codifica para CD36) y *TNFA* (codifica para el factor de necrosis tumoral alfa). En la región del centro se han identificado a *APOE* y *CPN10*, mientras que en la región Sur fueron *CPN10*, *INS*, *INR* e *IRS1* (codifican para la insulina, el receptor de insulina y el sustrato del receptor de insulina) (6-13). Estos trabajos sugieren que estos genes son agentes causales que modifican el riesgo y deben ser corroborados por estudios epidemiológicos de réplica, como se ha realizado en cuatro trabajos en mexiquenses con un gran número de diabéticos. En el primero de estos estudios se analizaron 24 genes y se encontró correlación con polimorfismos del tipo SNP (de la traducción al español que significa polimorfismo de cambio de una sola base) en *SLC30A8*, *HHEX*, *CDKN2A/2*, *IGF2BP*, *CDC123/CAMK1D* y *KCNQ1* (14). El segundo fue del tipo de búsqueda exhaustiva del genoma realizado en 8 214 mexicanos e individuos de origen latino no mexicanos con 9,2 millones de SNP el cual reveló otros dos genes asociados, *SLC16A11* y *SLC16A13* (15). En el tercero y el cuarto estudios se exploraron variantes en más de 14 genes, revelando que los SNP en *TCF7L2* y *ADRB* correlacionan con el riesgo para la diabetes (16-17). Esta heterogeneidad genética en la sociedad mexicana poscolonial es una evidencia que apoya la hipótesis del genotipo ahorrador como mecanismo causal de diabetes.

La hipótesis del genotipo ahorrador postula que la resistencia a la insulina es resultado de un genotipo que permitió desarrollar un mecanismo para optimización de nutrientes en los períodos de hambruna o ayuno prolongados durante la cuarta glaciación y así favorecer la selección positiva de estos pobladores. Este genotipo puede ser múltiples genes (como se observa en la población mexicana) (1, 5). Aunque hasta hoy día no se han identificado todos estos genes, algunos

codifican para proteínas del balance energético, transporte de lípidos, proteólisis muscular, inflamación, morfogénesis, toxicidad celular y oncogénesis en sociedades poscoloniales vulnerables de latinos y mexicanos herederos del genotipo ahorrador que, combinado con factores de riesgo ambientales, causan la DM tipo 2 (1, 5).

Considerando todas las premisas anteriores y que la resistencia a la insulina es el eje central del genotipo ahorrador, en el presente estudio se propuso un nuevo gen candidato de como factor de riesgo para DM tipo 2, el gen *ATXN2*. Se tomó en cuenta que en el ratón con desactivación génica (*knock out*) presenta disminución de la expresión del *INR*, resistencia a la insulina, obesidad central, esteatohepatitis y dislipidemia que son factores de riesgo para diabetes. Por otra parte, el gen *ATXN2* es activador de *GRB2*, amplificador de la vía de señalización del *INR* (18). El gen *ATXN2* también presenta un polimorfismo del tipo VNTR (de la traducción al español, número variable de repeticiones en tándem o seguidas); (CAG)_n localizado entre el sitio de inicio de la traducción del gen y parte de la región codificante del exón 1. La expansión anormal de este VNTR (mayor a 30 repeticiones) produce la ataxia espinocerebelosa tipo 2 (SCA2), la cual recientemente se ha demostrado que causa prediabetes y diabetes (19). Lo anterior sugiere que alelos largos expandidos en el rango normal (de 22-30 repeticiones) pueden tener un efecto patogénico en la diabetes. Por ello, el objetivo principal del presente estudio fue estimar si la expansión dentro del rango normal del polimorfismo (CAG)_n podría ser un factor de predisposición para DM tipo 2 pura en la población mexicana.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se trata de un estudio de casos y controles en el cual se incluyeron un total de 304 mestizos voluntarios (608 cromosomas) (figura 1), de los cuales 148 eran diabéticos tipos 2 puros (que corresponde a n = 296 cromosomas) y 156 (312 cromosomas) no tenían diabetes ni factores de riesgo cardiovascular durante los últimos 10 años en su historia clínica y de laboratorio; colesterol total < 200 mg/dL, triglicéridos totales < 170 mg/dL, presión arterial ≤ 120/85 mm Hg e índice de masa corporal < 25. Presentaban historia familiar negativa para formas superpuestas de diabetes así como para padecimientos

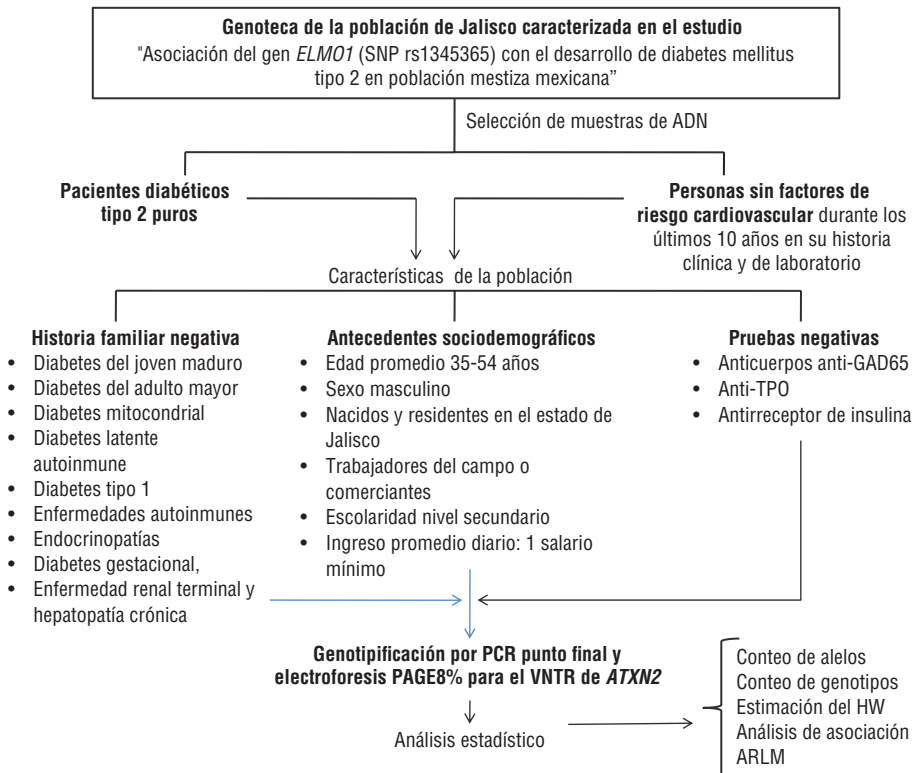
autoinmunes, endocrinopatías, diabetes gestacional, enfermedad renal terminal y hepatopatía crónica; pruebas negativas para anticuerpos anti-GAD65, anti-TPO y anti-receptor de insulina. Todos fueron caracterizados en el reporte "Asociación del gen *ELMO1* (SNP rs1345365) con el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 en población mestiza Mexicana" (20). El rango de edad fue de entre 35 y 54 años, todos fueron de sexo masculino, nacidos y residentes del estado de Jalisco (un estado del noroccidente de México). Ninguno de los participantes guardaba relación de parentesco entre sí. El perfil ocupacional incluía trabajadores rurales (n = 248) y/o comerciantes (n = 56), con escolaridad secundaria y con un salario diario promedio de 73,04 pesos mexicanos según datos de la Comisión Nacional de los Salarios (21).

Los participantes firmaron una carta de consentimiento informado en la cual aceptaban participar en el estudio citado en la referencia número 20; en él consentían que las muestras de suero y ADN, antecedentes patológicos y no patológicos también fueran utilizados en otros estudios genéticos y que aprobaban su publicación con fines científicos, guardando la confidencialidad del nombre y datos legales. Los resultados de los estudios bioquímicos y moleculares les fueron reportados en persona.

Este trabajo fue hecho acorde a la declaración de Helsinki, formó parte del proyecto "Caracterización clínico molecular de la expansión de los repetidos (CAG)_n en los genes *ATXN1*, *ATXN2*, *ATXN3*, en familias con ataxia espinocerebelosa, así como la asociación con hallazgos del síndrome metabólico en población considerada sana del Sur y Occidente de México" aprobado por la Secretaría de Educación Pública de México y por las comisiones de investigación, ética y bioseguridad del Instituto de Investigaciones sobre la Salud Pública de la Universidad de la Sierra Sur de México con números de registro UNISI-PTC-068-SEP y, ISSP/BAMM/04 respectivamente.

Caracterización molecular de la expansión (CAG)_n en el gen *ATXN2*

De la genoteca se seleccionaron los ADN de los diabéticos y de las personas sanas, obtenidos de sangre periférica mediante un *kit* Gene Catcher (Invitrogen®). El de ADN fue usado como sustrato para la PCR-punto final. Los iniciadores utilizados para detectar la expansión

FIGURA 1. Diseño metodológico del estudio

Fuente: elaboración de los autores. HW, equilibrio de Hardy-Weinberg; ARLM, análisis de regresión logística múltiple; VNTR, número variable de repeticiones en tándem o seguidas; PCR, reacción en cadena de la polimerasa; anti-TPO, antitiroperoxidasa.

(CAG)*n* fueron: cag-F (5'-GGGCCCT-CACCATGTCG-3') y cag-R (5'-CGGGCT-TGCCGACATTGG-3') (Sigma Aldrich) (22). El programa de amplificación y las condiciones de PCR, así como electroforesis en poliacrilamida al 8% fueron las publicadas antes (19, 22). El producto de PCR se desnaturalizó en un baño maría por dos minutos; luego se colocó en hielo granizado para su ulterior corrimiento electroforético en geles de poliacrilamida (PAGE) al 8%, proporción 19:1. Después, se tiñeron los geles con nitrato de plata 0,1 g, 0,5 mL de ácido acético y 10 mL de etanol aforados a 100 mL. La solución reveladora usada fue a base de hidróxido de sodio al 3% con 270 µL de formaldehído al 37% aforado a 100 mL.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El tamaño de la muestra se estimó con la fórmula de proporciones para el alelo de mayor frecuencia en población mexicana, lo cual arrojó una muestra total de 159 sujetos (que corresponde a 316 cromosomas) (22-23). Las frecuencias de alelos, genotipos e índice de heterocigosidad se establecieron por conteo directo. En

las personas sanas se estableció la prueba del equilibrio de Hardy-Weinberg (HW) con la fórmula para alelos múltiples (24). El HW se consideró cuando la suma de las diferencias observadas y esperadas tuvieron un valor de $X^2 < 3,84$ con una $p > 0,05$ (25).

El estudio de asociación se realizó al comparar la distribución de genotipos de los casos y controles en tablas de contingencia de dos por dos. Las diferencias en la distribución se validaron por la X^2 y se consideraron significativos con una $X^2 > 3,84$ y $p \leq 0,05$ con dos colas.

Se estableció el razón de riesgo de desarrollo (ORR, razón de momios), así como la prueba *z* para esta y el intervalo de confianza del 95% (IC95%). Se consideró factor de riesgo cuando el valor del ORR fue mayor a 1, y factor protector cuando fue menor ≤ 1 . La fuerza de asociación fue estimada en base a la escala de Handler (26). Cuando se analizó al VNTR (CAG)*n* en *ATXN2* como factor de riesgo, se consideró que cada sujeto puede ser portador de un genotipo conformado por dos alelos de repeticiones con igual o diferente longitud. Además, el VNTR es un polimorfismo, ya que tiene

dos alelos con una frecuencia superior al 1% en las poblaciones; el de 22 y 23 repetidos, el resto son variantes alélicas (22).

Se realizó también un análisis de regresión logística múltiple (ARLM) para diseccionar la relación entre la variable dependiente (DM tipo 2) y el conjunto de independientes (alelos y genotipos del VNTR de *ATXN2*) apoyados del programa Statistical Package for the Social Science versión 17.0.1®. Se realizaron cuatro modelos para analizar la distribución de alelos en los dos grupos de estudio (la unidad de análisis es el número de cromosomas) y 5 modelos para el análisis de genotipos (la unidad es el individuo). En todos ellos se estimó el ORR, error estándar, valor de *z* así como IC95%.

RESULTADOS

Distribución relativa de alelos para el repetido (CAG)*n* de *ATXN2*

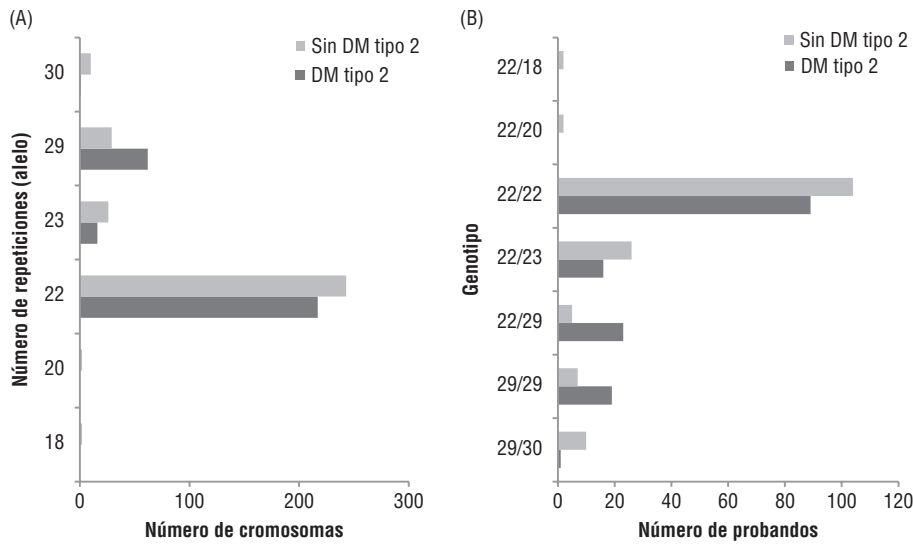
El alelo más frecuente en la población total analizada fue el de 22 repetidos con un 76%, le siguen el de 29 repetidos con un 14,70%, 23 repetidos con 6,90%, 30 repetidos con 1,80%, mientras que los alelos de 18 y 20 repeticiones se presentaron con una frecuencia de 0,32%. Sin embargo, en el presente estudio no encontramos alelos de repeticiones menores a 13, ni superiores a 30 (figura 2A). Los alelos 22, 23, 29 y 30 son polimórficos en esta población con frecuencias superiores a 1% (figura 2A), mientras que los alelos de 18 y 20 repetidos presentan una frecuencia relativa menor a 0,5% son variantes raras.

En las personas sanas, el alelo más frecuente fue 22 repetidos con 77,88%, le siguieron el de 29 con 9,20% ($n = 14$), 23 repeticiones con 8,5%, 30 repeticiones con 3,20% ($n = 5$), así como los alelos de 18 y 20 repetidos con 0,65% respectivamente, estos últimos ausentes en los probandos diabéticos tipo 2 (figura 2A). En los diabéticos tipo 2, el alelo más frecuente fue el de 22 repetidos con 70,13% y con menor frecuencia el de 29 repetidos con 20,50% ($n = 33$), 23 repetidos con 5,10% y con 0,30% el de 30 repeticiones ($n = 1$).

Distribución relativa de genotipos para el repetido (CAG)*n* de *ATXN2*

En la población total analizada se encontraron 7 genotipos, homocigotos para el alelo de 22 y 29

FIGURA 2. Distribución de alelos del VNTR de ATXN2 (A) y distribución de genotipos del VNTR de ATXN2 (B)



Fuente: Elaboración de los autores. El patrón relativo de la frecuencia alélica y de genotipos presenta un valor de $X^2 = 6,89$ y $26,77$ y $p = 0,0001$ y $0,0000$, respectivamente. DM tipo 2, diabetes mellitus tipo 2.

CUADRO 1. Riesgo de desarrollo para alelos del VNTR (CAG)_n de ATXN2

Alelo	ORR	Error estándar	Valor de z	P > z	IC 95%	
18	NA	NA	NA	NA	NA	NA
20	NA	NA	NA	NA	NA	NA
22	0,80	0,15	-1,17	0,240	0,55	1,16
23	0,63	0,20	-1,39	0,160	0,33	1,20
29	2,60	0,62	3,96	0,000	1,62	4,18
30	0,10	0,10	-2,16	0,310	0,01	0,81
ARLM. Modelo 1 (excluye alelos de 30, 20 y 18)						
22	14,28	14,78	2,57	0,010	1,87	108,63
23	9,84	10,62	2,12	0,030	1,18	81,54
29	34,20	36,08	3,35	0,001	4,32	270,49
ARLM. Modelo 2 (excluye alelos de 29, 20 y 18)						
22	0,50	0,11	-2,96	0,003	0,32	0,79
23	0,34	0,13	-2,77	0,006	0,16	0,73
30	0,05	0,06	-2,69	0,007	0,00	0,45
ARLM. Modelo 3 (excluye alelos de 23, 20 y 18)						
22	1,78	0,57	1,81	0,070	0,95	3,34
29	4,27	1,62	3,82	0,000	2,03	9,00
30	0,20	0,21	-1,47	0,141	0,02	1,70
ARLM. Modelo 4 (excluye alelos de 22, 20 y 18)						
23	0,70	0,23	-1,05	0,293	0,36	1,35
29	2,45	0,59	3,69	0,000	1,52	3,95
30	0,11	0,12	-2,06	0,040	0,01	0,90

NA, no aplica; VNTR, número variable de repeticiones en tándem o seguidas; ORR, razón de momios; IC95%, intervalo de confianza del 95%; ARLM, análisis de regresión logística múltiple.

Fuente: elaboración de los autores. La unidad de análisis es el cromosoma. Dado que cada sujeto es portador de dos alelos, con un total de 304 sujetos incluidos, se analizan 608 cromosomas.

repeticiones y heterocigotos 18/22, 20/22, 22/23, 22/29 y 29/30 (figura 2A y B); su distribución en la población estaba en HW. El índice de heterocigosidad fue de 0,2796. El genotipo más frecuente fue el homocigoto para

el alelo de 22 repetidos con 63,5%, le siguen 22/23 con 13,9%, 22/29 con 9,20%, 29/29 con 8,50%, 29/30 con 3,60% y 0,65% para 18/22 y 20/22 (figura 1B). En las personas sanas, el genotipo más frecuente fue 22/22 con

66,67%; le siguieron 22/23 con 16,70; 29/30 con 6,4%; 29/29 con 4,4%; 22/29 con 3,2% y, finalmente los heterocigotos 18/22 y 20/22 con una frecuencia de 1,30%. En los diabéticos, el genotipo más frecuente fue 22/22 con 60,14%; 22/29 con 15,54%; 29/29 con 12,84%; 22/23 con 10,81% y 29/30 con 0,67% (figura 2B).

Análisis de asociación de alelos y genotipos con DM tipo 2

Alelos. Al comparar la distribución de alelos entre los dos grupos de estudio, diabéticos tipo 2 y sanos, se muestra que la distribución es significativa con $X^2 = 26,77$ y $p = 0,0000$. Se observa una asociación moderada con una ORR de 2,60 para el alelo de 29, resultando un factor de riesgo (cuadro 1). Mediante el análisis de regresión múltiple en el modelo estadístico 2 y 4, se encontró que el alelo de 30 repeticiones está fuertemente asociado como un factor protector, con ORR de 0,05 y 0,11 (cuadro 1).

Genotipos. Al comparar la distribución de genotipos en los dos grupos de estudio, se encontró que es significativamente estadística con una $X^2 = 31,8$ y $p = 0,0001$ y se muestra asociación en los casos portadores de alelos mayores a 23 repeticiones (cuadro 1) y $p < 0,05$. La asociación es fuerte para los genotipos homocigotos 29/29 y 22/29, respectivamente con valores de ORR > 3 (cuadro 2). En el ARLM de la distribución genotípica por los modelos 1 y 5, se observa que los portadores 22/29 y 29/29 presentan, en efecto, un riesgo incrementado para el desarrollo de DM tipo 2; en este último modelo se excluye los sujetos homocigotos 22/22. Los genotipos 29/30, 22/23 y 22/22 no son concluyentes como factores de riesgo o protección (cuadro 2).

DISCUSIÓN

El presente trabajo se realiza en la población mestiza de escasos recursos del estado de Jalisco, México. Los resultados muestran que los alelos más frecuentes fueron el de 22 y 23 repetidos lo que hacen al VNTR de ATXN2 un polimorfismo (22). También se detectaron alelos de superior longitud y no se encontraron repeticiones cortas, en contraste con lo reportado en la población cohorte del centro de México (22). Sin embargo, la distribución para los genotipos está en equilibrio HW y el índice de heterocigosidad es muy similar. Estas diferencias se pueden explicar porque la composición

CUADRO 2. Riesgo de desarrollo para genotipos del repetido CAG de ATXN2

Genotipo	ORR	Error estándar	Valor de z	P > z	IC95%	
29/30	0,10	0,10	-2,18	0,050	0,01	0,79
29/29	3,17	1,45	2,52	0,010	1,29	7,79
22/29	5,63	2,85	3,40	0,001	2,08	15,23
22/23	0,61	0,20	-1,42	0,154	0,31	1,20
22/22	0,78	0,18	-1,03	0,303	0,49	1,24
ARLM. Modelo 1 (excluye genotipo 29/30)						
29/29	43,42	48,70	3,36	0,001	4,82	391,27
22/29	73,60	84,10	3,76	0,000	7,83	691,23
22/23	9,84	10,62	2,12	0,034	1,18	81,54
22/22	13,69	14,25	2,51	0,012	1,78	105,30
ARLM. Modelo 2 (excluye genotipo 29/29)						
29/30	0,06	0,07	-2,42	0,016	0,00	0,60
22/29	3,14	1,92	1,88	0,060	0,95	10,40
22/23	0,42	0,20	-1,80	0,072	0,16	1,07
22/22	0,58	0,22	-1,38	0,168	0,27	1,25
ARLM. Modelo 3 (excluye genotipo 22/29)						
29/30	0,04	0,05	-2,74	0,006	0,00	0,42
29/29	1,29	0,74	0,45	0,650	0,42	4,00
22/23	0,29	0,14	-2,52	0,012	0,11	0,76
22/22	0,40	0,16	-2,27	0,023	0,18	0,88
ARLM. Modelo 4 (excluye genotipo 29/29)						
29/30	0,20	0,21	-1,47	0,141	0,02	1,70
22/29	5,42	2,91	3,15	0,002	1,89	15,57
22/23	9,20	5,34	3,82	0,000	2,94	28,71
22/22	1,71	0,57	1,59	0,112	0,88	3,32
ARLM. Modelo 5 (excluye genotipo 22/22)						
29/30	0,12	0,13	-1,98	0,040	0,01	0,98
29/29	3,35	1,55	2,61	0,009	1,34	8,33
22/29	5,68	2,92	3,38	0,001	2,07	15,55
22/23	0,76	0,26	-0,79	0,432	0,38	1,50

ORR, razón de momios; IC95%, intervalo de confianza del 95%; ARLM, análisis de regresión logística múltiple.

Fuente: elaboración de los autores. La unidad de análisis es el cromosoma. Dado que cada sujeto tiene un genotipo, este análisis es sobre un total de 304 sujetos.

étnica que es muy diferente en la población cohorte del Occidente de México (Jalisco) y en la del centro (Ciudad de México y Distrito Federal), descritas ya en múltiples estudios (6-20). También influye la divergencia evolutiva de la región donde está el VNTR, lo que se refleja en la poca variabilidad y se traduce en la alta frecuencia del alelo de 22 repeticiones (19, 22).

Este reporte es el primer estudio de epidemiología que sugiere la asociación del polimorfismo (CAG)_n del gen para ATXN2 con el desarrollo de DM tipo 2 pura. Los homocigotos 22/29 y 29/29 tienen el riesgo más alto y es significativo acorde a la escala de Handler y validado por el ARLM. Se ha reportado anteriormente que las repeticiones del rango anormal 37-49 son responsables de un estado de prediabetes y de DM tipo 2 en pacientes con ataxia espinocerebelosa 2 (SCA2); los resultados de ambos estudios en conjunto sugieren la participación de

la ataxina-2 en la diabetes (19). Esto se apoya en los hallazgos encontrados en el ratón con desactivación génica para ATXN2K, que presenta disminución del INR y alteraciones relacionadas con el desarrollo de diabetes, como obesidad (18). La asociación con el VNTR se relaciona con la selección adecuada de casos y controles, ya que se incluye a diabéticos tipo 2 puros y personas sanas sin factores de riesgo cardiovascular. Esto permite descartar sesgos de la estructura poblacional como se ha reportado para ELMO1 en México (20) y deberá ser considerado en futuros diseños de cohortes en latinoamericanos para eliminar falsos positivos de la DM tipo 2 sobrepuesta. Esto se refuerza mediante la inclusión de probandos con un rango de edad entre 35-55 años tal como se realizó, lo que elimina los sesgos de información y confusión por la inclusión de diabetes de inicio en el joven maduro y en el adulto mayor. Por lo anterior,

se puede sugerir que el VNTR de ATXN2 es un factor de riesgo para diabetes (26).

El presente estudio es un modelo que permite comprender al salubrista el impacto de polimorfismos de repetidos en tándem como mecanismos causales de enfermedad. En la actualidad, se ha incrementado el número de enfermedades involucradas con estas expansiones. Bajo ciertas circunstancias, estas pueden aumentar más allá de los límites normales dando lugar a una mutación que favorece la presencia de cierta enfermedad (22). El estado de premutación (alelos largos dentro del rango normal, entre 23-30 repeticiones) también puede ser un factor que modifica el riesgo para esclerosis lateral amiotrófica (ELAS) o parálisis supranuclear progresiva (PSP) (27-29) y predisponen para la DM tipo 2 pura, como en el presente estudio. Hasta el momento de realización de este estudio, no se encontró evidencia de estos desórdenes neurológicos en los diabéticos. Todos estos resultados hacen suponer que, en la transición epidemiológica, el incremento de enfermedades crónicas y los trastornos neurodegenerativos tiene relación con la activación de mecanismos moleculares comunes. Hay evidencias de esto, por ejemplo en la PSP tipo 1 (por expansiones en el gen TAU y en ATXN2), el fenotipo que incluye DM tipo 2 de inicio a los 35 años (29). Las variaciones en APOE (regulador transporte de colesterol) influyen en el desarrollo de enfermedad de Alzheimer, diabetes, enfermedad de Parkinson y en el fenotipo de la SCA3 (30-33). La calpaína 10 se asocia a diabetes y a enfermedad de Alzheimer. La SCA1 (por expansiones CAG en ATXN1) tienen asociación con la resistencia a la insulina (34).

El presente estudio tiene cuatro limitantes a nivel de epidemiología y genética. La primera de ellas es que no se realizaron marcadores de ancestría en la población analizada; esto no se llevó a cabo porque ya está bien caracterizado el alto componente amerindio y español de la población mestiza del estado de Jalisco (35-36).

La segunda limitación, si se considera que se deben buscar marcadores con especificidad y sensibilidad, el VNTR analizado no explica todos los casos, pero se debe de seguir explorado teniendo en cuenta que la causalidad de la diabetes es multifactorial, donde participan muchos genes menores (25). En este sentido, los resultados del presente

estudio sugieren que el gen *ATXN2* es un gen menor, lo que se ve apoyado en estudios en México que revelan muchos genes implicados (6-17) y en los valores del IC95% superiores a 270 para el alelo de 29 repeticiones obtenidos mediante el ARLM. Este efecto epidemiológico del gen reduce el poder de asociación y explica estadísticamente porque en la escala de Handler el grado de asociación es fuerte para algunos alelos y genotipos del VNTR del *ATXN2*. Pero es lo esperado, porque este alelo es poco común en población mexicana (19, 22).

La tercera limitante es que, para precisar la fuerza de asociación, se requiere un mayor número de sujetos diabéticos tipo 2 puros (muestras superiores a 15 000 probandos) lo cual solo es posible a través de un estudio multicéntrico de réplica, muy difícil de realizar en el corto plazo, ya que lleva un período extenso captar y analizar pacientes con las características clínicas, que solo tiene el presente estudio.

La última limitante es que no se puede aseverar que el VNTR del *ATXN2* sea un agente causal que pueda modificar el riesgo. Para ello se requieren estudios

funcionales del impacto del polimorfismo en la expresión génica que demuestren un efecto biológico diferente de cada alelo, los cuales no fueron objeto de la presente investigación (8). Se debe seguir explorando en las sociedades poscoloniales latinas, ya que *ATXN2* es un regulador del INR y de la señalización de la insulina que lo hace parte del genotipo ahorrador (37).

CONCLUSIONES

Este es el primer estudio que permite sugerir la asociación del polimorfismo (CAG)_n del gen *ATXN2* con el desarrollo de DM tipo 2 pura en población de escasos recursos. Los alelos normales largos del VNTR son factores que aumentan el riesgo para DM tipo 2 pura en la población mexicana analizada.

La recomendación para los salubristas de América Latina en la era posgenómica es que deben tener una interacción mayor con los genetistas para realizar estudios multidisciplinarios como el presente, que permiten explorar factores genéticos para establecer marcadores predictivos y preventivos en población vulnerable para

enfermedades de gran prevalencia como la DM tipo 2.

Agradecimientos Los autores desean agradecer a Nory O. Dávalos y Luis J Flores por su participación en el desarrollo del trabajo, a Jonnathan Castro Juárez por la corrección externa de estilo y a Siliceo Murrieta por el apoyo en el análisis estadístico.

Financiamiento. El presente estudio fue financiado totalmente por la Secretaría de Educación Pública de México, a través del "Apoyo a la incorporación de nuevos PTC convocatoria 2012" y mediante la convocatoria 2013 "Apoyo para el fortalecimiento de nuevos cuerpos académicos".

Conflictos de interés. Ninguno declarado por los autores.

Declaración. Las opiniones expresadas en este manuscrito son responsabilidad del autor y no reflejan necesariamente los criterios ni la política de la *RPSP/PAJPH* y/o de la OPS.

REFERENCIAS

- Carrillo C, Panduro A. Genética de la diabetes mellitus tipo 2. *Investigación en Salud*. 2001;3:27-34.
- Gordon C. Transición epidemiológica y las diferencias en la salud de la población entre la periferia y el centro urbano del Área Metropolitana de Panamá, 2001-2011. *Invest Pens Crit*. 2015;3(1):17-38.
- Flores-Alvarado LJ, Ramírez-García SA, Ferman PD, Dávalos-Rodríguez NO, Chávez-López C, Cruz-Bastida M, et al. Molecular Heterogeneity of Type 2 Diabetes Mellitus in Mexican Population and its Impact of the Public Health on Policies in Primary Care. *Med Chem*. 2014;4:791-7.
- Rosales-Gómez RC, López J de J, Núñez NY, González-Santiago AE, Ramírez-García SA. Type 2 diabetes nephropathy: a thresholds complex trait and chromosomal morbid map. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2010;48:521-30.
- Ramírez-García SA, Cabrera-Pivaral CE, Huacuja RL, Flores-Alvarado LJ, Pérez-García G, González-Rico JL, et al. Implications in primary health care of medical genetics and genomic in type 2 diabetes mellitus. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2013;51(3):e6-26.
- Del Bosque-Plata L, Aguilar-Salinas CA, Tusié-Luna MT, Ramírez-Jiménez S, Ramírez S, Auron GM, et al. Association of the calpain-10 gene with type 2 diabetes mellitus in a Mexican population. *Mol Genet Metab*. 2004;81(2):122-26.
- Canizales-Quinteros S, Tusié-Luna MT. Role of the allelic E4 variant of apolipoprotein E in lipid concentrations in a Mexican rural indigenous population predisposed to type 2 diabetes mellitus. *Rev Invest Clin*. 2000;52(3):314-17.
- Ruiz B, Godínez SA, Nuño GP, Panduro A. Genetic polymorphism of apolipoprotein E associated to type 2. *Diabetologia*. 2001;44:A91.
- Guzmán-Flores JM, Muñoz-Valle JF, Sánchez-Corona J, Cobián JG, Medina-Carrillo L, García-Zapién A, et al. Tumor necrosis factor-alpha gene promoter -308G/A and -238G/A polymorphisms in Mexican patients with type 2 diabetes mellitus. *Dis Markers*. 2011;30(1):19-24.
- Martín-Márquez BT, Herón PM, Sánchez-Hernández PE, Enciso-Amorós E, Sandoval-García F, Corona-Sánchez J, et al. Asociación del polimorfismo T188G en el gen del transportador lipídico CD36 con diabetes mellitus tipo 2 en mestizos mexicanos del occidente de México. *Archivos de Ciencia*. 2011;3(1):21.
- Villafán-Bernal JR, Sánchez-Enríquez S, Llamas-Cobarrubias M, Guzmán P, Muñoz-Valle JF. El polimorfismo Hind III-180 C/T, nuevo marcador de susceptibilidad para diabetes mellitus tipo 2. *Archivos de Ciencia*. 2011;3(1):53.
- Sánchez-Corona J, Flores-Martínez SE, Machorro-Lazo MV, Galaviz-Hernández C, Morán-Moguel MC, Perea FJ, et al. Polymorphisms in candidate genes for type 2 diabetes mellitus in a Mexican population with metabolic syndrome findings. *Diabetes Res Clin Pract*. 2004;63(1):47-55.
- Burgete-García AI, Cruz-López M, Madrid-Marina V, López-Ridaura R, Hernández-Avila M, Cortina B, et al. Association of Gly972Arg polymorphism of IRS1 gene with type 2 diabetes mellitus in lean participants of a national health survey in Mexico: a candidate gene study. *Metabolism*. 2010;59(1):38-45.
- Gamboa-Meléndez MA, Huerta-Chagoya A, Moreno-Macías H, Vázquez-Cárdenas P, Ordóñez ML, Rodríguez R, et al. Contribution of common genetic variation to the risk of type 2 diabetes in the Mexican Mestizo population. *Diabetes*. 2012;61:3314-21.
- SIGMA Type 2 Diabetes consortium, Williams AL, Jacobs SB, Moreno-Macías H, Huerta-Chagoya A, Churchhouse C, et al. Sequence variants in SLC16A11 are a common risk factor for type 2 diabetes in Mexico. *Nature*. 2014;506:97-101.
- Cruz M, Valladares-Salgado A, García-Mena J, Ross K, Edwards M, Ángeles-Martínez J, et al. Candidate gene association study conditioning on individual ancestry in patients with type 2 diabetes and metabolic syndrome from Mexico City. *Diabetes Metab Res Rev*. 2010;26:261-70.
- Martínez-Gómez LE, Cruz M, Martínez-Nava GA, Madrid-Marina V, Parra E,

- García-Mena J, et al. A replication study of the IRS1, CAPN10, TCF7L2, and PPARG gene polymorphisms associated with type 2 diabetes in two different populations of Mexico. *Ann Hum Genet.* 2011;75(5):612–20.
18. Lastres BI, Brodessa S. Insulin receptor and lipid metabolism pathology in ataxin-2 knock-out mice. *Hum Mol Gen.* 2008;17:1465–81.
19. Ramírez-García SA, Volpini V, Castañeda G, Sánchez-Corona J, Moran MC, Gutiérrez R, et al. Expansión del repetido CAG del gen ATXN2 en pacientes del noroccidente de México con ataxia espinocerebelosa y la evidencia de cinco genes modificadores. *Archivos de Ciencias.* 2011;3:28.
20. Ramírez-García SA, Charles-Niño C, Mazariego MR, Topete Gonzalez LR, Flores Alvarado LJ, Leyva-Santiago J, et al. Asociación del gen ELMO1 (snps rs1345365) con el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 en población mestiza mexicana. *Invest Clin.* 2015;56(4): 341–55.
21. Resolución del Honorable Consejo de Representantes de la Comisión Nacional de los Salarios Mínimos de México. *Diario Oficial de la Federación.* 2015;18(12).
22. Magaña J, Vergara M, Sierra M, García JE, Rodríguez A, Gómez MR, et al. Análisis molecular de los repetidos CAG en pacientes mexicanos con ataxia espinocerebelosa tipo 2. *Gac Med Mex.* 2008;144:413–18.
23. Pierce B. *Genética: Un enfoque conceptual.* 3ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2010.
24. Mateu E, Casal J. Tamaño de la muestra. *Revista Epidemiología y Medicina Preventiva.* 2003;1:8–14.
25. Duncan CT. *Statistical methods in genetic epidemiology.* Nueva York: Oxford University Press; 2004.
26. Flores AE, Burgete AI, Salazar ME. Diseños de Investigación en epidemiología genética. *Rev Panam Salud Publica.* 2012;31(1):88–94.
27. Daoud H, Belzil V, Martins S, Sabbagh M, Provencier P, Lacomblez L, et al. Association of long ATXN2 CAG repeat sizes with increased risk of amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol.* 2011;68:739–42.
28. Ross OA, Rutherford NJ, Baker M, Soto OA, et al. Ataxin-2 repeat-length variation and neurodegeneration. *Hum Molec Genet.* 2011;20:3207–12.
29. Gallardo E, Navarro H, Ramírez-García SA, Castañeda G, et al. Síndrome Steele-Richarson-Oslzewski. A propósito de un caso. *Archivos de Ciencia.* 2013;5(S1): 83.
30. Ruiz B, Godínez SA, Nuño GP, Panduro A. Genetic polymorphism of apolipoprotein E associated to type 2 diabetes mellitus in Mexican population. *Diabetologia.* 2001; 44: A91.
31. Hernández NZH, Ruiz MB, Martínez LE, Roman S, et al. Association of the epsilon 2 allele of APOE gene to hypertriglyceridemia and to early-onset alcoholic cirrhosis. *Alcohol Clin Exp Res.* 2008;32(4):559–66.
32. Gallegos AMP, Figuera LE, Ortiz GG, Jiménez JF, et al. Apolipoprotein E genotypes in Mexican patients with Parkinson's disease. *Dis Markers.* 2009;27(5):225–30.
33. Bettencourt C, Raposo M, Kazachkova N, Cymbrom T, et al. The APOE ε2 allele increases the risk of earlier age at onset in Machado-Joseph disease. *Arch Neurol.* 2011;68(12):1580–3.
34. Lalić NM, Dragasević N, Stefanova E, Jotić A, et al. Impaired insulin sensitivity and secretion in normoglycemic patients with spinocerebellar ataxia type 1. *Mov Disord.* 2010;25(12):1976–80.
35. Martínez-Cortés G, Salazar-Flores J, Fernández-Rodríguez LG, Rubi-Castellanos R, et al. Admixture and population structure in Mexican-Mestizos based on paternal lineages. *J Hum Genet.* 2012;57(9):568–74.
36. Rubi-Castellanos R, Martínez-Cortés G, Muñoz-Valle JF, González-Martín A, et al. Pre-Hispanic Mesoamerican demography approximates the present-day ancestry of Mestizos throughout the territory of Mexico. *Am J Phys Anthropol.* 2009;139(3): 284–94.
37. Baschetti R. Diabetes epidemic in newly westernized populations: is it due to thrifty genes or to genetically unknown foods? *J R Soc Med.* 1998;91:622–25.

Manuscrito recibido el 2 de diciembre de 2015.
Aceptado para publicación, tras revisión, el 25 de abril de 2016.

ABSTRACT

(CAG)_n polymorphism of the ATXN2 gene, a new marker of susceptibility for type 2 diabetes mellitus

Objective. Estimate whether there is an association between the (CAG)_n repeat in the ATXN2 gene in the Mexican population and type 2 diabetes mellitus (DM).

Methods. Epidemiological case-control study, including healthy people and diabetics. (CAG)_n expansion was detected by end-point polymerase chain reaction (PCR). PCR outputs were analyzed by electrophoresis (PAGE 8%) and silver nitrate staining.

Results. (CAG)_n nucleotide allele distribution in the study population was similar to that reported in central Mexico. The 22-repeat allele is the most frequent; however, there is an association with carriers of long repeats in the normal range with diabetes.

Conclusions. The results suggest that the (CAG)_n repeat of the ATXN2 gene could be a causal factor for type 2 DM.

Key words

Ataxin-2; diabetes mellitus type 2; obesity; insuline receptor; non-alcoholic fatty liver disease.