



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

## FACULTAD DE QUÍMICA

### PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

### MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

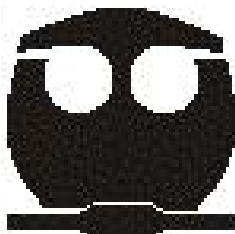
Estudio de asociación de polimorfismos de los genes *TCF7L2*, *SLC30A8*, *HHEX*, *LOC387761* y *EXT2* en pacientes con Diabetes tipo 2

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

PRESENTA:  
ROXANA GUADALUPE GUTIÉRREZ VIDAL

ASESOR:  
DRA. MARTA ALICIA MENJÍVAR IRAHETA



México DF, Octubre del 2009



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# Estudio de asociación de polimorfismos de los genes TCF7L2, SLC30A8, HHEX, LOC387761 y EXT2 en pacientes con Diabetes tipo 2

## RECONOCIMIENTOS:

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección de la Dra. Marta A. Menjívar Iraheta, en la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Con apoyo de Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) al proyecto 78762 y el proyecto de PAPIIT-DGAPA IN-208507. Durante los estudios de maestría, goce una beca otorgada por CONACYT (207486) para la realización de la presente.

El Comité Tutorial que me asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. José Pedraza Chaverri	Facultad de Química, UNAM
Dr. Samuel Canizales Quinteros	Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica, INCMNSZ
Dra. Marta Menjívar Iraheta	Facultad de Química, UNAM

El Jurado de Examen estuvo constituido por:

Dra. Amélia Farrés González-Saravia	Facultad de Química, UNAM
Dr. Rafael Camacho Carranza	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dr. Emilio Rojas del Castillo	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dra. Ma. Teresa Tusié Luna	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dr. Samuel Canizales Quinteros	Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica, INCMNSZ

## DEDICATORIA

---

A mi madre, por ser la persona más importante en mi vida. Aunque su partida ha dejado un profundo dolor espero que donde esté se encuentre bien, que siempre estará en mi corazón y mi mente.

## AGRADECIMIENTOS

---

A mi madre

por haber siempre estado conmigo, apoyando mis sueños e ilusiones

A mi padre

por su apoyo que me ha brindado durante mi vida

Dra. Marta Menjívar Iraheta

por apoyarme y guiarme en la realización de este trabajo y sobre todo por su amistad y apoyo en los momentos más difíciles de mi vida

Dr. Samuel Canizales Quinteros y Dr. José Pedraza Chaverri

por sus acertados consejos

Dra. Guadalupe Ortiz, MenC Angeles Granados Silvestre y MenC Isela

Montufar por su apoyo para la realización de este proyecto

A Luis

por su apoyo y amor que me ha dado

A Adriana

por su apoyo, comprensión, amistad y hospitalidad

A mis amigas Kadiya, Estela, Laura, Helena y Náyade

por su amistad y los buenos momentos

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
Índice de tablas	1
Índice de figuras y gráficas	3
Abreviaturas	4
1. Resumen	6
2. Antecedentes	8
2.1 Diabetes mellitus	8
2.2 Complicaciones a largo plazo de la diabetes	8
2.3 Prevalencia diabetes mellitus	13
2.4 Clasificación de la diabetes mellitus	13
2.5 Diagnóstico	15
2.6 Diabetes tipo 2	16
2.6.1 TCF7L2 (TCF4)	22
2.6.2 SLC30A8 (ZnT8)	25
2.6.3 HHEX /IDE	28
2.6.4 EXT2	30
2.6.5 LOC387761	31
3. Planteamiento del problema	32
4. Hipótesis	33
5. Objetivo general	34
5.1 Objetivos particulares	35
6. Material y método	36
6.1 Participantes del estudio	36
6.2 Determinaciones bioquímicas	38
6.3 Determinación hormonal	38
6.4 Extracción de DNA	38
6.5 Genotipificación	39
6.6 Secuenciación	40
6.7 Expresión de <i>LOC387761</i>	44
6.8 Análisis estadístico	46
7. Resultados	47

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
8. Discusión	63
9. Conclusiones	69
10. Anexo	71
11. Bibliografía	72

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Función de los genes asociados a la DT2.	18
<b>Tabla 2.</b> Estudios de asociación de todo el genoma para la DT2 realizados en 2007.	19
<b>Tabla 3.</b> Determinación del tamaño de la muestra bajo el modelo aditivo.	37
<b>Tabla 4.</b> Tamaño de los fragmentos de los 8 exones de SLC30A8 y condiciones de Tm empleadas.	41
<b>Tabla 5.</b> Datos bioquímicos y antropométricos de los DT2 y los controles del estudio.	47
<b>Tabla 6.</b> Asociación del SNP rs7903146 en población Mexicana.	48
<b>Tabla 7.</b> Distribución del SNP rs7903146 en los grupos indígenas y mestizos.	49
<b>Tabla 8.</b> Parámetros bioquímicos e IMC con el SNP rs7903146.	49
<b>Tabla 9.</b> Asociación del SNP rs13266634 en población Mexicana.	50
<b>Tabla 10.</b> Distribución del SNP rs13266634 en grupos indígenas y mestizos.	50
<b>Tabla 11.</b> Parámetros bioquímicos e IMC con el SNP rs13266634.	51
<b>Tabla 12.</b> Asociación del SNP rs1111875 <i>HHEX</i> en población Mexicana.	52
<b>Tabla 13.</b> Distribución del SNP rs1111875 en grupos indígenas y mestizos.	52
<b>Tabla 14.</b> Parámetros bioquímicos e IMC con el SNP rs1111875 de <i>HHEX</i> .	53
<b>Tabla 15.</b> Asociación del SNP rs7480010 de <i>LOC387761</i> .	53
<b>Tabla 16.</b> Distribución del SNP rs7480010 en grupos indígenas y mestizos.	54
<b>Tabla 17.</b> Parámetros bioquímicos e IMC con el SNP rs7480010 de <i>LOC38776</i> .	55
<b>Tabla 18.</b> Análisis de desequilibrio de ligamiento de los SNPs de <i>EXT2</i> : rs3740878, rs11037909 y rs1113132.	56
<b>Tabla 19.</b> Asociación del SNP rs3740878 <i>EXT2</i> en población Mexicana.	57



<b>Tabla 20.</b> Distribución del SNP rs3740878 en grupos indígenas y mestizos.	57
<b>Tabla 21.</b> Parámetros bioquímicos e IMC con el SNP rs3740878.	58
<b>Tabla 22.</b> Distribución de los alelos de riesgo en diabéticos y controles.	59
<b>Tabla 23.</b> Asociación entre la diabetes y 3-4 alelos de riesgo.	60
<b>Tabla 24.</b> Asociación entre la diabetes y 5-6 alelos de riesgo.	61
<b>Tabla 25.</b> Asociación entre la diabetes y 6-7 alelos de riesgo.	61

## Índice de figuras y gráficas.

<b>Figura 1.</b> Localización de genes asociados a la DT2 mediante SNPs en una célula beta pancreática.	21
<b>Figura 2.</b> Vía de señalización Wnt.	22
<b>Figura 3.</b> Gen del transportador de zinc.	25
<b>Figura 4.</b> Función del transportador de Zn.	27
<b>Figura 5.</b> Función de HHEX en el desarrollo del hígado y páncreas.	28
<b>Figura 6.</b> Expresión de <i>LOC387761</i> .	55
<b>Figura 7.</b> Expresión de <i><math>\beta</math>-actina</i> .	56
<b>Figura 8.</b> Representación gráfica del desequilibrio de ligamiento de los SNPs de <i>EXT2</i> rs3740878, rs11037909 y rs1113132.	56
<b>Figura 9.</b> Análisis de electroferogramas por el programa SeqScape v3.2.	62
<b>Gráfica 1.</b> Frecuencia de los alelos de riesgo para los SNPs.	60

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
A	Adenina
ABCC8/SUR 1	Cassette de unión a ATP, sub-familia C (CFTR/MRP), miembro 8
	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 8
ACDC	Adiponectina
ADA	Asociación Americana de Diabetes
AGE	Productos de glicosilación avanzada
C	Citosina
CANP-10	Calpaína 10
cDNA	DNA complementario
CDKAL1L	Proteína 1 asociada a la subunidad regulatoria CDK5 tipo 1
	CDK5 regulatory subunit associated protein 1-like 1
CDKN2A/2B	Inhibidor 2A/2B de la cinasa dependiente de ciclina
	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A/2B
CK-1 $\alpha$	Caseína cinasa 1 $\alpha$
DAG	Diacilglicerol
DE	Desviación estándar
DHAP	Dihidroxiacetonfosfato
DL	Desequilibrio de ligamiento
DNAg	DNA genómico
DT1	Diabetes tipo 1
DT2	Diabetes tipo 2
e	Día de la etapa del embrión en el ratón
ENPP1/PC1	Pirofosfatasa/fosfodiesterasa 1 ectonucleótido
	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1
EXT2	Exostosina 2
FTO	Fat mass and obesity associated
G	Guanina
GLP-1	Péptido 1 tipo glucagon
	Glucagon like peptide 1
GSK-2	Glucógeno sintasa cinasa 2
GWAS	Estudios de asociación de todo el genoma
	Genome wide association studies
HHEX	Hematopoiéticamente expresado homeobox
HMG	High mobility group
HNF4A	Factor nuclear de hepatocito 4
IDE	Enzima degradadora de insulina
IGF2BP2	Proteína 2 de unión a mRNA del factor de crecimiento 2 tipo insulina
	(Insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 2)
IHGSC	International Human Genome Sequencing Consortium
IMC	Índice de masa corporal
KASPar	Sistema de genotipificación de KBiosciences PCR SNP

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
KCNJ11/KIR6.2	Canal de potasio del tipo rectificador entrante, subfamilia J miembro 11 Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 11
LOC387761	Gen hipotético LOC387761
mRNA	RNA mensajero
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotiamida adenina dinucleótido fosfato
OR	Odd ratio o razón de momios
PCR	Cadena de la polimerasa
pERK	Cinasa 3 del factor 2 alfa de iniciación e la traducción eucariótica Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 3
PGE2	Prostaglandinas
PKC	Proteína cinasa C
PPARG	Receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
R	Arginina
RETN	Resistina
siRNA	RNA de interferencia pequeños Small interference RNA
SLC30A8/ ZnT8	Transportador de zinc de la familia 30, miembro 8 Solute carrier family 30 zinc transporter, member 8
SNPs	Polimorfismos de un solo nucleótido
T	Timina
TCF1/HNF1A	HNF1 homeobox A
TCF2/HNF1B	HNF1 homeobox B
TCF7L2/ TCF7L2/TCF	Factor de transcripción 7-tipo 2
Vía WNT	Wingless
W	Triptófano
Zip	Proteínas tipo Zrt y Irt Zrt and Irt like proteins
ZnT	Transportador de zinc

## 1. RESUMEN

La diabetes es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizada por hiperglucemia como resultado de defectos en la secreción de insulina, acción de la insulina o de ambos. La diabetes es un problema de salud a nivel mundial pues afecta al 10.7 % de la población mundial (ADA, 2007). El tipo más común de diabetes es la tipo 2 y México está dentro de los 10 países con mayor incidencia de diabetes tipo 2. Numerosos estudios han mostrado que la etiología de la diabetes tiene dos componentes: los factores ambientales (mala alimentación, poca actividad física), y los factores genéticos. En la actualidad, la evaluación de la composición genética de la diabetes tipo 2 ha sido mediante polimorfismos de un solo nucleótido. Estudios en diversas poblaciones indican que el impacto de los polimorfismos varía entre las poblaciones. La identificación de este tipo de polimorfismos ha sido difícil mediante los estudios genéticos convencionales tales como estudios de ligamiento o estudios casos control de genes candidatos, por ello se han diseñado nuevos estudios como los estudios de asociación del genoma completo. Tomando ventaja de los resultados obtenidos del primer estudio de asociación del genoma completo (Sladek y cols., 2007), se evaluaron los polimorfismos de seis nuevos genes asociados a la diabetes tipo 2: *TCF7L2*, *SLC30A8*, *HHEX/IDE*, *LOC387761* y *EXT2* en 234 controles, 455 diabéticos tipo 2 y 100 indígenas; y se analizó toda la región codificante de *SLC30A8* (Transportador de Zinc) en 25 diabéticos, por ser el único polimorfismo de los ocho identificados que se encuentra en una región codificante y por su función en el almacenamiento de insulina. La genotipificación de los polimorfismos se llevó a cabo mediante el ensayo KASPar y la secuenciación de *SLC30A8* se realizó con Big Dye Terminator v1.1 y v3.1 con el secuenciador 3130xl Genetic Analyzer. Se encontró asociación con la diabetes tipo 2 y las variantes rs7903146 de *TCF7L2* ( $P=0.05$ ) y rs7480010 de *LOC387761* ( $P=0.019$ ). En los diabéticos, los portadores del alelo de riesgo tuvieron un índice de masa corporal mayor que los individuos que no poseen el alelo de riesgo. En controles, los individuos con el alelo de riesgo A de rs7480010 *LOC387761* presentan concentraciones menores de insulina que los que no poseen el alelo de riesgo. Los sujetos control con el genotipo AA tuvieron mayores concentraciones de colesterol y

triglicéridos que los sujetos con los genotipos AG y GG. Mientras que los portadores del alelo de riesgo C de rs1111875 *HHEX/IDE* mostraron concentraciones más elevadas de glucosa y colesterol que los que no tienen el alelo de riesgo, en los controles. Estos resultados muestran que la variante rs7903146 *TCF7L2*, la cual ha sido ampliamente asociada la diabetes tipo 2 en diversas poblaciones, también participa en la susceptibilidad en la diabetes tipo en población mexicana. La variante rs7480010 de *LOC387761* confiere riesgo a desarrollar diabetes tipo 2 en la población mexicana y probablemente el mecanismo sea la alteración del metabolismo de lípidos. Los datos obtenidos para rs1111875 de *HHEX* sugieren su participación en la diabetes tipo 2 mediante una incorrecta homeostasis de glucosa y alteración del metabolismo de lípidos, probablemente promoviendo una falla en la secreción de la insulina.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 DIABETES

La diabetes es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizada por hiperglucemia como resultado de defectos en la secreción de insulina, acción de la insulina o en ambos (ADA, 2007). La hiperglucemia está acompañada de trastornos en el metabolismo de lípidos y proteínas (WHO, 1997). Los síntomas de una marcada hiperglucemia son poliuria, polidipsia, pérdida de peso y algunas veces polifagia y visión borrosa (ADA, 2007).

### 2.2 COMPLICACIONES A LARGO PLAZO DE LA DIABETES

La alteración en los niveles de glucosa está asociada con daños a largo plazo, tales como la retinopatía potencialmente con pérdida de la visión, nefropatía conduciendo a una falla renal, neuropatía diabética periférica con riesgo de ulceraciones en pies, amputación y neuropatía autonómica causando síntomas gastrointestinales, genitourinarios y disfunción sexual.

Existen tres vías metabólicas a través de las cuales la hiperglucemia lleva, a través de los años, a las complicaciones microvasculares crónicas de la diabetes:

#### ***1) Aumento de la actividad de la enzima aldosa reductasa:***

La aldosa reductasa es una enzima que cataliza la reducción de hexosas, como la glucosa, a sorbitol. La aldosa reductasa está presente en el ojo (epitelio corneal, cristalino y pericitos retinales), riñón (podocitos, células mesangiales, epitelio tubular), y nervio periférico (axones y células de Schwann). Cuando hay hiperglucemia, la aldosa reductasa transforma a la glucosa en sorbitol, y este último es metabolizado a fructosa a través de la sorbitol deshidrogenasa. En este proceso ocurren cuatro fenómenos: 1) producción de sorbitol; 2) producción de fructosa; 3) disminución del NADPH; y 4) aumento del NADH.

El sorbitol aumenta la presión osmótica intracelular provocando daño a los tejidos por edema celular. En las fibras nerviosas, el aumento del sorbitol bloquea el contratransportador  $\text{Na}^+/\text{mioinositol}$ , haciendo disminuir el mioinositol y los fosfoinosítidos intracelulares, lo que causa una depleción de diacilglicerol (DAG). En el nervio, la disminución del DAG frena la actividad de la ATPasa  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$ , causando mayor edema axonal.

La disminución de DAG ocurre exclusivamente en la neuropatía, ya que existe un aumento de DAG en la retinopatía y en la nefropatía diabética. El aumento de la fructosa causa fructosilación de las proteínas, un fenómeno muy similar a la glicosilación. El consumo de NADPH favorece por un lado el estrés oxidativo, al disminuir el cociente glutatión reducido/oxidado. La glicosilación proteica es acelerada por el estrés oxidativo. El aumento de la actividad de la ciclooxigenasa, también favorece la producción de PGE2 (Prostaglandinas), sumándose a uno de los efectos de la activación de la  $\beta_2$  proteína cinasa C (PKC). La baja del NADPH también aumenta la actividad de la vía de las pentosas, activando a su vez a la  $\beta_2$  PKC.

Finalmente, el aumento del NADH favorece la síntesis de DAG. El aumento del DAG también activa a la  $\beta_2$  PKC. Por lo tanto, la activación de la aldosa reductasa no sólo produce daño celular por sí misma, sino que aumenta el daño producido por los otros dos mecanismos: la activación de la  $\beta_2$  -proteína cinasa C y la glicosilación proteica.

## **2) Aumento del DAG y de la actividad de la $\beta_2$ -proteín cinasa C:**

Este mecanismo ocurre en la retinopatía y la nefropatía. La PKC pertenece a la familia de enzimas que son capaces de fosforilar las proteínas responsables de la transducción de señales intracelulares. La isoforma  $\beta_2$  PKC aumenta su actividad en las células endoteliales de retina y riñón, cuando éstas son expuestas a la hiperglucemia. Esta activación de la  $\beta_2$  PKC ocurre porque la hiperglucemia produce un aumento en la síntesis de novo de DAG, que es un potente estimulador de esta enzima. Este aumento en la síntesis de DAG a partir de



hiperglucemia ocurre gracias a una activación en la vía de las pentosas, y a una mayor oferta de dihidroxiacetonfosfato (DHAP). La  $\beta_2$  PKC, a su vez, activa a la fosfolipasa A2, aumentando así la producción de PGE2 y de Tromboxano A2. Estos últimos mediadores modifican drásticamente la permeabilidad endotelial y la respuesta a la angiotensina II en el músculo liso vascular. Dichos cambios en la permeabilidad endotelial y en la respuesta vasoconstrictora a la angiotensina II son responsables de la génesis de la retinopatía y la nefropatía diabéticas.

### **3) Glicosilación no enzimática de proteínas:**

La glucosa se combina con los residuos amino de las proteínas, formando inicialmente una base de Schiff, la cual posteriormente se reordena, formando el producto Amadori. La hemoglobina glicosilada que es un índice de calidad de control glicémico, es un producto Amadori de glucosa y hemoglobina. En proteínas de larga vida, y en el curso de meses y años, el producto Amadori se reordena para formar compuestos de cetoaldehído que son mucho más estables (irreversibles). Se forman así los AGE (Productos de Glicosilación Avanzada), que son proteínas que sufren una serie de cambios a consecuencia de este proceso: a) formación de puentes anormales entre péptidos, b) alteración de la estructura secundaria y terciaria y c) alteraciones funcionales. Entre las alteraciones funcionales de las proteínas destaca el cambio en la permeabilidad de las membranas basales, fenómeno muy importante en la génesis de la retinopatía y la nefropatía diabética. La glicosilación del colágeno hace que ligamentos, cápsulas y aponeurosis pierdan elasticidad. Además, en condiciones de hiperglucemia, la glucosa puede también sufrir un proceso de autooxidación intracelular en presencia de un metal de transición, generando radicales libres y cetoaldehído. El mismo cetoaldehído actúa como propagador en la transformación de producto Amadori en AGE. De este modo, la autooxidación de la glucosa acelera aún más la glicosilación no enzimática de proteínas.

## **RETINOPATIA DIABÉTICA**

Esta complicación crónica está estrechamente relacionada con el daño que la hiperglucemia es capaz de hacer, especialmente en los capilares de la retina. Los pericitos retinales son los primeros en ser afectados, ya que acumulan sorbitol, pierden capacidad contráctil y mueren. Simultáneamente, ocurre una vasodilatación capilar, que se debe en parte a la pérdida de pericitos, y en parte a la activación de la b2 PKC. Sin embargo, tienen que transcurrir 5 o más años desde el comienzo de la hiperglucemia para que esta permeabilidad aumentada de la membrana basal (glicosilación) produzca exudados céreos por exudación de lípidos y microhemorragias por grietas en los capilares. En este mismo momento comienzan a perderse las células endoteliales, debilitándose la pared capilar y dando origen a microaneurismas. Años después, la pérdida de células endoteliales llega a tal punto que se da origen a los capilares acelulares, simples tubos de membrana basal, obstruidos en parte por microtrombos originados en el interior de los microaneurismas. A partir de este momento hay isquemia en extensas áreas de la retina, produciéndose microinfartos que se ven en el oftalmoscopio como exudados algodinosos. Como respuesta a la isquemia, la retina secreta un factor angiogénico, que estimula la génesis de capilares de novo. Estos nuevos capilares son frágiles, y se rompen con gran facilidad, dando origen a hemorragias mayores primero en la retina y después en el cuerpo vítreo. Es la hemorragia vítrea la responsable final de la ceguera en la mayoría de los diabéticos.

## **NEFROPATIA DIABÉTICA**

La hiperglucemia crónica es también la responsable de esta complicación. En los primeros años de la diabetes, la hiperglucemia produce cambios funcionales, como son la vasodilatación de las arteriolas aferente y eferente (aldosa reductasa y b2 PKC activadas), con aumento del flujo plasmático renal. Sin embargo, la activación de la b2 PKC hace que la vasodilatación sea mayor en la arteriola aferente que en la eferente, aumentando la presión de filtración y la filtración

glomerular. Ya después de 5 años de diabetes, la hiperglucemia se ha traducido en cambios moleculares y estructurales. El engrosamiento de la pared de las arteriolas aferente y eferente (glicosilación) normaliza eventualmente el flujo plasmático renal, y la membrana glomerular basal se engruesa y aumenta su permeabilidad, apareciendo microalbuminuria primero (30-200 mg/24 horas), y microalbuminuria después (>200 mg/24 horas). Simultáneamente las células mesangiales se multiplican (por la activación de  $\beta_2$  PKC) y aumenta la cantidad de matriz mesangial. En esta etapa el paciente tiene macroalbuminuria en el rango de síndrome nefrótico, con hipertensión arterial en casi todos los casos. Finalmente, la suma de matriz mesangial aumentada, más el engrosamiento de la membrana basal glomerular, van estrangulando a las asas capilares, reduciendo progresivamente el lumen de éstos. Por lo cual sobreviene una progresiva disminución del flujo plasmático renal y de la filtración glomerular, que llevan al paciente a la insuficiencia renal terminal.

### **NEUROPATIA DIABÉTICA:**

Esta complicación de la hiperglucemia está relacionada con la activación de la aldosa reductasa y con la glicosilación de proteínas. A principios de la evolución de la diabetes, la activación de la aldosa reductasa en el nervio produce una depleción de mioinositol, lo que lleva a una disminución del DAG. Esto produce una menor actividad de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  y edema axonal. En estas circunstancias ya se observa una disminución en la velocidad de conducción nerviosa. El edema también puede producir compresión de nervios que pasan por canales óseos inextensibles, como los pares craneanos (mononeuropatías). Posteriormente, la combinación de obstrucción de vasos responsables del aporte sanguíneo (arteriosclerosis y engrosamiento de membrana basal), más la glicosilación de la mielina, que la hace apetecible a los macrófagos, produce desmielinización segmentaria. A esto se agrega la glicosilación de la tubulina, con severo daño del transporte axonal. Este último fenómeno produciría mayor daño en las fibras más largas, lo que explicaría la mayor severidad distal de la

neuropatía diabética. Clásicamente, esta secuencia de eventos hace que en una biopsia de nervio periférico, aparezca una combinación simultánea de fibras normales, fibras desmielinizadas, fibras destruidas, y axones en regeneración.

Cabe recalcar que la susceptibilidad de las fibras nerviosas al daño por la diabetes no es la misma para cada tipo de fibra. En general, las fibras mielinizadas gruesas (motoras, sensibilidad táctil y vibratoria) son más resistentes a la hiperglucemia y más susceptibles al daño por la isquemia. Por otro lado, las fibras mielinizadas delgadas, y las fibras no mielinizadas (sensaciones de dolor y calor), son más sensibles al daño por hiperglucemia y más resistentes a la isquemia. Es por esta razón que los diabéticos pueden perder la sensibilidad al dolor y al calor en los pies, años antes de tener pérdida de sensibilidad vibratoria o táctil.

### **2.3 PREVALENCIA DIABETES**

La diabetes afecta al 10.7% de la población mundial (ADA, 2007). De acuerdo a la Asociación Americana de Diabetes (ADA) los 10 países con mayor incidencia de diabetes en el 2003 fueron India, China, EUA, Rusia, Japón, Alemania, Pakistán, Brasil, México y Egipto. En este estudio, también se realizó una estimación de lo que ocurrirá en el 2025, donde México pasará de la posición nueve a la siete (IDF, 2006).

Datos en la población mexicana indican que la diabetes, junto con las enfermedades cardiovasculares, son las primeras causas de muerte en México (INEGI, 2007).

### **2.4 CLASIFICACIÓN DE LA DIABETES**

En 1997, la ADA en conjunto con un comité de expertos internacionales, propusieron una clasificación que está vigente actualmente describiendo cuatro categorías de pacientes (ADA, 2007):

**I) Diabetes Tipo 1 (DT1).** La cual representa del 5 al 10% de los casos de diabetes. Se caracteriza por la destrucción autoinmune de las células beta del páncreas, por ello los pacientes presentan deficiencia absoluta de insulina, tendencia a la cetoacidosis y necesidad de tratamiento con insulina (insulino dependientes).

**II) Diabetes Tipo 2 (DT2).** Representa del 90 al 95% de los casos de diabetes. Son individuos que presentan resistencia a la insulina y generalmente tienen deficiencia relativa de insulina. Las etiologías no son conocidas, pero se sabe que no hay una destrucción inmune de las células beta del páncreas. Es un grupo heterogéneo de pacientes, la mayoría obesos y/o con distribución de grasa predominantemente abdominal, con fuerte predisposición genética no bien definida (multigénica). Presentan niveles de insulina plasmática normal o elevada, sin tendencia a la acidosis, responden a dieta e hipoglucemiantes orales, aunque muchos con el tiempo requieren de insulina para su control.

**III) Diabetes gestacional.** Se caracteriza por una alteración de la regulación de la glucosa que aparece durante el embarazo. La diabetes gestacional puede desaparecer al término del embarazo o persistir como intolerancia a la glucosa o diabetes tipo 2.

**IV) Otros tipos específicos de diabetes.** En este grupo se encuentran 8 subgrupos, dentro de los cuales se encuentran:

1) Defectos genéticos de la célula beta como los tipo MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young); 2) defectos genéticos en la acción biológica de la insulina; 3) enfermedades del páncreas exocrino como pancreatectomía, pancreatitis aguda, pancreatitis crónica, neoplasia del páncreas, hemocromatosis; 4) endocrinopatías como síndrome de Cushing, acromegalia, glucagonoma, feocromocitoma; 5) diabetes secundaria inducida por fármacos o químicos (corticoides, ácido nicotínico, L- asparagina, interferón alfa, pentamidina); 6) por agentes infecciosos como Rubeola congénita, Coxsachie B, citomegalovirus,

parotiditis); 7) formas raras autoinmunes como síndrome de Stiff-man, anticuerpos contra el receptor de insulina; 8) síndromes genéticos a veces asociados a diabetes (síndrome de Down, Klinefelter, Turner, Wolfram, etc).

## 2.5 DIAGNÓSTICO

Para el diagnóstico definitivo de diabetes se usa la determinación de glucosa en plasma o suero.

Valores normales:

- ❖ En ayunas de 10 a 12 horas, los valores normales de glucemia < 100 mg/dL.
- ❖ En un test de sobrecarga oral de glucosa (75 g), los valores normales de glucemia son:

Basal < 110 mg/dL,

A los 30, 60 y 90 minutos < 200 mg/dL

A los 120 minutos post sobrecarga < 140 mg/dl

El paciente debe cumplir con alguno de estos 3 criterios lo que debe ser confirmado en otra oportunidad para asegurar el diagnóstico.

1. Glucemia (en cualquier momento) > 200 mg/dL, asociada a síntomas clásicos (poliuria, polidipsia, baja de peso)
2. Presentar dos o mas valores de glucemia > 126 mg/dL, en diferentes días
3. Respuesta a la sobrecarga a la glucosa alterada con una glucemia a los 120 minutos post sobrecarga > 200 mg/dL.

## 2.6 DIABETES TIPO 2

La prevalencia de la DT2 se ha incrementado a nivel mundial. México se ubica dentro de los primeros 10 países con mayor prevalencia y es una de las primeras causas de muerte, por ello es importante su estudio en población mexicana. Este incremento se debe al menos en parte a factores **ambientales**, tales como un mayor incremento en la disponibilidad de los alimentos, baja calidad de los mismos, poca oportunidad y motivación para realizar actividades físicas, los cuales actúan sobre individuos **genéticamente** susceptibles (Sladek y cols., 2007). Se sabe que los factores genéticos juegan un papel importante ya que se ha detectado su existencia mediante estudios de gemelos, familias y de mezcla entre poblaciones. Si bien se han reconocido errores genéticos puntuales que explican la etiopatogenia de algunos casos, que comprometen el gen responsable de la síntesis de insulina, del receptor y de algunos efectores enzimáticos, en la gran mayoría se desconoce el defecto, siendo lo más probable que existan alteraciones genéticas múltiples (poligénicas). El estudio de la participación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) ha cobrado gran interés, pues se cree que modifican la respuesta individual de los factores ambientales (Owen y McCarthy, 2007). Grupos de etnias minoritarias en los E.U.A incluyendo hispanos, afroamericanos y americanos nativos se ven afectados de 2 a 4 veces mayor de desarrollar DT2 que los caucásicos.

Un SNP es un pequeño cambio o variación, que ocurre dentro de la secuencia del DNA de una persona. El código genético está formado en base a cuatro nucleótidos: adenina (A), timina (T), guanina (G) y citosina (C). Son las formas más comunes de polimorfismos en el genoma humano. La variación de un SNP ocurre cuando una única base, como la A, reemplaza una de las otros tres nucleótidos (C, G o T). En los humanos los SNPs ocurren en promedio más del 1% de las veces y se ha estimado que en la población mundial existen más de 10 millones de SNPs. Debido a que el 3-5% de la secuencia del DNA humano codifica para proteínas, la mayoría de los SNPs se localizan fuera de las regiones

codificantes. Los SNPs que se encuentran dentro de las regiones codificantes son de gran interés para los investigadores porque existe mayor probabilidad que conduzcan a una alteración biológica en alguna proteína. De acuerdo a los genetistas, los SNPs son marcadores para localizar genes dentro del DNA. Los cambios en los genes incrementan el riesgo de sufrir enfermedades poligénicas. Por ello se comparan los SNPs de personas con una enfermedad poligénica con los SNPs de personas que no tienen dicha enfermedad. Si un SNP en particular es más común en los sujetos con la enfermedad, se dice que ese SNP está señalando una región del DNA o un gen que esté involucrado en la enfermedad (The International HapMap Consortium, 2003).

Existen más de 695 artículos publicados acerca de la asociación entre variantes genéticas y DT2 (datos arrojados por PUBMED, 2009). Sin embargo, no se observa asociación en diversos estudios de la misma variante en muestras de una misma población o en diferentes poblaciones. Los SNPs identificados por estudios de ligamiento o genes candidatos pertenecen a los genes *CANP-10*, *KCNJ11*, *HNF4A*, *RETN*, *PPARG*, *KIR6.2*, *ACDC* y *ENPP1* (Tabla 1). Los estudios de ligamiento consisten en estudiar familias con varios integrantes con DT2 empleando marcadores genéticos, que permitan identificar que regiones del cromosoma que segregan con la enfermedad, es decir que marcadores genéticos presentan los afectados que los sanos no los tienen. Los estudios de genes candidatos, los cuales son seleccionados con base en su función y principalmente son genes involucrados en la homeostasis de la glucosa, se hacen en familias o en estudios caso control y se busca un alelo de riesgo que se encuentre en mayor frecuencia en los diabéticos que en los controles.



**Tabla 1.** Función de los genes asociados a la DT2.

<b>GEN</b>	<b>PROTEINA</b>	<b>FUNCION</b>
<i>CAPN-10</i>	CAPN-10	Proteasa, regula niveles de $\beta$ -catenina
<i>HNF-4A</i>	HNF-4A	Factor de transcripción, involucrado en el desarrollo y función pancreática.
<i>KCNJ11</i>	KIR6.2	Subunidad de canal K(ATP), involucrado en la secreción insulina
<i>SUR1</i>	SUR 1	Subunidad de canal K(ATP), involucrado en la secreción insulina
<i>ENPP1</i>	PC1	Inhibe la activación del receptor de insulina
<i>PPARG</i>	PPARG	Adipogénesis, promueve el almacén de triglicéridos
<i>ACDC</i>	Adiponectina	Aumenta la captación ácidos grasos, glucosa y $\beta$ -oxidación. Disminuye la gluconeogénesis y síntesis ácidos grasos
<i>RETN</i>	Resistina	Hormona, relacionada a la resistencia a la insulina

Debido a que no se han podido localizar más variantes de susceptibilidad mediante estudios de ligamiento y estudios de genes candidatos, recientemente se recurrió al uso de estudios de asociación del genoma completo (GWAS: Genome Wide Association Studies) para enfermedades comunes y complejas de las que se desconoce su etiología. Este estudio básicamente consiste en hacer un escaneo con más de 100 mil SNPs que se localicen a lo largo de todo el genoma en individuos sin DT2 (controles) y en pacientes con DT2 (Hirschhorn y cols., 2005). Los GWAS se han realizado en población estadounidense, finlandesa, inglesa y francesa (Saxena y cols., 2007; Scott y cols., 2007; Zeggini y cols., 2007; Sladek y cols., 2007). Estudios que permitieron encontrar nuevos SNPs asociados a la susceptibilidad de la DT2, incluso concordando varios SNPs entre los diferentes estudios (Tabla 2).

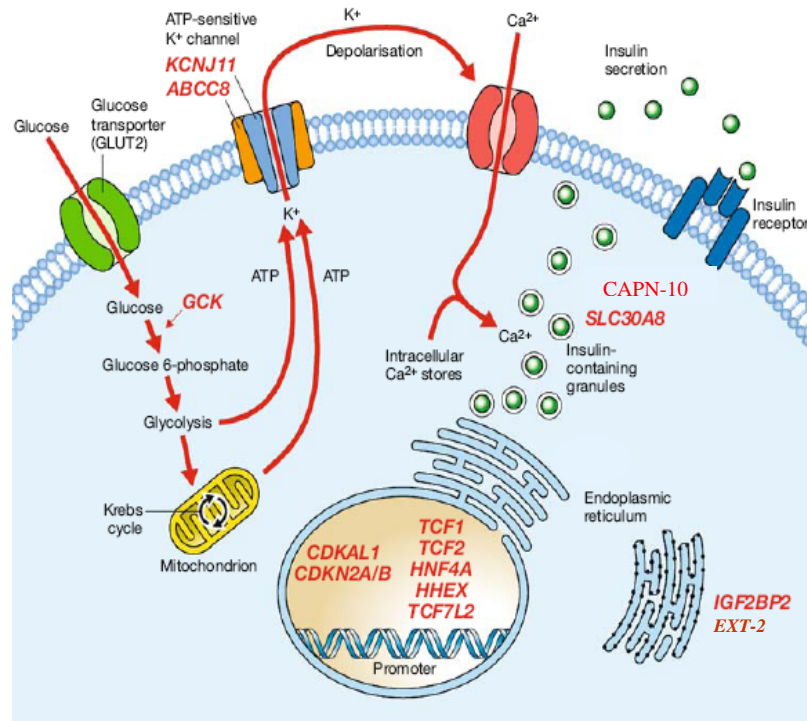
**Tabla 2.** Estudios de asociación de todo el genoma para la DT2 del 2007.

Gen/Proteína	SNPs asociados	Autor y población de estudio			
		Sladek y cols., (franceses)	y Zeggini cols.,(ingleses)	y Saxena y cols., (finlandeses y suecos)	Scott y cols., (finlandeses)
<i>TCF7L2/</i> TCF7L2	rs7903146	X	X	X	X
<i>SLC30A8/</i> ZnT8	rs13266634	X	X	X	X
<i>HHEX/IDE/</i> HHEX/IDE	rs1111875 rs7923837	X	X	X	X
<i>EXT2/</i> EXT2	rs3740878 rs1113132 rs11037909	X			
<i>LOC387761/</i> LOC387761	rs7480010	X			
<i>CDKAL1/</i> CDKAL1	rs7754840		X	X	X
<i>CDKN2A/2B/</i> CDKN2A/2B	rs10811661		X	X	X
<i>IGF2BP2/</i> IGF2BP2	rs4402960		X	X	X
<i>FTO/</i> FTO	rs8050136		X		X
<i>PPARG/</i> PPARG	rs1801282			X	X
<i>KCNJ11/</i> KIR6.2	rs5219			X	X
No. de individuos estudiados	Diabéticos	2617	1924	1464	1161
	Controles	2894	2938	1467	1174
No. SNPs evaluados		392 935	490 032	386 731	315 000

La mayoría de los GWAS, no son capaces de detectar las variantes encontradas por medio de estudios de ligamiento o estudios de genes candidatos, porque tienen un poder limitado para detectar el efecto modesto que tienen sobre la patología. Además, los microarreglos no contienen las variantes idóneas asociadas a dichos genes. Por lo tanto en la tabla 2 solo se observa asociación en algunos genes previamente reportados como *KCNJ11* y *PPARG*.

Del trabajo publicado por Sladek y cols., (2007) seis de los ocho SNPs asociados (rs13266634 8, rs1111875, rs7923837, rs3740878, rs11037909, rs1113132) presentan como alelos de riesgo a los alelos ancestrales (denominado ancestrales por su elevada frecuencia en distintas poblaciones), lo cual puede ser consistente con la hipótesis de que los alelos ancestrales se adaptaron al ambiente de las poblaciones antiguas pero ahora, bajo factores ambientales diferentes, éstos incrementan la susceptibilidad a la enfermedad. El diseño del presente estudio se realizó a principios del 2007 y el GWAS disponible era el de los franceses (Sladek y cols., 2007).

Los SNPs están asociados a genes con funciones específicas dentro de la célula, se cree que por sí solo no tendrán un importante impacto biológico, pero la suma de estas pequeñas alteraciones conducirá a un funcionamiento incorrecto de la célula beta que finalmente conlleva al desarrollo de la DT2 (Figura 1). En la figura 1 se representan los genes a estudiar en el presente trabajo y otros anteriormente descritos, que se expresan en la célula beta, con el fin de ubicarlos en un contexto celular para comprender su papel dentro de la DT2. Cabe señalar que hay genes que se expresan en otros tipos celulares y existen SNPs de otros genes que no se encuentran en la célula beta como *ACDC* y *PPARG* que se encuentran en el tejido adiposo. *ACDC* codifica para la hormona resistina que se desconoce su papel, pero se cree que está involucrada en la resistencia a la insulina. *PPARG* codifica para el factor de transcripción: receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas que participa en la adipogénesis.



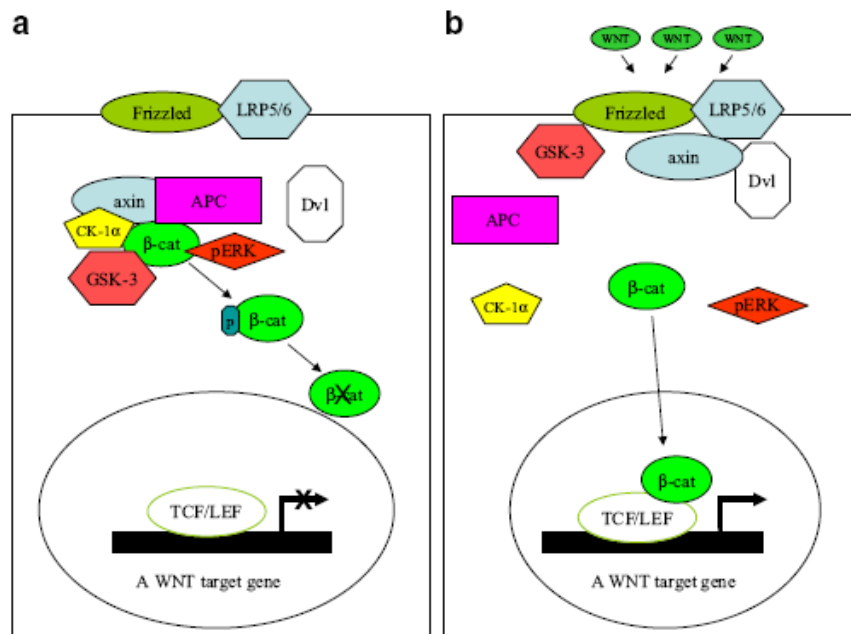
Florez y cols., 2008

**Figura 1.** Localización de genes asociados a la DT2 mediante SNPs en una célula beta pancreática. GSK codifica para la glucocinasa, es el sensor de glucosa en la célula beta. KCNJ11 codifica para la subunidad del canal de potasio sensible a ATP, el cual interacciona con SUR1 codificado por el gen (*ABCC8*) para regular el paso de  $K^+$  a través de la membrana celular. *HNF4A*, *TCF1* (codifica a HNF1A), *TCF2* (codifica HNF1B), *HHEX* y *TCF7L2* codifican para factores de transcripción producidos en la célula beta y están involucrados en el desarrollo pancreático. *SLC30A8* codifica para el transportador de zinc (Zn-8) el cual es responsable de transportar zinc hacia las vesículas que contienen insulina. *CDKAL1* y *CDKN2A/B* participan en la vía de las cinasas dependientes de ciclinas, por ello pueden estar involucradas en la regeneración de la célula beta. *IGF2BP2* codifica para una proteína que se une al mRNA de *IGF2* para dirigir su localización específica subcelular para su síntesis. *CAPN-10* codifica para la calpaína-10 que es una proteasa que hidroliza a una proteína responsable de la fusión de los gránulos de insulina con la membrana celular. *EXT2* codifica para la exostosina 2 involucrada en la síntesis de insulina y el desarrollo pancreático temprano.

En base a estos resultados el trabajo consistió en la evaluación de todos los SNPs encontrados en el primer GWAS que se dio a conocer a principios del 2007. Los genes que fueron asociados a la DT2 en dicho trabajo son *TCF7L2*, *SLC30A8*, *HHEX/IDE*, *EXT2* y *LOC387761*, cuya función y características se describen a continuación.

## 2.6.1 Factor de transcripción 7 tipo 2 (TCF7L2)

El gen del *factor de transcripción 7-tipo 2* (Transcription factor 7-like 2, *TCF7L2* o *TCF*) tiene una longitud de 215.9 kb, se localiza en el cromosoma 10 en la región q25, posee 17 exones y tiene splicing alternativo dando lugar a 4 isoformas. Se expresa en la mayoría de los tejidos, incluyendo células beta maduras del páncreas, a excepción del músculo esquelético. Codifica para un factor de transcripción que posee un dominio de unión al DNA tipo HMG (por sus siglas en inglés *high mobility group*). En la rata, durante la diferenciación fetal de las células beta, *TCF7L2* tiene un patrón de expresión similar al de *NGN3* (factor de transcripción importante para el desarrollo del páncreas y diferenciación de células beta), por lo tanto esto sugiere un papel en el desarrollo del islote. *TCF7L2* participa en la vía de señalización de WNT (Wingless), la cual regula la expresión de genes blanco como la incretina *GLP-1* (Glucagon like peptide 1) de las células endocrinas L del intestino (Yi y cols., 2005) (Figura 2).



Diabetologia 2008; 51: 1771–1780.

**Figura 2.** Vía de señalización WNT. A) Sin la estimulación por WNTs, β-catenina se localiza dentro de un complejo de GSK-2, CK-1α y pERK, que al ser fosforilado es destruido vía degradación por el proteosoma. B) Estimulación con WNT, el complejo de fosforilación/destrucción se disocia. Lo que provoca la acumulación de β-catenina libre, la cual entra al núcleo y forma el complejo con TCF, promoviendo la expresión genes blancos de la vía de WNT.

Cuando los receptores frizzled/LRP5/6 están sin sus ligandos de WNT, la vía de WNT está desactivada debido a que hay formación de un complejo entre GSK-2, CK-1 $\alpha$  y pERK (complejo fosforilado), el cual fosforila a  $\beta$ -catenina y dicho cambio conduce su degradación vía proteosoma. Sin embargo, cuando los ligandos WNT estimulan la vía al unirse a los receptores frizzled/LRP5/6, lo cual conduce a la disociación del complejo fosforilado de GSK-2, CK-1 $\alpha$  y pERK y se evita así la degradación de  $\beta$ -catenina. La  $\beta$ -catenina libre viaja al núcleo y se une a TCF, promoviendo la expresión de genes blancos como GLP-1 (Jin, 2008).

El gen de *TCF7L2* fue asociado a la DT2 por primera vez por Grant y cols., (2006), en población islandesa. Específicamente, el SNP **rs7903146** está localizado en el intrón 4 de *TCF7L2* y es un cambio de una citosina (C) por una timina (T), debido produciendo tres diferente genotipos: CC, CT y TT. A la fecha, la variante rs7903146 es la más ampliamente asociada a la DT2 en diversas poblaciones. Entre las poblaciones de estudio se encuentran los europeos blancos (Sladek y cols., 2007; Zeggini y cols., 2007; Scott y cols., 2007), hindúes (Chandrak y cols., 2007) y japoneses (Horikoshi y cols., 2007, Hayashi y cols., 2007), méxico-americanos (Lehman y cols., 2007), africanos del Oeste (Helgason y cols., 2007). Cauchi y cols. (2007) conjuntaron los datos de estos estudios previos para realizar un meta-análisis donde se observa cómo este SNP es reproducible a lo largo de las poblaciones y reporta un OR en general de 1.46, el cual es el OR más alto que se haya obtenido con respecto a otros SNPs estudiados hasta el momento, tales como *CAPN10*, *PPARG*, *KCNJ11*, *HNF4A*, etc. Pocos estudios muestran lo contrario, como Parra y cols. (2007) en mexicanos con DT2 de inicio temprano tardío (muestreo en el Distrito Federal) y Ng y cols., (2008) en asiáticos (Hong Kong y Corea), quienes no encontraron asociación entre la DT2 y el SNP rs7903146. A pesar de ello, se considera una de las variantes más importante dentro de la susceptibilidad de la DT2. Aún se desconoce el mecanismo biológico de rs7903146 por el cual contribuye en la susceptibilidad de desarrollar DT2, debido a que se encuentra en el intrón 4. De acuerdo a la función de *TCF7L2* dentro de la vía de señalización, Grant y cols. (2006) propusieron que las variantes

del gen *TCF7L2* pueden alterar los niveles del GLP-1, el cual es gen blanco del complejo TCF7L2 y  $\beta$ -catenina. GLP-1 influye en la secreción de insulina en las células beta del páncreas. Sin embargo, los niveles de GLP-1 no se han encontrado alterados respecto a los genotipos del SNP. Dahlgren y cols. (2007) observaron que la secreción de la insulina estimulada por glucosa, vía oral o vía intravenosa, se afecta por el alelo T de riesgo del SNP rs7903146, lo que implica que es otro el mecanismo que falla en el estímulo de la célula beta. Shu y cols. (2008) observan que la secreción de insulina mediada por GLP-1 está alterada cuando hay una depleción de TCF7L2 mediante siRNA en islotes humanos, por lo que ellos proponen que lo que está alterado es la vía de señalización de GLP-1 en la secreción de insulina, más que una alteración en los niveles de GLP-1. Además se observó menor proliferación y mayor apoptosis en islotes pancreáticos de ratón y humano. Adicionalmente, estos autores reportan que la depleción de TCF7L2, altera la secreción de insulina estimulada por glucosa y el índice insulinogénico. Cuando se sobreexpresa *TCF7L2* mediante la transfección de un plásmido con el gen *TCF7L2* se observa lo opuesto, pues protege a la célula beta de los efectos tóxicos de la glucosa e interleucina 6 y aumenta la proliferación y disminuye apoptosis en islotes pancreáticos de ratón y de humano. Se ha observado que una menor expresión de TCF7L2 en tejido adiposo visceral y subcutáneo de pacientes DT2 en comparación con individuos normoglicémicos (Cauchi y cols., 2006).

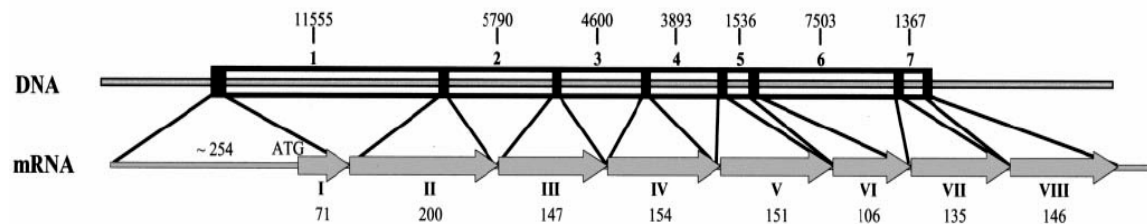
Lyssenko y cols. (2007) observaron que el alelo T del SNP rs1903146 predice la DT2. La presencia del alelo T se asocia tanto a la expresión aumentada de *TCF7L2* en islotes humanos como a la alteración de la secreción de insulina *in vivo* e *in vitro*, donde está aumentada la expresión de TCF7LT2 e insulina. Para confirmar este hecho los autores sobreexpresaron a *TCF7L2* en islotes humanos no diabéticos y observaron que la duplicación de la concentración de *TCF7L2* provocaba un incremento de 2.3 veces de insulina y adicionalmente una alteración en la secreción de insulina estimulada por glucosa, pero sin efecto en la expresión de glucagon.

La variante de *TCF7L2* se asocia a una secreción de insulina reducida durante la prueba de tolerancia a la glucosa oral y una baja conversión de proinsulina a insulina en alemanes (Kirchhoff y cols., 2008).

Por otro lado existe un estudio que muestra que la mayoría de los pacientes con DT2 que poseen el alelo T (riesgo) del SNP rs7903146 tienen como tratamiento insulina (principalmente los homocigotos) y que hay pocos pacientes con el alelo T que controlan su DT2 con ejercicio (Kimber y cols., 2007). Se puede interpretar que rs7903146, junto con otros SNPs podían servir no solo de diagnóstico, sino que también para dar un tratamiento adecuado a cada paciente.

### 2.6.2 Transportador de zinc 8 (SLC30A8 )

El gen *SLC30A8* (Solute carrier family 30, zinc transporter, member 8) posee 41617 bp, contiene 8 exones y codifica para la proteína transportadora de zinc con 369 aminoácidos. Su función es transportar zinc hacia las vesículas que contienen insulina (Figura 3).



Chimienti y cols., 2004

**FIGURA 3.** Gen del transportador de zinc. Estructura del gen *SLC30A8* (ZnT8) y su splicing. El gen se localiza en el cromosoma 8q24.11, contiene 8 exones y tiene una longitud de 37 kb.

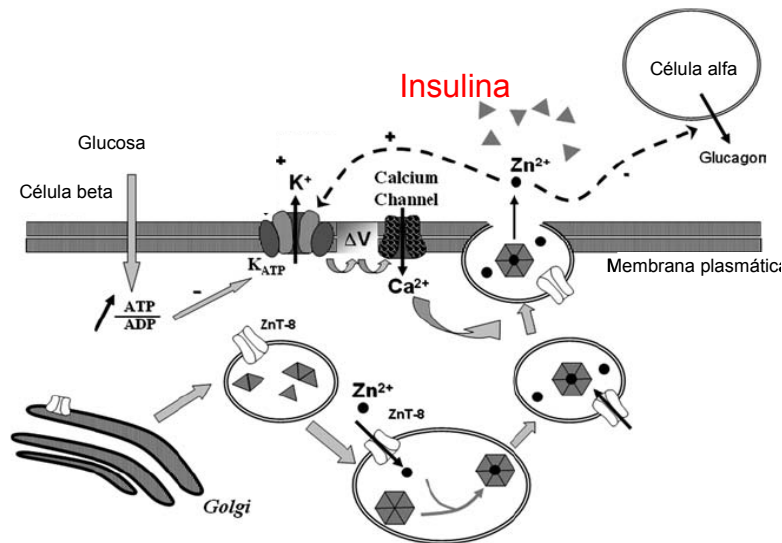
ZnT-8 pertenece a la familia de los ZnT, los cuales presentan seis dominios transmembranales con el dominio amino y el carboxilo que se localizan hacia el citoplasma. Además presentan una región rica en histidinas entre los dominios IV y V, lo cual puede ser su dominio de unión al metal. Los dominios



transmembranales I, II y V son fuertemente anfipáticos y están altamente conservados (Liuzzi y cols., 2004).

El contenido de zinc en la célula beta-pancreática es uno de los más altos. El transportador está involucrado en la toma de zinc y almacenamiento de la insulina en las células beta pancreáticas es ZnT8 (*SLC30A8*). La insulina se encuentra almacenada dentro de vesículas secretoras como un hexámero sólido unido a dos iones de  $Zn^{2+}$ . Cuando se secreta insulina, las vesículas de insulina se fusionan con la membrana plasmática de las células beta del páncreas y se libera su contenido, tanto la insulina como el zinc, a la circulación (Figura 3).

Más aún, parece haber una relación compleja entre el zinc, la DT1 y la DT2, pues varias complicaciones de la diabetes pueden estar mediadas por el estrés oxidativo, potencializado en parte por una deficiencia de zinc (Chausmer, 1998). Es por ello que el zinc parece ser un metal importante para la secreción de insulina y puede servir como un mediador en el almacén y la secreción de insulina. Adicionalmente se cree que el zinc puede modular la función de comunicación celular vía interacciones paracrinas/autocrinas (Chimienti y cols., 2005; Chimienti y cols., 2004). Ishihara y cols. (2003) reportaron que el zinc liberado de la secreción de insulina vía células beta, se relacionó con la supresión de la secreción de glucagon por las células alfa pancreáticas, que son sus vecinas (Figura 4).



Chimienti y cols., 2004

**FIGURA 4.** Mecanismo de la secreción de la insulina y el papel hipotético del transportador de Zn (ZnT-8) en la célula beta pancreática. La acumulación de zinc en las vesículas se da durante el proceso de maduración, el almacenamiento y la secreción. El complejo zinc insulina de las vesículas es un hexámero, formado por 2 iones de  $Zn^{2+}$ . El zinc también es un importante componente en el mecanismo de secreción de la insulina vía acción autocrina, además modula la función de células vecinas vía interacciones paracrinas.  $K_{ATP}$ : Canal de K dependiente de ATP

El polimorfismo **rs13266634** del gen *SLC30A8*, se encontró asociado con DT2 en franceses, ingleses, estadounidenses, finlandeses, japoneses y coreanos (Sladek y cols., Zeggini y cols., Saxena y cols., Scott y cols., y Horikoshi y cols., 2007; Lee y cols., 2008). Sin embargo, existe otra publicación con japoneses donde no encuentra asociación (Furukawa y cols., 2007). En afro-americanos y asiáticos (Hong Kong y Corea) tampoco se asocia la variante a la DT2 (Lewis y cols., 2008). Dentro de los nuevos SNPs asociados a la DT2 el SNP rs13266634 es el único que se encuentra en una región codificante y es una variante no sinónima que se encuentra en el exón 8. El cambio es una citosina (C) por una timina (T) por lo tanto los genotipos que se observan son CC, CT y TT, y en la proteína conduce a un cambio de arginina (R) por triptófano (W) en el codón 325.

Straiger H y cols. (2007) asocia dicho polimorfismo con una disminución en la secreción de insulina cuando los individuos poseen el alelo de riesgo C.

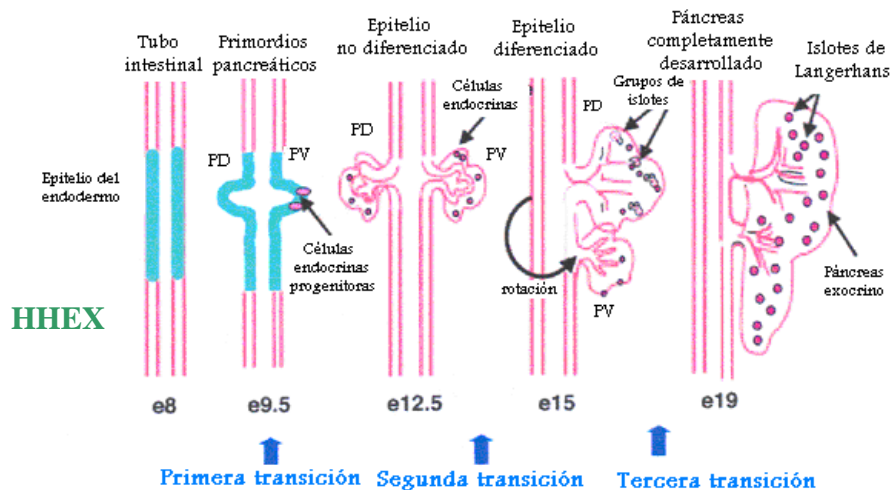
La variante de *SLC30A8* no se asoció a una secreción de insulina reducida durante la prueba de tolerancia a la glucosa oral. Sin embargo, si se relacionó a

una baja conversión de proinsulina a insulina en alemanes (Kirchhoff y cols., 2008).

### 2.6.3 Hematopoietically expressed homeobox/ Enzima degradadora de insulina (*HHEX / IDE*)

#### **HHEX**

El gen *HHEX* (hematopoietically expressed homeobox) se localiza en el cromosoma 10q24, tiene 4 exones y una longitud de 5.7 kb (Morgutti M y cols., 2001). Codifica para un factor de transcripción (represor) de 270 aminoácidos. Se expresa en linfocitos B, pero no en los linfocitos T. Se ha observado que HHEX se expresa en el dominio celular endodérmico, la yema del hígado y del páncreas, después de la organogénesis. HHEX es esencial para el desarrollo hepático y pancreático (Figura 5).



Habener y cols., 2005

**FIGURA 5.** Diagrama esquemático del desarrollo pancreático en ratón. Durante el desarrollo pancreático se requiere la expresión de varios factores de transcripción en determinadas etapas. En el día 8 (e8) de gestación, el epitelio del endodermo del tubo intestinal da origen al páncreas ventral y dorsal, etapa donde participa HHEX (e9.5). En el e14 los primordios comienzan a diferenciarse en las líneas celulares del endocrino y exocrino y proliferan. En el día 15, el páncreas ventral y dorsal rotan, se fusionan y se forma un páncreas casi desarrollado para el día 19, que contiene las células endocrinas organizadas en conjuntos de células aislados que se condensan en un islote de Langerhans. Posteriormente sigue su maduración de las células endocrinas, y continua por 2-3 semanas después de su nacimiento.

Existen estudios que sugieren su participación en la diferenciación y/o mantenimiento del estado diferenciado del hepatocito (Tanaka y cols., 1999). HHEX es blanco de la vía de señalización de Wnt (Foley y cols., 2005).

## ***IDE***

El gen de la *enzima degradadora de insulina* (Insulin-degrading enzyme, *IDE*) codifica para la enzima IDE también conocida como insulicina, y es una metalopeptidasa que puede degradar varios péptidos, incluyendo la insulina y el péptidos beta-amiloide.

Se sabe que si hay disminución de la actividad de la IDE existe una acumulación en islote de polipéptido amiloide conocida como amilina, la cual ha mostrado citotoxicidad en cultivos celulares de células beta pancreáticas (Bennett y cols., 2003), además se ha observado que en ratón knockout de IDE existe intolerancia a la glucosa (Farris y cols., 2003).

Sladek y cols.,. (2007) identificaron los SNPs **rs1111875** y **rs7923837**, como variantes de susceptibilidad a la DT2. rs1111875 es un cambio de C por T, y sus genotipos son CC, CT y TT. rs7923837 es un cambio de guanina (G) por una adenina (A) por lo tanto los genotipos son GG, GA y AA. Dichas variantes están en desequilibrio de ligamiento con los genes *IDE* y *HHEX*, y están ubicados entre estos dos genes. En seguida esta asociación fue confirmada en ingleses, estadounidenses y finlandeses mediante estudio de asociación de todo el genoma (Zeggini y cols., 2007; Saxena y cols., 2007; y Scott y cols., 2007).

En estudios de asociación caso control en daneses, holandeses, japoneses, alemanes y coreanos también se reportó asociación (Grarup y cols., 2007; van Vliet-Ostaptchouk y cols., 2008; Furukawa y cols., 2008; Herder y cols., 2008; Lee y cols., 2008). Sin embargo, en población noruega, afro-americana, asiática (Hong Kong y Corea) no se encontró asociación con la DT2 (Hertel y cols., 2008; Lewis y cols., 2008; Ng y cols., 2008).

Los alelos asociados a diabetes de *HHEX/IDE* se relacionan con una menor función de la célula beta del páncreas, incluyendo sensibilidad a la glucosa en población alemana (Pascoe y cols., 2007). Las variantes en HHEX/IDE se asocian a una secreción de insulina reducida durante la prueba de tolerancia a la glucosa oral (Kirchhoff y cols., 2008). Adicionalmente, Straiger y cols. (2007) estudiaron en europeos blancos la asociación de la sensibilidad y secreción de la insulina con ambos SNPs previamente reportados, encontrando que estos polimorfismos si están asociados a una disminución de la secreción en personas que poseen el alelo de riesgo G para ambos SNPs.

#### **2.6.4 Exostosina 2 (*EXT2*)**

*Exostosina 2* (*Exostosin 2*, *EXT2*) se localiza en el cromosoma 11 y codifica para la proteína exostosina 2 (*EXT2*) que tiene 718 aminoácidos, con una masa molecular de 82 kD. *EXT2* modula la señalización de hedgehog, vía que se encuentra involucrada en el desarrollo temprano del páncreas (Flores y cols., 1997) y en la síntesis de la insulina (Thomas, 2000). Se localiza en el retículo endoplásmico. Además se ha observado que la exostosina 1 (*EXT1*), proteína que pertenece a la familia de las exostosis, y *EXT2* se dimerizan permitiendo la acumulación de ambas proteínas en el aparato de Golgi.

Dentro de los 4 estudios de asociación de todo el genoma publicados en el 2007, solo Sladek y cols. (2007) reportaron asociación entre tres SNPs del gen *EXT2* (**rs1113132**, **rs11037909** y **rs3740878**) y la DT2. En rs1113132 es un cambio de una citosina (C) por guanina (G), rs11037909 cambia C por T y rs3740878 es un cambio de A por G. No se ha podido mostrar dicha asociación entre estos SNPs y la DT2 en estudios realizados en poblaciones japonesa, afroamericana, alemana, china e indios Pima (Horikoshi y cols., 2007; Omori y cols., 2008; Lewis y cols., 2008; Herder y cols., 2008; Rong y cols., 2009). Los estudios antes citados han incluido los tres SNPs y han observado que están en un elevado desequilibrio de ligamiento. La evaluación de los SNPs rs1113132, rs11037909 y rs3740878 en el

presente estudio se hizo sin conocer los resultados del resto de los estudios, pues su diseño se baso en el de los franceses porque era el único disponible en ese entonces.

### **2.6.5 LOC387761**

*LOC387761* es un gen hipotético, recibe este nombre porque se desconoce a la proteína que codifica. Este tipo de genes surgieron del proyecto del genoma humano (IHGSC, 2003). A partir de estas secuencias, gracias a análisis bioinformáticos se identificaron regiones que tienen características de una región codificante: marco de lectura abierto y de tamaño considerable, secuencia blanco para llevar a cabo “splicing”, de la cual se obtiene una secuencia de mRNA y a su vez una proteína. En base a este tipo de predicciones, el gen *LOC387761* contiene 66 kb, su mRNA es de 684 b y la proteína de 277 aminoácidos.

Dentro del gen *LOC387761* se ubicó el SNP **rs7480010**, el cual se asoció a la DT2 en población francesa por primera vez en un GWAS (Sladek y cols., 2007). No ha sido asociado en los GWAS y en estudios de asociación caso-control en diversas poblaciones como inglesa, americana, finlandesa, japonesa, china e indios Pima (Zeggini y cols., Saxena y cols., y Scott y cols., 2007; Omori y cols., 2008; Wu y cols., 2008; Rong y cols., 2009). El estudio de SNP rs7480010 al igual que los SNPs de *EXT2* se encuentra dentro de los SNPs identificados por los franceses, por ello se incluyo en el presente estudio.

Adicionalmente, en hispano-americanos la variante de *LOC387761* se asoció a una elevada liberación de insulina en respuesta a estímulo con el alelo de riesgo mostrando un efecto protector (Palmer y cols., 2008). En población alemana no se encontró relación entre el SNP y función de la célula beta (Staiger y cols., 2007).

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Actualmente, la diabetes tipo 2 es una de las principales de muerte en México. Con base a estudios genéticos se sabe de la elevada heredabilidad genética de la diabetes tipo 2 en la población mexicana. Recientemente, los estudios de asociación del genoma completo en caucásicos han descrito nuevos genes asociados a la diabetes tipo 2. Sin embargo, se sabe que la participación de los genes varía entre las diversas poblaciones. Por lo tanto, es importante evaluar estos nuevos genes asociados a la diabetes tipo 2 en la población mexicana.

#### 4. HIPÓTESIS

Diversos estudios muestran la participación de los SNPs en la susceptibilidad a desarrollar la DT2, siendo la población mexicana una de las poblaciones con más prevalencia en el mundo de DT2 y que presenta una fuerte historia familiar de DT2 es probable que los SNPs, producto del primer estudio de asociación de todo el genoma (Sladek y cols., 2007) rs7903146, rs13266634, rs1111875, rs7923837, rs7480010, rs3740878, rs11037909 y rs1113132, presenten de igual manera asociación a la DT2 en la población mexicana.

Dada la participación del gen *SCL30A8* (ZnT-8) en la secreción de insulina y la elevada prevalencia de diabéticos tipo 2 de inicio temprano que presentan falla secretora de insulina (Aguilar-Salinas y cols., 2001), es probable que existan otros SNPs adicionalmente al rs13266634 dentro del gen *SLC30A8* que se asocien a la DT2 en población mexicana.



## 5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la asociación de los SNPs rs7903146, rs13266634, rs1111875, rs7923837, rs7480010, rs3740878, rs11037909 y rs1113132, así como SNPs no descritos de la región codificante de *SLC30A8* en población mexicana, que corresponden a genes previamente reportados como factores de riesgo en el desarrollo de la DT2.

## 5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Conocer si los SNPs rs7903146, rs13266634, rs1111875, rs7923837, rs7480010, rs3740878, rs11037909 y rs1113132 se asocian a los parámetros bioquímicos, que pueda indicar una posible mecanismo en el desarrollo de la susceptibilidad a la DT2.
- Evaluar las frecuencias de los alelos de riesgo de los SNPs a estudiar en indígenas.
- Estudiar si la suma de los alelos de riesgo de los SNPs a estudiar tiene algún impacto sobre la DT2.
- Realizar estudios de expresión de los genes que se haya encontrado asociación a la DT2 siempre y cuando no haya información ya disponible.

## **6. MATERIAL Y MÉTODO**

### **6.1 PARTICIPANTES DEL ESTUDIO**

Los individuos que participaron en el presente estudio firmaron una carta de consentimiento informado (ver anexo). Se les aplicó un cuestionario para conocer sus datos generales y registrar sus datos antropométricos.

#### **PACIENTES**

Los diabéticos captados fueron seleccionados en base a los siguientes criterios:

- Criterios de inclusión
  - Pacientes con DT2 mexicanos de al menos tres generaciones (Glucosa  $\geq 126$  mg/dL)
  - Sujetos no relacionados
  
- Criterios de exclusión
  - Diabéticos tipo I
  - Diabéticos de otros tipos específicos

#### **CONTROLES**

Para la selección de los controles es decir sujetos sin DT2 se tomaron los siguientes criterios:

- Individuos mexicanos en al menos tres generaciones, mayores de 45 años de edad
- Con niveles de glucosa  $< 100$  mg/dL
- Sin antecedentes heredo familiares de DT2
- Sujetos no relacionados

## Tamaño de la muestra

Se utilizó el programa QUANTO para determinar el tamaño de muestra adecuado para realizar el presente estudio, considerando lo siguiente;

- ◆ Tipo de estudio: para una enfermedad y caso control, así como la relación entre caso y controles que se desee manejar (2:1)
- ◆ Modelo de genético: Dominante, recesivo y aditivo.
- ◆ Frecuencia alélica: frecuencia el SNPs a estudiar
- ◆ Poder estadístico: 80%
- ◆ Nivel de significancia: 5 %

Tabla 3. Determinación del tamaño de la muestra bajo el modelo aditivo.

SNPs	Frecuencia alelo riesgo	N diabéticos	N controles
rs7903146	0.15	763	382
rs13266634	0.75	947	474
rs1111875	0.59	726	363
rs7480010	0.76	606	303
rs3740878	0.42	1442	721
3-4 alelos de riesgo	0.73	222	113
5-6 alelos de riesgo	0.82	237	121
7-8 alelos de riesgo	0.54	353	180

Los datos fueron calculados considerando las frecuencias del alelo de riesgo y el riesgo relativo obtenido del presente trabajo y una prevalencia de DT2 del 10%. P del poder estadístico con el tamaño de muestra obtenida en el presente trabajo.

## MESTIZOS (Controles y diabéticos)

Individuos que hayan nacido en México cuyos padres y abuelos se identifiquen por si mismos como mestizos mexicanos.

## **INDÍGENAS**

Sujetos no relacionados que se reconozcan por si mismos como indígenas. Que hablen su lengua nativa, conserven sus costumbres y tradiciones de su origen. El estudio incluyo 25 Yaquis del estado de Sonora, 25 Mazahuas del estado de México, 25 Teneek del estado de San Luis Potosí y 25 Purépechas del estado de Michoacán.

### **6.2 DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS**

Se realizó la determinación de glucosa, colesterol y triglicéridos por los métodos estandarizados colorimétricos (Stanbio Laboratory Boerne).

### **6.3 DETERMINACION HORMONALES**

La cuantificación de las hormonas como la insulina así como el péptido C se realizó mediante radioinmunoanálisis (Diagnostic Products Corporation).

### **6.4 EXTRACCIÓN DE DNA**

La extracción y cuantificación de DNA genómico (DNAg) de leucocitos de pacientes con DT2, controles e indígenas se realizó mediante el kit MasterPure Complete DNA&RNA Purification de EPICENTRE Biotechnologies.

- 1) Se colocaron 200  $\mu$ L de sangre en un tubo de reacción de 2.0 mL.
- 2) Se añadió 600  $\mu$ L del reactivo Red Cell Lysis Solution, para mezclar los tubos se invirtieron 3 veces, posteriormente se golpeo el fondo del tubo para suspender cualquier remanente.
- 3) Se incubó 10 min a temperatura ambiente,
- 4) Se centrifugó por 25 seg a 13,000 rpm para formar el botón de leucocito.
- 5) Se removió la mayor parte de sobrenadante, dejando aproximadamente 25  $\mu$ L de líquido. Se suspendió el botón con ayuda del vortex.

- 6) Se resuspendieron los leucocitos en 300  $\mu$ L de Tissue and Cell Lysis Solution, pipeteando las células arriba y abajo varias veces.
- 7) Se incubaron en hielo las células por 3-5 minutos.
- 8) Posteriormente se añadieron 150  $\mu$ L de MPC Protein Precipitation Reagent a los 300  $\mu$ L de la muestra lisada, se agitó vigorosamente con vortex por 10 segundos.
- 9) Las muestras fueron centrifugadas durante 10 minutos a 10, 000 rpm en una microcentrifuga. En caso de que el botón estuviera claro, pequeño o no hubiera, se agregó 25  $\mu$ L de MPC Protein Precipitation Reagent, se mezcló y nuevamente se centrifugó.
- 10) El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se desechó el botón.
- 11) Se añadieron 500  $\mu$ L de isopropanol al sobrenadante. Se invirtieron los tubos varias veces (30-40 veces).
- 12) Se centrifugó 4° C por 10 minutos en una microcentrifuga para precipitar el DNA.
- 13) Cuidadosamente se eliminó el isopropanol sin despegar el botón de DNA.
- 14) Se lavó el DNA dos veces con etanol al 75% frío.
- 15) Se centrifugó 30 segundos a 10, 000 rpm para fijar el botón en el fondo del tubo y poder remover los residuos de etanol con pipeta.
- 16) Se resuspendió el DNA en 10-35  $\mu$ L de TE Buffer.

## **6.5 GENOTIPIFICACIÓN**

Se realizó un escaneo rápido mediante la genotipificación (determinación del genotipo de los SNPs) de ocho nuevos polimorfismos previamente asociados a la DT2 mediante un GWAS (Nature 2007; 445: 881-885).

La genotipificación se llevó a cabo mediante el ensayo KASPar realizado por la compañía Inglesa KBiosciences (Hertfordshire, UK), el cual es un sistema de genotipificación que emplea fluorescencia para discriminar un alelo del otro, utilizando dos oligos sentido que compiten porque son alelo específico marcados con fluoróforos diferentes y un oligo reverse.

Para ello las muestras se procesaron de la siguiente manera:

- 1) Se realizó la cuantificación del DNA por espectrofotometría.
- 2) En base a la concentración obtenida, se diluyeron las muestras de DNA a una concentración de 10 ng/μL.

El 10 % de las muestras se analizaron por duplicado para confirmar los datos obtenidos.

## **6.6 SECUENCIACIÓN**

El SNP rs13266634 (R325W) del gen *SLC30A8* corresponde a un cambio no sinónimo, siendo el único SNP que se localiza en una región codificante de los ocho SNPs que surgieron del primer GWA del 2007. En base a lo anterior se eligió este gen para secuenciar toda la región codificante de *SLC30A8*, con el fin de conocer si existen otros SNPs involucrados en la susceptibilidad al desarrollo de la DT2 en pacientes mexicanos. Adicionalmente, se consideró como un buen gen candidato, debido a que codifica para la proteína transportadora de zinc implicada en el flujo de zinc en las vesículas que almacenan insulina, el cual es esencial para el almacenamiento de la insulina.

Se llevó a cabo la secuenciación de la región codificante de *SLC30A8* con el fin de conocer la presencia de SNPs en diabéticos de inicio temprano (edad de diagnóstico < 45 años), esto se consideró como prueba piloto por ello solo se emplearon 25 sujetos con DT2 tomados al azar (12 hombres y 13 mujeres). Para lo cual se realizó lo siguiente:

- 1) Se diseñaron los oligonucleótidos empleando el programa FastPCR versión 6.0. para la amplificación de los 8 exones del gen *SLC30A8* ( NC000008).

2) Se estandarizaron las condiciones para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para los 8 exones.

Se empleó un programa general de PCR, donde solo varía la temperatura de alineación que depende del par de oligos empleado para cada exón.

Programa general de PCR:

94 ° C	2 min	} 30 Ciclos
94 ° C	30 seg	
X ° C	30 seg	
72 ° C	30 seg	
72 ° C	7 min	
4 ° C	∞	

X=Representa el valor de Tm según el producto de PCR por amplificar.

Tabla 4. Tamaño de los fragmentos de los 8 exones de SLC30A8 y condiciones de Tm empleadas.

Exón	Tamaño producto PCR	Tm (°C)
Exón 1	237	59
Exón 2	340	60
Exón 3	265	60
Exón 4	331	60
Exón 5	346	59.5
Exón 6	566	59.5
Exón 7	323	59.5
Exón 8	267	62

3) Se amplificaron los 8 exones utilizando el kit de Epicentre (*MasterAmp High Fidelity Extra-Long PCR Kit de Epicentre Technologies*).

4) Se realizó la purificación de los productos de PCR con el kit *GeneClean Turbo for PCR* de la casa comercial Q-BIOgene.

4.1) Se añadió 5 volúmenes de GENE CLEAN Turbo for PCR Salt Solution por cada volumen de PCR obtenido, se mezcló.

4.2) Se transfirió la mezcla a la columna ensamblada con el tubo colector de 2 mL.



- 4.3) Se centrifugó a 13, 000 rpm por 15 segundos.
  - 4.4) Se adicionó 300  $\mu$ L de la solución preparada GENE CLEAN Turbo for PCR Wash.
  - 4.5) Se centrifugó a <13, 000 x g por 15 segundos.
  - 4.6) Se descartó el filtrado y se centrifugó la columna GENE CLEAN turbo for PCR a 13, 000 rpm por 4 minutos para eliminar el resto de la solución de lavado de la columna.
  - 4.7) Se colocó la columna en un tubo limpio.
  - 4.8) Se añadió 30  $\mu$ L de GENE CLEAN Turbo for PCR Elution Solution o agua, directamente sobre la membrana y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente.
  - 4.9) Se centrifugó a 13, 000 rpm por 30 segundos, para obtener finalmente el DNA purificado.
- 5) Se llevó a cabo la secuenciación de los 8 exones del gen *SLC30A8*. En la reacción de secuenciación se emplearon dos diferentes estrategias debido a que los fragmentos a secuenciar tenían diferentes longitudes (237-566 pb). Para los fragmentos menores de 260 pb se empleo el protocolo de Big Dye terminator v1.1 y el Big Dye terminator v3.1 para productos mayores a 260 pb (Applied Biosystems).

A partir de los productos de PCR purificados se preparó la reacción de secuenciación como a continuación se muestra:

Reactivo	Volumen ( $\mu$ L)
Big-Dye v1.1 o v3.1	1.0
Primer (F ó R)	1.0
Buffer 5X	3.5
H <sub>2</sub> O	12.5
Producto purificado	2

Empleando el siguiente programa en el termociclador:

96 °C	30 seg	} 25 Ciclos
95 °C	30 seg	
50 °C	10 seg	
60 °C	4 min	
72 °C	1 min	
4°C	∞	

Posteriormente se purificó la reacción de secuenciación empleando las columnas *Centri-sep* de Princeton Separation.

- 5.1) Se hidrataron las columnas de *Centri-sep* con 750 µL con agua inyectable, invirtiendo varias veces y mezclando con vortex para eliminar las burbujas de aire. Se almacenaron en el refrigerador por 2 horas.
  - 5.2) Se colocó la columna (*Centri-sep*) en un tubo colector de 2 ml, quitando el tapón inferior para eliminar el agua de la columna.
  - 5.3) Se centrifugó a 3,000 rpm por 2 minutos, para eliminar el agua.
  - 5.4) Se colocó la columna (*Centri-sep*) en un tubo de reacción de 1.5 mL y se adicionó la muestra en el centro de la membrana.
  - 5.5) Se centrifugó a 3,000 rpm por 1 minuto.
  - 5.6) Se secó de la muestra en el concentrador DNA por 30 minutos aproximadamente.
- 6) Se realizó la lectura de los fragmentos generados en la reacción de secuenciación con el secuenciador 3130xl Genetic Analyzer de Applied Biosystems. Para ello las muestras secas se resuspendieron en 15 µL de formamida ultrapura (Applied Biosystems), se incubó por 15 minutos. Se pasaron las muestras a la gradilla de secuenciación, se desnaturalizaron las muestras a 95° C por 2 minutos seguido de choque térmico metiéndolas en hielo. De esta manera las muestras están listas para su lectura.

7) Se analizaron los electroferogramas obtenidos mediante el programa SeqScape v2.6 de Applied Biosystems.

## 6.7 EXPRESIÓN DE *LOC387761*

En base a la relación que se encontró en el gen hipotético *LOC387761* con la DT2 en población mexicana en el presente estudio, se decidió realizar una búsqueda de la expresión del gen en diferentes tejidos. Para lo cual se diseñaron 3 diferentes oligos para la amplificación del mRNA de la secuencia XM\_373495.4, los cuales abarcaron todo el mRNA y la segunda mitad del mRNA. El ensayo de expresión partió de cDNA de humano del kit Human MTC Panel de Clontech Laboratories, el cual contiene cDNA de los siguientes tejidos: corazón, cerebro, placenta, pulmón, hígado, músculo esquelético, riñón y páncreas.

En el ensayo se emplearon los oligos para amplificar los dos fragmentos diferentes del gen *LOC387761* (inicio del exón 2 al exón 7 y el final del exón 2 al exón 7). Además, se incluyó a  $\beta$ -actina como gen constitutivo.

Mezcla de reacción para los genes  *$\beta$ -actina* y *LOC387761*:

Reactivo	Volumen ( $\mu$ L)
cDNA	5
Buffer	1
dNTP's	0.5
Oligo forward	0.25
Oligo reverse	0.25
Agua	3.0
Taq Polimerasa (Promega)	0.30

Oligos empleados:

Gen	Oligo forward	Oligo reverse
<i>β-actina</i>	GATGATGATATCGCCGCGCTCGTC	GTCCATCACGATGCCAGTGGTACG
LOC387761	GAGTTCCGAAAATTTGCCGTTGGT	TGCTTAAAGGACAAACCACCACCT
	CACAGGCATTTTCATGCTGAGGA	

Programa de PCR:

75° C	1 min	
Se adiciona la Taq polimerasa		
95° C	1 min	} 25 ciclos* 40 ciclos**
95° C	30 seg	
60° C* o 61°**	1 min	
72° C	1 min	
72° C	3 min	
4° C		

\**β-actina*  
\*\*LOC387761

## 6.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se hizo utilizando el programa SPSS 15.0. Para el estudio de asociación se aplicó la prueba de regresión logística lineal. La comparación de las frecuencias alélicas entre los grupos indígenas y los mestizos sanos se llevó a cabo con la prueba ji-cuadrada. En la comparación de parámetros bioquímicos y antropométricos se realizó con un modelo general lineal univariado ajustando por género, edad e IMC. Los valores de insulina y aquellos que no tenían una distribución normal fueron transformados con logaritmo base 10. El modelo aditivo compara los tres genotipos asignándole más valor a los homocigotos que a los heterocigotos con el alelo de riesgo. Mientras que el modelo dominante agrupa a los homocigotos y heterocigotos con el alelo de riesgo en un solo grupo sin diferenciarlos y los compara con el otro homocigoto (sin el alelo de riesgo).

El desequilibrio de ligamiento para los 3 SNP de *EXT2* se realizó con el programa Haploview versión 4.1. El tamaño de la muestra se calculó con el programa Quanto. Se utilizó la prueba de  $X^2$  para evaluar la suma de los alelos de riesgo de los SNPs analizados. El análisis se realizó agrupando por el número de alelos de riesgo de la siguiente manera 0-2 alelos, 3-4 alelos, 5-6 alelos y 7-8 alelos debido a que el número de individuos con 0, 1 y 2 es muy reducido.

## 7. RESULTADOS

Los datos obtenidos de las determinaciones bioquímicas y de las mediciones antropométricas de los DT2 y controles se resumen en la tabla 5, observándose diferencias en los parámetros bioquímicos entre los diabéticos y controles. Es interesante ver como dentro del grupo de los diabéticos, los de inicio temprano y tardío tienen particularmente diferencias significativas de concentraciones de glucosa. Por lo observado en el presente trabajo y reportes de otros estudios (Frayling y cols., 2003; Flavell y cols., 2005; Villareal-Molina y cols., 2008) que muestran estas diferencias entre los diabéticos de inicio temprano y tardío, surge el interés de evaluar la asociación genética en todos los diabéticos y estratificándolos por edad de diagnóstico, considerando un edad de corte de 45 años.

**Tabla 5.** Datos bioquímicos y antropométricos de los DT2 y los controles del estudio.

	DT2	DT2 TEMPRANO	DT2 TARDIO	CONTROL	P	P
N	455	276	179	234	-	-
Hombres	147	92	55	78	-	-
Mujeres	308	184	124	156	-	-
Edad de diagnóstico	43.2±11.96	35.5±6.47	55.2±8.01	-	-	-
IMC	28.5±4.99	28.5±5.24	28.5±4.58	26.8±3.82	2.1x10 <sup>-7</sup>	6.7x10 <sup>-19</sup> €
Glucosa (mg/dL)	189.9±89.89	200.2±95.89	174.7±77.46	86.9±9.17	1.4x10 <sup>-21</sup>	8.2x10 <sup>-21</sup> *
Colesterol (mg/dL)	203.1±48.97	200.5±50.20	207.2±47.02	213.4±46.23	0.006	9.1x10 <sup>-3</sup> ¥
Triglicéridos (mg/dL)	224.1±203.27	229.2±195.67	216.6±215.0	161.1±80.86	1.0x10 <sup>-5</sup>	1.9x10 <sup>-30</sup> €
Insulina (mUI/mL)	17.9±32.64	17.4±26.21	18.8±40.28	10.5±9.37	6.6x10 <sup>-5</sup>	6.0x10 <sup>-3</sup> €
Péptido C (ng/mL)	6.17±12.99	5.1±13.23	8.5±12.21	1.94±1.62	0.005	3.0x10 <sup>-3</sup> €

Los datos reportados representan la media±desviación estándar. El valor de P fue obtenido mediante la prueba de Mann-Whitney U comparando los DT2 vs controles. \*Diferencia entre los controles y DT2 de inicio temprano; controles y DT2 de inicio tardío; y DT2 de inicio temprano y DT2 de inicio tardío. € Diferencia entre los controles y DT2 de inicio temprano e inicio tardío. ¥ Diferencia entre los controles y DT2 de inicio temprano.

A continuación se muestran los resultados de los análisis de asociación que presentan un poder estadístico de 0.31-0.62 para cada SNP.

En la tabla 6 se observan las frecuencias genotípicas y los datos de la asociación de rs7903146 de *TCF7L2* en la población mexicana estudiada. El análisis de asociación de este SNP muestra que no existe asociación a la DT2 en todos los diabéticos o los diabéticos de inicio tardío. Sin embargo, se observa una asociación nominal en los diabéticos de inicio temprano (P=0.057; OR=1.775).

**Tabla 6.** Asociación del SNP rs7903146 de *TCF7L2* en población mexicana.

	Genotipo			Aditivo		Dominante	
	CC	CT	TT	P	OR (CI 95%)	P	OR (CI 95%)
<b>TODOS DT2</b>	162 (69.5)	69 (29.6)	2 (0.9)	<b>0.382</b>	1.242 (0.764-2.021)	<b>0.093</b>	1.621 (0.935-2.810)
<b>DT2 INICIO TEMPRANO</b>	114 (68.3)	51 (30.5)	2 (1.2)	<b>0.245</b>	1.350 (0.814-2.239)	<b>0.057</b>	1.775 (0.992-3.155)
<b>DT2 INICIO TARDIO</b>	48 (72.7)	18 (27.3)	0	<b>0.890</b>	0.955 (0.499-1.828)	<b>0.550</b>	1.265 (0.586-2.734)
<b>CONTROL</b>	79 (76.0)	19 (18.3)	6 (5.8)				

Datos de genotipo y el porcentaje entre paréntesis. El análisis se realizó por regresión logística multinomial ajustando por género e IMC. El análisis para rs7903146 solo contempla los sujetos recolectados en el Hospital Juárez de México, debido a que el resto de las muestras ya habían sido analizadas para este SNP por otro laboratorio.

En la tabla 7 se muestran las frecuencias alélicas y genotípicas para los grupos indígenas y mestizos sanos, no observándose diferencias estadísticamente significativas entre las frecuencias alélicas de rs7903146 de los grupos indígenas y los mestizos. El homocigoto (TT) para el alelo de riesgo no está presente en los indígenas.

**Tabla 7.** Distribución del SNP rs7903146 en los grupos indígenas y mestizos.

Grupo	Genotipo			Alelo		P
	CC	CT	TT	C	T	
Teenek	18 (78.3)	5 (21.7)	0	41 (89.1)	6 (10.9)	<b>0.49</b>
Purépecha	16 (76.2)	5 (23.8)	0	37 (88.1)	5 (11.9)	<b>0.63</b>
Mazahua	20 (83.3)	4(16.7)	0	44 (91.7)	4 (8.3)	<b>0.24</b>
Yaqui	8 (80.0)	2 (20.0)	0	18 (90.0)	2 (10.0)	<b>0.75</b>
Mestizo	79 (76.0)	19 (18.3)	6 (5.8)	177 (85.1)	31 (14.9)	

Frecuencias genotípicas y alélicas, entre paréntesis es el porcentaje. El valor de *P* fue obtenido mediante una  $\chi^2$  al comparar las frecuencias alélicas de los grupos indígenas y los mestizos sanos.

Con el fin de conocer algún efecto de los SNPs sobre los parámetros bioquímicos, IMC y en caso de los diabéticos la edad de diagnóstico. Cada grupo por separado (diabéticos y controles) se compararon los promedios de dichos parámetros entre los genotipos. Las tablas que se muestran solo corresponden a los controles, las tablas de diabéticos no se muestran porque no se observa diferencia significativa. El efecto de los SNPs sobre los parámetros bioquímicos e IMC puede observarse mejor en los controles porque los diabéticos se encuentran bajo tratamiento. La tabla 8 muestra que ninguno de los parámetros estudiados son afectados por el SNP rs7903146.

**Tabla 8.** Parámetros bioquímicos e IMC con el SNP rs7903146.

	Glucosa (mg/dL)	Colesterol (mg/dL)	Triglicéridos (mg/dL)	Insulina (mUI/mL)	IMC (Kg/m <sup>2</sup> )
CT/TT	83.6±10.58	204.0±25.87	145.2±60.17	4.3±2.17	26.4±2.10
CC	87.6±9.92	210.3±43.64	164.6±100.90	4.9±2.16	26.2±3.59
<b>P</b>	<b>0.067</b>	<b>0.475</b>	<b>0.463</b>	<b>0.624</b>	<b>0.475</b>
CC	87.6±9.92	210.3±43.64	168.3±103.94	4.9±2.16	26.7±3.74
CT	82.3±10.28	207.4±40.52	151.3±88.96	4.2±2.39	25.6±2.95
TT	88.2±8.65	204.0±25.87	145.3±60.17	4.8±1.53	26.4±2.10
<b>P</b>	<b>0.066</b>	<b>0.708</b>	<b>0.516</b>	<b>0.849</b>	<b>0.430</b>

Los datos representan la media±DE. Los valores de *P* son de un modelo general lineal univarido ajustando por género, edad e IMC.



Las frecuencias genotípicas y los datos de asociación del SNP rs13266634 de *SLC30A8* se encuentran en la tabla 9. Se observa que no hay asociación del SNP y la DT2. La tabla 10 muestra las frecuencias alélicas y genotípicas de los grupos indígenas y los mestizos sanos. Los Teeneks, Purépechas y Mazahuas tienen frecuencias alélicas similares a los mestizos, mientras que los Yaquis presentan una mayor frecuencia del alelo C en comparación con los mestizos.

**Tabla 9.** Asociación del SNP rs13266634 de *SLC30A8* en población mexicana.

	Genotipo			Aditivo		Dominante	
	CC	CT	TT	P	OR (CI 95%)	P	OR (CI 95%)
<b>TODOS DT2</b>	240 (55.3)	169 (38.9)	25 (5.8)	<b>0.961</b>	1.007 (0.764-1.327)	<b>0.496</b>	1.270 (0.638-2.526)
<b>DT2 INICIO TEMPRANO</b>	150 (57.0)	101 (38.4)	12 (4.6)	<b>0.684</b>	1.066 (0.783-1.453)	<b>0.286</b>	1.557 (0.690-3.513)
<b>DT2 INICIO TARDIO</b>	90 (52.3)	69 (40.1)	13 (7.6)	<b>0.624</b>	0.924 (0.661-1.291)	<b>0.854</b>	0.926 (0.411-2.087)
<b>CONTROL</b>	122 (56.0)	81 (37.2)	15 (6.9)				

Datos de genotipo y entre paréntesis el porcentaje correspondiente. El análisis se realizó por regresión logística multinomial ajustando por género e IMC.

**Tabla 10.** Distribución del SNP rs13266634 en grupos indígenas y mestizos.

Grupo	Genotipo			Alelo		P
	CC	CT	TT	C	T	
<b>Teenek</b>	13 (61.9)	8 (38.1)	0	34 (81.0)	8 (19.0)	<b>0.32</b>
<b>Purépecha</b>	11(55.0)	9(45.0)	0	31 (77.5)	9 (22.5)	<b>0.63</b>
<b>Mazahua</b>	10(40.0)	14 (56.0)	1 (4.0)	34 (68.0)	16 (32.0)	<b>0.35</b>
<b>Yaqui</b>	10 (90.9)	1(9.1)	0	21 (95.5)	1 (4.5)	<b>0.02</b>
<b>Mestizo</b>	122 (56.0)	81(37.2)	15 (6.9)	325 (74.5)	111 (25.5)	

Frecuencia genotípicas y alélicas, el porcentaje entre paréntesis. El valor *P* fue obtenido mediante una  $\chi^2$  al comparar las frecuencias de los grupos indígenas y los mestizos sanos.

Los parámetros bioquímicos e IMC en los mestizos sanos de acuerdo al genotipo de rs13266634 se observan en la tabla 11. El SNP rs13266634 no afecta los parámetros bioquímicos e IMC en población mexicana.

**Tabla 11.** Parámetros bioquímicos e IMC con el SNP rs13266634.

	Glucosa (mg/dL)	Colesterol (mg/dL)	Triglicéridos (mg/dL)	Insulina (mUI/mL)	IMC (Kg/m <sup>2</sup> )
CC/CT	83.9±7.11	210.1±45.66	162.1±78.72	7.6±2.14	26.9±3.86
TT	87.1±8.72	206.8±55.48	132.8±85.51	7.6±2.41	25.9±2.75
<b>P</b>	<b>0.417</b>	<b>0.496</b>	<b>0.251</b>	<b>0.696</b>	<b>0.221</b>
CC	86.7±9.92	212.3±46.19	156.4±72.44	7.7±2.06	26.7±3.47
CT	87.5±7.97	207.0±45.00	170.2±86.92	7.4±2.77	27.3±4.35
TT	83.8±7.11	206.8±55.48	132.8±85.51	7.6±2.41	25.9±2.75
<b>P</b>	<b>0.654</b>	<b>0.582</b>	<b>0.311</b>	<b>0.768</b>	<b>0.232</b>

Los datos representan la media±DE. Los valores de *P* son de un modelo general lineal univarido ajustando por género, edad e IMC.

En la región ligada a los genes *HHEX/IDE* se reportaron dos SNPs asociados a la DT2: rs1111875 y rs7923837. Sin embargo, el ensayo para rs7923837 no pudo ser validado, por ello solo se presentan los resultados para rs1111875. En la tabla 12 se muestran las frecuencias genotípicas y los valores de asociación del SNP rs1111875 de *HHEX/IDE*, donde se observa que este SNP no contribuye con la susceptibilidad de la DT2 en población mexicana.

Al analizar la edad de diagnóstico entre los 3 genotipos de rs1111875 en los diabéticos, se observó en los sujetos con el alelo G tienen una edad de inicio menor en comparación con los que presentan el alelo C (42 años de edad, *P*=0.046). Realizándose un nuevo análisis de asociación considerando inicio temprano, diabéticos igual o menor de 42 años de edad, pero no se observó asociación (*P*=0.169).

**Tabla 12.** Asociación del SNP rs1111875 de *HHEX/IDE* en población mexicana.

	Genotipo			<i>P</i>	Aditivo		Dominante	
	CC	CT	TT		OR (CI 95%)	<i>P</i>	OR (CI 95%)	
<b>TODOS DT2</b>	168 (38.8)	205 (47.3)	60 (13.9)	<b>0.367</b>	1.121 (0.875-1.436)	<b>0.475</b>	1.888 (0.741-1.904)	
<b>DT2 INICIO TEMPRANO</b>	108 (40.9)	127 (48.1)	29 (11.0)	<b>0.115</b>	1.253 (0.947-1.658)	<b>0.110</b>	1.569 (0.903-2.728)	
<b>DT2 INICIO TARDIO</b>	61 (35.9)	78 (45.9)	31 (18.2)	<b>0.826</b>	0.966 (0.713-1.310)	<b>0.549</b>	1.187 (0.677-2.082)	
<b>CONTROL</b>	75 (35.0)	104 (48.6)	35 (16.4)					

Datos de genotipo y entre paréntesis el porcentaje correspondiente. El análisis se realizó por regresión logística multinomial ajustando por género e IMC.

Las frecuencias alélicas, genotípicas y el valor de *P* al comparar las frecuencias alélicas de los grupos indígenas y los mestizos se muestran en la tabla 13. Los grupos indígenas y los mestizos no difieren significativamente en las frecuencias alélicas de rs1111875.

**Tabla 13.** Distribución del SNP rs1111875 en grupos indígenas y mestizos.

Grupo	Genotipo			Alelo		<i>P</i>
	CC	CT	TT	C	T	
<b>Teenek</b>	8 (33.3)	13 (54.2)	3 (12.5)	29 (60.4)	19 (39.6)	<b>0.85</b>
<b>Purépecha</b>	7 (35.0)	11 (55.0)	2 (10.0)	25 (62.5)	15 (37.5)	<b>0.67</b>
<b>Mazahua</b>	11 (44.0)	12 (48)	2 (8.0)	34 (68.0)	16 (32.0)	<b>0.22</b>
<b>Yaqui</b>	2 (22.2)	4 (44.4)	3 (33.3)	8 (44.4)	10 (55.6)	<b>0.21</b>
<b>Mestizo</b>	75 (35.0)	104 (48.6)	35 (16.4)	254 (59.3)	174 (40.7)	

Frecuencias genotípicas y alélicas, entre paréntesis corresponde al porcentaje. El valor de *P* fue obtenido mediante una  $\chi^2$  al comparar las frecuencias alélicas de los grupos indígenas y los mestizos sanos.

Los parámetros bioquímicos e IMC de sujetos sanos de acuerdo al genotipo de rs1111875 se encuentran en la tabla 14. La concentración de glucosa y colesterol parecen estar afectados por rs1111875, a pesar de no tener asociación con la

DT2. Es necesario aumentar el tamaño de la muestra para descartar su participación en la susceptibilidad a la DT2.

**Tabla 14.** Parámetros bioquímicos e IMC con el SNP rs1111875.

	Glucosa (mg/dL)	Colesterol (mg/dL)	Triglicéridos (mg/dL)	Insulina (mUI/mL)	IMC (Kg/m <sup>2</sup> )
CC/CT	87.5±8.25	214.9±43.11	159.5±74.96	7.5±2.38	26.9±3.91
TT	82.6±9.89	193.0±46.65	145.3±79.96	7.8±2.00	26.9±3.30
<b>P</b>	<b>0.003</b>	<b>0.012</b>	<b>0.302</b>	<b>0.661</b>	<b>0.884</b>
CC	88.6±8.6	215.3±39.84	157.2±67.66	7.3±2.37	26.7±3.91
CT	86.6±7.88	214.7±45.42	161.2±80.23	7.6±2.40	27.1±3.92
TT	82.6±9.89	193.0±46.65	145.4±79.24	7.8±2.00	26.9±3.30
<b>P</b>	<b>0.004</b>	<b>0.035</b>	<b>0.578</b>	<b>0.881</b>	<b>0.816</b>

Los datos representan la media±DE. Los valores de *P* son de un modelo general lineal univarido ajustando por género, edad e IMC.

En la tabla 15 se observan las frecuencias genotípicas y los valores de significancia de la asociación de rs7480010 en la población mexicana estudiada. Se encontró asociación entre el SNP de *LOC387761* rs7480010 y la DT2 en ( $P=0.019$ ,  $OR=0.702$  [0.523-0.944]). Al hacer el análisis de asociación por separando a los diabéticos de acuerdo a la edad de diagnóstico se observó asociación en los dos grupos, siendo más fuerte la significancia de la asociación en los diabéticos de inicio tardío que en los de inicio temprano ( $P=0.007$ ,  $P=0.020$ , respectivamente).

**Tabla 15.** Asociación del SNP rs7480010 de *LOC387761*.

	Genotipo			<i>P</i>	Aditivo OR (CI 95%)	<i>P</i>	Dominante OR (CI 95%)
	AA	AG	GG				
<b>TODOS DT2</b>	300 (68.1)	125 (28.3)	16 (3.6)	<b>0.019</b>	1.429 (1.054-1.936)	<b>0.004</b>	1.594 (1.113-2.283)
<b>DT2 INICIO TEMPRANO</b>	178 (66.7)	80 (30.0)	9 (3.4)	<b>0.057</b>	1.230 (0.828-1.827)	<b>0.020</b>	1.365 (0.872-2.135)
<b>DT2 INICIO TARDIO</b>	123 (70.3)	45 (25.7)	7 (4.0)	<b>0.022</b>	1.581 (1.068-2.340)	<b>0.007</b>	1.829 (1.162-2.878)
<b>CONTROL</b>	121 (55.3)	90 (41.1)	8 (3.7)				

Datos de genotipo y entre paréntesis el porcentaje correspondiente. El análisis se realizó por regresión logística multinomial ajustando por género e IMC.

En la siguiente tabla se muestra las frecuencias alélicas, genotípicas y el valor de *P* al comparar las frecuencias alélicas de los grupos indígenas y los mestizos sanos del SNP rs7480010. Los Teneeks y Mazahuas tienen frecuencias significativamente mayores del alelo de riesgo G que los mestizos (91.7% y 98.0%).

**Tabla 16.** Distribución del SNP rs7480010 en grupos indígenas y mestizos.

Grupo	Genotipo			Alelo		P
	AA	AG	GG	A	G	
<b>Teenek</b>	20 (83.3)	4 (16.7)	0	44 (91.7)	4 (8.3)	<b>0.018</b>
<b>Purépecha</b>	15 (71.4)	5 (23.8)	1 (4.8)	35 (83.3)	7 (16.7)	<b>0.33</b>
<b>Mazahua</b>	24 (96.0)	1 (4.0)	0	49 (98.0)	1 (2.0)	<b>0.0005</b>
<b>Yaqui</b>	9 (60.0)	4 (26.7)	2 (13.3)	22 (73.3)	8 (26.7)	<b>0.65</b>
<b>Mestizo</b>	121 (55.3)	90 (41.1)	8 (3.7)	332 (75.8)	106 (24.2)	

Frecuencias genotípicas y alélicas, entre paréntesis corresponde al porcentaje. El valor de *P* fue obtenido mediante una  $\chi^2$  al comparar las frecuencias alélicas de los grupos indígenas y los mestizos sanos.

El SNP rs7480010 se relacionó con los parámetros bioquímicos (Tabla17) tales como colesterol, triglicéridos e insulina. Los sujetos con el genotipo AA presentan concentraciones más elevadas de colesterol y triglicéridos que los individuos con genotipos GA y GG ( $P=0.013$  y  $P=0.027$ , respectivamente, datos no mostrados en la tabla). En la insulina los individuos con el genotipo AA tienen concentraciones más bajas que los individuos con genotipo GA o GG. Al estratificar al grupo de los diabéticos por genotipo, se observó diferencia significativa en el IMC entre los genotipos. Los diabéticos con genotipo AA y AG tienen mayor IMC 28.7 Kg/m<sup>2</sup> y 28.3 Kg/m<sup>2</sup> que los individuos con GG 25.0 Kg/m<sup>2</sup>.

**Tabla 17.** Parámetros bioquímicos e IMC con el SNP rs7480010 de *LOC38776*.

	Glucosa (mg/dL)	Colesterol (mg/dL)	Triglicéridos (mg/dL)	Insulina (mUI/mL)	IMC (Kg/m <sup>2</sup> )
AG/AA	86.7±8.73	212.6±46.0	153.5±69.35	7.5±2.10	26.8±3.86
GG	88.3±12.11	200.2±27.22	146.33±118.1	14.6±1.98	27.8±2.13
<b>P</b>	<b>0.759</b>	<b>0.517</b>	<b>0.704</b>	<b>0.029</b>	<b>0.155</b>
AA	86.9±8.83	219.8±47.66	166.6±76.70	7.9±2.05	27.1±3.76
AG	86.0±8.61	202.3±41.72	139.8±62.44	7.1±2.15	26.8±3.98
GG	88.3±12.11	200.2±27.22	146.3±118.14	14.6±1.98	27.8±2.13
<b>P</b>	<b>0.772</b>	<b>0.046</b>	<b>0.054</b>	<b>0.097</b>	<b>0.146</b>

Los datos representan la media±DE. Los valores de *P* son de un modelo general lineal univariado ajustando por género, edad e IMC.

Con base en los resultados de asociación con la DT2 y su relación con los parámetros bioquímicos se realizó una búsqueda de la expresión del gen *LOC387761* en el kit Human MTC Panel (Clontech Laboratories) que contiene cDNA de humano de los siguientes tejidos: hígado, riñón, intestino, páncreas, placenta, músculo esquelético y pulmón. La expresión del gen *LOC387761* en los 8 tejidos empleados no se pudo identificar, se utilizó el gen constitutivo *β-actina* como control positivo del ensayo (Figura 6 y 7).

**Figura 6.** Expresión de *LOC387761*.



Marcador de tamaño (pb); 2. Corazón; 3 Cerebro.; 4. Placenta; 5. Pulmón; 6. Hígado; 7. Músculo esquelético; 8. Riñón; 9. Páncreas; 10. Control Positivo; 11. Control negativo  
Juego No. Oligos: 517 pb; Juego No. 2: 338 pb

**Figura 7.** Expresión de  $\beta$ -actina.



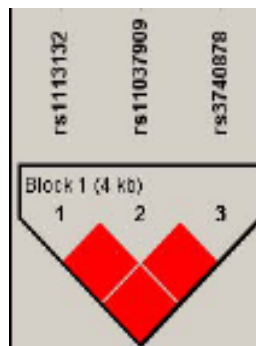
Marcador de tamaño (pb); 2. Corazón; 3 Cerebro.; 4. Placenta; 5. Pulmón; 6. Hígado; 7. Músculo esquelético; 8. Riñón; 9. Páncreas; 10. Control Positivo; 11. Control negativo

Los tres SNPs de *EXT2*: rs3740878, rs11037909 y rs1113132, se encuentran en el mismo bloque haplotípico, es decir siempre segregaran de forma dependiente ( $r^2 > 0.9$ , Tabla 18). La figura 8 ilustra el alto desequilibrio de ligamiento (DL) al estar todos en color rojo, de acuerdo al programa utilizado (Haploview). Por ello solo se reportó el análisis de asociación para uno de los tres SNPs (rs3740878).

**Tabla 18.** Análisis de desequilibrio de ligamiento de los SNPs de *EXT2*: rs3740878, rs11037909 y rs1113132.

L1	L2	$r^2$
rs1113132	rs11037909	0.987
rs1113132	rs3740878	0.987
rs11037909	rs3740878	1

**Figura 8.** Representación gráfica del desequilibrio de ligamiento de los SNPs de *EXT2* rs3740878, rs11037909 y rs1113132.



En la tabla 19 se observa las frecuencias genotípicas y el valor de *P* de la asociación del SNP rs3740878 en población mexicana, no se observa asociación con este SNP y la DT2.

**Tabla 19.** Asociación del SNP rs3740878 *EXT2* en población mexicana.

	Genotipo			Aditivo		Dominante	
	AA	AG	GG	<i>P</i>	OR (CI 95%)	<i>P</i>	OR (CI 95%)
<b>TODOS DT2</b>	61 (14.3)	193 (45.1)	174 (40.7)	<b>0.125</b>	0.828 (0.651-1.054)	<b>0.264</b>	1.222 (0.860-1.739)
<b>DT2 INICIO TEMPRANO</b>	37 (14.1)	118 (45.0)	107 (40.8)	<b>0.127</b>	0.813 (0.622-1.061)	<b>0.327</b>	1.214 (0.824-1.789)
<b>DT2 INICIO TARDIO</b>	24 (14.4)	76 (45.5)	67 (40.1)	<b>0.298</b>	0.853 (0.632-1.151)	<b>0.361</b>	1.229 (0.790-1.912)
<b>CONTROL</b>	43 (20.0)	96 (44.7)	76 (35.3)				

Datos de genotipo y entre paréntesis el porcentaje correspondiente. El análisis se realizó por regresión logística multinomial ajustando por género e IMC.

La tabla 20 muestra las frecuencias genotípicas y alélicas del SNP rs3740878, al comparar las frecuencias alélicas de los mestizos y los grupos indígenas, se observa que los Teeneks y Mazahuas tienen frecuencias significativamente mayores del alelo G que los mestizos (72.9%; 80.0%, respectivamente).

**Tabla 20.** Distribución del SNP rs3740878 en grupos indígenas y mestizos.

Grupo	Genotipo			Alelo		<i>P</i>
	AA	AG	GG	A	G	
<b>Teenek</b>	2 (8.3)	9 (37.5)	13 (54.2)	13 (27.1)	35 (72.9)	<b>0.04</b>
<b>Purépecha</b>	3 (14.3)	13 (61.9)	5 (23.8)	19 (45.2)	23 (54.8)	<b>0.72</b>
<b>Mazahua</b>	1 (4.0)	8 (32.0)	16 (64.0)	10 (20.0)	40 (80.0)	<b>0.002</b>
<b>Yaqui</b>	2 (20.0)	4 (40.0)	4 (40.0)	8 (40.0)	12 (60.0)	<b>0.83</b>
<b>Mestizo</b>	43 (20.0)	96 (44.7)	76 (35.3)	182 (42.3)	248 (57.7)	

Frecuencias genotípicas y alélicas, entre paréntesis corresponde al porcentaje. El valor de *P* fue obtenido mediante una  $\chi^2$  al comparar las frecuencias alélicas de los grupos indígenas y los mestizos sanos.



La comparación de los parámetros bioquímicos e IMC de acuerdo a los genotipos de rs3740878 se muestran en la tabla 21. Las concentraciones de glucosa, colesterol y triglicéridos e IMC no son diferentes en los genotipos de rs3740878 en controles.

**Tabla 21.** Parámetros bioquímicos e IMC con el SNP rs3740878.

	Glucosa (mg/dL)	Colesterol (mg/dL)	Triglicéridos (mg/dL)	Insulina (mUI/mL)	IMC (Kg/m <sup>2</sup> )
AA/AG	86.8±44.05	216.0±46.67	158.9±74.63	7.6±2.26	27.1±3.87
GG	87.0±46.60	210.0±49.43	148.2±72.56	8.3±1.98	26.6±3.68
<b>P</b>	<b>0.715</b>	<b>0.459</b>	<b>0.428</b>	<b>0.382</b>	<b>0.417</b>
AA	86.1±40.02	220.3±50.69	149.7±61.90	6.4±2.19	27.1±4.16
AG	87.1±45.80	214.3±45.01	162.8±79.46	8.1±2.28	27.1±3.77
GG	87.0±46.60	210.0±49.43	148.2±72.56	8.3±1.98	26.6±3.69
<b>P</b>	<b>0.859</b>	<b>0.686</b>	<b>0.473</b>	<b>0.255</b>	<b>0.720</b>

Los datos representan la media±DE. Los valores de *P* son de un modelo general lineal univarido ajustando por género, edad e IMC.

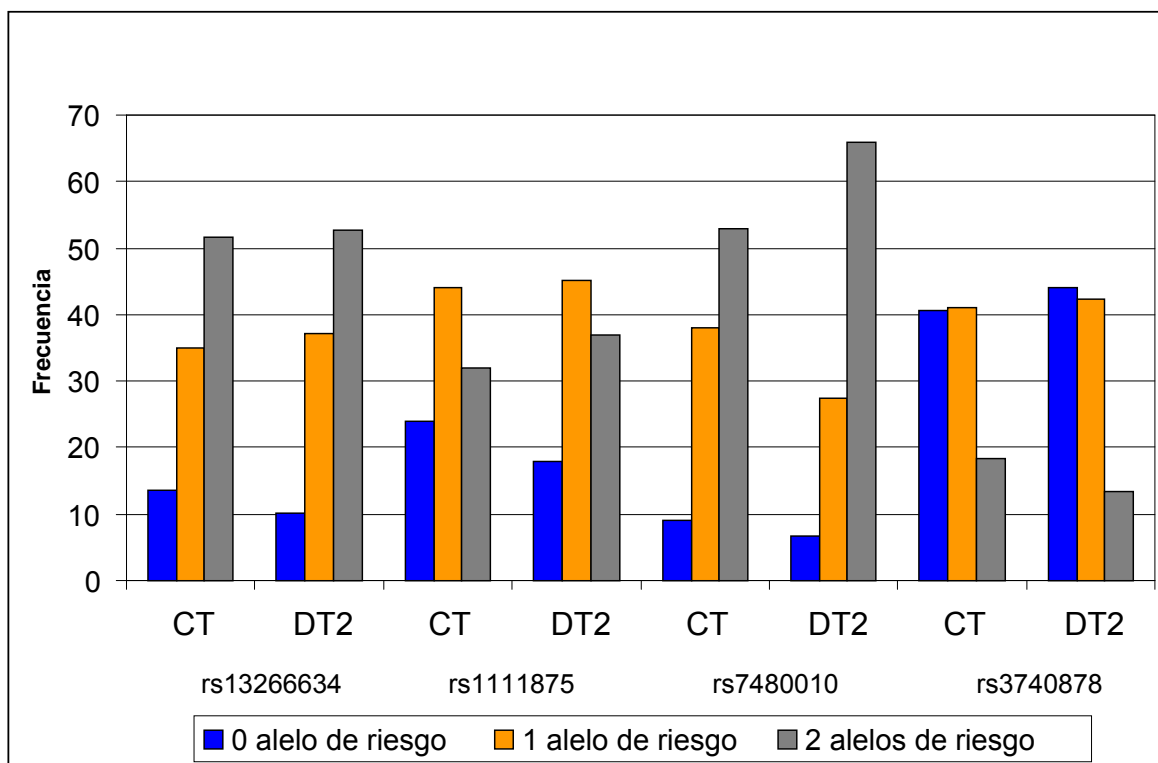
Se han asociado varios SNPs a las enfermedades poligénicas, que contribuyen levemente a la predisposición a la enfermedad, con razones de momios (OR) menores de 1.5. Estos alelos de riesgo de los SNPs presentan penetrancia baja y pueden explicar la compleja composición genética de las enfermedades multifactoriales (Reich y Landers, 2001). Algunos estudios teóricos previos han demostrado la utilidad potencial de combinar múltiples variantes con baja penetrancia para predecir enfermedades complejas (Yang y cols., 2003). Existen trabajos que han estudiado la combinación de variantes agrupando por número de alelos de riesgo (Weedon y cols., 2006; Scott y cols., 2006). Por lo tanto, para evaluar la suma de los alelos de riesgo en el desarrollo de la diabetes en la población mexicana se compararon a los diabéticos y los controles agrupándolos por el número de alelos de riesgo entre los 4 SNPs (rs13266634, rs1111875, rs7480010 y rs3740878). Aproximadamente 50% de las muestras empleadas para este estudio fueron utilizadas por otro laboratorio para la evaluación del SNP rs7903146 de *TCF7L2*, para no sesgar el análisis de la suma de los SNPs no se

consideró a dicho SNP. La agrupación por número de alelos de riesgo conduce a una reducción importante del tamaño de la muestra en algunos grupos por lo que el análisis se hizo agrupando a más de un grupo de alelo de riesgo, el poder estadístico para estos análisis son de 0.73 a 0.93. En la gráfica 1 se observa que los alelos de riesgo más comunes corresponden a los polimorfismos rs13266634 y rs7480010.

**Tabla 22.** Distribución de los alelos de riesgo en diabéticos y controles.

No. de alelos de riesgo	DT2	CT
0	9 (2.0)	9 (3.9)
1	0 (0.0)	5 (2.2)
2	13 (2.9)	10 (4.4)
3	37 (8.1)	21 (9.2)
4	99 (21.8)	46 (20.1)
5	135 (29.7)	65 (28.4)
6	117 (25.7)	44 (19.2)
7	40 (8.8)	23 (10.0)
8	5 (1.1)	6 (2.6)

**Gráfica 1.** Frecuencia de los alelos de riesgo para los SNPs.



Las agrupaciones que se emplearon y su análisis se encuentran en las tablas 23, 24 y 25. Al comparar los individuos con 0-2 alelos de riesgo contra los que tienen 3-4 alelos de riesgo se observó asociación a la diabetes  $P=0.015$  (Tabla 23). Es mayor el valor estadístico para la asociación cuando los diabéticos tienen de 5-6 alelos de riesgo  $P=0.003$  (Tabla 24). Sin embargo, no se observa asociación cuando los sujetos tienen de 7-8 alelos de riesgo (Tabla 25).

**Tabla 23.** Asociación entre la diabetes y 3-4 alelos de riesgo.

No. de Alelos	DT2	CT	<i>P</i>	OR	IC 95%
3-4	136 (86.1)	67 (73.6)	0.015	2.214	1.158-4.234
0-2	22 (13.9)	24 (26.4)			

El valor de *P* se obtuvo por  $\chi^2$ .

**Tabla 24.** Asociación entre la diabetes y 5-6 alelos de riesgo.

No. de Alelos	DT2	CT	<i>P</i>	OR	IC 95%
5-6	252 (92.0)	109 (82.0)	0.003	2.522	1.356-4.691
0-2	22 (8.0)	24 (18.0)			

El valor de *P* se obtuvo por  $\chi^2$ .

**Tabla 25.** Asociación entre la diabetes y 6-7 alelos de riesgo.

No. de Alelos	DT2	CT	<i>P</i>	OR	IC 95%
7-8	45 (67.2)	29 (54.7)	0.164	1.693	0.805-3.560
0-2	22 (32.8)	24 (45.3)			

El valor de *P* se obtuvo por  $\chi^2$ .

Dentro de los SNPs que se estudiaron el SNP de *SLC30A8* es el único que se encuentra en una región codificante. De ahí surge el interés en su secuenciación de la toda la región codificante. Los resultados de secuenciación de los ocho exones de *SLC30A8* en 25 diabéticos de inicio temprano, se analizaron con el programa SeqScape v3.2 de Applied Biosystems. En SeqScapev3.2 se introduce la secuencia reportada por el Pubmed y los electroferogramas obtenidos, para comparar ambas secuencias e identificar algún cambio (Figura 9).

Figura 9. Análisis de electroferogramas por el programa SeqScape v3.2.



De las variantes reportadas en el HapMap: una en el éxon 1 y dos en el exón 8, se observó solo las del exón 8 y no se identificaron nuevas variantes dentro de la región codificante. Al no encontrar otros SNPs no se continuó con la búsqueda.

## 8. DISCUSIÓN

La diabetes es un problema de salud pública en México con un evidente componente genético. El estudio de la genética de la DT2 ha sido complicado porque los estudios genéticos que se han hecho a la fecha no han permitido identificar a todos los genes involucrados en su etiología. En los últimos años se han implementado nuevas estrategias como los estudios de asociación de todo el genoma (GWAS) para la identificación de nuevos genes. Sin embargo, estos estudios son muy costosos por ello solo los han realizado algunas poblaciones, principalmente poblaciones caucásicas. Tomando ventaja de los resultados de los GWAS, el presente trabajo evaluó la participación de SNPs de los genes que fueron recientemente asociados a la DT2.

El SNP rs7480010 de *LOC387761* se asoció a la DT2 en la población mexicana, el cual ha sido asociado en un GWAS en franceses (Sladek y cols., 2007) y con asociación nominal en finlandeses (Scott y cols., 2007). En otros GWAS realizados en ingleses y norteamericanos (Zegginni y cols., 2007; Saxena y cols., 2007), o estudios de asociación en japoneses no se encontró asociación con rs7480010 y la DT2 (Horikoshi y cols., 2007; Omori y cols., 2008). En población francesa el alelo G de rs7480010 es el alelo de riesgo. Sin embargo, con base en los resultados obtenidos en población mexicana, el alelo de riesgo asociado a la DT2 es el alelo A. Así mismo, se observa que los sujetos con el genotipo AA tienen mayores concentraciones de triglicéridos y colesterol. En este sentido, los niveles elevados de triglicéridos se han propuesto en varios estudios como factor de riesgo a la DT2 (Dotevall y cols., 2004; Perry y cols., 1995; Schmidt y cols., 2005; Tirosh y cols., 2008). Los niveles de triglicéridos circulantes representan el balance de la síntesis de triglicéridos y su utilización. Consistentemente, los niveles elevados de triglicéridos van acompañados de concentraciones bajas de HDL, lo cual ha mostrado ser un verdadero marcador de resistencia a la insulina, constituyendo un evidente factor de predisposición a la DT2 (McLaughlin y cols., 2005). Además, los niveles altos de ácidos grasos libres derivados potencialmente

de los triglicéridos pueden deteriorar la sensibilidad y/o la secreción de la insulina (Boden y cols., 2002; Yaney y cols. 2003). A pesar de que han observado niveles elevados de colesterol total en diabéticos, no se ha establecido como factor de riesgo en la DT2. Los niveles elevados de colesterol, particularmente LDL, son bien reconocidos como factor de riesgo para enfermedades cardiovasculares. Hao y cols. (2007) observaron en células beta de ratón que los niveles elevados de colesterol están directamente relacionados a una falla en la secreción de insulina. Sin embargo, se requieren realizar más estudios respecto al papel que desempeñan las concentraciones elevadas de triglicéridos y colesterol y su relación con la variante rs7480010. Los niveles bajos de insulina en los controles con el alelo de riesgo A demuestran una baja actividad secretora en comparación con los controles sin el alelo de riesgo A. Estas diferencias en los parámetros bioquímicos no se observaron en los diabéticos posiblemente por el manejo terapéutico de las alteraciones metabólicas implicadas en la enfermedad. Por otro lado, el alelo de riesgo A de rs7480010 también se asoció a IMC elevados en los diabéticos, índice que mide obesidad, el cual representa un factor de riesgo de DT2. La obesidad no se asoció a la variante rs7480010 ( $P=0.10$ , dato no reportado).

Existe otro estudio, en población hispano-americana que también muestra esta discrepancia del alelo de riesgo entre poblaciones de origen hispano y europeo, el cual reportó al alelo G de rs7480010 (de riesgo para los caucásicos) como alelo protector, porque se asoció a una elevada liberación de insulina en respuesta a glucosa (Palmer y cols., 2008). Este tipo de asociaciones con alelos de riesgo diferentes se les conoce como asociaciones flip-flop, las cuales son poco comunes y sus resultados están en tela de juicio cuando son de dos estudios independientes de una misma población. En diferentes poblaciones se puede explicar por ser diferentes poblaciones y a efectos heterogéneos de la misma variante debido a diferencias genéticas o ambientales (Lin P y cols., 2007). Por otra parte, esta variante podría encontrarse en desequilibrio de ligamiento con alguna otra variante funcional y representar solo un marcador, ya que no es un cambio funcional. Por ello, se requieren realizar más estudios con el fin de conocer

la contribución de la región cercana a la variante rs7480010 en los niveles de triglicéridos y colesterol que se observaron en el presente trabajo e identificar si esto se relaciona a la susceptibilidad a la DT2.

Di Rienzo y Hudson (2005) propusieron la hipótesis de la adaptación de los alelos ancestrales al ambiente de las poblaciones antiguas tal como periodos de hambruna para poder sobrevivir. Pero que en el estilo de vida actual, la falta de actividad física y exceso de alimentación, estos alelos pueden incrementar el riesgo en las enfermedades. De demostrarse que el alelo A de rs7480010 fuera un marcador de una variante funcional implicada en DT2, la elevada frecuencia del alelo ancestral A de la variante rs7480010 observada en los grupos indígenas particularmente en Teenek y Mazahuas sugiere una herencia indígena de susceptibilidad a la DT2, por ser los representantes de las poblaciones antiguas que dieron origen a los mestizos mexicanos. Se requieren estudios que nos permitan apoyar esta hipótesis.

El gen *LOC387761* es un gen hipotético, lo cual implica que es una región dentro del genoma que parece ser un gen por ciertas características como marco de lectura abierta, con tamaño adecuado, sitios de probable corte y empalme y que parece codificar a una proteína dada. En base a lo anterior la expresión de *LOC387761* no se logró por las siguientes tres posibles causas: 1) el diseño de los oligos no fue el adecuado, ya que el mRNA, ADN y la proteína son predicciones; 2) esta región no codifica para una proteína; 3) la región de *LOC387761* no es en realidad un gen.

La variante de *TCF7L2* rs7903146 se asoció de manera nominal a la DT2 de inicio temprano en población mexicana, dichos resultados concuerdan con lo reportado en Méxicoamericanos donde se observa asociación con la DT2 y con una edad de inicio menor en los sujetos con el alelo de riesgo T (Lehman y cols., 2007) y con poblaciones de otros orígenes como asiático, europeo, africano y norteamericano (Grant y cols., 2006; Sladek y cols., 2007; Zeggini y cols., 2007; Scott y cols.,



2007; Chandrak y cols., 2007; Horikoshi y cols., 2007; Hayashi y cols., 2007; Helgason y cols., 2007).

Existe otro estudio en mexicanos que no muestra asociación con la DT2. En dicho trabajo no reportan la edad de diagnóstico de los diabéticos, por lo que no se sabe si la falta de asociación se deba a que los individuos eran diabéticos tipo 2 de inicio tardío (Parra y cols., 2007). A pesar de ello, hasta el momento el SNP rs7903146 es considerado como el SNP más ampliamente asociado a la DT2.

La variante rs1111875 de *HHEX* no fue asociada a la DT2 en población mexicana al igual que en afroamericanos, indios Pima y judíos Ashkenazi (Lewis y cols., 2008; Rong y cols., 2008; Bronstein y cols., 2008) y hasta el momento solo ha sido asociada en caucásicos y asiáticos (Grarup y cols., 2007; Van VlietOstapcho y cols., 2008; Furukawa y cols., 2008; Horikoshi y cols., 2008; Omori y cols., 2007; Sladek y cols., 2007; Zeggini y cols., 2007; Scott y cols., 2007). En el presente estudio, la variante rs1111875 parece estar involucrada en la susceptibilidad a la DT2 de inicio temprano, probablemente la falta de asociación se deba a disminución del tamaño de muestra de diabéticos de inicio temprano (Poder estadístico obtenido 0.72). Los resultados sugieren que *HHEX/IDE* pudiera estar involucrada en la homeostasis de la glucosa y el metabolismo de colesterol al asociarse concentraciones plasmáticas de glucosa y colesterol elevadas en sujetos control con el alelo de riesgo (CC y CT) vs. los sujetos sin alelo de riesgo (TT). Por lo tanto, es necesario realizar más estudios para evaluar esta hipótesis.

De manera similar que a los afroamericanos, holandeses y daneses el SNP de *SLC30A8* rs13266634 no se asoció a la DT2 en mexicanos (Lewis y cols., 2008; Steinthorsdottir y cols., 2007). A pesar de que el tamaño de muestra obtenido no fue el adecuado para determinar su asociación (Poder estadístico  $P_E = 0.44$ ), el estudio nos permite observar que no existe variación entre las frecuencias de los controles contra los diabéticos con este tamaño de muestra.

Por otro lado la variante rs3740878 de *EXT2* que fue relacionada a la DT2 solo en franceses (Sladek y cols., 2007). Esta variante se ha estudiado en pocas poblaciones como en finlandeses, suecos y chinos, pero al igual que en población mexicana se ha encontrado que las otras dos variantes de *EXT2* (rs11037909 y rs1113132) están en desequilibrio de ligamiento y que no se asocian a la DT2 ( $P_E=0.31$ ) (Scott y cols., 2007; Saxena y col., 2007; Horikoshi y cols., 2007; Omori y cols., 2008). La elevada frecuencia del alelo G de la variante rs3740878 reportada en el presente estudio concuerda con la frecuencia alélicas del HapMap en individuos con ascendencia mexicana de California (48 %). Existe una evidente diferencia entre las frecuencias alélicas de los europeos (23.0 %) y mexicanos (57.7 %) para el alelo G. Existe la posibilidad de que este hecho sea producto de la deriva génica, es decir las poblaciones ancestrales por el número reducido de habitantes que la conformaban, hicieron que se fijara un determinado alelo.

De acuerdo al presente estudio los SNPs previamente reportados en poblaciones caucásicas no contribuyen por si solos de manera importante sobre la diabetes en población mexicana. Sin embargo, al hacer un análisis agrupando por número de alelos de riesgo como se ha realizado en otros estudios (Weedon y cols., 2006; Scott y cols., 2006) se observó asociación con la diabetes en los sujetos con 3-4 y 5-6 alelos de riesgo (0.015 y 0.003, respectivamente). Pensando en que el resultado estuviera dado por la asociación encontrada con la variante de *LOC387761* y la DT2, esta fue eliminada, y aún sin ella la asociación permaneció, comprobando que existe una suma de alelos de riesgo que favorece el desarrollo de la DT2. Estos resultados apoyan la hipótesis que los alelos de riesgo de los SNPs asociados a las enfermedades multifactoriales presentan penetrancia baja y pueden explicar su compleja composición genética (Reich y Landers, 2001). La baja frecuencia de sujetos con 7-8 alelos de riesgo se debe principalmente a que el SNP rs3740878 es poco común en esta población.

Hasta la fecha la detección de los SNPs involucrados en el desarrollo de la DT2 ha sido difícil debido a que su contribución es pequeña y por ello se requiere un gran

número de individuos a estudiar. Estudios con tamaños de muestras reducidos como el presente que mostró bajos valores de poder estadístico (0.31-0.62), pero nos proporcionan una idea del comportamiento de las frecuencias de las variantes entre los sujetos control y los diabéticos, con lo cual podemos identificar una posible asociación entre SNPs y la enfermedad. Además deben hacerse estudios más complejos para evaluar la interacción de los múltiples SNPs de riesgo que se han encontrado asociados a la diabetes.

Debemos tener presente que la DT2 es una enfermedad multifactorial y multigénica, por lo tanto los SNPs de genes involucrados interaccionan entre ellos y con factores ambientales. Por lo tanto, la relación de los parámetros bioquímicos encontrados no debe despreciarse por el hecho de que las comparaciones en los controles no sobrepasan los niveles de referencia. Por ello, se puede pensar que las variantes contribuyen al desarrollo de la diabetes, como resultado de la suma de SNPs como se observa en el presente trabajo, favoreciendo niveles elevados glucosa, triglicéridos y colesterol en los sujetos, lo cual finalmente conduce a la enfermedad.

Este tipo de estudios pretende conformar un grupo de polimorfismos asociados a la susceptibilidad de la DT2, para evaluar la suma de los SNPs y su impacto. Posteriormente estos resultados serán útiles para el diseño de una estrategia o metodologías que puedan ser empleadas con fines pronósticos y un adecuado manejo terapéutico.

## 9. CONCLUSIONES

- La variante rs7903146 de *TCF7L2* participa en el desarrollo de la diabetes tipo 2 de inicio temprano en población mexicana, lo que concuerda con la mayoría de los estudios, siendo éste el gen con más replicas.
- Los resultados de la variante rs7480010 de *LOC387761* sugieren que este gen o una variante funcional en desequilibrio con rs7480010 esté involucrada en la susceptibilidad a la diabetes tipo 2 en población mexicana.
- La variante rs7480010 probablemente este marcando una variante funcional que puede estar involucrada en la alteración del metabolismo de lípidos, contribuyendo en el desarrollo de la DT2 en población mexicana.
- En el presente estudio no se logró conocer la expresión de *LOC387761*. Sin embargo, será de gran utilidad conocer su patrón de expresión.
- En general se observaron mayores frecuencias de los alelos de riesgo en los grupos indígenas, lo cual sugiere una herencia indígena de diabetes en los mestizos. Por lo que su participación en indígenas diabéticos debe ser evaluada.
- La región *HHEX/IDE* parece estar involucrada en la homeostasis de la glucosa y en el metabolismo del colesterol, pudiendo promover la susceptibilidad a desarrollar DT2.
- El gen *SLC30A8* (ZnT8) parece no participar en el desarrollo de la DT2 en población mexicana con ninguna variante en su región codificante.
- La presencia de 3-6 alelos de riesgo de los SNPs estudiados incrementa el riesgo a desarrollar diabetes tipo 2 en población mexicana apoyando la hipótesis sobre la suma de los SNPs es la responsable de la susceptibilidad de las enfermedades multifactoriales.

- Se requieren más estudios para conocer el papel de las variantes asociadas a la DT2 y rasgos metabólicos como factores de riesgo en la DT2.

## 10. ANEXO

**HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO**  
**LABORATORIO DE ENDOCRINOLOGIA MOLECULAR**  
**UNIDAD DE INVESTIGACION**

CARTA CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR COMO CONTROL SANO EN EL PROYECTO:  
“EVALUACION MOLECULAR DE PACIENTES CON DIABETES MELLITUS DE INICIO TEMPRANO”.

México D.F. a \_\_\_\_\_

A Quien Corresponda:

El (la) que suscribe: \_\_\_\_\_  
de \_\_\_\_\_ años de edad, acepto participar en forma libre y voluntaria, donando una muestra de sangre que será utilizada como CONTROL SANO, en el proyecto “Evaluación molecular de pacientes con diabetes mellitus de inicio temprano”, que se llevará a cabo, como un convenio entre el Hospital Juárez de México y la Facultad de Química de la UNAM, y cuyo objetivo es identificar los genes responsables de la diabetes mellitus de inicio temprano en población mexicana.

Se me ha informado de la importancia del estudio así como de los objetivos del mismo y forma en que se tomará la muestra de sangre. Dándome la oportunidad para hacer preguntas libremente y estando satisfecha de la información y respuestas recibidas acepto participar en él.

Firma del Control Voluntario: \_\_\_\_\_

Teléfono: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

Firma del Investigador: \_\_\_\_\_

## 11. BIBLIOGRAFIA

Apelqvist A, Ahlgren U y Edlund H. Sonic hedgehog directs specialized mesoderm differentiation in the intestine and pancreas. *Curr Biol* 1997; 7: 801–804.

American Diabetes Association (ADA), Diagnosis and Clasification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2007; 30: S42-S47..

Bennett RG, Hamel FG y Duckworth WC. An insulin-degrading enzyme inhibitor decreases amylin degradation, increases amylin-induced cytotoxicity, and increases amyloid formation in insulinoma cell cultures. *Diabetes* 2003; 52: 2315–2320.

Boden G, Shulman GI: Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining the role in the development of insulin resistance and  $\beta$ -cell dysfunction. *Eur J Clin Invest* 2002; 32: 14-23.

Bort R, Martinez-Barbera JP, Beddington RS y Zaret KS. Hex homeobox gene-dependent tissue positioning is required for organogenesis of the ventral pancreas. *Development* 2004; 131: 797–806.

Bort R, Signore M, Tremblay K, Martinez Barbera JP y Zaret KS. Hex homeobox gene controls the transition of the endoderm to a pseudostratified, cell emergent epithelium for liver bud development. *Dev Biol* 2006; 290: 44–56.

Cauchi S, Meyre D, Dina C, Choquet H, Samson Ch, Gallina S, Balkau B, Charpentier G, Pattou F, Stetsyuk V, Scharfmann R, Staels B, Frühbeck G y Froguel P. Transcription Factor *TCF7L2* Genetic Study in the French Population: expression in human beta-cells and adipose tissue and strong association with type 2 diabetes. *Diabetes* 2006; 55: 2903-2908.

Cauchi S, El Achhab Y, Choquet H, Dina C, Krempler F, Weitgasser R, Nejjari C, Patsch W, Chikri M, Meyre D, Froguel P. *TCF7L2* is reproducibly associated with type 2 diabetes in various ethnic groups: a global meta-analysis. *J Mol Med* 2007; 85: 777-782.

Chausmer A. B. Zinc, Insulin and Diabetes. *J Am Coll Nutr.* 1998. 17; 2: 109-115.

Chimienti F, Devergnas S, Favier A, Seve M. Identification and cloning of a beta-cell-specific zinc transporter, ZnT-8, localized into insulin secretory granules. *Diabetes* 2004; 53: 2330-7.

Chimienti F, Favier A, Seve M. ZnT-8, a pancreatic beta-cell-specific zinc transporter. *Biometals* 2005; 18: 313-7.

Chimienti F, Devergnas S, Pattou F, Schuit F, Garcia-Cuenca R, Vandewalle B, Kerr-Conte J, Van Lommel L, Grunwald D, Favier A, Seve M. In vivo expression and functional characterization of the zinc transporter ZnT8 in glucose-induced insulin secretion. *J Cell Sci* 2006; 119: 4199-4206.

Dahlgren A, Zethelius B, Jensevik K, Syvänen A-C, Berne C. Variants of the *TCF7L2* gene are associated with beta cell dysfunction and confer an increased risk of type 2 diabetes mellitus in the ULSAM cohort of Swedish elderly men. *Diabetologia* 2007; 50: 1852-1857.

Di Rienzo A and Hudson RR. An evolutionary framework for common diseases: the ancestral-susceptibility model. *Trends Genet* 2005; 21: 596–601.

Diabetes Atlas, third edition, International Diabetes Federation (IDF) 2006.

Dotevall A, Johansson S, Wilhelmsen L, Rosengren A. Increased levels of triglycerides, BMI and blood pressure and low physical activity increase the risk of diabetes in Swedish women: a prospective 18-year follow-up of the BEDA study. *Diabet Med* 2004; 21: 615–622.

Farris W, Mansourian S, Chang Y, Lindsley L, Eckman EA, Frosch MP, Eckman CB, Tanzi RE, Selkoe DJ y Guenette S. Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid b-protein, and the b-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 2003; 100: 4162–4167.

Flavell DM, Ireland H, Stephens JW, Hawe E, Acharya J, Mather H, Hurel SJ, Humphries SE: Peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene variation influences age of onset and progression of type 2 diabetes. *Diabetes* 2005; 54: 582–586.

Foley AC y Mercola M. Heart induction by Wnt antagonists depends on the homeodomain transcription factor Hex. *Genes Dev* 2005; 19: 387–396.

Frayling TM, Wiltshire S, Hitman GA, Walker M, Levy JC, Sampson M, Groves CJ, Menzel S, McCarthy MI, Hattersley AT: Young-onset type 2 diabetes families are the major contributors to genetic loci in the Diabetes UK Warren 2 genome scan and identify putative novel loci on chromosomes 8q21, 21q22, and 22q11. *Diabetes* 2003; 52: 1857–1863.

Grant SF, Thorleifsson G, Reynisdottir I, Benediktsson R, Manolescu A, Sainz J, Helgason A, Stefansson H, Emilsson V, Helgadottir A, Styrkarsdottir U, Magnusson KP, Walters GB, Palsdottir E, Jonsdottir T, Gudmundsdottir T, Gylfason A, Saemundsdottir J, Wilensky RL, Reilly MP, Rader DJ, Bagger Y, Christiansen C, Gudnason V, Sigurdsson G, Thorsteinsdottir U, Gulcher JR, Kong A, Stefansson K. Variant of transcription factor 7-like 2 (*TCF7L2*) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 2006; 38: 320-3.



Grarup N, Rose CS, Andersson EA, Andersen G, Nielsen AL, Albrechtsen A, Clausen JO, Rasmussen SS, Jørgensen T, Sandbaek A, Lauritzen T, Schmitz O, Hansen T, Pedersen O. Studies of association of variants near the HHEX, CDKN2A/B, and IGF2BP2 genes with type 2 diabetes and impaired insulin release in 10,705 Danish subjects: validation and extension of genome-wide association studies. *Diabetes* 2007; 56: 3105-3111.

Groves CJ, Zeggini E, Minton J, Frayling TM, Weedon MN, Rayer NW, Hitman GA, Walker M, Wiltshire S, Hattersley AT, McCarthy MI. Association Analysis of 6,736 U.K. Subjects Provides Replication and Confirms TCF7L2 as a Type 2 Diabetes Susceptibility Gene With a Substantial Effect on Individual Risk. *Diabetes* 2006; 55: 2640-2644.

Habener JF, Kemp DM, Thomas MK. Minireview: transcriptional regulation in pancreatic development. *Endocrinology* 2005; 146: 1025-1034.

Hao M, Head WS, Gunawardana SC, Hasty AH, Piston DW. Direct effect of cholesterol on insulin secretion: a novel mechanism for pancreatic beta-cell dysfunction. *Diabetes* 2007; 56: 2328-2338.

Herder C, Rathmann W, Strassburger K, Finner H, Grallert H, Huth C, Meisinger C, Gieger C, Martin S, Giani G, Scherbaum WA, Wichmann HE, Illig T. Variants of the PPAR $\gamma$ , IGF2BP2, CDKAL1, HHEX, and TCF7L2 genes confer risk of type 2 diabetes independently of BMI in the German KORA studies. *Horm Metab Res* 2008; 40: 722-726.

Hertel JK, Johansson S, Raeder H, Midthjell K, Lyssenko V, Groop L, Molven A, Njølstad PR. Genetic analysis of recently identified type 2 diabetes loci in 1,638 unselected patients with type 2 diabetes and 1,858 control participants from a Norwegian population-based cohort (the HUNT study). *Diabetologia* 2008; 51: 971-977.

Horikoshi M, Hara K, Ito C, Shojima N, Nagai R, Ueki K, Froguel P, Kadowaki T. Variations in the HHEX gene are associated with increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetologia* 2007; 50: 2461-2466.

Ishihara H, Maechler P, Gjinovci A, Herrera PL, Wollheim CB. Islet beta-cell secretion determines glucagon release from neighbouring alpha-cells. *Nat Cell Biol* 2003; 5: 330-5.

Jin T. The WNT signalling pathway and diabetes mellitus. *Diabetologia* 2008; 51: 1771-1780.

Kerr-Conte J, Van Lommel L, Grunwald D, Favier A, Seve M. In vivo expression and functional characterization of the zinc transporter ZnT8 in glucose-induced insulin secretion. *J Cell Sci* 2006; 119: 4199-206.

Kimber CH, Doney AS, Pearson ER, McCarthy MI, Hattersley AT, Leese GP, Morris AD, Palmer CN. TCF7L2 in the Go-DARTS study: evidence for a gene dose effect on both diabetes susceptibility and control of glucose levels. *Diabetologia* 2007; 50: 1186-1191.

Kirchhoff K, Machicao F, Haupt A, Schäfer SA, Tschritter O, Staiger H, Stefan N, Häring HU, Fritsche A. Polymorphisms in the TCF7L2, CDKAL1 and SLC30A8 genes are associated with impaired proinsulin conversion. *Diabetologia* 2008; 51:597-601.

Lee YH, Kang ES, Kim SH, Han SJ, Kim CH, Kim HJ, Ahn CW, Cha BS, Nam M, Nam CM, Lee HC. Association between polymorphisms in SLC30A8, HHEX, CDKN2A/B, IGF2BP2, FTO, WFS1, CDKAL1, KCNQ1 and type 2 diabetes in the Korean population. *J Hum Genet* 2008; 53: 991-998.

Lewis JP, Palmer ND, Hicks PJ, Sale MM, Langefeld CD, Freedman BI, Divers J, Bowden DW. Association analysis in african americans of European-derived type 2 diabetes single nucleotide polymorphisms from whole-genome association studies. *Diabetes* 2008; 57: 2220-2225.

Lin P, Vance JM, Pericak-Vance MA et al. The Flip-Flop Phenomenon. *Am.J Hum Genet* 2007; 80: 531-538.

McLaughlin T, Reaven G, Abbasi F, Lamendola C, Saad M, Waters D, Simon J, Krauss RM: Is there a simple way to identify insulin-resistant individuals at increased risk of cardiovascular disease? *Am J Cardiol* 2005; 96: 399–404.

Morgutti M, Demori E, Pecile V, Amoroso A, Rustighi A, Manfioletti, G. Genomic organization and chromosome mapping of the human homeobox gene HHEX. *Cytogenet Cell Genet* 2001; 94: 30-32.

Omori S, Tanaka Y, Takahashi A, Hirose H, Kashiwagi A, Kaku K, Kawamori R, Nakamura Y, Maeda S. Association of CDKAL1, IGF2BP2, CDKN2A/B, HHEX, SLC30A8, and KCNJ11 with susceptibility to type 2 diabetes in a Japanese population. *Diabetes* 2008; 57: 791-795.

Owen KR y McCarthy MI. Genetics of type 2 diabetes. *Curr Opin Genet Dev* 2007; 17:1–6.

Palmer DN, Goodarzi MO, Langefeld CD, Ziegler J, Norris JM, Haffner SM, Bryer-Ash M, Bergman R, Wagenknecht LE, Taylor KD, Rotter JI, Bowden DW. Quantitative Trait Analysis of Type 2 Diabetes Susceptibility Loci Identified from whole genome association studies in the insulin resistances atherosclerosis family study. *Diabetes* 2008; 57: 1093-1100.

Parra EJ, Cameron E, Simmonds L, Valladares A, McKeigue P, Shriver M, Wacher N, Kumate J, Kittles R, Cruz M. Association of TCF7L2 polymorphisms with type 2 diabetes in Mexico City. *Clin Genet* 2007; 71: 359-366.

Pascoe L, Tura A, Patel SK, Ibrahim IM, Ferrannini E, Zeggini E, Weedon MN, Mari A, Hattersley AT, McCarthy MI, Frayling TM, Walker M; RISC Consortium; U.K. Type 2 Diabetes Genetics Consortium. Common variants of the novel type 2 diabetes genes CDKAL1 and HHEX/IDE are associated with decreased pancreatic beta-cell function. *Diabetes* 2007; 56: 3101-3104.

Permut MA, Wasson J y Cox N. Genetic epidemiology of diabetes. *J Clin Invest* 2005; 115:1431–1439.

Perry IJ, Wannamethee SG, Walker MK, Thomson AG, Whincup PH, Shaper AG: Prospective study of risk factors for development of non-insulin dependent diabetes in middle aged British men. *BMJ* 1995; 310; 560–564.

Prentki M, Posner BI, Balding DJ, Meyre D, Polychronakos C, Froguel P. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature* 2007; 445: 881-885.

Reich DE, Lander ES. On the allelic spectrum of human disease. *Trends Genet* 2001; 17: 502–510.

Rong R, Hanson RL, Ortiz D, Wiedrich C, Kobes S, Knowler WC, Bogardus C, Baier LJ. Association analysis of variation in/near FTO, CDKAL1, SLC30A8, HHEX, EXT2, IGF2BP2, LOC387761, and CDKN2B with type 2 diabetes and related quantitative traits in Pima Indians. *Diabetes* 2009; 58: 478-488.

Saxena R, Voight BF, Lyssenko V, Burt NP, de Bakker PI, Chen H, Roix JJ, Kathiresan S, Hirschhorn JN, Daly MJ, Hughes TE, Groop L, Altshuler D, Almgren P, Florez JC, Meyer J, Ardlie K, Bengtsson K, Isomaa B, Lettre G, Lindblad U, Lyon HN, Melander O, Newton-Cheh C, Nilsson P, Orho-Melander M, Rastam L, Speliotes EK, Taskinen MR, Tuomi T, Guiducci C, Berglund A, Carlson J, Gianniny L, Hackett R, Hall L, Holmkvist J, Laurila E, Sjogren M, Sterner M, Surti A, Svensson M, Svensson M, Tewhey R, Blumenstiel B, Parkin M, Defelice M, Barry R, Brodeur W, Camarata J, Chia N, Fava M, Gibbons J, Handsaker B, Healy C, Nguyen K, Gates C, Sougnez C, Gage D, Nizzari M, Gabriel SB, Chirn GW, Ma Q, Parikh H, Richardson D, Ricke D, Purcell S. Genome-Wide Association Analysis Identifies Loci for Type 2 Diabetes and Triglyceride Levels. *Science* 2007; 316; 1331-1336.

Schmidt MI, Duncan BB, Bang H, Pankow JS, Ballantyne CM, Golden SH, Folsom AR, Chambless LE: Identifying individuals at high risk for diabetes: thetherosclerosis Risk in Communities study. *Diabetes Care* 2005; 28;2013–2018.

Scott LJ, Bonnycastle LL, Willer CJ, Sprau AG, Jackson AU, Narisu N, Duren WL, Chines PS, Stringham HM, Erdos MR, Valle TT, Tuomilehto J, Bergman RN, Mohlke KL, Collins FS, Boehnke M. Association of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) variants with type 2 diabetes in a Finnish sample. *Diabetes* 2006; 55: 2649-53.

Scott LJ, Mohlke KL, Bonnycastle LL, Willer CJ, Li Y, Duren WL, Erdos MR, Stringham HM, Chines PS, Jackson AU, Prokunina-Olsson L, Ding CJ, Swift AJ, Narisu N, Hu T, Pruim R, Xiao R, Li XY, Conneely KN, Riebow NL, Sprau AG, Tong M, White PP, Hetrick KN, Barnhart MW, Bark CW, Goldstein JL, Watkins L, Xiang F, Saramies J, Buchanan TA, Watanabe RM, Valle TT, Kinnunen L, Abecasis GR, Pugh EW, Doheny KF, Bergman RN, Tuomilehto J, Collins FS, Boehnke M. A Genome-Wide Association Study of Type 2 Diabetes in Finns Detects Multiple Susceptibility Variants. *Science* 2007; 316: 1341-1345.

Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L, Serre D, Boutin P, Vincent D, Belisle A, Hadjadj S, Balkau B, Heude B, Charpentier G, Hudson TJ, Montpetit A, Pshezhetsky AV, Prentki M, Posner BI, Balding DJ, Meyre D, Polychronakos C, Froguel P. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature* 2007; 445: 881-885.

Staiger H, Machicao F, Stefan N, Tschrötter O, Thamer C, Kantartzis K, Schäfer SA, Kirchhoff K, Fritsche A, Häring HU. Polymorphisms within novel risk loci for type 2 diabetes determine beta-cell function. *PLoS ONE* 2007; 2: e832.

The International HapMap Consortium. The International HapMap Project. *Nature* 2003; 426: 789-796.

Thomas MK, Rastalsky N, Lee JH y Habener JF. Hedgehog signaling regulation of insulin production by pancreatic b-cells. *Diabetes* 2000; 49: 2039–2047.

Tirosh A, Shai I, Bitzur R, Kochba I, Tekes-Manova D, Israeli E, Shochat T, Rudich A. Changes in triglyceride levels over time and risk of type 2 diabetes in young men. *Diabetes Care* 2008; 31: 2032-2037.

van Vliet-Ostaptchouk JV, Onland-Moret NC, van Haeften TW, Franke L, Elbers CC, Shiri-Sverdlov R, van der Schouw YT, Hofker MH, Wijmenga C. HHEX gene polymorphisms are associated with type 2 diabetes in the Dutch Breda cohort. *Eur J Hum Genet* 2008; 16: 652-656.

Villarreal-Molina MT, Flores-Dorantes MT, Arellano-Campos O, Villalobos-Comparan M, Rodríguez-Cruz M, Miliar-García A, Huertas-Vazquez A, Menjivar M, Romero-Hidalgo S, Wachter NH, Tusie-Luna MT, Cruz M, Aguilar-Salinas CA, Canizales-Quinteros S; Metabolic Study Group. Association of the ATP-binding cassette transporter A1 R230C variant with early-onset type 2 diabetes in a Mexican population. *Diabetes* 2008; 57: 509-513.

Weedon MN, McCarthy MI, Hitman G, Walker M, Groves CJ, Zeggini E, Rayner NW, Shields B, Owen KR, Hattersley AT, Frayling TM. Combining information from common type 2 diabetes risk polymorphisms improves disease prediction. *PLoS Med* 2006; 3:e374 .

Willer CJ, Bonnycastle LL, Conneely KN, Duren WL, Jackson AU y cols. Screening of 134 Single Nucleotide Polymorphisms(SNPs) Previously Associates With Type 2 Diabetes Replicates Association With 12 SNPs in Nine Genes. *Diabetes* 2007; 56: 256-264.

Wiltshire S, Hattersley AT, Hitman GA, Walker M, Levy JC, Sampson M, O'Rahilly S, Frayling TM, Bell JI, Lathrop GM, Bennett A, Dhillon R, Fletcher C, Groves CJ, Jones E, Prestwich P, Simecek N, Rao PVS, Wishart M, Foxon R , Howell S, Smedley D, Cardon LR, Menzel S y McCarthy MI. A genome-wide scan for loci predisposing to type 2 diabetes in a U.K. population (the Diabetes UK Warren 2 Repository): analysis of 573 pedigrees provides independent replication of a susceptibility locus on chromosome 1q. *Am J Hum Genet* 2001; 69: 553–569.

Wu Y, Li H, Loos RJ, Yu Z, Ye X, Chen L, Pan A, Hu FB, Lin X. Common variants in CDKAL1, CDKN2A/B, IGF2BP2, SLC30A8, and HHEX/IDE genes are associated with type 2 diabetes and impaired fasting glucose in a Chinese Han population. *Diabetes* 2008; 57: 2834-2842.

[www.hapmap.org](http://www.hapmap.org)

[www.inegi.gob.mx](http://www.inegi.gob.mx)

Yaney GC, Corkey BE. Fatty acid metabolism and insulin secretion in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 2003; 46: 1297-1312.

Yang Q, Khoury MJ, Botto L, Friedman JM, Flanders WD. Improving the prediction of complex diseases by testing for multiple disease susceptibility genes. *Am J Hum Genet* 2003; 72: 636–649.

Yi F, Brubaker PL, Jin T. TCF-4 mediates cell type-specific regulation of proglucagon gene expression by beta-catenin and glycogen synthase kinase-3-beta. *J Biol Chem* 2005; 280: 1457-1464.

Zeggini E, Weedon MN, Lindgren CM, Frayling TM, Elliott KS, Lango H, Timpson NJ, Perry JR, Rayner NW, Freathy RM, Barrett JC, Shields B, Morris AP, Ellard S, Groves CJ, Harries LW, Marchini JL, Owen KR, Knight B, Cardon LR, Walker M, Hitman GA, Morris AD, Doney AS, McCarthy MI, Hattersley AT. Replication of Genome-Wide Association Signals in U.K Samples Reveals Risk Loci for Type 2 Diabetes. *Science* 2007: 316; 1336-1341.