



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA HAPLOTÍPICA DE LOS  
POLIMORFISMOS DE UN SOLO NUCLEÓTIDO *RS7903146 (C/T)* Y  
*RS1225372 (G/T)* EN EL GEN *TCF7L2* Y SU ASOCIACIÓN A  
DIABETES MELLITUS TIPO 2 DE INICIO TARDÍO EN UNA POBLACIÓN  
MEXICANA

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Licenciada en Bioquímica Diagnóstica

P R E S E N T A

ALMA VERÓNICA VARGAS VALENCIA

ASESORAS:

DRA. VIRGINIA SÁNCHEZ MONRROY

M. EN C. MARITERE DOMINGUEZ ROJAS

BIOL. LUCILA MARITZA LOZANO TRENADO

Cuatitlán Izcalli, Edo. De México. 2013



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO  
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ  
Jefa del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos la: Tesis

Determinación de la frecuencia haplotípica de los polimorfismos de un solo nucleótido rs7903146 (C/T) y rs12255372 (G/T) en el gen TCF7L2 y su asociación a Diabetes Mellitus tipo 2 de inicio tardío en una población mexicana

Que presenta la pasante: Alma Verónica Vargas Valencia

Con número de cuenta: 306327560 para obtener el Título de: Licenciada en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 09 de mayo de 2013.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
VOCAL	QFB. Rosalba Bonilla Sánchez	
SECRETARIO	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	
1er. SUPLENTE	QFB. Gabriela Escalante Reynoso	
2do. SUPLENTE	M. en C. Alejandro Gutiérrez García	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).



Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio Multidisciplinario de Investigación de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad de la Universidad del Ejército y Fuerza Aérea Mexicana.

**A MIS PADRES, RAQUEL Y EDUARDO.**

**Y A MI HERMANO JAVIER.**

## **AGRADECIMIENTOS**

Primeramente a Dios por permitirme ver el lado amable la vida, a mi papá por ser mi súper héroe de la vida real, a mi mamá por su gran ejemplo y a mi hermano por ser la constante en mi vida.

A la Dra. Virginia Sánchez Monroy por su excelente asesoría y apoyo en la realización de este trabajo, por sus siempre adecuados consejos y por su gran calidez.

A la Biol. Lucila Maritza Lozano Trenado por compartir conmigo sus técnicas de laboratorio y hacer mi trabajo más fácil y con mejores resultados. Y en general a todo el laboratorio de Biología Molecular de la EMGS.

A la Maestra Idalia Ávila por ser un gran ejemplo a seguir, por su pasión a la docencia y simplemente por inspirarme a ser mejor.

A José Merlán por ser el más grande *Timmy* del mundo, mi cómplice de locuras diarias y el mejor amigo también; por compartir mi extraña visión del mundo y quererlo vivir conmigo de igual manera. Y a Corina por estos cuatro años juntas... y todo lo que vivimos; no imagino la carrera sin ti en el cuarto de a lado.

A mis amigos de toda la vida: Víctor, Martha, Lez, Laura, Jaque, Fabi, Lupe y Gaby por su continuo apoyo y dosis de felicidad que le dan a mi vida.

A todos mis compañeros y amigos que estuvieron en los días de estudio y noches de... más estudio. A todos aquellos profesores que me fortalecieron académica y personalmente para llegar a este punto en mi vida. Los llevaré en mi memoria por siempre.

Finalmente y de manera muy especial a la Maestra Maritere Domínguez Rojas por haber confiado en mí y darme la oportunidad de realizar este proyecto cuando nadie más lo habría hecho.

**GRACIAS.**

## I. TABLA DE CONTENIDO

I. Tabla de contenido .....	5
I.1. Abreviaturas .....	7
I.2. Índice de Figuras .....	8
I.3. Índice de Tablas.....	9
I.4. Índice de Gráficas.....	10
II. Resumen .....	11
III. Introducción.....	12
III.1. Definición de Diabetes Mellitus .....	12
III.2. Clasificación de la Diabetes Mellitus.....	12
III.3. Diabetes Mellitus tipo 2 .....	14
III.3.1. Fisiopatología .....	14
III.3.2. Epidemiología .....	15
III.3.3. Diabetes Mellitus tipo 2 en México. ....	16
III.4. Genes asociados a Diabetes Mellitus tipo 2 .....	17
III.5. El gen <i>TCF7L2</i> .....	20
III.6. Discriminación Alélica con sondas Taqman® .....	22
IV. Justificación.....	26
V. Objetivos .....	27
VI. Material y métodos.....	28
VII. Diagrama de flujo experimental.....	34
VIII. Resultados .....	35
IX. Discusión .....	45
X. Conclusiones .....	47

**XI. Referencias ..... 48**  
**XII. Anexos ..... 51**

## I.1. ABREVIATURAS

A	Adenina
ADA	Asociación Americana de Diabetes
C	Citosina
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EMGS	Escuela Militar de Graduados de Sanidad
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud
G	Guanina
IFD	Federación Internacional de Diabetes
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
nm	Nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
OR	Odds Ratio
pb	Pares de bases
PBS	Buffer de fosfato
SNP	Polimorfismo de un Solo Nucleótido
T	Timina

## I.2. ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Proyecciones mundiales del número de personas con Diabetes 2011 y 2030 ....	16
<b>Figura 2.</b> Incidencia de DM2 en México 2010 .....	17
<b>Figura 3.</b> Reacción de PCR con sondas Taqman .....	24
<b>Figura 4.</b> Resultados de una discriminación alélica.....	25
<b>Figura 5.</b> Kit de extracción DNeasy de Quiagen. ....	29
<b>Figura 6.</b> Transiluminador con fotodocumentador.....	29
<b>Figura7.</b> Nanodrop 1000 Thermo Scientific para la cuantificación de DNA.....	30
<b>Figura 8.</b> Equipo para PCR en Tiempo Real .....	32
<b>Figura 9.</b> Estados de origen de los sujetos participantes del estudio. ....	36
<b>Figura 10.</b> Electroforesis DNA del grupo de casos .....	37
<b>Figura 11.</b> Electroforesis de DNA del grupo de controles .....	37
<b>Figura 12.</b> Electroforesis de los productos de PCR.....	38
<b>Figura 13.</b> Amplificación en tiempo real. ....	39
<b>Figura 14.</b> Intensidad de Fluorescencia .....	40
<b>Figura 15.</b> Discriminación alélica de casos .....	41

### I.3. ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Otros tipos de diabetes mellitus.....	13
<b>Tabla 2.</b> Genes y SNP asociados a DM2.....	18
<b>Tabla 3.</b> Mezcla de reacción para una reacción para PCR. ....	30
<b>Tabla 4.</b> Condiciones de amplificación de PCR.....	32
<b>Tabla 5.</b> Datos bioquímico-antropométricos de la población estudiada.....	35
<b>Tabla 6.</b> Resultados de las frecuencias de los genotipos de los grupos de estudio del polimorfismo <i>rs7903146 (C/T)</i> .....	41
<b>Tabla 7.</b> Resultados de las frecuencias de los genotipos de los grupos de estudio del polimorfismo <i>rs12255375 (G/T)</i> .....	42
<b>Tabla 8.</b> Frecuencias genotípicas y alélicas .....	43
<b>Tabla 9.</b> Razón de momios de casos y controles.....	43
<b>Tabla 10.</b> Posibles haplotipos según los genotipos .....	44
<b>Tabla 11.</b> Frecuencias haplotípicas .....	44

#### I.4. ÍNDICE DE GRÁFICAS

<b>Gráfica 1.</b> Distribución del grupo de casos según el género.....	35
<b>Gráfica 2.</b> Distribución del grupo de controles según el género.....	35
<b>Gráfica 3.</b> Frecuenciade genotipos del SNP rs7903146 (C/T) del grupo de Casos.....	42
<b>Gráfica 4.</b> Frecuenciade genotipos del SNP rs7903146 (C/T) del grupo de Controles .....	42
<b>Gráfica 5.</b> Frecuenciade genotipos del SNP rs12255375 (G/T) del grupo de Casos .....	43
<b>Gráfica 6.</b> Frecuenciade genotipos del SNP rs12255375 (G/T) del grupo de Controles .....	43
<b>Gráfica 7.</b> Frecuencia de haplotipos del grupo de Casos .....	44
<b>Gráfica 8.</b> Frecuencia de haplotipos del grupo de Controles.....	44

## II. RESUMEN

La Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) es una condición heterogénea caracterizada por la resistencia a la insulina y una secreción deficiente de ésta. La DM2 presenta una alta prevalencia en la población mexicana. La frecuencia de DM2 en ciertas familias y poblaciones étnicas sugiere un fuerte antecedente genético para la enfermedad.

Las asociaciones entre polimorfismos en el factor de transcripción 7 tipo 2 (*TCF7L2*) y la DM2 lo han convertido en el gen más fuertemente asociado a susceptibilidad genética en diferentes grupos étnicos.

Es por ello que se buscó evaluar la frecuencia de los polimorfismos *rs7903146* (C/T) y *rs12255372* (G/T) del gen *TCF7L2* en una población mexicana, con la finalidad de conocer, si existe asociación entre la presencia de los polimorfismo y la enfermedad; utilizando la técnica de PCR en tiempo real con sondas Taqman® para determinar el genotipo de cada muestra de DNA genómico.

Los resultados obtenidos mostraron que no existe relación entre la presencia de los polimorfismos y el desarrollo de la enfermedad.

### **III. INTRODUCCIÓN**

#### **III.1. DEFINICIÓN DE DIABETES MELLITUS**

La Diabetes mellitus (DM) es un desorden metabólico multifactorial crónico degenerativo cuya patogénesis está influenciada por diferentes factores de riesgo, genéticos y del medio ambiente, en el que se altera el metabolismo de proteínas, lípidos y carbohidratos. Se manifiesta como hiperglucemia, aunque puede coexistir con hipercolesterolemia e hipertriglicerolemia (Alpízar, 2001; Cruz, 2010).

#### **III.2. CLASIFICACIÓN DE DIABETES MELLITUS**

La actual clasificación de DM fue aprobada por la Asociación Americana de Diabetes (ADA) y avalada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en julio de 1997 tras las modificaciones a la elaborada en 1979. En ésta se reconocen cuatro grupos principales: Diabetes mellitus tipo 1, Diabetes mellitus tipo 2, otros tipos específicos de diabetes y Diabetes gestacional (Alpízar, 2001; Islas, 2005).

La Diabetes mellitus tipo 1 (DM1) se caracteriza por la destrucción de las células  $\beta$  del páncreas por causas autoinmunes o idiopáticas que lleva a la deficiencia absoluta de insulina. Los pacientes pueden ser de cualquier edad y suelen presentar comienzo abrupto de signos y síntomas con insulopenia y cetonuria asociada a la hiperglucemia, por lo que requieren del tratamiento con insulina (Alpízar, 2001).

La Diabetes mellitus tipo 2 se presenta con resistencia a la insulina y deficiencia parcial o absoluta en su producción. Cerca del 90% de los casos pertenecen a éste grupo y la mayoría de los pacientes son mayores de 30 años, obesos y presentan pocos síntomas.

Entre los otros tipos específicos de diabetes se conjunta el 3% de los casos y estos se deben a diferentes causas mencionadas en la tabla 1.

Tabla 1 Otros tipos de diabetes mellitus (Islas Andrade & Revilla Monsalve, 2005 modificado)

Tipo específico de diabetes	Causa
Defectos genéticos de la función de la célula $\beta$	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Cromosoma 12 HNF-1<math>\alpha</math> (MODY 3),</li> <li>▪ Cromosoma 7 glucosinasa (MODY 2),</li> <li>▪ Cromosoma 20 HNF-4<math>\alpha</math> (MODY 1),</li> <li>▪ DNA mitocondrial</li> </ul>
Defectos genéticos de la acción de la insulina	Resistencia a la insulina tipo A, leprecaunismo, síndrome de Rabson-Mendenhall, diabetes lipoatrófica.
Enfermedades del páncreas exocrino	Pancreatitis, traumatismo o pancreatectomía, neoplasia, fibrosis quística, hemocromatosis
Endocrinopatías	Acromegalia, síndrome de Cushing, glaucoma, feocromocitoma, hipertiroidismo, somatostatina, aldosteronoma.
Sustancias químicas o fármacos	Pentamidina, ácido nicotínico, glucocorticoides, hormona tiroidea, interferón $\alpha$ , agonistas $\beta$ -adrenérgicos
Infecciones	Rubeola, citomegalovirus.
Formas poco comunes de diabetes mediada inmunológicamente	Síndrome del hombro rígido, anticuerpos contra el receptor de insulina.
Otros síndromes que acompañan a la diabetes	Síndromes de Down, Turner, Klinefelter, Wolfram, Huntington.

La Diabetes Gestacional se define como cualquier grado de intolerancia a la glucosa que comienza o se detecta por primera vez durante el embarazo a causa de alteraciones metabólicas y hormonales propias de dicho estado. Suele desaparecer después del parto, pero aumenta la probabilidad de desarrollar DM2 posteriormente (Alpizar, 2001).

### **III.3. DIABETES MELLITUS TIPO 2**

La DM2 es una condición heterogénea que no es atribuible a un solo mecanismo fisiopatológico; son necesarias la resistencia a la insulina y una secreción deficiente de ésta para que la enfermedad se manifieste. La frecuencia de DM2 en ciertas familias y poblaciones étnicas sugiere un fuerte antecedente genético para la enfermedad, sin embargo, son necesarios factores del medio ambiente como obesidad y estilo de vida sedentario para desarrollar la enfermedad (Alpizar, 2001). La DM2 cursa con hiperglucemia e insulino-resistencia, los primeros eventos inician, como ya se mencionó, con un déficit en la secreción de insulina y en muchos pacientes se da una deficiencia relativa de la misma en asociación con resistencia periférica (Mahler, 1999; Tusié 2000).

#### ***III.3.1. Fisiopatología***

Desde hace tiempo, se ha discutido la contribución de los dos principales defectos (falla de la célula  $\beta$  y resistencia a la insulina) de la génesis de la diabetes. Aún no ha sido posible identificar el defecto inicial, sin embargo se ha observado que uno de los aspectos iniciales son los cambios en la pulsatilidad de la insulina (liberación de insulina asincrónica) que se caracterizan por una alteración en la primera fase de secreción de insulina durante la estimulación de glucosa y pueden preceder la aparición de intolerancia a la glucosa. Los defectos en la pulsatilidad con la que se secreta la insulina, son causa de menor actividad de la hormona en los tejidos periféricos, incrementando la gluconeogénesis hepática (Islas Andrade & Revilla Monsalve, 2005).

Esta desregulación en la pulsatilidad es precedida por:

- Disminución de la masa de células  $\beta$  (por el depósito de ácidos grasos, colesterol y otros lípidos tóxicos) disminuyendo la cantidad de insulina secretada; hasta ser insuficiente para inhibir la lipólisis y la gluconeogénesis.
- Baja respuesta de las células  $\beta$  al estímulo con glucosa,

- Hiperinsulinismo dependiente de proinsulina,
- Disminución del contenido de insulina en la célula  $\beta$ ,
- Aumento de gránulos inmaduros en la célula  $\beta$ ,
- Aumento del volumen de células  $\beta$  y
- Aumento en la secreción de glucagón.

Las vías de resistencia a la insulina así como la disminución de la secreción de insulina reducen la señalización de ésta en sus tejidos blanco, lo que lleva a un aumento de los ácidos grasos circulantes y a hiperglucemia de la diabetes. La glucosa y los ácidos grasos en sangre son reincorporados al páncreas empeorando la secreción y la resistencia a la insulina, conduciendo finalmente a la insuficiencia en la función de las células  $\beta$ . Todos estos eventos anteceden y acompañan a la DM2 (Mahler, 1999; Guzmán, 2003; Salehi, 2006; Alpízar-Salazar 2007).

### ***III.3.2. Epidemiología.***

La diabetes se considera una pandemia con tendencia ascendente, estimaciones recientes refieren la existencia de 366.2 millones de enfermos en el mundo, cifra que de acuerdo a la Federación Internacional de Diabetes (IFD) podría duplicarse para el año 2030 (Figura 1)

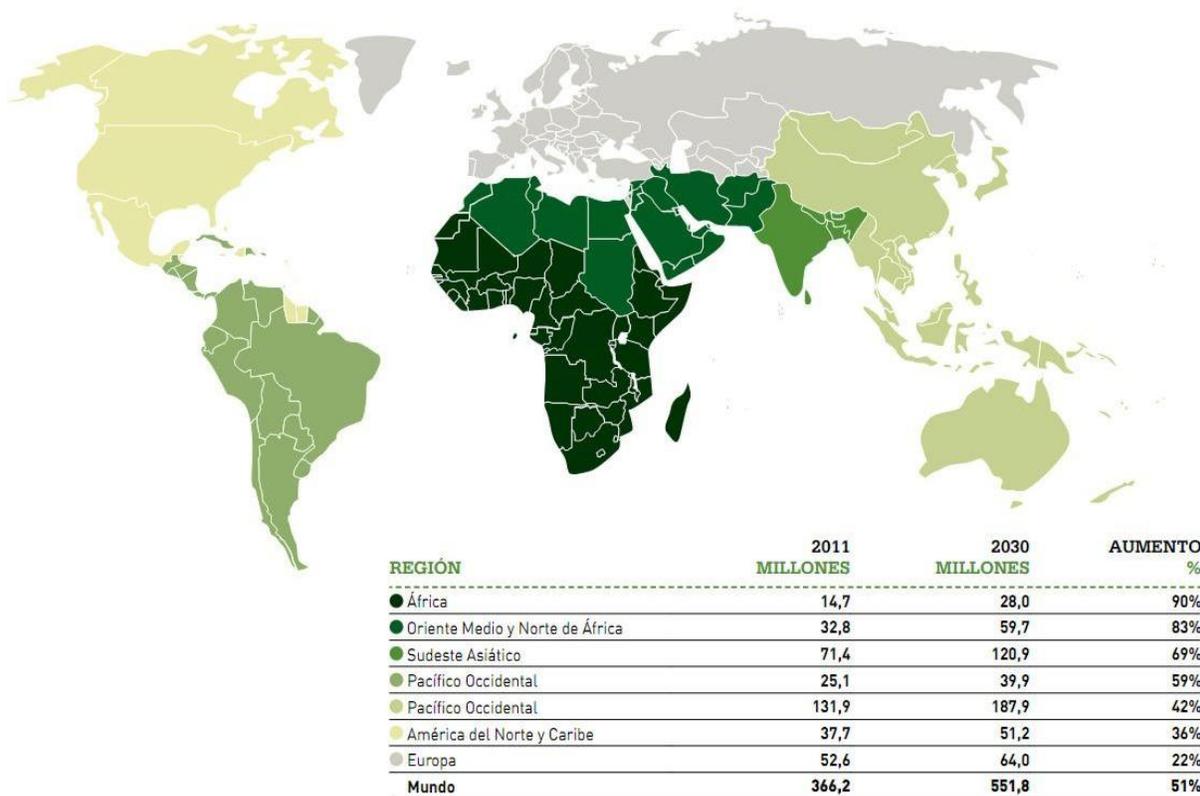


Figura 1 Proyecciones mundiales del número de personas con Diabetes (20-79 años), 2011 y 2030 (Federación Internacional de Diabetes)

### III.3.3. Diabetes Mellitus tipo 2 en México.

México se encuentra entre los primeros 10 países con mayor número de diabéticos (IDF, 2009; Martorell, 2005). Entre 1980 y 2000, la DM se convirtió en la primera causa de muerte en la población mexicana y durante los últimos siete años su mortalidad ha crecido a un ritmo superior a 3% anual (Olaiz-Fernández, 2006).

Una encuesta realizada en el año 2000 por la Secretaría de Salud mostró que en México existen más de cuatro millones de personas enfermas, de las cuales poco más de un millón no han sido diagnosticadas, mientras que según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006 (ENSANUT 2006), la prevalencia nacional de diabetes por diagnóstico médico previo en adultos fue de 7,0% (7,3% mujeres y 6,5% hombres). Cabe destacar que dicha prevalencia se acentúa en función de la edad; así, para el grupo de 50 a 59 años, dicha proporción llegó a 13,5% (14,2% mujeres y 12,7% hombres) y para el grupo de 60 a 69 años, 19,2% (21,3% mujeres y 16,8% hombres)

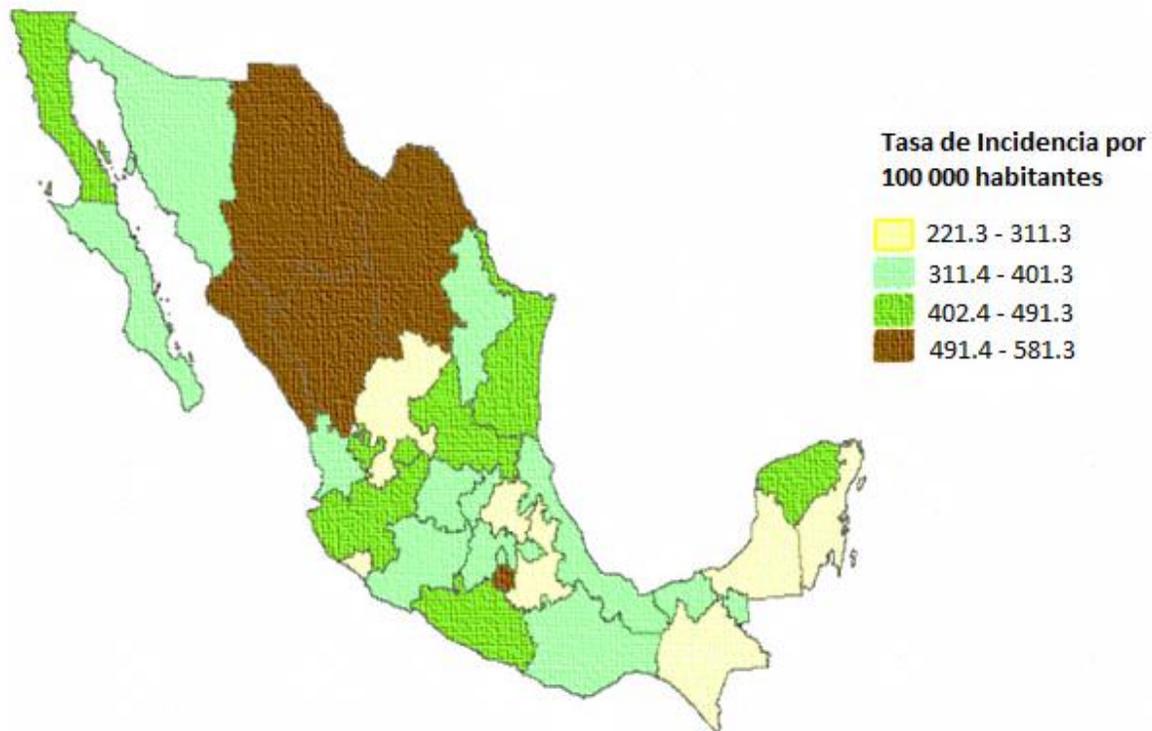


Figura 2 Incidencia de DM2 en México (2010). Modificado de SUAVE/DGE/SALUD. SUIVE/ INEGI 2010

Debido a su asociación con múltiples complicaciones microvasculares como retinopatía, nefropatía y neuropatía; y macrovasculares tales como infarto agudo de miocardio y enfermedades cerebrovascular y vascular periférica; la DM2 es considerada como un trastorno crónico complejo que conlleva a una disminución de la esperanza y de la calidad de vida en quienes la padecen (ENSANUT, 2006).

#### III.4. GENES ASOCIADOS A DM2

Numerosos estudios han tratado de definir la participación de distintos genes relacionados con el metabolismo y la homeostasis de la glucosa en la patogénesis de la DM2 mediante estudios de asociación, de ligamiento genético o buscando polimorfismos. Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) son variaciones de la secuencia de DNA que ocurren por el cambio de un solo nucleótido de la secuencia. Para que una variación se considere como SNP debe presentarse en al menos 1% de la población; representan el 90% de las variaciones en el genoma humano y ocurren en promedio cada 40 nucleótidos (Hidalgo, 2006).

A las variaciones que se heredan conjuntamente como un bloque se les llama Haplotipo. Es decir, combinaciones de dos o más SNP en un mismo cromosoma que pasan juntos a la siguiente generación. Los bloques de haplotipos miden en promedio 20 mil nucleótidos, y tienen en promedio cerca de 50 SNP (Hidalgo, 2006).

Entre los más de 300 genes que se han investigado, se ha logrado identificar en las regiones cromosómicas 1q21-24, 1q31-q42, 2q, 3p25, 5q, 6q 8p, 9q21 10q12.3, 10q23, 11p15, 11q13-14, 12q12, 19q13 Y 20q11-q13 genes implicados en la susceptibilidad a la DM2 o rasgos metabólicos cuantitativos asociados a esta (Tusié, 2000).

Estos genes son: *PPARG*, *KCNJ11*, *TCF7L2*, *COKAL1*, *CDKN2A1B*, *IGF2BP2*, *HHEX/IDE*, *FTO* y *SLC30A8*. Tres de ellos (*TCF7L2*, *PPARG* y *KCNJ11*) se han reportado como los más implicados a nivel mundial en el desarrollo de DM2 en diversas poblaciones (Tusié, 2000).

Las variaciones más comunes en la secuencia de ácido desoxirribonucleico (DNA), corresponden a polimorfismos de un solo nucleótido (SNP). Los SNP ocurren en promedio cada 400 nucleótidos (Adenina, A; Guanina, G; Citosina, C; o Timina, T) y hay cerca de 10 millones de ellos en todo el genoma; la gran mayoría son bialélicos, es decir, alternan entre dos nucleótidos (Hidalgo, 2006).

En la tabla 2 se muestran los principales SNP en los genes asociados a DM2.

Tabla 2 Genes y SNP asociados a DM2

Gen	SNP	Locus	Función
<b><i>HNF4A</i></b>	<i>rs1884613</i> C>G	20q13.12	Factor nuclear que regula el metabolismo de lípidos y carbohidratos. Es un activador transcripcional de varios genes. Necesario para la correcta secreción de insulina en respuesta a glucosa
	<i>rs2144908</i> G>A		
	<i>rs1800961</i> C>T		
<b><i>TCF7L2</i></b>	<i>rs4506565</i> T>A	10q25.3	Factor nuclear que transcribe proglucagon y genes de insulina.

	<i>rs7903146</i> C>T		
<b>PPARG2</b>	<i>rs17036328</i> T>C <i>rs1801282</i> G>C Pro12Ala <i>rs17036314</i> G>C	3p25	Receptor nuclear que regula el almacenamiento de ácidos grasos y metabolismo de la glucosa.
<b>KCNJ11</b>	<i>rs5215</i> G>A Val337Ile. <i>rs5219</i> A>G Lys23Glu	11p15.1	Gen que codifica la Proteína integral de membrana Kir 6.2 subunidad que asociada con el receptor de sulfonilureas (SUR) forman el canal de potasio sensible-ATP
<b>HHEX</b>	<i>rs7923837</i> A>G <i>rs1111875</i> T>C	10q23.33	Factor de transcripción de la familia <i>homeobox</i> involucrado en procesos de desarrollo y expresión en determinados linajes hematopoyéticos
<b>SLC30A8</b>	<i>rs3802177</i> G>A <i>rs13266634</i> T>C Arg325Trp	8q24.11	Transportador de Zinc en las células beta almacenaje y secreción de insulina
<b>CDKAL1</b>	<i>rs7756992</i> A>G <i>rs7754840</i> G>C	6p22.3	Homólogo a CDCDK5RAP1, inhibidor de CDK5.
<b>FTO</b>	<i>rs8050136</i> C>A <i>rs9939609</i> T>A	16q12.2	Gen asociado a la obesidad y al índice de masa corporal
<b>TCF1</b>	Gln4863>paro	12q24.2	Gen de la proteína del Factor hepatocítico nuclear 1 alfa , que regula la expresión de varios genes en el hígado, defectos en este gen causan MODY tipo 3
<b>IRS1</b>	<i>rs1801278</i> G>A	2q36	Gen del Sustrato receptor de la insulina tipo 1, participa en la cascada de señalización inducida

	Gly972 Arg rs2943641 T>C		por la insulina,
<b>IGF2BP2</b>	rs4402960 G>T rs1470579 A>C rs4402960 G>T	3q27.2	Gen de la Proteína de unión al factor de crecimiento; participa en el desarrollo pancreático1
<b>CDKN2B</b>	rs10811661 C>T	9P21.3	Inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina y supresor de tumores p15, participa en el desarrollo de los islotes pancreáticos.
<b>ADAMTS9</b>	rs7578597 T>C Thr1187Ala rs4607103 T>C	3p14.1	Gen que codifica una proteína miembro de la familia ADAMTS, implicada en el clivaje de proteoglicanos, en el control de la forma de los órganos durante el desarrollo y la inhibición de la angiogénesis.
<b>CAPN10</b>	Intrón 3 UCSNP-43 G>A rs3842570 IVS6, INS/DEL, 39-BP	2q37.3	Cistein-proteasa que participa en la regulación de la apoptosis de las células β.

### III.5. TCF7L2

*TCF7L2*, gen ubicado en el cromosoma 10q25.3 que codifica para un factor de transcripción de la vía de señalización Wnt, se sabe que tienen funciones de desarrollo en la determinación del destino celular, la supervivencia, la proliferación y movimiento (Moon, 2004;. Clevers, 2006; MacDonald, 2009).

Existen cuatro factores de células T en mamíferos:

- TCF7 o TCF-1
- LEF-1
- TCF7L1 o TCF-3
- TCF7L2 o TCF-4

El factor de célula T tipo 2, se involucra en la regulación de la transcripción del proglucagon y en la producción del péptido tipo glucagón 1 (GLP-1) en las células L del intestino dada su participación en la vía de señalización WNT (Jin, 2008).

Dada la complejidad de esta vía y a que todos los SNP identificados en el gen *TCF7L2* se encuentran en regiones intrónicas; la manera en que estos SNP afectan la expresión del gen y que conlleve al riesgo de desarrollo de DM2, aún se desconocen (Jin, 2008).

Lyssenco y colaboradores proponen que los SNP asociados a DM2 pueden influir aumentando la expresión de *TCF7L2* en los islotes pancreáticos que reduce la secreción de insulina pero no la de glucagón; sin embargo los mecanismos exactos por los que dichas alteraciones se relacionan con la secreción de insulina requieren más estudios (Lyssenco, 2007).

Diversas variantes en el gen *TCF7L2* se han asociado de manera consistente con la DM2 en poblaciones de diferente origen étnico. Entre ellos, el alelo T *rs7903146* es probablemente la mejor opción para evaluar el efecto de este gen en el riesgo de DM2 (Cauchi, 2007).

Se ha investigado la asociación entre el polimorfismo *rs7903146* y la DM2 en los marroquíes (406 personas normoglucémicos y 504 sujetos con DM2) y los austríacos caucásicos (1075 personas normoglucémicos y 486 sujetos DM2). Los odds ratio (OR) para DM2 fueron 1.56 [1.29 – 1.89] ( $p= 2.9 \times 10^{-6}$ ) y 1.52 [1.29-1.78] ( $p= 3.0 \times 10^{-7}$ ) en los marroquíes y los austríacos, respectivamente (Cauchi, 2007).

En 2007 Chandak y colaboradores realizaron un estudio de asociación de los SNP *rs7903146*, *rs12255372* y *rs4506565* en el gen *TCF7L2*, y la DM2 en una población india y observaron una fuerte asociación con todos los polimorfismos: *rs12255372* OR=1.50 [95% CI=1.24–1.82],  $p=4.0 \times 10^{-5}$ , *rs4506565* OR=1.48 [95% CI=1.24–1.77],  $p=2.0 \times 10^{-5}$  y *rs7903146* OR=1.46 [95% CI=1.22–1.75],  $p=3.0 \times 10^{-5}$  (Chandak, 2007).

En lo que respecta a la población mexicana, en 2010 el Dr. Cruz y su grupo de trabajo analizaron la asociación de 14 polimorfismos localizados en 10 genes (*TCF7L2*, *ENPP1*, *ADRB3*, *KCNJ11*, *LEPR*, *PPAR*, *FTO*, *CDKAL1*, *SIRT1* y *HHEX*) y DM2 y síndrome metabólico en el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). En este estudio se incluyeron 519 sujetos diabéticos, 389 con síndrome metabólico y 547 controles. Los SNP localizados en el gen *TCF7L2* (*rs7903146*, alelo T, OR= 1.76,  $p= 0.001$  y *rs12255372*, alelo T, OR= 1.78,  $p= 0.002$ ), mostraron fuerte asociación con DM2 pero no con síndrome metabólico (Cruz, 2010).

### **III.6. LA TÉCNICA DE DISCRIMINACIÓN ALÉLICA CON SONDAS TAQMAN®**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica de Biología Molecular suficientemente sensible que permite la rápida amplificación de secuencias de DNA a partir de una sola célula en cantidades suficientes para la clonación o secuenciación. Se utiliza la PCR en el diagnóstico clínico, análisis genético, ingeniería genética y análisis forense (Clark, 2011).

Se utiliza la DNA polimerasa para la síntesis de DNA utilizando una molécula de DNA pre-existente como plantilla. Cada nueva molécula de DNA sintetizado se convierte en una plantilla para generar más, creando así una reacción en cadena. La PCR en realidad amplifica sólo un segmento de DNA (la secuencia diana), no la molécula completa de DNA (Clark, 2011).

La discriminación alélica es un ensayo PCR de punto final, que contiene más de un par de sondas por reacción. La presencia de dos sondas permite detectar dos posibles variantes tipo SNP en una secuencia determinada (Applied Biosystems, 2010).

La tecnología de sondas TaqMan® utiliza la actividad de nucleasa 5'-3' de la Taq polimerasa para permitir la detección del producto de PCR mediante la liberación de un reportero fluorescente resultado de la PCR.

Dos sondas TaqMan® son usadas en la discriminación alélica, una para cada alelo en un sistema de dos alelos. Cada prueba consiste de un oligonucleótido con un

reportero en el extremo 5' y un *quencher* o silenciador en el extremo 3'. Los marcadores ocupados son VIC® para el alelo 1 (*wildtype*) FAM™ (6-carboxyfluorescein) para el alelo 2, el alelo mutado. El quencher utilizado es ROX™ (5-Carboxy - X - rhodamine) (Applied Biosystems, 2010).

En la fase de polimerización, la sonda se encuentra intacta e hibridada con el DNA; por lo tanto la proximidad del reportero y el *quencher*, o cebador, inhibe la fluorescencia del reportero (Figura 3A). Durante la PCR cuando los *primers* (oligonucleótidos) *forward* (sentido) y *reverse* (anti sentido) se anclan al DNA y la polimerasa comienza la amplificación sucede el desplazamiento de la sonda (Applied Biosystems, 2010).

La Taq polimerasa también repara errores en el DNA tales como triples cadenas; este fenómeno ocurre durante la polimerización, por lo tanto la DNA polimerasa rompe la sonda separando el quencher del reportero en la fase de separación, resultando en el incremento de fluorescencia del reportero. Sin embargo, como se puede observar en la Figura 3D, el extremo 3' permanece bloqueado con el quencher para prevenir la amplificación de esta sonda durante la PCR (Applied Biosystems, 2010).

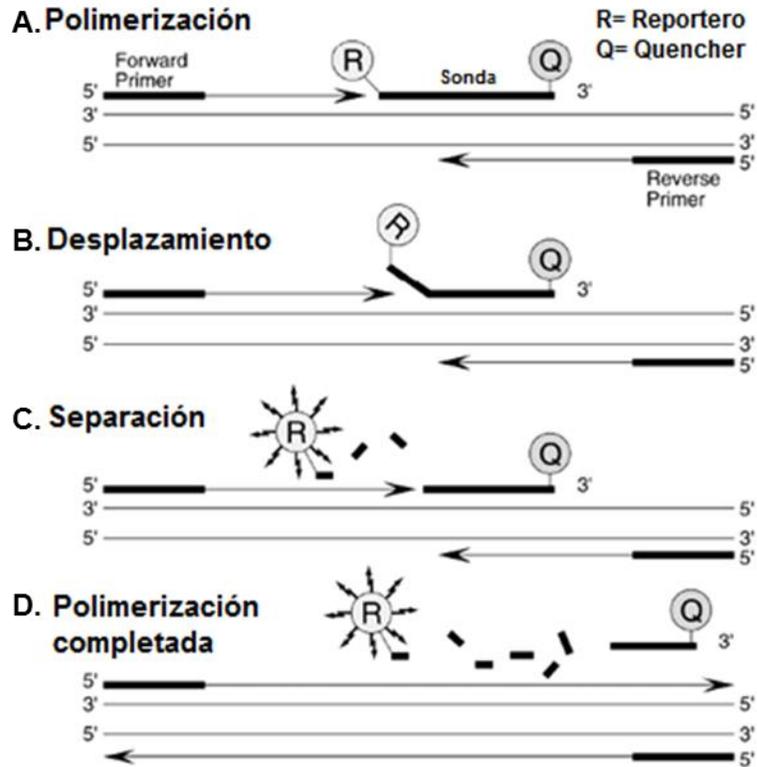


Figura 3 Reacción de PCR con sondas Taqman (Applied Biosystems, 2010)

El proceso previamente descrito sucede cada ciclo y no interfiere en la acumulación exponencial del producto. El aumento de la fluorescencia se mide, y es una consecuencia directa de amplificación de la diana durante la PCR. Las señales de fluorescencia se generan sólo si las secuencias de las sondas se amplifican durante la PCR. Debido a estos requisitos, la amplificación no específica no se detecta (Applied Biosystems, 2010).

La discriminación consiste en una lectura de barrido de cada tubo una vez que la PCR ha terminado y genera los siguientes grupos de acuerdo a la fluorescencia emitida "No DNA", "Alelo X" y "Alelo Y". Los resultados se presentan en grupos según la fluorescencia detectada como se muestra en la figura 4 (Applied Biosystems, 2010).

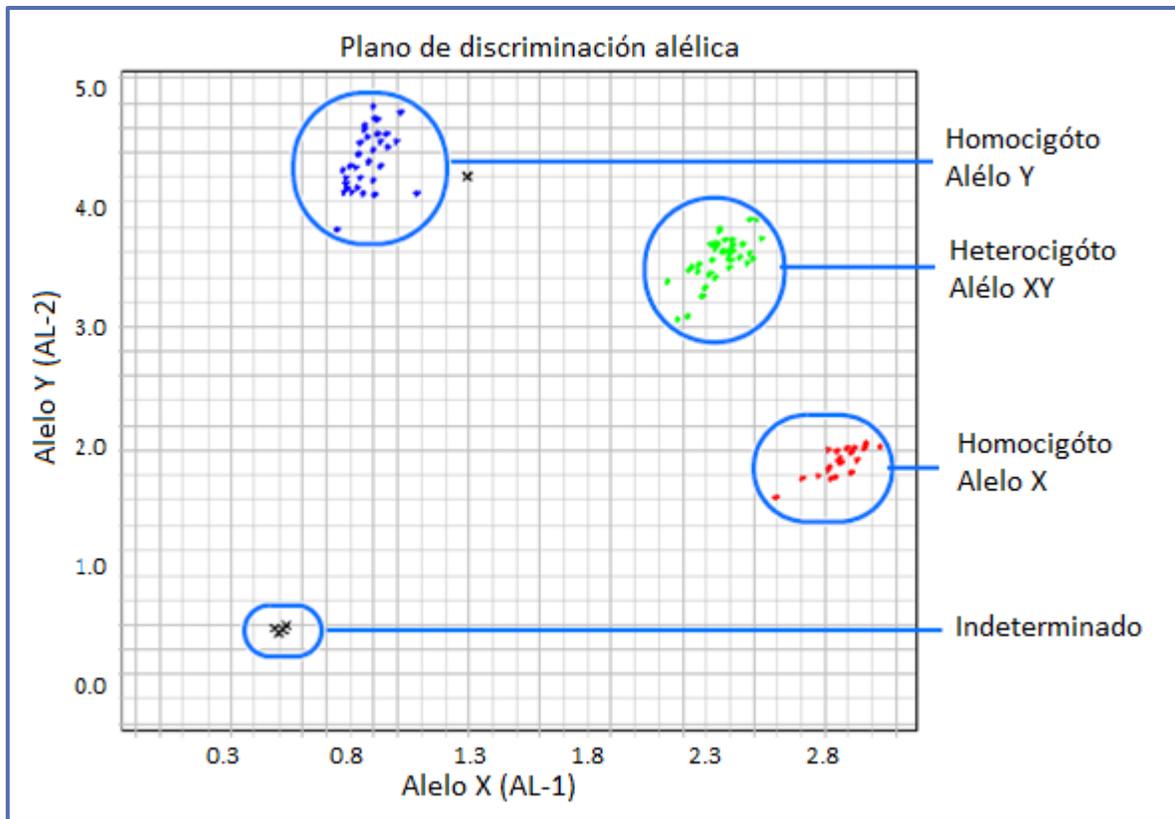


Figura 4 Resultados de una discriminación alélica (Applied Biosystems, 2010).

#### IV. JUSTIFICACIÓN

La DM2 presenta una alta prevalencia en la población mexicana, generando a nuestros sistemas de salud altos costos de atención médica. El gasto anual por diabetes en nuestro país se calcula en un 4.7% del gasto público, destinado a la Secretaría de Salud (38 millones de dólares). La identificación temprana de los grupos de alto riesgo y/o afectados por la enfermedad reduciría el impacto negativo en la economía y disminuiría la morbi-mortalidad presentada.

Por esta razón, se buscó evaluar la frecuencia de los polimorfismos *rs7903146* (C/T) y *rs12255372* (G/T) del gen *TCF7L2* en una población de pacientes diabéticos y otra de derechohabientes no diabéticos, atendidos en la Clínica de Especialidades Médicas del Ejército y Fuerza Aérea Mexicana con el fin de estudiar, si existe asociación entre la presencia del polimorfismo y el inicio y progreso de la enfermedad.

Esto a su vez podría ser utilizado posteriormente como un marcador pronóstico para tomar medidas terapéuticas y preventivas en los pacientes diabéticos y poblaciones en riesgo respectivamente; que permitan, no sólo, disminuir la mortalidad y mejorar la calidad de vida de quienes padecen la enfermedad, sino también disminuir los grandes costos de atención médica que este tipo de padecimientos representan para los sistemas de salud.

## V. OBJETIVOS

### **Objetivo General**

Determinar la frecuencia haplotípica de los polimorfismos de un solo nucleótido *rs7903146 (C/T)* y *rs12255372 (G/T)* en el gen *TCF7L2* en una población mexicana mediante la técnica de discriminación alélica con sondas Taqman®, comparando un grupo de personas diagnosticadas con diabetes mellitus tipo 2 y un grupo de individuos no diabéticos; para establecer si existe asociación entre la presencia de algún polimorfismo y la enfermedad que lo haga considerarse como un factor de riesgo.

### **Objetivos Particulares**

Determinar las frecuencias genotípicas y alélicas y haplotípicas de los SNP *rs7903146 (C/T)* y *rs12255372 (G/T)* en el gen *TCF7L2* mediante PCR con sondas Taqman®.

Establecer si existe asociación entre la frecuencias analizadas y el riesgo de desarrollar Diabetes Mellitus tipo, 2 mediante el cálculo de Odds Ratio (OR).

## VI. MATERIAL Y MÉTODOS

### **Grupo de estudio y Obtención de muestras**

Para realizar este estudio se formaron dos grupos, un grupo de casos que consistió en 281 derechohabientes, mayores de 40 años, con diagnóstico de DM2 que acudieron a la Unidad de Especialidades Médicas durante los meses de enero de 2011 a marzo de 2012; y un grupo de controles que incluyó al personal de la planta laboral de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad (EMGS) y derechohabientes de la Unidad de Especialidades Médicas clínicamente sanos y sin antecedentes familiares de diabetes mellitus tipo 2, conformado por un total 137 individuos.

Ambos grupos fueron informados sobre el tipo de estudio en que participarían, los métodos para la obtención de muestra y los posibles riesgos y efectos secundarios resultantes de este estudio. Todos los pacientes accedieron voluntariamente a participar y firmaron una Carta de consentimiento informado (Anexo1), además de llenar un cuestionario (Anexo 2) donde se recolectaron los datos personales y bioquímico-antropométricos dentro de los que se incluyen: edad, peso, talla y nivel de glucosa basal; en caso de no contar con este último, fue solicitado a su médico familiar.

Se tomaron dos muestras mediante el cepillado del carrillo bucal usando cepillos citológicos que posteriormente se colocaron en tubos Ependorff con 2.0 ml de buffer de fosfatos (PBS) 1X. Estos tubos se conservaron a una temperatura de 4°C y se transportaron al Laboratorio Multidisciplinario de Investigación de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad para la posterior extracción de DNA.

### **Extracción de DNA**

Se realizó una extracción en columnas usando el kit *DNeasy Blood and tissue* de Qiagen (Figura 5), siguiendo el protocolo establecido por la casa comercial.

Esta técnica consiste en la extracción de DNA con solventes por afinidad de cargas, utilizando columnas que permiten la retención del DNA en ellas. La extracción inició con la

lisis de las células utilizando proteinasa K y buffer de lisis. Posteriormente se incubaba a 70°C para favorecer la acción de la proteinasa K; y se realizan lavados con diferentes buffers.



Figura 5. Kit de extracción DNeasy de Quiagen (Fotografía tomada en la EMGS).

### **Integridad de DNA por electroforesis**

Para confirmar la integridad del DNA previamente extraído, se hizo un corrimiento electroforético en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio en TBE 0.5% (Tris-HCl 88 mM, EDTA 2mM); en una cámara de electroforesis modelo *Horizon 58* (Gibco BRL Life Technologies) a un voltaje constante de 90 volts durante 15 minutos.

Para observar el DNA en el gel, se utilizó un transiluminador de luz ultravioleta (Bio-imaging systems) y se capturaron fotografías con el fotodocumentador *Kodak Gel Logic 100* que utiliza una cámara Polaroid modelo MP4 (Figura 6).



Figura 6. Transiluminador con fotodocumentador (Fotografía tomada en la EMGS).

### Cuantificación de DNA

Para la cuantificación de DNA se utilizó el espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Figura 7) midiendo la absorbancia a  $\lambda=260$  nm, y mediante la relación 260/280 se corroboró la pureza de la muestra.

Para realizar la cuantificación se ejecutó el software del instrumento y se seleccionó la opción de "DNA", posteriormente se calibró usando 2  $\mu$ l de agua grado inyectable; finalmente se cuantificaron las muestras colocando 2  $\mu$ l de cada una en el espectrofotómetro.



Figura7. Nanodrop 1000 Thermo Scientific para la cuantificación de DNA (Fotografía tomada en la EMGS).

Para las muestras con una concentración de DNA muy elevada se realizó la dilución correspondiente para tener una concentración final de 10 ng/ $\mu$ l.

### Discriminación Alélica

#### **i. PCR con sondas Taqman**

Se realizó la mezcla de reacción para el número de muestras que se procesaron en cada ensayo o corrida, usando la mitad de reactivos de lo establecido en el inserto de *Applied Biosystem* (Tabla 3).

Tabla 3 Mezcla de reacción para una reacción (1x), para las reacciones de una placa (96x) y considerando un excedente (102x).

	1x	96x	102x
<b>Master Mix</b>	6.250 $\mu$ l	600.0 $\mu$ l	637.50 $\mu$ l
<b>Sonda</b>	0.625 $\mu$ l	60.0 $\mu$ l	63.75 $\mu$ l

La solución *Master Mix* contiene todo lo necesario para llevar a cabo una PCR, es decir; *primers*, cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>), Taq polimerasa y agua en las cantidades adecuadas.

Las sondas contienen las dos posibles secuencias para la mutación unidas a un *quencher*. Constan de aproximadamente 50 bases.

La sonda para el polimorfismo *rs7903146* (C/T) fue la siguiente:

**TAGAGAGCTAAGCACTTTTATAGATA [C/T]TATATAATTTAATTGCCGTATGAGG**

Y está ubicada en el gen en la siguiente posición:

```
... GAGAAAGCAG GATTGAGCAG GGGGAGCCGT CAGATGGTAA TGCAGATGTG
ATGAGATCTC TGCCGGACCA AAGAGAAGAT TCCTTTTTTAA ATGGTGACAA
ATTCATGGGC TTTCTCTGCC TCAAAACCTA GCACAGCTGT TATTTACTGA
ACAATTAGAG AGCTAAGCAC TTTTATAGATA CTATATAATT TAATTGCCGT
ATGAGGCACC CTTAGTTTTT AGACGAGAAA CCACAGTTAC AGGGAAGGCA
AGTAACTTAG TCAATGTCAG ATAACTAGGA AAAGGTTAGA GGGGCCCTGG ...
```

La sonda para el polimorfismo *rs12255372* (G/T) fue la siguiente:

**TGCCAGGAATATCCAGGCAAGAAT[G/T]ACCATATTCTGATAATTACTCAGGC**

Y está ubicada en el gen en la siguiente posición:

```
... ACTAAGGCGT GAGGGACTCA TAGGGGTCTG GCTTGGAAAG TGTATTGCTA
TGTCCAGTTT ACACATAAGG ATGTGCAAAT CCAGCAGGTT AGCTGAGCTG
CCCAGGAATA TCCAGGCAAG AATGACCATA TTCTGATAAT TACTCAGGCC
TCTGCCTCAT CTCCGCTGCC CCCCCGCCC CTGACTCTCT TCTGAGTGCC
AGATTCAGCC TCCATTTGAA TGCCAAATAG ACAGGAAATT AGCATGCCCA
GAATCCACGT CTTTAGTGCA CTCTCTCCCC ...
```

A cada pocillo se agregaron 5.625 µl de DNA y en cada ensayo se establecieron tres blancos de reactivo, sustituyendo en DNA con agua estéril. Obteniendo así un volumen total de 12.5 µl en cada pocillo.

Una vez lista la placa se cubrió con una mica óptica, que permite la detección de la fluorescencia emitida; y se procedió a realizar una PCR en el equipo *7000 Sequence Detection System* de *Applied Biosystems* (Figura 8) bajo las siguientes condiciones:

Tabla 4. Condiciones de amplificación de PCR

Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
95°C	10 min	1
92°C	15 seg	40
60°C	60 seg	1



Figura 8. Equipo para PCR en Tiempo Real 7000 Sequence Detection System de Applied Biosystems (Fotografía tomada en la EMGS).

Al establecer las condiciones de la PCR en el equipo en cada ensayo; se seleccionaron los marcadores (fluoróforos) correspondientes para cada tipo de sonda, en este caso se utilizaron: VIC para la sonda del gen silvestre (*wildtype*) y FAM para la sonda del gen mutado.

#### i. Discriminación Alélica

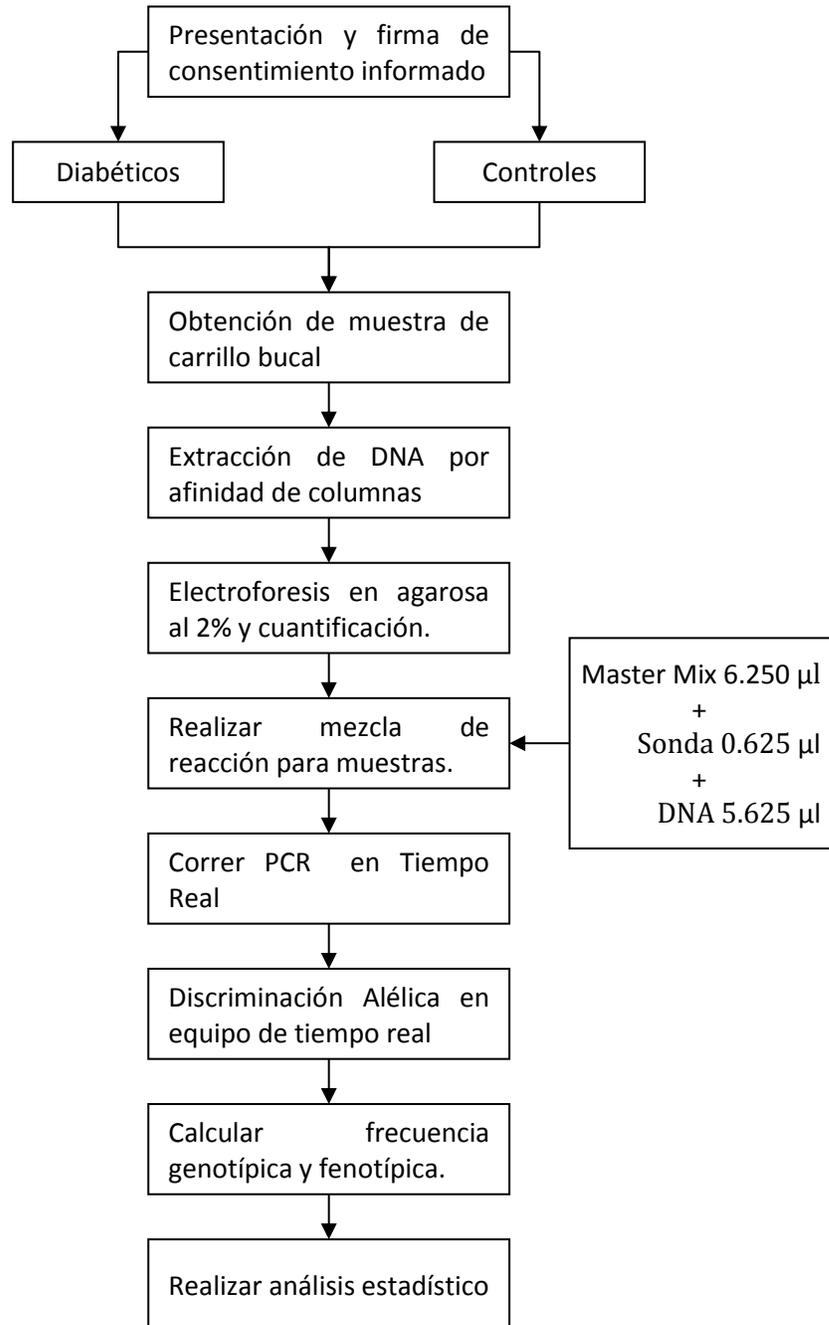
Posterior a la amplificación del DNA se procedió a realizar la discriminación alélica en el equipo *7000 Sequence Detection System* de *Applied Biosystems* por lo que se programaron nuevos ensayos, en la misma placa. Se seleccionaron los mismos

marcadores usados para la amplificación y se hicieron dos detecciones; una llamada *pre-read* (pre-lectura) y una llamada *post-read* (post-lectura). Cada detección consta de un solo ciclo de 60 segundos a 60°C donde se mide la fluorescencia emitida en cada pocillo.

### **Análisis estadístico**

Se realizó el análisis estadístico con el software EPIINFO y Sigmastat. A todos los datos; calculando la media de la edad, peso, altura, índice de masa corporal y niveles de glucosa basal de cada grupo de estudio. En lo que respecta a los resultados de frecuencia genotípica y alélica se determinaron  $\chi^2$  y OR.

## VI.1 DIAGRAMA DE FLUJO EXPERIMENTAL

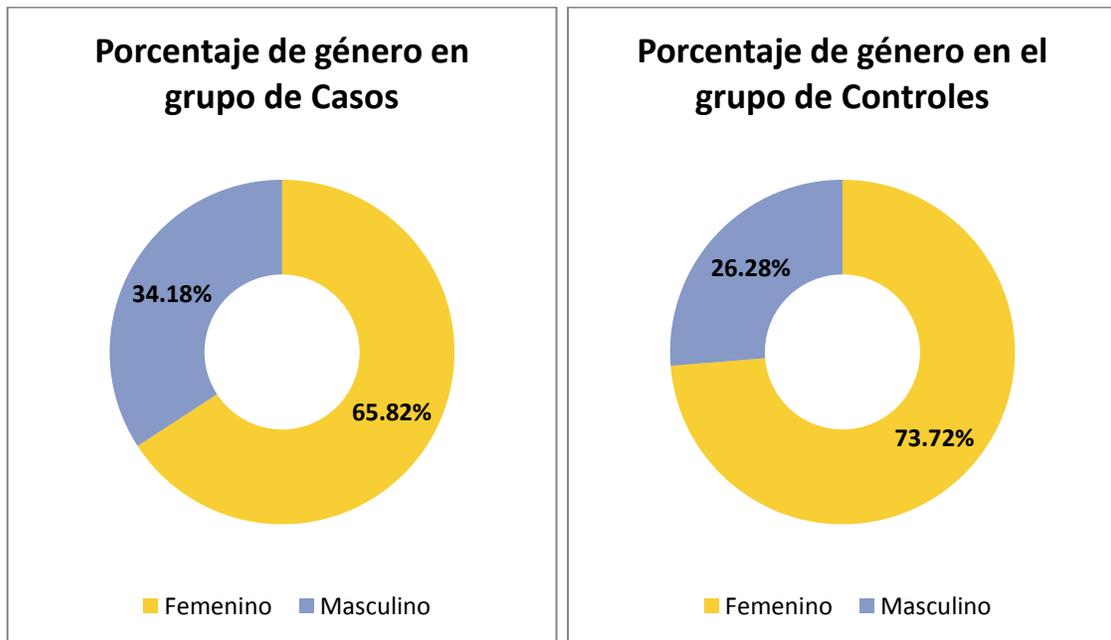


## VII. RESULTADOS

Durante el periodo comprendido de enero de 2011 a marzo de 2012 se obtuvieron 281 muestras de pacientes diabéticos y 137 muestras de personas no diabéticas. Los datos bioquímico-antropométricos de dichos pacientes se encuentran en la tabla 5.

Tabla 5 Datos bioquímico-antropométricos de la población estudiada.

	Casos	Controles	<i>P</i>
<i>n</i>	281	137	
Mujeres	184	101	
Hombres	97	36	
Edad (años)	62 ± 10.5	57 ± 11.8	<0.001
Peso (Kg)	69.0 ± 13.4	68.7 ± 11.1	0.899
Talla (m)	1.56 ± 0.09	1.57 ± 0.09	0.503
IMC	28.27 ± 4.99	27.87 ± 4.99	0.485
Glucosa (mg/dL)	161.6 ± 70.9	95.6 ± 16.9	<0.001



Gráfica 1. Distribución del grupo de casos según el género.

Gráfica 2. Distribución del grupo de controles según el género



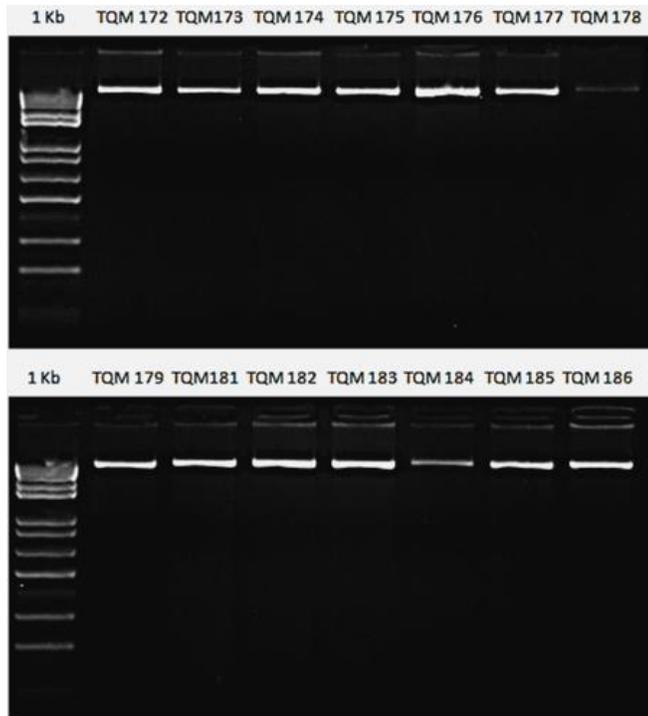


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio de DNA de pacientes diabéticos. A la izquierda, en el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular de 1Kb y en el resto de los pocillos se encuentra el DNA íntegro.

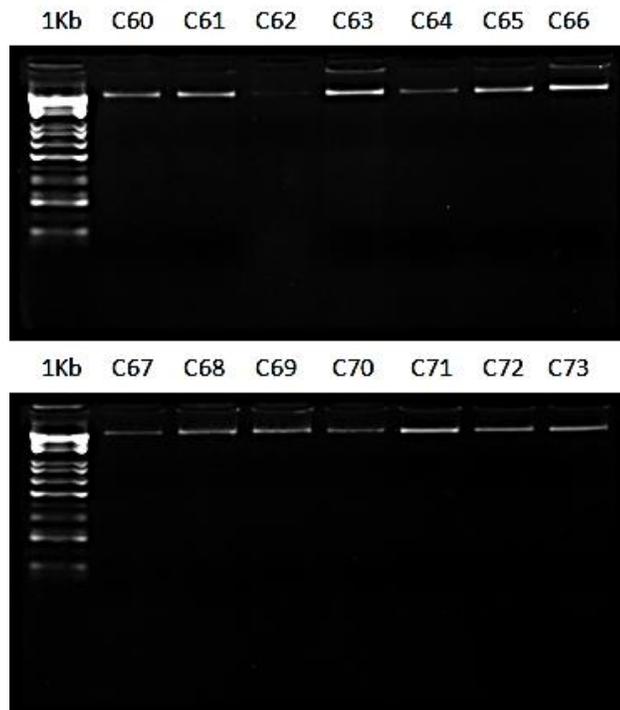


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 2% tenido con bromuro de etidio de DNA de pacientes control. A la izquierda, en el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular de 1Kb y en el resto de los pocillos se encuentra el DNA íntegro.

Los amplicones obtenidos a partir de los ensayos de PCR con sondas Taqman<sup>®</sup> son de aproximadamente 20 pb, como se puede observar en la figura 12.

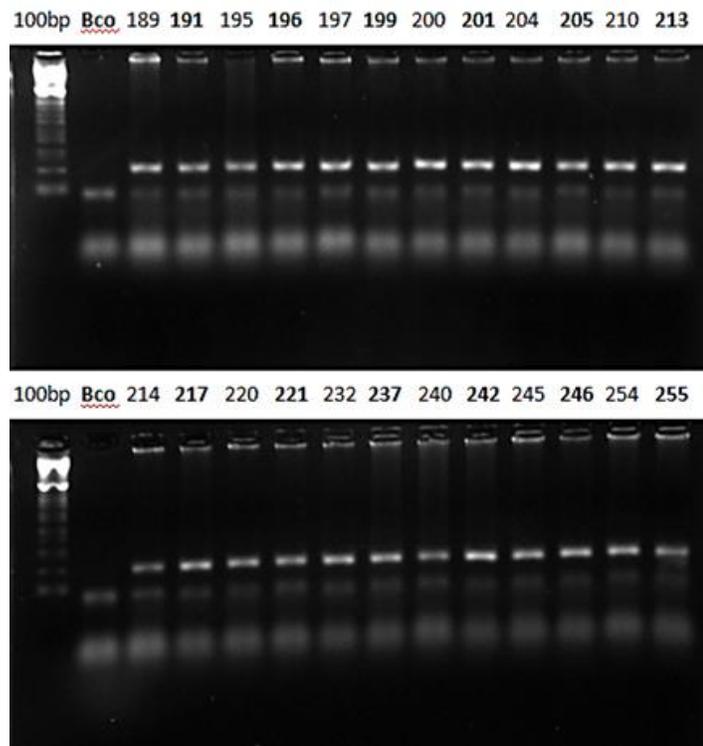


Figura 12. Productos de PCR en gel de agarosa al 4% teñido con bromuro de etidio. A la izquierda en el primer carril se observa un marcador de peso molecular de 100 pb.

El software del equipo proporciona gráficas de la amplificación de acuerdo al ciclo y a la fluorescencia emitida; también se pueden observar graficas que indican la fluorescencia de cada muestra. En las figuras 13 y 14 pueden observarse dichas gráficas para un alelo heterocigoto, uno homocigoto *wildtype* y un homocigoto mutado.

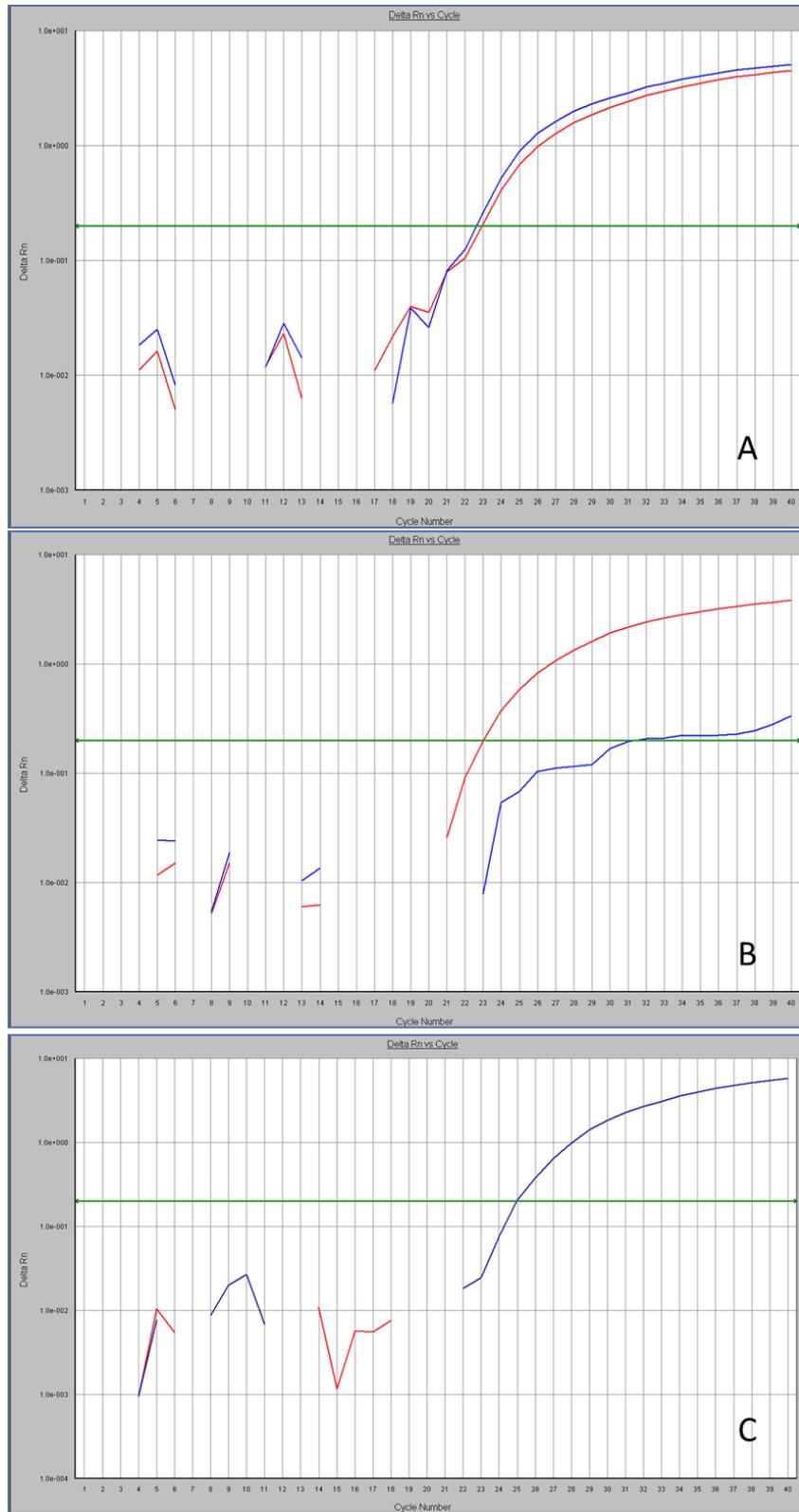


Figura 13 Amplificación en tiempo real de una muestra heterocigota (A), una muestra homocigota para el alelo no mutado (B) y una muestra homocigota para el alelo mutado (C). En el eje x se presenta el número de ciclos de PCR y en el eje Y el Delta Rn.

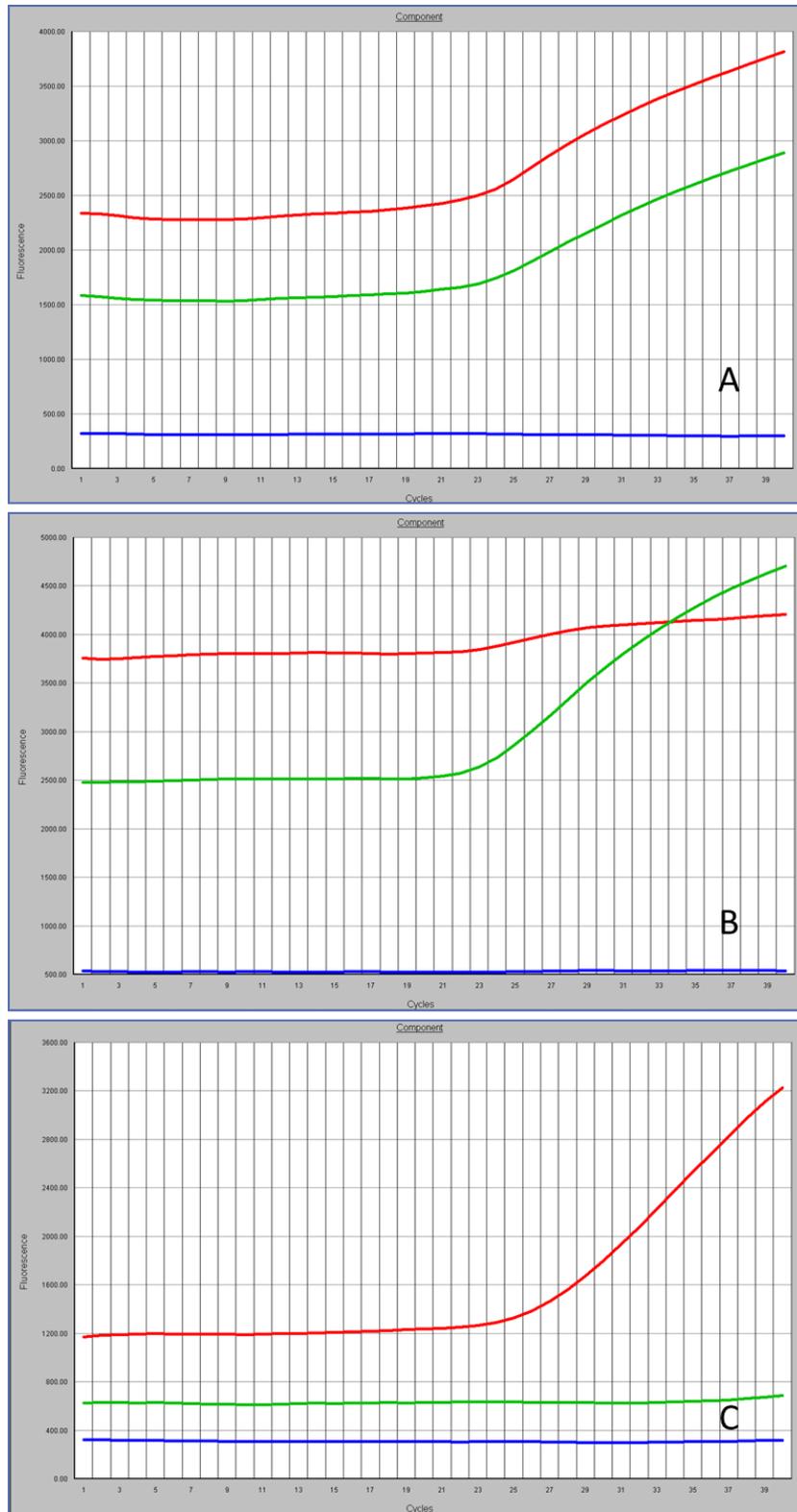


Figura 14 Intensidad de Fluorescencia en muestras heterocigotas, wildtype y homocigotas mutadas en A, B y C respectivamente. En cada gráfica se puede observar la intensidad de fluorescencia emitida por la muestra de acuerdo al fluróforo liberado por la polimerasa.

Otra gráfica que el software proporciona es la de la discriminación alélica (Figura 15) donde se separan las muestras de acuerdo a la fluorescencia emitida.

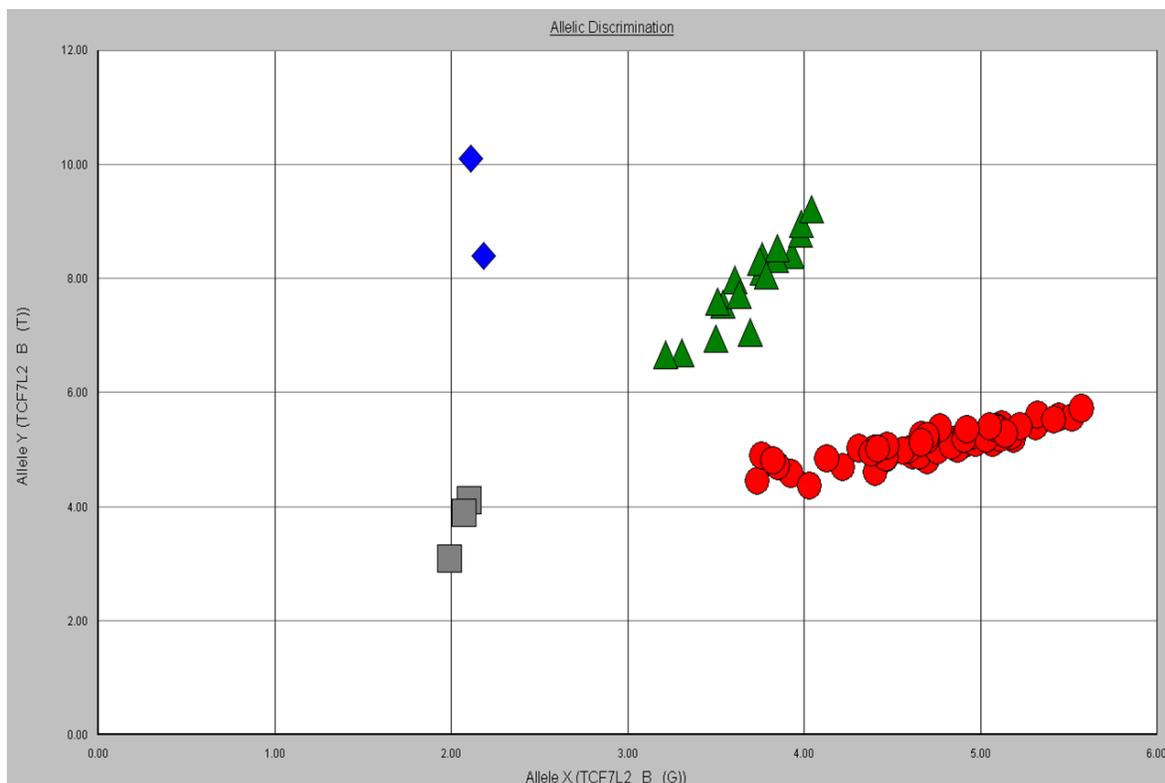
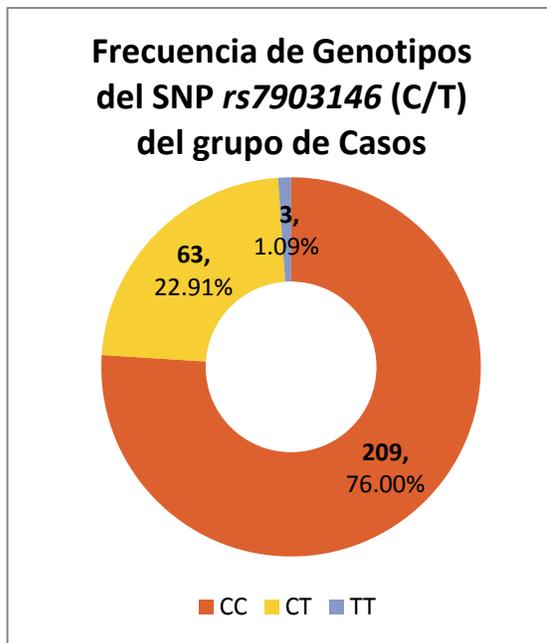


Figura 15 Discriminación alélica de casos. Los cuadros en gris representan los blancos de reactivo, los círculos rojos son las muestras del alelo silvestre (*wildtype*), los triángulos verdes son las muestras que contienen ambos alelos y los rombos azules son muestras de alelos homocigotos para la mutación.

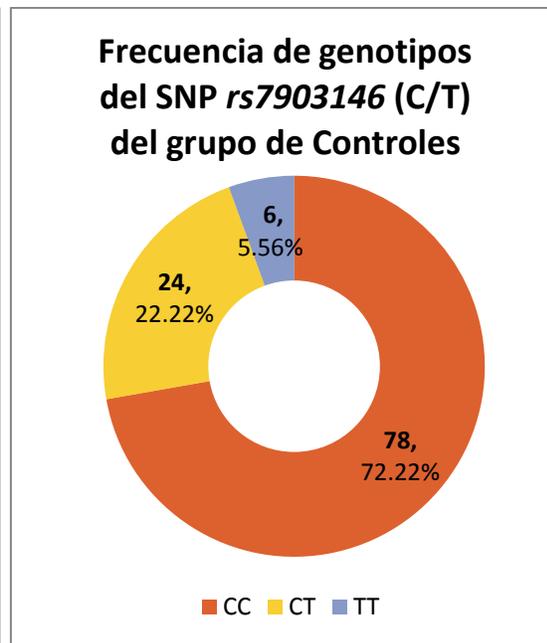
A continuación se muestran los resultados de las frecuencias de los genotipos resultados de la discriminación alélica del polimorfismo *rs7903146* (C/T).

Tabla 6. Resultados de las frecuencias de los genotipos de los grupos de estudio para el polimorfismo *rs7903146* (C/T)

Genotipo	Casos		Controles	
	No. de muestras	Porcentaje	No. de muestras	Porcentaje
CC	209	76.00%	78	72.22%
CT	63	22.91%	24	22.22%
TT	3	1.09%	6	5.56%
<b>Total</b>	<b>275</b>	<b>100.00%</b>	<b>108</b>	<b>100.00%</b>



Gráfica 3. Frecuencia de Genotipos del SNP *rs7903146* (C/T) del grupo de Casos

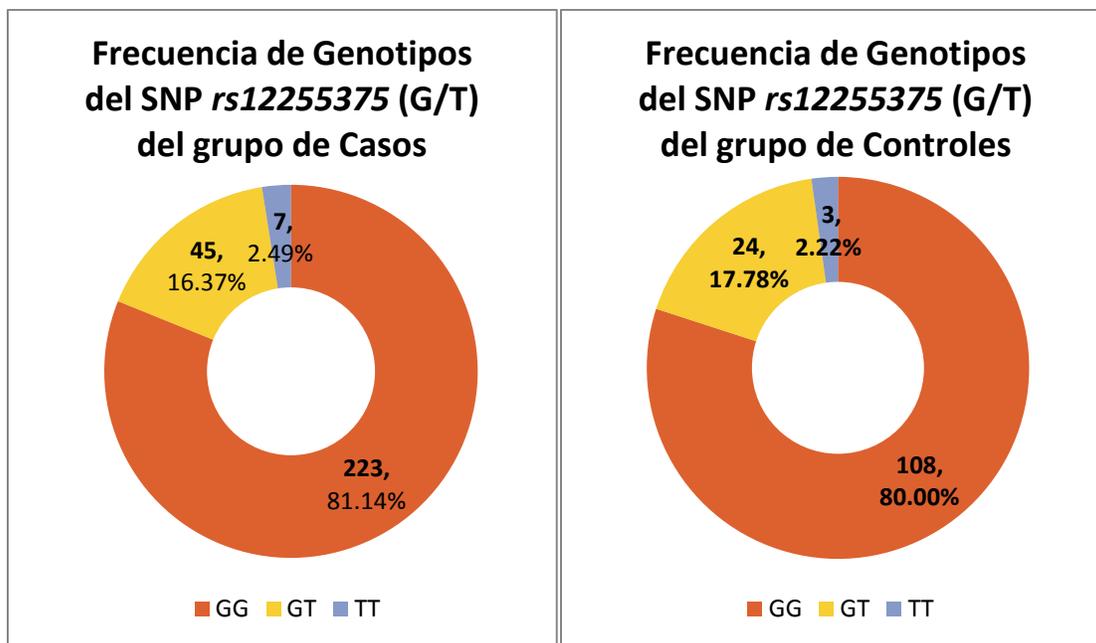


Gráfica 4. Frecuencia de Genotipos del SNP *rs7903146* (C/T) del grupo de Controles

Los resultados de la discriminación alélica del polimorfismo *rs12255375* (G/T) se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 7 Resultados de las frecuencias de los genotipos de los grupos de estudio del polimorfismo *rs12255375* (G/T)

Genotipo	Casos		Controles	
	No. de muestras	Porcentaje	No. De Muestras	Porcentaje
GG	223	81.09%	108	80.00%
GT	45	16.36%	24	17.78%
TT	7	2.49%	3	2.22%
<b>Total</b>	<b>275</b>	<b>100.00%</b>	<b>135</b>	<b>100.00%</b>



Gráfica 5. Frecuencia de genotipos del SNP *rs12255375* (G/T) del grupo de Casos

Gráfica 6. Frecuencia de genotipos del SNP *rs12255375* (G/T) del grupo de Controles

Las frecuencias genotípicas, alélicas obtenidas son:

Tabla 8. Frecuencias genotípicas y alélicas

	SNP	Genotipo/Alelo	Casos	Controles	OR	p
Frecuencia Genotípica	<i>rs7903146</i> (C/T)	CC	0.7600	0.7222		
		CT	0.2291	0.2222		
		TT	0.0109	0.0556		
	<i>rs12255375</i> (G/T)	GG	0.8109	0.8000		
		GT	0.1636	0.1852		
		TT	0.0255	0.0222		
Frecuencia Alélica	<i>rs7903146</i> (C/T)	C	0.8745	0.8333	0.8211	0.333
		T	0.1255	0.1667		
	<i>rs12255375</i> (G/T)	G	0.8927	0.8926	0.9507	0.333
		T	0.1073	0.1148		

El cálculo del OR o razón de momios para determinar el riesgo de desarrollar DM2 basado en la presencia de alelos mutados se muestra a continuación:

Tabla 9. Razón de momios de casos/controles

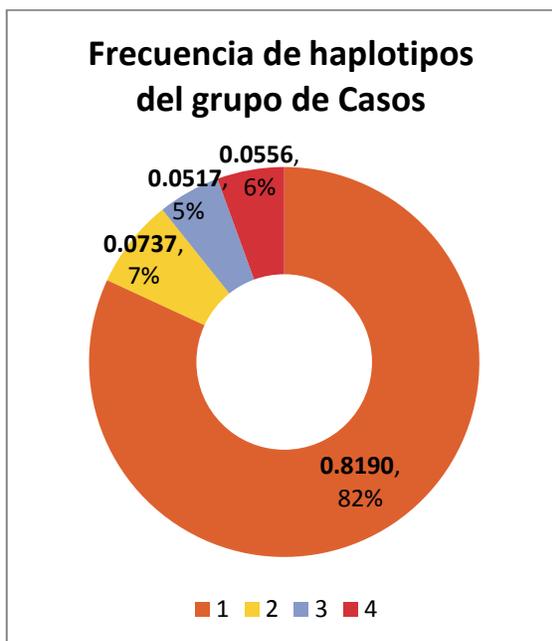
SNP	Alelo	OR casos/controles
<i>rs7903146</i> (C/T)	T	0.8211
<i>rs12255375</i> (G/T)	T	0.9507

Tabla 10. Posibles Haplotipos en función de genotipos

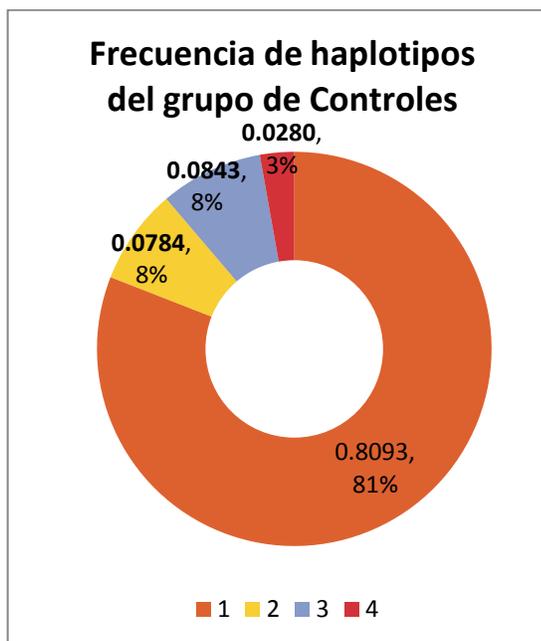
Genotipos	C > T	CC	CT	TT
<b>G &gt; T</b>				
GG		CG+CG	CG+TG	TG+TG
GT		CG+CT	CG+TT CT+TG	TG+TT
TT		CT+CT	CT+TT	TT+TT

Tabla 11. Frecuencias haplotípicas

Haplotipo	rs7903146 (C/T)	rs12255375 (G/T)	Casos	Controles	P
1	C	G	0.8190	0.8093	0.004
2	T	G	0.0737	0.0784	0.020
3	T	T	0.0517	0.0843	0.150
4	C	T	0.0556	0.0280	0.203



Gráfica 7. Frecuencia de haplotipos del grupo de Casos



Gráfica 8. Frecuencia de haplotipos del grupo de Controles

## VIII. DISCUSIÓN

Las asociaciones entre diversos polimorfismos en el factor de transcripción 7 tipo 2 y la diabetes mellitus tipo 2 han sido evaluadas ampliamente en diversos grupos étnicos. Particularmente, en la población europea, el gen *TCF7L2* se ha convertido en el gen más fuertemente asociado a susceptibilidad genética de DM2. Sin embargo estudios en la población mexicana han sido inconsistentes e insuficientes.

En la mayoría de los trabajos reportados en la literatura, el polimorfismo *rs7903146* (C/T) muestra asociación significativa con la DM2. El estudio más reciente que se ha realizado en México por el Dr. Cruz y colaboradores, en el Instituto Mexicano de Seguro Social indica el mismo patrón de resultados.

Los resultados del actual estudio, presentan discrepancia con lo mencionado anteriormente. Esto se debe a diferentes causas: el tamaño de la población estudiada, la edad promedio tanto de casos como de controles y el lugar de origen de los sujetos de estudio.

A pesar de que la diversidad de la población mestizo mexicana plantea varios desafíos para estudios genéticos, representa un poderoso recurso para el análisis de las bases genéticas de enfermedades complejas como lo es la DM2 (Silva-Zolezzi, 2009).

Por lo tanto, uno de los aspectos relevantes de este estudio es la heterogeneidad de la población estudiada. Mientras que la población analizada por Cruz y colaboradores solo es una muestra de la zona sur del Distrito Federal, la muestra de este estudio proviene principalmente del centro, pero también del norte y sureste del país. Lo que proporciona una visión más cercana de la realidad de la población mexicana.

Un fenómeno curioso que se presenta es la frecuencia de los alelos mutados, que fue mayor en el grupo de los controles que de los casos, esto conlleva a que el riesgo relativo calculado sea menor a 1, estableciendo que no existe asociación entre los polimorfismos y el desarrollo de la DM2. En estudios realizados a poblaciones

indígenas se han encontrado frecuencias alélicas en sujetos sanos, superiores a las presentadas por pacientes diabéticos de poblaciones caucásicas.

Las frecuencias alélicas obtenidas, son cercanas a lo reportado para las poblaciones Pima y Maya; grupos amerindios; lo cual es coherente dado el lugar de origen de la población estudiada; para poder realizar afirmaciones más serias respecto a este punto, es necesario analizar la ancestría de las muestras utilizadas para dividir las según la región y el grupo étnico más cercano.

El análisis de haplotipos es importante para conocer el genoma, para esto se requiere de técnicas masivas de análisis como los microarreglos de DNA; sin embargo estudiar la relación de la combinación de dos SNP, proporciona nueva información sobre la posible susceptibilidad genética, aunque en este caso no exista una diferencia estadísticamente significativa entre los casos y controles para ninguno de los cuatro posibles haplotipos, el análisis genético debe dirigirse al estudio de haplotipos.

Los resultados obtenidos son confiables en cuanto a reproducibilidad; sin embargo para poder realizar un meta-análisis de asociación entre los polimorfismos del gen TCF7L2 y el riesgo de Diabetes Mellitus tipo 2 en la población mexicana, es recomendable analizar un grupo más numeroso de individuos de las diferentes regiones del país, incluyendo algún grupo indígena que no presente una mezcla genética pronunciada.

## **IX. CONCLUSIONES**

Las frecuencias haplotípicas de los SNP *rs7903146* (C/T) y *rs12255372* (G/T) no indican que exista susceptibilidad genética para el desarrollo de Diabetes Mellitus tipo 2 de inicio tardío.

En cuanto a las frecuencias alélicas de los polimorfismos tampoco indican un riesgo relativo de desarrollo de la enfermedad.

La determinación del genotipo del gen *TCF7L2* no se puede utilizar como marcador pronóstico para la DM2.

Es necesario realizar un estudio de haplotipos sobre este gen con una muestra poblacional más grande, heterogénea y representativa de la población mexicana para poder establecer la relación contundente entre los polimorfismos y la enfermedad.

## X. REFERENCIAS

- Alpizar, M. 2001. "Guía integral para el manejo del paciente diabético". El Manual Moderno. México, D.F.
- Applied Biosystems. 2010. "Allelic Discrimination Getting Started Guide".
- Cauchi, S., El Achhab, Y., Choquet, H., Dina, C., Krempler, F., Weitgasser, R., Nejjari, C., Patsch, W., Chikri, M., Meyre, D. y Froguel, P. 2007. TCF7L2 is reproducibly associated with type 2 diabetes in various ethnic groups: a global meta-analysis. Journal of Molecular Medicine. **85**:777-782.
- Chandak, G., Janipalli, C., Bhaskar S., Kulkarni, S. Mohankrishna, P., Hattersley, A., Frayling, T. y Yajnik, C. 2007. Common variants in the TCF7L2 gene are strongly associated with type 2 diabetes mellitus in the Indian population. Diabetologia. **50**:63-67
- Clark, D. 2011. "Molecular Biology. Academic Cell Update". Elsevier. California, USA.
- Clevers H. 2006. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. Cell. **127**:469–480.
- Cruz, M., Valladares-Salgado, A., García-Mena, J., Ross, K., Edwards, M., Ángeles-Martínez, J., Ortega-Camarillo, C., Escobedo de la Peña, J., Burguete-García, A., Wachter-Rodarte, N., Ambriz, R., Rivera, R., D'artote, A. L., Peralta, J., Parra, Esteban J. y Kumate, J. 2010. Candidate genes associations study conditioning on individual ancestry in patients with type 2 diabetes and metabolic syndrome from Mexico City. Diabetes/Metabolism Research and Review. **26**:261-270.
- Guzmán-Juárez, N. y Madrigal-Bujaidar, E. 2003. Revisión de las características clínicas, metabólicas y genéticas de la diabetes mellitus. Bioquímica. **28**:14-23.
- Hidalgo, A., Silva-Zolezzi, I., Barrientos, E., March, S., Del Bosque, L., Pérez, O., Balam, E., Contreras, A., Dávila, C., Orozco, L. y Jiménez-Sánchez, G. 2006. "Proyecto Mapa Genómico de los Mexicanos". Ciencia y Desarrollo. **32**:32-53.

- International Diabetes Federation (IDF). Diabetes Atlas. 4ta ed. Brussels: IDF; 2009.
- Islas, S. y Revilla Ma. C. 2005. "Diabetes Mellitus". Tercera edición, McGraw Hill Interamericana. México, D.F.
- Jin, T. y Lui, L. 2008. The Wnt Signaling Pathway Effector TCF7L2 and Type 2 Diabetes Mellitus. Molecular Endocrinology. **22**:2383-2392.
- Lyssenko, V., Lupi, R., Marchetti, P., Del Guerra, S., Orho-Melander, M., Almgren, P., Sjögren, M., Ling, C., Eriksson, K., Lethagen, Å, Mancarella, R., Berglund, G., Tuomi, T., Nilsson, P., Del Prato, S. y Groop, L. 2007. Mechanisms by which common variants in the TCF7L2 gene increase risk of type 2 diabetes. The Journal of Clinical Investigation. **117**: 2155-2163
- MacDonald, B., Tamai, K., y He X. 2009. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. Developmental Cell. **17**: 9–26.
- Mahaler, R. y Adler, M. 1999. Type 2 Diabetes Mellitus: Update on Diagnosis, Pathophysiology, and Treatment. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. **84**:1165-1171.
- Moon, R., Kohn, A., De Ferrari, G. y Kaykas A. 2004. WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. Nature Reviews Genetics. **5**: 691–701.
- Muendlein, A., Sealy, C., Geller-Rhomberg, S., Sonderegger, G., Rein, P., Winder, T., Beer, S., Vonbank, A. y Drexel, H. 2011. Single Nucleotide Polimorphisms of TCF7L2 Are Linked to Diabetic Coronary Atherosclerosis. PLoS ONE. 6:e17978. doi:10.1371/journal.pone.0017978
- Olaiz-Fernández, G., Rivera-Dommarco, J., Shamah-Levy, T., Rojas, R., Villalpando-Hernández, S., Hernández-Ávila, M. y Sepúlveda-Amor J. 2006. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. Cuernavaca, México, Instituto Nacional de Salud Pública.

- Osgood-McWeeney, D., Galluzzi, J., y Ordovaz, J. 200). Allelic Discrimination for Single Nucleotide Polymorphisms in the Human Scavenger Receptor Class B Type 1 Gene Locus Using Fluorescent Probes. Clinica Chemistry. **46**:118-119.
- Polakis, P. 2000. Wnt signaling and cancer. Genes & Development. **14**: 1837–1851.
- Salehi, A. Vieira, E. y Gylfe, E. 2006. Paradoxical stimulation of glucagon secretion by high glucose concentrations. Diabetes. **55**: 2318-2323.
- Silva-Zolezzi, I., Hidalgo-Miranda, A., Estrada-Gil, J., Fernandez-Lopez, J., Uribe-Figueroa, L., Contreras, A., Balam-Ortiz, E., del Bosque-Plata, L., Velazquez-Fernandez, D., Lara, C., Goya, R., Hernandez-Lemus, E., Dávila, C., Barrientos, E., March, S. y Jimenez-Sanchez, G. 2009. Analysis of genomic diversity in Mexican Mestizo populations to develop genomic medicine in Mexico. Proceedings of the National Academy of Sciences. **106**: 8611-8616
- Tusié, Ma. T. 2000. La genética de la diabetes mellitus tipo 2: genes implicados en la diabetes de aparición temprana. La Revista de Investigación Clínica. **52**:296-305.
- Zeng, X., Tamai, K. y Doble B. 2005. A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. Nature. **438**: 873–877

## XI. ANEXOS

### Anexo 1 Carta de consentimiento informado

SECRETARIA DE LA DEFENSA NACIONAL  
DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD  
UNIDAD DE ESPECIALIDADES MÉDICAS  
ESCUELA MILITAR DE SANIDAD  
CARTA DE CONCENTIMIENTO BAJO INFORMACIÓN

México, D.F. a \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 201\_.

#### DATOS PERSONALES:

Nombre: \_\_\_\_\_

Matrícula: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_ Sexo: Masc o Fem Tel: \_\_\_\_\_

Domicilio: \_\_\_\_\_

Autorizo libre y voluntariamente me participación en el estudio de investigación sobre **“DIAGNÓSTICO POR PCR EN TIEMPO REAL DEL POLIMORFISMO DEL TRANSPORTADOR CATIONICO ORGÁNICO TIPO 1 (OCT-1) EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2 CON TRATAMIENTO DEL FÁRMACO METFORMINA”**.

El objetivo de este estudio es implementar una nueva técnica de detección de las variantes genéticas rs2282143 exón 6 (P341L) y rs12208357 exón 1 (R61C) del transportador catiónico orgánico tipo 1 (OCT-1) en pacientes con DM2 tratados con el fármaco metformina.

Se me ha explicado que mi participación consistirá en permitir que se me realice el siguiente procedimiento:

- 1.- Contestaré un breve cuestionario con respecto a mi padecimiento
- 2.- Se me tomará muestra por duplicado del carrillo bucal para la extracción de material genético.
- 3.- En cualquier momento puedo retirarme voluntariamente de este estudio, por convenir a mis intereses, aun cuando haya aceptado previamente.

Se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de mi participación en el estudio, que son los siguientes: Leve irritación del carrillo bucal. Si usted tiene preguntas acerca del estudio o sobre sus derechos, puede comunicarse con el Tte. Cor. M.C. Salvador Martín Polo Soto, médico adscrito a la Sección de Investigación de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad y responsable del proyecto al teléfono 55400758 Ext. 2 ó 7.

ACEPTO Y AUTORIZO

Mi participación en el estudio de investigación sobre **“DIAGNÓSTICO POR PCR EN TIEMPO REAL DEL POLIMORFISMO DEL TRANSPORTADOR CATIÓNICO ORGÁNICO TIPO 1 (OCT-1) EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2 CON TRATAMIENTO DEL FÁRMACO METFORMINA”**.

_____ Nombre y firma de la persona que dio el consentimiento	_____ Nombre, firma y matrícula del encuestador
TESTIGO	
_____ Nombre y firma	_____ Nombre y firma

LOS DATOS RECABADOS SERÁN PROTEGIDOS, INCORPORADOS Y TRATADOS EN EL SISTEMA DE REGISTRO DE DATOS DE PACIENTES DERECHOHABIENTES, PENSIONISTAS Y CIVILES DE LA DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD, CON FUNDAMENTO EN EL ARTÍCULO 20 DE LA LEY DE TRANSPARENCIA Y ACCESO A LA INFORMACIÓN PÚBLICA GUBERNAMENTAL Y EL ARTÍCULO 48 DE SU REGLAMENTO, CUYA FINALIDAD ES INTEGRAR UN REGISTRO QUE PROPORCIONELA CAPACIDAD DE DEFINIR CON PRECISIÓN Y DILIGENCIA LA SITUACIÓN CLÍNICA DEL PACIENTE; ASÍ MISMO, LA NOM-168-SSA 1-1998 DEL EXPEDIENTE CLÍNICO, RELATIVA A LA CONFIDENCIALIDAD DE LA INFORMACIÓN PÚBLICA ([www.ifai.org.mx](http://www.ifai.org.mx)) Y PODRÁN SER TRANSMITIDOS A LOS ESCALONES DEL SERVICIO DE SANIDAD CON LA FINALIDAD DE DAR SEGUIMIENTO A LA LEY DE ATENCIÓN MÉDICA INTEGRAL, ADEMÁS DE OTRAS TRANSMISIONES DE CONFORMIDAD CON LO PREVISTO POR LA LEY DE LA MATERIA. LA UNIDAD ADMINISTRATIVA RESPONSABLE DEL SISTEMA DE DATOS PERSONALES ES LA DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD Y EL LUGAR EN QUE EL INTERESADO PODRÁ EJERCER LOS DERECHOS DE ACCESO Y CORRECCIÓN ANTE LA MISMA ES LA UNIDAD DE ESPECIALIDADES MÉDICAS UBICADA EN LA AVENIDA INDUSTRIA MILITAR, LOMAS DE SAN ISIDRO DELEGACIÓN MIGUEL HIDALGO, C.P. 11620, D.F. LO ANTERIOR SE INFORMA EN CUMPLIMIENTO DEL ARTÍCULO DÉCIMO SÉPTIMO DE LOS LINEAMIENTOS GENERALES DE PROTECCIÓN DE DATOS PERSONALES, PUBLICADOS EN EL DIARIO OFICIAL DE LA FEDERACIÓN EL 30 DE SEPTIEMBRE DEL AÑO 2005.

**Anexo 2 Cuestionario de datos**

EJERCITO MEXICANO			
U.D.E.F.A		ESCUELA MILITAR DE GRADUADOS DE SANIDAD	
"DIAGNÓSTICO POR PCR EN TIEMPO REAL DEL POLIMORFISMO DEL TRANSPORTADOR CATIONICO ORGÁNICO TIPO 1 (OCT-1) EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2 CON TRATAMIENTO DEL FÁRMACO METFORMINA"			
GRADO: _____		NOMBRE: _____	
MATRICULA: _____		EDAD: _____	
SEXO: ( M ) ( H )			
SOMATOMETRÍA Y LABORATORIO:		VALORES AL MOMENTO DEL DIAGNOSTICO	
PESO: _____		TALLA: _____	
IMC: _____			
TA inicial (mmHg): _____			
CINTURA: _____		FREC. CARD.: _____	
		HDL: _____	
HA1C1: _____		COLESTEROL: _____	
		TRIGLICERIDOS: _____	
		LDL: _____	
TIEMPO DE DIAGNOSTICO DE LA DIABETES MELLITUS TIPO 2:			
DATOS PERSONALES			
DIRECCIÓN: _____			
TELEFONO: _____		ORIGINARIO DE: _____	
PADRE ORIGINARIO: _____		MADRE ORIGINARIO: _____	
MEDICAMENTOS			
NOMBRE: METFORMINA		DOSIS: _____	
NOMBRE: _____		DOSIS: _____	
NOMBRE: _____		DOSIS: _____	
NOMBRE: _____		DOSIS: _____	
NOMBRE: _____		DOSIS: _____	
ANTECEDENTES PERSONALES PATOLOGICOS			
ENFERMEDADES AUTOINMUNES:	(SI)	(NO)	TIPO: _____
RETINOPATIA.	(SI)	(NO)	TIPO: _____
HIPERTENSION:	(SI)	(NO)	TIPO: _____
CARDIOPATÍAS:	(SI)	(NO)	TIPO: _____
NEFROPATÍAS:	(SI)	(NO)	TIPO: _____
HEPATOPATÍAS:	(SI)	(NO)	TIPO: _____
VASCULOPATÍAS:	(SI)	(NO)	TIPO: _____
ANTECEDENTES HEREDITARIOS			
HIPERTENSIÓN :	(SI)	(NO)	QUE FAMILIAR: _____
DIABETES:	(SI)	(NO)	QUE FAMILIAR: _____
CARDIOPATÍAS:	(SI)	(NO)	QUE FAMILIAR: _____
NEFROPATÍAS:	(SI)	(NO)	QUE FAMILIAR: _____
HEPATOPATÍAS:	(SI)	(NO)	QUE FAMILIAR: _____
VASCULOPATÍAS:	(SI)	(NO)	QUE FAMILIAR: _____

\_\_\_\_\_  
Grado, nombre y firma del encuestador