



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA
INSITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
DELEGACION SUR DEL DISTRITO FEDERAL
UMAE HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CMN SIGLO
XXI**

TITULO

**ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS DE UN SOLO
NUCLEÓTIDO rs10206899 DEL GEN NAT8, rs4805834
DEL GEN SLC7A9, rs16853722 DEL GEN *MECOM*,
rs17730281 DEL GEN *WDR72*, CON ENFERMEDAD
RENAL CRÓNICA TERMINAL EN PACIENTES CON
DIABETES MELLITUS TIPO 2**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA EN
LA ESPECIALIDAD DE NEFROLOGIA**

P R E S E N T A:

**DRA. IVONNE ELIZABETH BARCENAS
ARREDONDO**



**ASESOR:
DRA. DOMINGA JIMÉNEZ GUZMÁN**

**CO-ASESORES
DR. PEDRO TRINIDAD RAMOS
DR. JOSÉ JESÚS PERALTA ROMERO
DR. MIGUEL CRUZ LÓPEZ**

CIUDAD DE MEXICO, FEBRERO 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

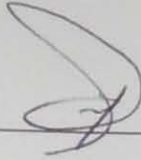
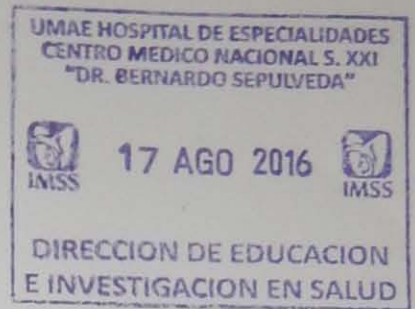


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

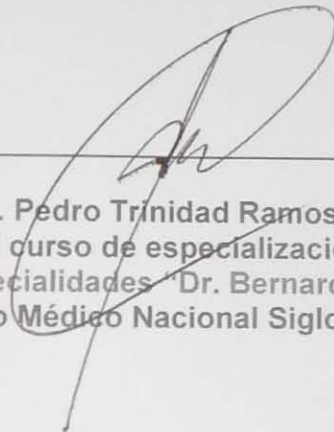
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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.



Dra. Diana Graciela Ménez Díaz
Jefe de División de Educación en Salud
Hospital de Especialidades "Dr. Bernardo Sepúlveda"
Centro Médico Nacional Siglo XXI



Dr. Pedro Trinidad Ramos
Profesor titular del curso de especialización en Nefrología
Hospital de Especialidades "Dr. Bernardo Sepúlveda"
Centro Médico Nacional Siglo XXI



Dra. Dominga Jiménez Guzmán
Asesora Clínica
Hospital de Especialidades "Dr. Bernardo Sepúlveda"
Centro Médico Nacional Siglo XXI

1.- Datos del alumno	1.- Datos del alumno
Apellido paterno: Apellido materno: Nombre: Teléfono: Universidad: Facultad o escuela: Carrera: No. de cuenta:	Barcenas Arredondo Ivonne Elizabeth 6141979183 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Medicina – División de Estudios de Posgrado Especialidad en Nefrología 514210757
2.- Datos del asesor	2.- Datos del asesor
Apellido paterno: Apellido materno: Nombre:	Jiménez Guzmán Dominga
3.- Datos del co-asesor	3.- Datos del co-asesores
Apellido paterno: Apellido materno: Nombre: Apellido paterno: Apellido materno: Nombre: Apellido paterno: Apellido materno: Nombre	Trinidad Ramos Pedro Peralta Romero José Jesús Cruz López Miguel
4.- Datos de la tesis	4.- Datos de la tesis
Título: No. de páginas: Año: NÚMERO DE REGISTRO:	ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS DE UN SOLO NUCLEÓTIDO rs10206899 DEL GEN NAT8, rs4805834 DEL GEN SLC7A9, rs16853722 DEL GEN <i>MECOM</i> , rs17730281 DEL GEN <i>WDR72</i> , CON ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA TERMINAL EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2 46 páginas 2017 R-2016-3601-68

MÉXICO
ESTADOS UNIDOS MEXICANOS



Dirección de Prestaciones Médicas
Unidad de Educación, Investigación y Políticas de Salud
Coordinación de Investigación en Salud



Dictamen de Autorizado

Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud **3601** con número de registro **13 CI 09 015 184** ante COFEPRIS

HOSPITAL DE ESPECIALIDADES DR. BERNARDO SEPULVEDA GUTIERREZ, CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI, D.F. SUR

FECHA **23/05/2016**

DRA. DOMINGA JIMÉNEZ GUZMÁN

P R E S E N T E

Tengo el agrado de notificarle, que el protocolo de investigación con título:

ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS DE UN SOLO NUCLEÓTIDO RS10206899 DEL GEN NAT8, RS4805834 DEL GEN SLC7A9, RS16853722 DEL GEN MECOM, RS17730281 DEL GEN WDR72, CON ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA TERMINAL EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2.

que sometió a consideración de este Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud, de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores, cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de Ética y de investigación, por lo que el dictamen es **A U T O R I Z A D O**, con el número de registro institucional:

Núm. de Registro

R-2016-3601-68

ATENTAMENTE

DR.(A). CARLOS FREDY CUEVAS GARCÍA

Presidente del Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud No. 3601

IMSS

SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

INDICE

1. Resumen	1
2. Marco teórico	
2.1 Definición de Enfermedad renal crónica.....	3
2.2 Epidemiología de la ERC	3
2.3 Nefropatía diabética	4
2.4 Índice de comorbilidad de Charlson.....	4
2.5 Genética de la ERC.....	5
2.6 Polimorfismos de un solo nucleótido.....	6
2.7 Equilibrio de Hardy- Weinberg.....	8
2.8 Genes candidatos descritos en GWAS.....	9
3. Justificación.....	11
4. Planteamiento del problema	12
5. Objetivos	12
5.1 Objetivo general	12
5.2Objetivos específicos	12
6. Hipótesis de trabajo	13
7. Material y métodos	13
7.1 Diseño del estudio	13
7.2 Población del estudio	13
7.3 Criterios de inclusión	14
7.4 Criterios de exclusión	14
7.5 Criterios de eliminación	15
7.6 Operacionalización de las variables	15
7.7 Cálculo de la muestra	17
7.8 Descripción del estudio	
7.8.1 Obtención de muestras	17
7.8.2 Aislamiento y cuantificación del ADN genómico.....	18
7.8.3 Evaluación e integridad del ADN	19
7.8.4 Genotipificación	19
8. Análisis estadístico	23
9. Aspectos éticos	
9.1 Carta de consentimiento informado	25
9.2 Riesgos de la investigación	25
9.3 Confidencialidad	26
10. Recursos, financiamiento y factibilidad	26
11. Relevancia del estudio	27
12. Resultados	28
13. Discusión	33
14. Conclusión	35
Referencias bibliográficas	37

1. RESUMEN

En México la prevalencia de nefropatía diabética (ND) es considerada una de las complicaciones microvasculares crónicas de la Diabetes mellitus tipo 2 (DM2) más comunes que conllevan al desarrollo de enfermedad renal crónica (ERC). Se ha sugerido que los factores genéticos pueden modular el riesgo del desarrollo las complicaciones renales secundarias a DM2. Los estudios de replicación de variantes genéticas y los estudios de GWAS han mostrado asociación con distintos fenómenos asociados a la ERC como los niveles de creatinina y tasa de filtrado glomerular. Si bien es poco entendida su función no se han estudiado en población latinoamericana.

El objetivo de la presente tesis es determinar si las variantes rs10206899 (Chr2p12-p13) del gen *NAT8*, rs4805834 (Chr19q13) del gen *SLC7A9*, rs16853722 del gen *MECOM*, rs17730281 del gen *WDR72*, están asociadas con la presencia de ERC en pacientes con ND así como analizar su comportamiento con variables asociadas a ERC y evaluar la comorbilidad asociada con el índice de Charlson para al comparar grupos de pacientes con DM2.

Se realizó un estudio de 178 casos (pacientes con DM2 y ERC estadio 5) y 177 controles (pacientes con DM2 sin ERC), que consistió en la realización de un cuestionario completo de antecedentes personales patológicos y la extracción de DNA genómico a partir de las células mononucleares de sangre periférica para su posterior análisis por medio de PCR en tiempo real. Las variables recabadas se integraron en una base de datos, se realizó el análisis estadístico con el programa Stata versión 12.

Se analizaron un total de 355 sujetos, siendo 177 considerados como controles y 178 casos. Al comparar ambos grupos se observan diferencias estadísticamente significativas en variables como el tiempo de evolución de la DM2, antecedente de retinopatía diabética, dislipidemia e hiperuricemia siendo éstos mayores en los casos. El IMC fue mayor en los controles probablemente debido a un síndrome de desgaste en pacientes con ERC terminal. El Índice de comorbilidad de Charlson mayor en los casos, mostrando diferencias estadísticamente significativas. Las variantes genéticas rs17730281 del gen *WDR72* y rs4805834 del gen *SLC7A9* se encuentran en equilibrio de Hardy Weimberg en la población analizada en el

presente estudio. El análisis por modelos de herencia mendeliana, dominante, codominante y recesivo no mostro asociación de la presencia de las variantes rs17730281 del gen *WDR72* y rs4805834 del gen *SLC7A9* con ERC. En análisis de la presencia de las variantes rs17730281 del gen *WDR72* y rs4805834 del gen *SLC7A9* ajustado por variables conocidas como factor de riesgo a desarrollo de ERC no mostro asociación. A pesar de haber sido reportadas las variantes genéticas rs17730281 del gen *WDR72* y rs4805834 del gen *SLC7A9* a ERC en otras poblaciones, incluso con efectos pleiotrópicos en la población mexicana no fue asociada, esto puede ser debido a la ancestralidad del mexicano.

**ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS DE UN SOLO NUCLEÓTIDO
rs10206899 DEL GEN *NAT8*, rs4805834 DEL GEN *SLC7A9*, rs16853722
DEL GEN *MECOM*, rs17730281 DEL GEN *WDR72* CON ENFERMEDAD
RENAL CRÓNICA TERMINAL EN PACIENTES CON DIABETES
MELLITUS TIPO 2**

2. MARCO TEÓRICO

2.1.- Enfermedad Renal Crónica

La enfermedad renal crónica (ERC) es una patología irreversible de etiología múltiple, secundaria en un gran porcentaje a complicaciones de enfermedades crónicas degenerativas como son la DM2 e hipertensión arterial sistémica (HAS). Es definida por las guías de la Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (KDOQI) como el “daño renal de una duración igual o mayor a tres meses”, caracterizado por anomalías estructurales o funcionales con o sin descenso de la tasa de filtración glomerular a menos de 60ml/min/1.73m², siendo clasificada en 5 estadios (National Kidney Foundation 2002) con modificaciones en el 2005 por el grupo de Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO)^(1,2) y en el 2008 por el National Institute of Health and Clinical Excellence (NICE) (*National clinical guideline* 2008) considerando la subdivisión al estadio 3 en 3A (TFG de 45 a 59ml/min) y 3B (TFG 30 a 44ml/min 1.73m²) además de agregar el sufijo p en términos de pronóstico y por la presencia de proteinuria. La ERC actualmente es considerada un problema de salud pública a nivel mundial.

2.2 Epidemiología de la Enfermedad Renal Crónica

Se estima una incidencia de 346 pacientes con insuficiencia renal crónica (IRC) por millón de habitantes con una prevalencia de 929 pacientes por millón de habitantes, el 8.5 % de la población tiene enfermedad renal crónica, se cuenta con alrededor de 52.000 pacientes en terapias sustitutivas, de los cuales el 80% de los pacientes son atendidos en el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) ⁽³⁾. Se ha identificado una de las causas más importantes de IRC a la DM2.

2.3 Nefropatía diabética

La DM2, un importante problema de salud pública, es una enfermedad crónica con una alta morbilidad y mortalidad ^(4,5, 6). La nefropatía diabética (ND) es una de las complicaciones microvasculares crónicas y graves más comunes de la DM2 y una de las causas más importantes de ERC. Casi un 30% de los pacientes con DM2 desarrollan ND, con una prevalencia del 20-40% en pacientes con DM2 y ERC terminal. ⁽⁷⁾

Otros factores, como un mal control glucémico o de la presión arterial, también desempeñan un papel preponderante en el desarrollo de esta complicación ^(8,9). Sin embargo, no todos los individuos con un control deficiente de estas variables la desarrollan, por lo que se han investigado factores no glucémicos que puedan modular el riesgo de complicaciones renales de la diabetes como los factores genéticos, como indican algunos estudios de ligamiento familiar y predisposición genética ⁽¹⁰⁾.

La ND es un diagnóstico clínico que históricamente se ha basado en el hallazgo de proteinuria en una persona con diabetes. Esta definición es independiente de tales marcadores de ERC como el cambio patológico o TFG disminuida, en un principio se limitaba a la presencia de macroalbuminuria. El desarrollo de las pruebas más sensibles específicas para la albúmina ha dado lugar a la detección de los elementos más pequeños, microalbuminuria o "nefropatía incipiente". El límite inferior de la microalbuminuria se establece un tanto arbitrariamente a una tasa de excreción de albúmina (AER) de 20 g / min, que es equivalente a 30 mg / 24 h o a un cociente albúmina/creatinina (ACR) de 30 mg/g ⁽¹¹⁾.

2.4 Índice de comorbilidad de Charlson

El envejecimiento es un proceso deletéreo, progresivo, intrínseco y universal que con el tiempo ocurre en el ser humano a consecuencia de la interacción de múltiples factores, entre ellos los propios del individuo y su medio ambiente. Es un conjunto de procesos que contribuye a incrementar progresivamente la presencia de enfermedades crónicas. En diferentes estudios se ha demostrado que una mayor comorbilidad en los adultos mayores trae consigo un impacto negativo en la

mortalidad, función física y calidad de vida. Por tal motivo resulta de suma importancia incluir la evaluación de la comorbilidad cuando se realiza un trabajo de investigación en adultos mayores. ⁽²⁴⁾

El índice de comorbilidad de Charlson fue creado con el objetivo de desarrollar un instrumento pronóstico de comorbilidades que individualmente o en combinación pudiera incidir en el riesgo de mortalidad a corto plazo de pacientes incluidos en estudios de investigación. El índice consiste en 19 condiciones médicas catalogadas en cuatro grupos de acuerdo al peso asignado a cada enfermedad, la puntuación total es la sumatoria de todas las entidades clínicas presentadas por el paciente evaluado, que da como resultado el riesgo relativo de mortalidad. ⁽²⁴⁻²⁵⁾

La predicción exacta de la supervivencia para pacientes con Enfermedad renal terminal y múltiples condiciones comórbidas es difícil. Se han realizado estudios que evalúan la validez del Índice de Charlson en pacientes con IRC en diálisis o hemodiálisis encontrando en éste, una herramienta válida para evaluar la comorbilidad y predecir la supervivencia en pacientes con enfermedad renal crónica terminal, así como una predicción de costos a nivel institucional en estos pacientes. ⁽²⁵⁾

2.5 Genética de la Enfermedad Renal Crónica

El desarrollo de la nefropatía en individuos diabéticos depende tanto de factores metabólicos como de factores genéticos. Se han descrito distintas variantes genéticas asociadas a ND, tales como inserciones-delecciones (I/D), variantes del número de copias (CNV) y polimorfismos de un solo nucleótido (SNP).

Entre los genes más reportados se encuentran los de las proteínas del sistema renina-angiotensina, el cual puede estar implicado en el desarrollo de la lesión renal mediante el incremento de la presión glomerular, los de la mutación C677T en el gen de la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) y el SNP rs2268388 del gen de la acetil-coenzima A gen beta carboxilasa (ACACB) con la presencia de ND. ⁽¹⁴⁾

Sin embargo el binomio gen-gen y gen-medio ambiente ha sido controversial al analizar en distintos modelos de estudio y en distintas poblaciones ⁽¹³⁾.

Estudios de replicación de SNPs han aportado mayor información sobre el riesgo de progresión de la enfermedad renal, una posible participación con la respuesta al tratamiento renoprotector e interacción con otros factores de riesgo cardiovascular, por medio de estudios de asociación, estudios prospectivos (cohortes), y de casos y controles, en distintas poblaciones. En la actualidad un mayor número de personas han sido analizados por medio de metanálisis derivados de estudios de GWAS (Estudios de asociación en todo el genoma) aportando información más específica en variables con efectos pleiotrópicos asociados a la ERC en distintas poblaciones como las concentraciones de urea, creatinina, ácido úrico y disminución de la TFG.

2.6 Polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) y enfermedades.

La investigación de la relación de los genes con enfermedades ha incrementado su importancia a lo largo de los años. A partir de esto se han desarrollado técnicas y tecnología para llevar a cabo estas investigaciones. En 1990 se inicia el Proyecto de Genoma Humano y en el 2001 se publica el primer borrador. Posteriormente, en el 2003, se llevó a cabo una actualización la cual abarcó el 99% de la secuencia del genoma.

Aproximadamente el 99% del ADN es el mismo para todos los seres humanos y el resto es atribuido a diferencias en los genes que causan variabilidad. Por esto, se debe tomar en cuenta que el ADN no es una estructura pasiva y debido a su naturaleza puede estar en riesgo de sufrir cambios constantemente. Los cambios en la secuencia de un gen son llamados polimorfismos, lo cuales producen que existan diferentes alelos. Estas variantes son clasificadas de acuerdo a la proporción de la población en la que inciden, siendo el alelo ancestral el que presenta una mayor frecuencia y el alelo variante que se presenta de menor manera. Los seres humanos, al ser organismos diploides, pueden presentar tres genotipos: homocigoto para el alelo ancestral, heterocigoto y homocigoto para el alelo variante. En el primer genotipo, el individuo sólo presenta en su genotipo el alelo ancestral en ambos cromosomas, descartando la aparición de alguna variación genética. Una persona que presente el genotipo heterocigoto tiene tanto el alelo ancestral como el alelo variante, pudiendo o no expresarse cualquiera de

los dos. Por otra parte, los organismos que son homocigotos para la variante presentan dos copias del alelo menos frecuente en la población.

Los SNPs son polimorfismos en los que se presenta cambio de un solo nucleótido en una posición determinada. Estos tienen gran importancia en cuanto a la variabilidad fenotípica, así como en la susceptibilidad o desarrollo de enfermedades; siendo también los más frecuentes. Cabe mencionar que debe tener una frecuencia mayor del 1% en la población. Estos pueden ser clasificados por su posición en el gen. Los que están presentes en regiones codificantes se les conoce como “no sinónimos”. Por otro lado, hay SNPs que pueden estar localizados en la región promotora, influenciando la actividad en la transcripción del gen, en intrones, en sitios de splicing o en regiones intergénicas. También existen aquellos SNPs que no generan algún cambio aparente en la expresión del gen, los cuales son llamados “sinónimos”; sin embargo, se ha demostrado que pueden intervenir en ésta de alguna forma todavía no conocida ⁽²⁶⁾. Una representación de la posición de los SNPs en el genoma se muestra en la Figura 1.

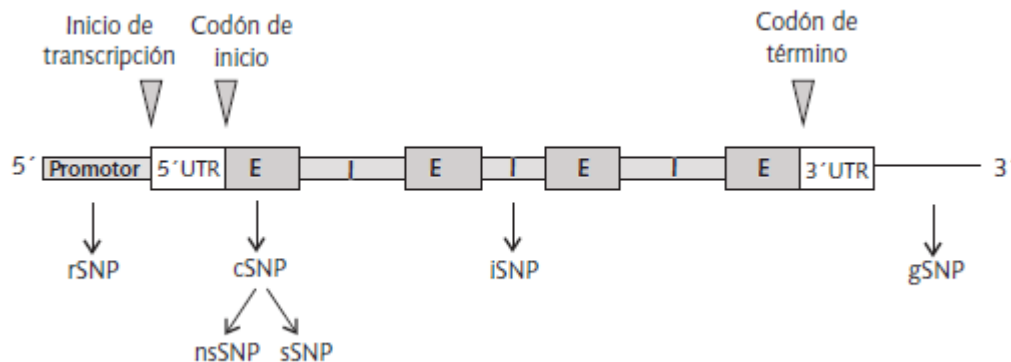


Figura 1. Clasificación de SNP's de acuerdo con su localización en el genoma. E: exones, I: intrones, UTR: regiones no codificantes. ⁽²⁷⁾.

Los SNPs se pueden relacionar con la aparición de alguna enfermedad de tipo genética. Por esta razón es necesario realizar estudios para poder asociarlos a éstas. Este tipo de pruebas se pueden llevar a cabo de manera directa o de manera indirecta. El primer caso, el SNP que se cree que está relacionado con la

enfermedad es genotipificado directamente. Para poder realizar esto, se debe de predecir el SNP que produce el fenotipo de interés, siendo este el reto más grande para este tipo de estudios. En los estudios indirectos no se necesita determinar previamente el SNP en cuestión, ya que éstos no son probados directamente realizándose. Este tipo de estudios son mayormente utilizados en estudios de casos-control.

Los estudios de asociación genética son un ejemplo de estudio indirecto, tienen la ventaja que no se necesitan sujetos relacionados entre sí. En éstos se buscan polimorfismos individuales de genes implicados en la patogénesis de la enfermedad y con ello determinar si existe algún tipo de relación con ella. Primeramente, se deben identificar los genes candidatos; el siguiente paso es identificar los diferentes polimorfismos sobre el gen que pudieran estar afectando su función; y finalmente se examina que tan frecuentemente se presentan los polimorfismos en personas que desarrollan la condición a estudiar respecto a una población control ⁽²⁷⁾.

En la población mexicana existe poca evidencia de la asociación de distintas variables genéticas asociadas a ERC, es por ello que surge la necesidad de establecer estudios multicéntricos que puedan ser capaces de reunir un número importante de pacientes y clarificar los numerosos interrogantes planteados sobre la relación de los genotipos de los SNPs candidatos y la enfermedad renal.

2.7 Equilibrio de Hardy-Weinberg. Su importancia en el análisis de variantes polimórficas asociadas a la presencia de ERC.

En una población, el conjunto de genes que comparten los individuos constituyen el acervo genético. La manera en que se distribuyen los alelos de un gen se puede obtener calculando las frecuencias en que un alelo se presenta en la población, las frecuencias de los diferentes genotipos y cómo cambian estas frecuencias de una generación a otra.

La relación teórica entre las proporciones relativas de los alelos del conjunto de genes y las frecuencias de los diferentes genotipos en la población, puede ser descrita con la ley de Hardy-Weinberg; la cual predice dos cosas:

1. Las frecuencias de los alelos en el conjunto de genes no cambian con el tiempo; por lo tanto, se heredan proporcionalmente de una generación a otra.
2. Si se consideran dos alelos de un locus, A y a, entonces las frecuencias de los genotipos AA:Aa:aa en la población se pueden calcular así:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

En donde p = frecuencia del alelo A y q = frecuencia del alelo a.

Una población que cumple estos dos criterios se dice que está en equilibrio de Hardy-Weinberg, para esto no debe existir diferencia significativa ($P \geq 0.05$) entre las frecuencias genotípicas observadas en la población y las calculadas mediante el modelo ⁽²⁸⁾.

Cabe mencionar que para realizar el cálculo se debe considerar que la población sea ideal, por lo que debe de seguir los siguientes criterios:

1. Los individuos tienen la misma probabilidad de supervivencia y de reproducirse.
2. No aparecen nuevos alelos, ni hay mutaciones.
3. No hay migración de individuos, hacia fuera ni hacia adentro.
4. La población es infinitamente grande, lo que significa que la población es suficientemente grande para evitar errores de muestreo y efectos aleatorios sean despreciables.
5. Los individuos de la población se aparean al azar.

Este recurso es de gran utilidad, ya que nos da indicio de cómo se presentan los alelos que conforman el acervo genético de la población y de qué manera se heredan a través de las generaciones.

2.8 Genes candidatos descritos en GWAS para la presente tesis:

2.8.1 Polimorfismo rs10206899

El polimorfismo rs10206899 (chr2p12-p13), ha sido asociado con creatinina, TFG, cistatina-C y ERC, esta variante se encuentra cerca de distintos genes como el *NAT8*, *NAT8B*, *ALMS 1*, *DUSP11* y *TPRKB*. Se ha descrito que *NAT8* es miembro

de la superfamilia GCN5-related N-acetyltransferase (*GNAT*), un grupo de enzimas que catalizan la transferencia de un grupo acetilo de la acetil-coenzima A, a una amplia gama de sustrato aceptor ⁽¹⁸⁾. El gen *NAT8* está fuertemente y casi exclusivamente, expresado en riñón, en particular por las células tubulares de la corteza renal ^(19,20).

Se ha descrito que la variante rs10206899 está en alto desequilibrio de ligamiento ($r^2 = 1,0$) con el único SNP no sinónimos del gen *NAT8*, el rs15358 (*A595G*). El rs15358 da un cambio de aminoácido no conservativo (*F143S*) dentro de la acetil-coenzima A vinculada al sitio del efecto para influir en la acetilación por *NAT8* ⁽²¹⁾. La acetilación es una vía metabólica clave para la desintoxicación de sustancias nefrotóxicas tales como los aminoglucósidos, anestésicos inhalatorios y toxinas ambientales, incluyendo disolventes industriales, como tricloroetileno ^(19,20). La variante rs15358 también está estrechamente asociada con los niveles de creatinina en el GWAS ($p=1.8 \times 10^{-8}$). Los resultados plantean la posibilidad de que la variación genética común en *NAT8* puede influir en las vías de acetilación, ocasionando perturbaciones conocidas por drogas y toxinas inducidas por la lesión renal ⁽²¹⁾.

2.8.2 Polimorfismo rs4805834

El polimorfismo rs4805834 (chr19q13) está cerca del gen *SLC7A9*, un transportador de aminoácidos catiónicos, altamente expresado en las células tubulares renales ⁽²²⁾. El gen *SLC7A9* es un fuerte candidato para la asociación de rs4805834 con la creatinina, la TFG, la cistatina-C y ERC. Se han descrito mutaciones en el gen *SLC7A9* asociadas con cistinuria y nefrolitiasis que se asocian con un mayor riesgo de ERC. La variante rs4805834 está también cerca del gen *CCDC123* (función desconocida) y *C19orf40* (*FAAP24*), este último ha sido identificado como un componente de la anemia de Fanconi, núcleo complejo que juega un papel crucial en la respuesta al daño del ADN. En un estudio de GWAS donde se analizaron 23,812 europeos esta variante fue asociada fuertemente a la TFG con un OR de 0.84 y un IC 95% de 0.76-0.92 ($p=3.6 \times 10^{-4}$). Estos resultados proporcionaron una nueva visión en el metabolismo de las vías

del soluto y transportadores de drogas en la susceptibilidad a la enfermedad renal crónica ⁽²¹⁾.

2.8.3 Polimorfismo rs16853722 y rs17730281

El gen *MECOM* (también conocido como *EVI1*) codifica un regulador transcripcional implicado en la hematopoyesis ⁽²³⁾. Mientras que el gen *WDR72* se ha vinculado con parámetros de funcionamiento renal, las variantes rs16853722 del gen *MECOM* y rs17730281 del gen *WDR72* recientemente han sido asociados con funciones pleiotropicas en parámetros asociados al funcionamiento renal como lo son BUN, creatinina sérica y TFG, en un estudio de GWAS de 51,327 sujetos asiáticos. Si bien es poco entendida su función no se han estudiado en población latinoamericana ⁽²¹⁾.

3. JUSTIFICACIÓN

Se ha demostrado que la población mexicana tiene un riesgo relativamente alto de desarrollar DM2. Diversos factores contribuyen a la predisposición de la enfermedad así como a sus complicaciones. El presente estudio tiene como finalidad la búsqueda de marcadores genéticos que en un futuro puedan ser utilizados como de riesgo o protección en pacientes con DM2 que presentan ERC.

Con los datos clínicos, de laboratorio y genéticos, se podrá entender un poco más a profundidad el papel de las variantes propuestas en la fisiopatología de la enfermedad. Nuestro interés primordial es en un futuro y con estudios y análisis posterior a este análisis la búsqueda de marcadores diagnósticos y de pronóstico oportuno asociado a la ERC.

La presente tesis forma parte del protocolo de investigación que lleva como título “ESTUDIO DE POLIMORFISMOS ASOCIADOS A INSUFICIENCIA RENAL

CRONICA EN PACIENTES MEXICANOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 2”, aprobado por el Comité de Ética en Investigación y de la Comisión Nacional de Investigación Científica del IMSS con Numero de Registro R-2016-785-022.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La DM2 es una enfermedad crónica con una alta morbilidad y mortalidad. La ND es una de las complicaciones microvasculares más graves y comunes de la DM2 y una de las causas más importantes de ERC. Casi un 30% de los pacientes con DM2 desarrollan ND, con una prevalencia del 20-40% de pacientes con DM2 culminan en ERC terminal. Para contribuir a la disminución de casos de nefropatía diabética terminal, se necesita generar conocimiento que permita identificar si la población con ND posee marcadores genéticos asociados al desarrollo de ERC descritos en otras poblaciones, con el fin de contar con pruebas genéticas fidedignas y rápidas que identifiquen a la población en riesgo de desarrollar ERC terminal desde etapas tempranas del diagnóstico de ND.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar si las variantes rs10206899 (Chr2p12-p13) del gen *NAT8*, rs4805834 (Chr19q13) del gen *SLC7A9*, rs16853722 del gen *MECOM*, rs17730281 del gen *WDR72*, están asociadas con IRC como de riesgo o protección al comparar grupos de pacientes con DM2.

5.2 Objetivos específicos

1.- Determinar las frecuencias alélicas de las variantes polimórficas rs10206899 (Chr2p12-p13) del gen *NAT8*, rs4805834 (Chr19q13) del gen *SLC7A9*, rs16853722 del gen *MECOM*, rs17730281 del gen *WDR72*.

2.- Determinar el comportamiento de las variables asociadas a la ERC (Urea, creatinina, TFG) en el grupo control y la presencia de las variantes genéticas.

3.- Determinar la asociación que existe entre el riesgo de comorbilidad (Índice de comorbilidad de Charlson) y la presencia de las variantes genéticas candidatas.

6. HIPÓTESIS DE TRABAJO

La presencia de los genotipos de riesgo o protección de las variantes polimórficas rs10206899 (Chr2p12-p13) del gen *NAT8*, rs4805834 (Chr19q13) del gen *SLC7A9*, rs16853722 del gen *MECOM*, rs17730281 del gen *WDR72*, están asociados con IRC en pacientes con ND.

La frecuencia alélica de las variantes polimórficas rs10206899 (Chr2p12-p13) del gen *NAT8*, rs4805834 (Chr19q13) del gen *SLC7A9*, rs16853722 del gen *MECOM*, rs17730281 del gen *WDR72* se encuentran asociadas al desarrollo de IRC en población mexicana.

7. MATERIAL Y METODOS

7.1 Diseño del estudio: Casos y Controles.

- Relación de Casos y Controles: 1:2.

7.2 Población de estudio: Sujetos mayores de 40 años, con historia al menos de 5 años de Diabetes Mellitus tipo 2.

- Periodo de Estudio: De 1 de Marzo al 30 de Julio de 2016.

- Lugar de Estudio: UMAE Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional Siglo XXI en la Ciudad de México.

7.3 Criterios de inclusión

Controles: En el estudio se incluyó en el grupo control pacientes con edad mayor a 40 años, no emparentados, con diagnóstico de DM2 de acuerdo a las guías establecidas por la ADA 2015 sin nefropatía diabética, con por lo menos 5 años de diagnóstico, con normoalbuminuria (< 30mg/dl). Que fueron captados de la Unidad de Investigación en Bioquímica del Hospital de Especialidades CMN SXXI.

Casos: Pacientes con el diagnóstico de IRC secundaria a ND, con por lo menos 5 años de diagnóstico de DM2, en tratamiento de sustitución renal con Diálisis peritoneal o Hemodiálisis. Los cuáles fueron captados de la Consulta externa y la Unidad de Hemodiálisis del servicio de Nefrología de CMN SXXI. La unidad de Hemodiálisis, tiene una población aproximada de 200 pacientes, de los cuales aproximadamente el 50% son portadores de IRC secundaria a Nefropatía diabética, población que constantemente es referida de los diferentes Hospitales Generales de la Zona Sur, aproximadamente 40 a 50 pacientes incidentes por mes para apoyo con sesiones de Hemodiálisis, que posteriormente son subrogados a Unidades de Hemodiálisis externas.

7.4 Criterios de exclusión

- Pacientes menores de 40 años de edad, emparentados.
- Pacientes con historia de DM2 menor a 5 años.
- Pacientes con DM2 con micro o macroalbuminuria y sin terapia de sustitución renal.
- Pacientes con DM1, enfermedades autoinmunes, pancreatomeclizados o neoplasias.
- Pacientes que no acepten participar en el protocolo.

7.5 Criterios de eliminación:

- Pacientes con DM 2 con o sin Nefropatía que no acudan para toma de muestra para extracción del DNA.

7.6 Operacionalización de las variables:

Nombre de la variable	Tipo de variable	Escala de medición	Definición conceptual	Definición operacional	Unidad de medición
VARIABLES DEMOGRÁFICAS					
Edad	Cuantitativa continua	Razón	Tiempo transcurrido desde el nacimiento hasta el momento actual	Tiempo transcurrido desde el nacimiento hasta el registro del paciente	Años
Sexo	Cualitativa dicotómica	Nominal	Taxón que agrupa a especies que comparten ciertos caracteres	Sexo consignado en la hoja de registro	1=Hombre 0 = Mujer
Peso	Cuantitativa Continua	Razón	Fuerza con la que la Tierra atrae un cuerpo	Cuantificación total en kilogramos registrado por la misma persona en la misma báscula calibrada durante las evaluaciones en consulta	Kilogramo (kg)
Talla	Cuantitativa Continua	Razón	Longitud de una persona medida de los pies a la cabeza	Altura registrada utilizando el mismo estadiómetro para todos los pacientes, en la primera evaluación y registrado en la hoja correspondiente	Metros (m)
Índice de masa corporal	Cuantitativa Continua	Razón	Medida de asociación entre el peso y la talla de un individuo	Relación del peso en Kg con el cuadrado de talla en metros, registrado durante las consultas	Kg/m ²
HISTORIA FAMILIAR DE DIABETES TIPO 2	Cualitativa Dicotómica	Nominal	Antecedente familiar (padres, tíos, abuelos, hermanos) de Diabetes Mellitus tipo 2.	Identificación en la hoja de recolección de datos durante la entrevista.	0 = No 1 = Si
EVOLUCION DE DIABETES MELLITUS TIPO 2	Cuantitativa Continua	Razón	Tiempo transcurrido desde el diagnóstico de Diabetes Mellitus Tipo 2.	Identificación en la hoja de recolección de datos durante la entrevista.	años
INDICE DE CONMORBILIDAD DE CHARLSON	Cuantitativa Continua	Razón	Sistema de evaluación de la esperanza de vida a los diez años, en dependencia de la edad en que se evalúa, y de las comorbilidades del paciente.	Se evaluara los puntos y el porcentaje de mortalidad a 10 años con un cuestionario en la hoja de registro durante la entrevista	PUNTOS %
VARIABLE DEPENDIENTE					
Polimorfismo rs10206899 gen NAT8	cualitativa dicotómica	Nominal	Variante polimorfica que se encuentra en chr2p12-p13, asociado con alteraciones en creatinina, TFG, cistatina-C y desarrollo de ERC, esta variante se encuentra cerca	Identificación mediante genotipación por PCR en tiempo real a partir de células mononucleares en muestra venosa	0 = No 1 = Si

			de distintos genes como el <i>NAT8</i>		
Polimorfismo rs4805834 del gen <i>SLC7A9</i>	cualitativa dicotómica	Nominal	Variante polimorfica que se encuentra en chr19q13 del gen <i>SLC7A9</i> , un transportador de aminoácidos catiónicos, expresado en las células tubulares renales asociado con la creatinina, la TFG, la cistatina-C y ERC.	Identificación mediante genotipación por PCR en tiempo real a partir de células mononucleares en muestra venosa	0 = No 1 = Si
Polimorfismo rs16853722 del gen <i>MECOM</i>	cualitativa dicotómica	Nominal	Variante polimorfica que se encuentra en el gen <i>MECOM</i> asociados con funciones pleiotropicas en BUN, creatinina sérica y TFG	Identificación mediante genotipación por PCR en tiempo real a partir de células mononucleares en muestra venosa	0 = No 1 = Si
Polimorfismo rs17730281d el gen <i>WDR72</i>	cualitativa dicotómica	Nominal	Variante polimorfica que se encuentra en el gen <i>WDR72</i> asociados con funciones pleiotropicas en BUN, creatinina sérica y TFG	Identificación mediante genotipación por PCR en tiempo real a partir de células mononucleares en muestra venosa	0 = No 1 = Si
VARIABLE INDEPENDIENTE					
DIABETES MELLITUS TIPO 2 SIN NEFROPATIA DIABETICA	Cualitativa dicotómica	Nominal	Paciente con diagnóstico de Diabetes Mellitus tipo 2 de acuerdo a las Guías de la ADA de más de 5 años de diagnostico sin nefropatía diabética insipiente o establecida	Según las Guías ADA, nivel de glucosa mayor de 126mg/dl en ayuno o mayor de 200mg/dl en pacientes con signos clásicos de hiperglucemia, Hb glucosilada mayor de 6.5%	0 = No 1 = Si
DIABETES MELLITUS TIPO 2 CON IRC EN TSR	Cualitativa dicotómica	Nominal	Paciente con Insuficiencia Renal Crónica secundaria a Nefropatía diabética	Pacientes con IRC secundaria a ND que se encuentren en Terapia de sustitución renal con Diálisis Peritoneal o Hemodiálisis	0 = No 1 = Si
TERCERAS VARIABLES					
HIPERTENSIÓN ARTERIAL	Cualitativa dicotómica	Razón	Presión arterial > 140/90 de acuerdo a Criterios de clasificación JNC 8	Registro de presión arterial sistólica y diastólica durante la entrevista	0= No 1= Si
RETINOPATIA DIABETICA	Cualitativa Dicotómica	Nominal	Retinopatía proliferativa en pacientes con diagnostico de Diabetes Mellitus tipo 2 de larga evolución	Pacientes con diagnóstico de Retinopatía diabética por Oftalmólogo	0 = No 1 = Si

7.7 Cálculo de la muestra

Se realizó el cálculo del tamaño de muestra para obtener un poder 0.9 con un nivel de significancia del 0.05 con el paquete estadístico STATA considerando las frecuencias esperadas de casos y controles, (tomando en cuenta la frecuencia alélica más baja y más alta de las variantes polimórficas candidatas) y considerando que se pareen 1:2 (relación casos-controles). Para obtener un poder de 0.9, se requieren una n de 1563 pacientes siendo 521 casos y 1042 controles. Se realizó un preanálisis en un total de 177 controles y 178 casos, observando que las muestras están en equilibrio de Hardy Weinberg y los análisis multivariados presentan intervalos de confianza al 95% muy cercanos por lo que fue necesario aumentar la n calculada.

7.8 Descripción general del estudio

El diseño del estudio es de tipo Casos y controles, el cual comprende dos grupos de pacientes con DM2 en los extremos de riesgo de la función renal:

- Grupo 1, pacientes con DM2 sin ND.
- Grupo 2, pacientes con el diagnóstico de ERC en estadio terminal secundaria a ND, en terapia de reemplazo renal.

7.8.1 Obtención de las muestras

Obtención de muestras

El presente estudio se realizó en el periodo comprendido del 1 de Marzo 2016 al 30 de Julio de 2016. Se captaron pacientes en el servicio de Hemodiálisis y de la Consulta externa de Nefrología que cumplían con criterios de selección y aceptaron participar en el estudio previa autorización bajo consentimiento informado para inclusión en protocolo de estudio.

La captura de datos se realizó con el llenado del cuestionario incluido en anexo 1, el cual incluye variables demográficas, como género, edad, sexo, peso, talla, IMC, historia familiar de DM2, tiempo de evolución de DM2, presencia de complicaciones asociadas a la misma como retinopatía diabética, hipertensión arterial sistémica e índice de comorbilidad de Charlson. Posteriormente se obtuvo una muestra venosa (tipo tejido sanguíneo) menor a 5ml con todas las medidas de

seguridad aplicables al manejo de material biológico infectocontagioso con apego a la NOM-087-ECOL-SSA1-2002, aplicando todas las especificaciones descritas para la protección de los binomios ambiental-salud, ambiental-residuos peligrosos, así como manejo y clasificación de residuos peligrosos biológicos-infecciosos (RPBI) de manera adecuada.



Figura 2. Almacenamiento de muestras, preparación y proceso

7.8.2 Aislamiento y cuantificación del DNA genómico.

Se utilizaron tubos vacutainer para la recepción de la muestra sanguínea, de la cual se aisló el ADN de células mononucleares con el equipo AutogenFlex Star (QIAamp DNA Blood Midi/ Kit, Qiagen, Alemania). Se realizaron diluciones del ADN para tener una concentración aproximada de 33.33 ng/ μ L en tubos eppendorf de 0.6 mL.

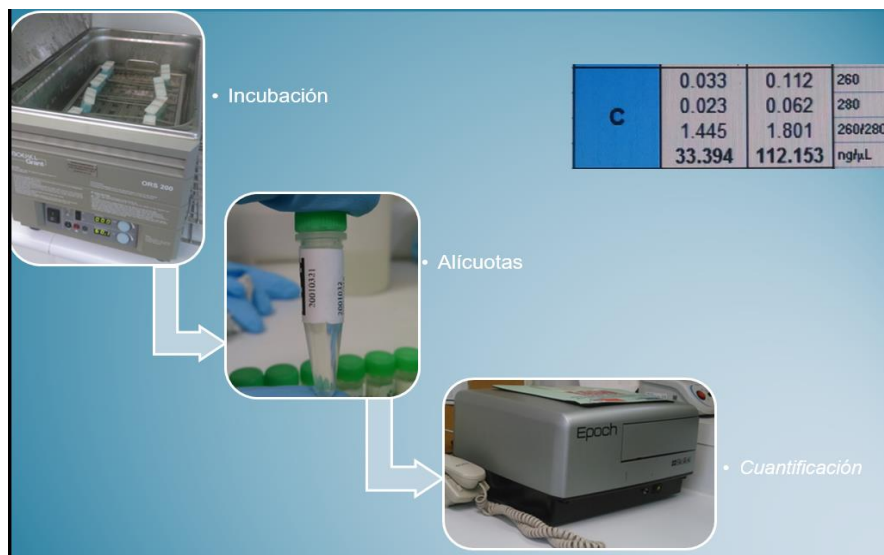


Figura 3. Incubación, alícuotas y cuantificación

7.8.3 Evaluación de integridad de ADN

La integridad del ADN se evaluó por fraccionamiento electroforético en geles de agarosa al 0.9% teñidos con bromuro de etidio en cámaras de BIORAD (CA, USA), mientras que la pureza se evaluó por medio de un espectrofotómetro a longitud de onda de 260/280nm, la concentración se determinó con el equipo (EpochBiotechWinooski, VT, US). Se consideró un rango de 1.8-2.0 en la relación de absorbancia A260/A280. Posteriormente, se realizaron alícuotas de diluciones del DNA para tener una concentración aproximada de 33.33 ng/μL en tubos eppendorf de 0.5 mL y se congelaron a -70°C hasta su uso. De estas diluciones se verificó la integridad del DNA por medio de fraccionamiento electroforético en geles de agarosa antes mencionado y su purificación. Todas las determinaciones se realizaron de acuerdo a especificaciones del buen uso de laboratorios, ubicado en la Unidad de Investigación de Bioquímica.

7.8.4 Genotipificación

Una vez comprobada la integridad del ADN, se llevó a cabo el análisis de los SNPs utilizando PCR en tiempo real. El fundamento de PCR se describe a continuación.



Figura 4. Dilución y concentración, separación, PCR

Fundamento de la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR).

En los estudios de genética poblacional, son necesarios métodos que permitan realizar la clasificación de los alelos presentes en la muestra y así mismo obtener las frecuencias alélicas. Uno de estos métodos es la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés: Polymerase Chain Reaction), con la cual se puede amplificar un sitio de interés en la secuencia de ADN.

Esta técnica se basa en una reacción enzimática que amplifica una región específica de ADN durante varios ciclos repetidos utilizando a la enzima ADN polimerasa, que es capaz de sintetizar ADN. Los elementos necesarios para realizar esta reacción son: el ADN molde, la enzima, oligonucleótidos o primers, rs17730281, rs4805834, los desoxirribonucleicos trifosfato (dNTPs: adenina, guanina, citosina y uracilo), el ion de magnesio (Mg^{2+}), solución amortiguadora y agua. El proceso comprende tres etapas: desnaturalización, hibridación y extensión. El proceso de la PCR se muestra esquemáticamente en la Figura 4.

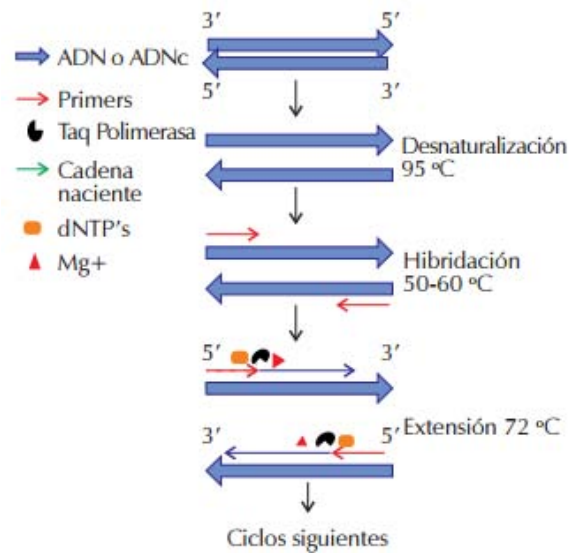


Figura 5. Proceso general de la PCR. Se muestran las tres etapas: desnaturalización, hibridación y extensión. En la desnaturalización se separan las dos cadenas de ADN aumentando la temperatura a 95°C. En la hibridación se lleva a cabo la unión de los primers con el sitio a amplificar disminuyendo la temperatura (50-60°C). En la etapa de extensión, la ADN polimerasa sintetiza nuevas cadenas de ADN complementarias añadiendo dNTPs en dirección 5' a 3'.⁽²⁹⁾

La PCR inicia con un proceso de la desnaturalización, en donde las muestras de ADN se someten a altas temperaturas (alrededor de 95°C) para que ambas cadenas se separen. Posteriormente, se lleva a cabo la hibridación entre los primers y las cadenas de ADN en el sitio de interés; la temperatura en esta etapa debe de estar en un rango de 50-60 °C para lograr una unión óptima. Por último, se lleva a cabo la extensión, en donde la polimerasa comienza a replicar el ADN en dirección 5' a 3', añadiendo dNTPs complementarios.

Por otra parte, un PCR en tiempo real se realiza de la misma forma, con la diferencia de que esta utiliza compuestos fluorescentes en la reacción; los cuales son detectados en cada ciclo, obteniéndose una señal la cual es proporcional a la cantidad de productos de PCR⁽²⁹⁾.

Esta técnica es útil para el análisis de la presencia de SNPs en la secuencia de ADN; ya que, si se cuenta con los primers indicados, se puede amplificar la región donde se encuentra la variante y así determinar si está presente en la muestra o no, llevando a cabo el proceso de genotipificación.

Ensayo de genotipificación de las sondas TaqMan® rs 17730281, rs4805834.

El ensayo de genotipificación, se basa en una PCR en tiempo real en donde se utilizan sondas TaqMan®, las cuales son oligonucleótidos que contienen dos fluoróforos: VIC® y FAM®. Estos están unidos a un quencher que se encarga de estabilizar la molécula para que no emita fluorescencia. Al momento en que la ADN polimerasa está realizando el proceso de extensión, al pasar por el fluoróforo rompe el enlace que lo une al quencher lo que provoca que se emita fluorescencia. En la Figura 5 se muestra cómo ocurre esta reacción.

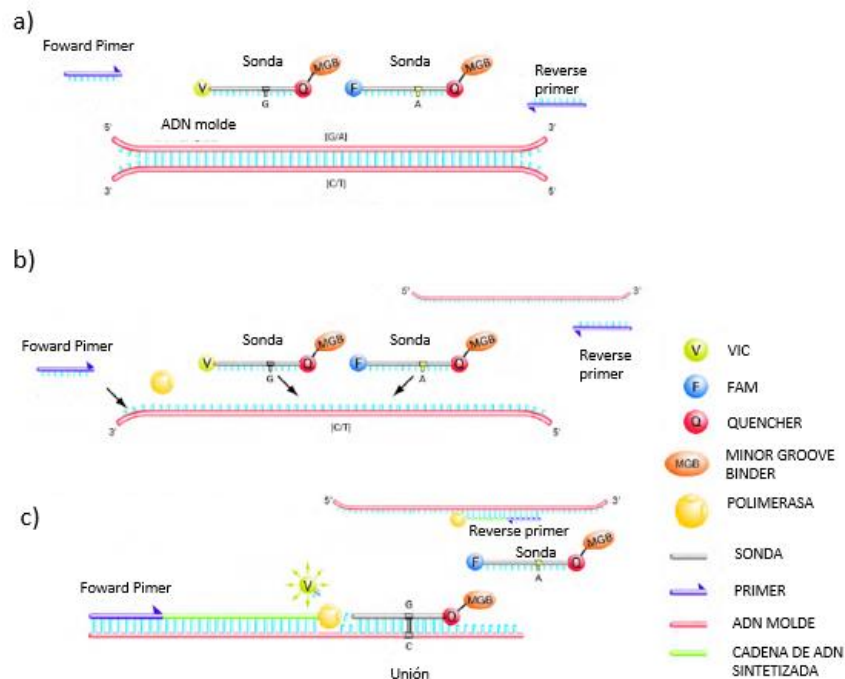


Figura 6. Etapas de la PCR en tiempo real con sondas TaqMan®. En a) se muestran los componentes del ensayo y el ADN molde. En b) se muestra el proceso de desnaturalización y de hibridación de la sonda. En c) se muestra cómo la ADN polimerasa realiza el proceso de extensión, y rompe la unión del fluoróforo con el *quencher*, produciendo fluorescencia (Applied Biosystem, Foster City California).

Los dos fluoróforos emiten a diferentes longitudes de onda, las cuales corresponden a cada alelo analizado. Por lo tanto, con esto se puede diferenciar si la muestra presenta el alelo ancestral o la variante. La fluorescencia es captada y en base a sus valores se realiza la discriminación genotípica, clasificando a la muestra como homocigoto para el alelo ancestral, heterocigoto u homocigoto para el alelo variante (Applied Technologies, Foster City, California).

Se utilizaron placas de 384 pozos en las cuales se añadió 1.5 μL de la muestra de DNA con una concentración de 33.33 ng/ μL , 0.5 μL de sonda rs 17730281, rs 4805834 para ensayos TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) y 3 μL de TaqMan Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA); para obtener una concentración final de 20 ng/ μL , 1x y 1x respectivamente en cada pozo. La placa se introdujo al equipo 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) el cual realizó PCR en tiempo real y la genotipificación de la muestra. Se llevaron a cabo 40 ciclos; los parámetros establecidos de cada ciclo fueron los siguientes: 95°C durante 10 min para activación de la enzima (solo al inicio del ensayo), 95°C durante 15 s para la desnaturalización y 60°C durante 1 min para la hibridación y la extensión. Los resultados obtenidos se procesaron en el programa SDS plate utility.

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables recabadas se integraron en una base de datos, para el análisis descriptivo de la información mediante frecuencias simples y absolutas, así como medidas de tendencia central y dispersión. Para evaluar el grado de asociación entre las variables y las covariables, se utilizaron modelos univariados y bivariados mediante la prueba X^2 o prueba exacta de Fisher para variables discretas; o bien la prueba t de Student, para variables continuas. Se realizó un análisis multivariado incluyendo a las variables confusoras (edad y sexo) mediante un modelo de regresión logística no condicional, para variables dependientes discretas; y un modelo de regresión lineal para las variables dependientes continuas. Para todas las pruebas se consideró un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo. Para el análisis se utilizó el programa estadístico Excel y Stata versión 12.

8.1 Análisis de riesgo genético

El análisis de riesgo o protección de las variantes genéticas se realizó por los siguientes modelos. Debido a que las variantes genéticas pueden estar asociadas a enfermedades se deben implementar estrategias para evaluar el efecto que tienen en esta. Una manera de realizar esto es mediante el ajuste a cuatro posibles modelos de herencia: dominante, recesivo, codominante y aditivo. En un

estudio de casos y controles se comparan las frecuencias genotípicas de ambos grupos buscando diferencia significativa ($P < 0.05$). La manera en que influye cada modelo sobre la enfermedad es la siguiente:

- Modelo dominante: Una sola copia del alelo en cuestión es suficiente para modificar el riesgo.
- Modelo recesivo: Hace falta la presencia de dos copias de la variante para modificar el riesgo.
- Modelo codominante: Cada genotipo proporciona un riesgo de enfermedad diferente.
- Modelo aditivo: Cada copia de la variante modifica el riesgo de manera aditiva.

Posteriormente, si se encuentra asociación entre la variante y la enfermedad en cuestión en cualquiera de estos modelos, se estima el riesgo relativo para su desarrollo, mediante una medida indicativa como la razón de momios ⁽³⁰⁾.

8.2 Razón de momios (OR)

La razón de momios (OR por sus siglas en inglés: Odds Ratio) es utilizada en estudios de casos y controles para estimar la presencia o ausencia de una enfermedad en la que interviene algún factor, ya sea de riesgo o de protección. Esta es una medida indicativa para obtener el riesgo relativo de padecer obesidad debido a la presencia un SNP.

El OR se calcula de la siguiente manera:

$$OR = \frac{a/c}{b/d} = \frac{ad}{bc}$$

en donde:

a = casos que presentan el factor

b = controles que presentan el factor

c = casos que no presentan el factor

d = controles que no presentan el factor.

Este indicador solo muestra si hay asociación o no con la presencia de la enfermedad. Si el valor de OR obtenido es 1, el factor es indiferente a la

enfermedad; si es mayor a 1, podría estar implícito como factor de riesgo; si es menor a 1, es considerado como factor de protección ⁽³¹⁾.

9. ASPECTOS ÉTICOS

La elaboración de este protocolo ha tomado en consideración los aspectos éticos plasmados en la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 07 de febrero de 1984, así como los lineamientos de la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial sobre Principios Éticos para las Investigaciones Médicas en Seres Humano. Todos los procedimientos estarán de acuerdo con lo estipulado en el Reglamento de la ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud. Título segundo de los aspectos éticos de las investigaciones en humanos, capítulo I, Artículo 17, Sección

9.1 Consentimiento informado

A todo paciente se le entrego y explico carta de consentimiento informado. Ningún paciente que no firmara la hoja se incluyó en el estudio. Se anexa hoja de consentimiento informado.

9.2 Riesgos de la investigación.

El estudio es de riesgo mínimo y se pidió a los participantes su autorización firmando una Carta de Consentimiento Informado (CCI). En la CCI se informó el objetivo del estudio y de su trascendencia. La carta explica el objetivo, los procedimientos, los potenciales beneficios, las molestias y los posibles riesgos; asimismo, mencionó el nombre de los responsables del estudio y aclararó la autonomía y libertad que tienen para participar. Como parte de las consideraciones éticas se informó que se extraerían 6 ml de sangre (una cucharada sopera) y que esta cantidad no pone en riesgo la salud de los participantes produciendo molestias mínimas. Asimismo, se informó que en la sangre se estudiaría si existen modificaciones en el DNA que correlacionen con IRC en pacientes con DM2.

9.3 *Confidencialidad*

Así mismo, se realizó la aclaración que la información que nos proporcione sería utilizada para identificarlo(a) (como su nombre, teléfono y dirección) y esta información sería guardada de manera confidencial y por separado al igual que sus respuestas a los cuestionarios, los resultados de sus pruebas clínicas, para garantizar su privacidad. Solamente el equipo de investigadores, de la UIM en Bioquímica de la UMAE Hospital de Especialidades Bernardo Sepúlveda, tuvo acceso a la información proporcionada durante su participación en este estudio. Sólo se proporcionará la información si fuera necesario para proteger sus derechos o su bienestar (por ejemplo si llegara a sufrir algún daño físico o si llegara a necesitar cuidados de emergencia), o si lo requiere la ley. Cuando los resultados de este estudio sean publicados o presentados en conferencias, no se dará información que pudiera revelar la identidad del paciente. (Artículo 21 Fracción VIII de la Ley General de Salud).

- Condiciones en las que se solicitará consentimiento informado.

La carta de consentimiento informado se solicitó previo a la inclusión del participante al estudio. El participante tiene la libertad de retirar su consentimiento en cualquier momento de la investigación (Artículo 21, Fracciones I-VII de la Ley General de Salud).

10. RECURSOS, FINANCIAMIENTO Y FACTIBILIDAD

El servicio de Nefrología del Hospital de Especialidades de Centro Médico Nacional Siglo XXI IMSS, a cargo del Dr. Pedro Trinidad Ramos Jefe del Servicio de Nefrología y la Dra. Dominga Jiménez Guzmán Médico adscrito al servicio de Nefrología, además contamos con la participación del personal médico y las facilidades de las autoridades correspondientes en consulta externa y en la unidad de Hemodiálisis, para llevar a cabo el estudio. Actualmente, la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica cuenta con la infraestructura, recursos humanos y económicos necesarios para llevar a buen término el proyecto. Gran parte del equipo humano está integrado por personal con experiencia mínima de 8 años en el área de diabetes.

11. RELEVANCIA DEL ESTUDIO

La población mexicana tiene un riesgo relativamente alto a DM2. El presente estudio multidisciplinario tiene como finalidad el tener la posibilidad de obtener posibles marcadores de riesgo o protección de la ERC en pacientes con DM2, obteniendo conocimientos innovadores en la fisiopatología de la enfermedad y de las variantes de genes involucrados en la enfermedad así como una posible utilidad clínica en la prevención, diagnóstico, y tratamiento oportuno de la enfermedad.

12. RESULTADOS

Se analizaron un total de 355 pacientes, siendo 177 considerados como controles y 178 casos. La tabla número 1 describe la comparación de parámetros antropométricos y bioquímicos. Se observa a que pesar de que la media en la edad es mayor en el grupo de los casos no existen diferencias estadísticamente significativas, por lo que la edad no influyo en los análisis posteriores. Al comparar ambos grupos se observan diferencias estadísticamente significativas en género siendo mayor número de hombres en los casos y mayor número de mujeres en los controles. El tiempo de evolución de DM2 se observó mayor en los casos con una media de 19.35 años. El IMC fue mayor en los controles y el Índice de comorbilidad de Charlson mayor en los casos, mostrando diferencias estadísticamente significativas. La hipertensión arterial sistémica es mayor en el grupo control. Existen diferencias estadísticamente significativas en los antecedentes patológicos de retinopatía, dislipidemia e hiperuricemia siendo mayor su presencia en el grupo de los casos.

Tabla 1. Características de la población de estudio

Variable	Controles	Casos	P
	177	178	
Edad	53.83 ±7.95	59.96 ±9.13	0.06
Sexo			
Hombres	64 (41.03%)	92 (58.97%)	0.004
Mujeres	112 (56.57%)	86 (43.43%)	0.004
Tiempo de evolución de DM2	8.06 ±6.21	19.35 ±8.47	0.0001
IMC	30.27 ±4.93	26.26 ±4.39	0.0001
ICC	2.28 ±0.56	7.96 ±0.70	0.0001
Antecedente familiar de DM2	NA	123	NA
Antecedente familiar de ERC	NA	26	NA
Hipertensión arterial sistémica	82 (56.16%)	64 (43.84%)	0.038
Retinopatía	26 (16.46%)	132 (83.54%)	0.0001
Dislipidemia	62 (43.66%)	80 (56.34%)	0.062
Hiperuricemia	0	10 (100%)	0.001

Para las variables categóricas se reporta la frecuencia (porcentaje), se utilizó el estadístico χ^2 . Para las variables continuas se reporta media (sd), se utilizó el estadístico t student ó U de Mann Withney.

Se consideró un valor de p significativo cuando $p < 0.05$.

ANÁLISIS DEL PCR EN TIEMPO REAL

Al realizar el análisis del PCR en tiempo real el plot de amplificación y de discriminación alélica fueron adecuadas para las variantes rs17730281 del gen *WDR72* y del rs4805834 del gen *SLC7A9*.

Análisis de la variante rs17730281 del gen WDR72

Al realizar el análisis de las frecuencias alélicas del polimorfismo del rs17730281 del gen *WDR72* observamos que se encuentran en equilibrio de Hardy Weimberg ($p=0.87$), las frecuencias de ambos alelos son muy similares en ambos grupos. (Tabla 2)

Tabla 2. Frecuencias alélicas en la población de estudio del rs17730281 del gen *WDR72*

Alelo	Control	Caso	Total	EHW
G	200 (56)	186 (52)	386	p = 0.87
A	154 (43)	170 (47)	324	
Total	354	356	710	
Se reporta la frecuencia y los (porcentajes), el estadístico se realizó con la prueba chi ² ,				p 0.256

La Tabla 3 muestra la frecuencia de los genotipos observando que existe mayor frecuencia de los heterocigotos, seguido por genotipo ancestral y mostrando una menor frecuencia con el homocigoto a la variante.

Tabla 3. Frecuencia de los genotipos en la población de estudio rs17730281 del gen *WDR72*

Genotipos	Controles	Casos	Total
G/G	56 (54.36)	47 (45.6)	103
G/A	88 (48.8)	92 (51.1)	180
A/A	33 (45.8)	39 (54.1)	72
Total	177	178	355

Se reporta la frecuencia y los (porcentajes), el estadístico se realizó con la prueba chi²

Al realizar el análisis de los modelos de herencia mendeliana observamos que en el modelo dominante a pesar de tener intervalos de confianza cercanos y un OR de riesgo no hay diferencias estadísticamente significativas, mismo fenómeno

ocurre al analizar los modelos Recesivo y codominante, por lo tanto la presencia del rs17730281 del gen *WDR72* no está asociado a la presencia de ERC en pacientes con DM2 con o sin ERCT (Tabla 4).

Tabla 4. Modelos de herencia y estadísticos para la evaluación rs17730281 del gen *WDR72*

Modelo de Herencia	Genotipo	Casos	Controles	OR	IC	p
Dominante	GG	47	56	1		
	GA+AA	131	121	1.12	0.613 - 2.03	NS
Resesivo	GG+GA	139	144	1		
	AA	39	33	1.23	0.643 - 2.35	NS
Codominante	GG	47	56	1		
	GA	92	88	0.58	0.231-1.497	NS
	AA	39	33	1		

El análisis fue ajustado por edad y sexo. Se realizó un análisis multivariado de la presencia de la variante rs17730281 del gen *WDR72* ajustando por factores de riesgo identificados para el desarrollo de ERC como lo son HTA, dislipidemia, tiempo de evolución de DM2, presencia de proteinuria e hiperuricemia sin encontrar diferencias estadísticamente significativas. Por otra parte el análisis de asociación de la presencia de la variante rs17730281 del gen *WDR72* con el Índice de Charlson tampoco mostro asociación.

Análisis de la variante rs4805834 del gen SLC7A9

Al realizar el análisis de las frecuencias alélicas del polimorfismo del rs4805834 del gen *SLC7A9* observamos que se encuentran en equilibrio de Hardy Weimberg (p=0.59), las frecuencias de ambos alelos son muy similares en ambos grupos. (Tabla 5)

Tabla 5. Frecuencias alélicas en la población de estudio para la variante rs4805834 del gen *SLC7A9*

Alelo	Control	Caso	Total	EHW
C	341	376	386	0.59
T	21	18	324	
Total	362	394	710	
Se reporta la frecuencia y los (porcentajes), el estadístico se realizó con la prueba chi2,				p 0.218

La Tabla 6 muestra la frecuencia de los genotipos del rs4805834 del gen *SLC7A9* observando que existe mayor frecuencia de los pacientes con genotipo ancestral (C/C), seguido por los pacientes con genotipo heterocigoto (C/T) y mostrando una menor frecuencia con el homocigoto a la variante (T/T).

Tabla 6. Frecuencia de los genotipos en la población de estudio de la variante rs4805834 del gen *SLC7A9*

Genotipos	Controles	Casos	Total
C/C	157 (49.52)	160 (50.47)	317
C/T	19 (51.35)	18 (48.65)	37
T/T	1 (100)	0 (0)	1
Total	177	178	355

Se reporta la frecuencia y los (porcentajes), el estadístico se realizó con la prueba chi²

Al realizar el análisis de los modelos de herencia mendeliana observamos que en el modelo Dominante a pesar de tener intervalos de confianza cercanos (0.392 - 2.074) y un OR de protección (0.902) no muestra diferencias estadísticamente significativas, mismo fenómeno ocurre al analizar los modelos Recesivo y codominante, por lo tanto la presencia del rs4805834 del gen *SLC7A9* no está asociado a la presencia de ERC en pacientes con DM2 con o sin ERCT (Tabla 7).

Tabla 7. Modelos de herencia y estadísticos para la evaluación de la variante rs 4805834 del gen *SLC7A9*

Modelo de Herencia	Genotipo	Casos	Controles	OR	IC	p
Dominante	CC	179	161	1		
	CT+TT	18	20	0.902	0.392 - 2.074	NS
Resesivo	CC+CT	197	180	1		
	TT	0	1	1		
Codominante	CC	179	161	1		
	CT+TT	18	19	0.777	0.406 - 1.484	NS
	TT	0	1			

El análisis fue ajustado por edad y sexo. Se realizó un análisis multivariado de la presencia de la variante del rs4805834 del gen *SLC7A9* ajustando por factores de riesgo identificados para el desarrollo de ERC como lo son HTA, dislipidemia,

tiempo de evolución de DM2, presencia de proteinuria e hiperuricemia sin encontrar diferencias estadísticamente significativas. Por otra parte el análisis de asociación de la presencia de la variante del rs4805834 del gen *SLC7A9* con el Índice de Charlson tampoco mostro asociación.

ANÁLISIS DE LA VARIANTES rs10206899 DEL GEN *NAT8* Y rs16853722 DEL GEN *MECOM*.

La presencia de los genotipos de riesgo o protección de las variantes polimórficas rs10206899 (Chr2p12-p13) del gen *NAT8* y rs16853722 del gen *MECOM* no fueron concluidas debido a una falta de hibridación de las sondas taqman, esto pudo haber sido debido a un defecto de la sonda, fue reportado este problema a la empresa Applied sin embargo el envió de las mismas tardará aproximadamente 6 meses, por tal motivo solo se reportan los resultados de las variantes rs17730281 del gen *WDR72* y del rs4805834 del gen *SLC7A9*. Se realizará el reporte pertinente en el “ESTUDIO DE POLIMORFISMOS ASOCIADOS A INSUFICIENCIA RENAL CRONICA EN PACIENTES MEXICANOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 2”, al contar con las sondas apropiadas.

13. DISCUSIÓN

En el análisis de las variables estudiadas se encontró que el IMC fue mayor en los controles esto fue debido a que existe un síndrome de desgaste en los casos, por lo tanto el IMC es menor en estadios avanzados de ERC. Las frecuencias alélicas de la variante rs17730281 del gen *WDR72* y rs4805834 del gen *SLC7A9* se encuentran en equilibrio de Hardy Weimberg, por lo tanto la muestra y selección de nuestros grupos fue adecuada, la muestra fue significativa de acuerdo a su selección, las frecuencias alélicas rs17730281 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=17730281) y del rs4805834 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=4805834) son similares a las reportadas en las librerías de genes.

En México existe poca evidencia en la asociación de distintas variables tanto clínicas como bioquímicas asociadas a SNP del gen *SLC7A9* y *WDR72*, siendo reportadas en otras poblaciones, principalmente europeas y amerindias. ^(32,33)

Un estudio de cohorte en el cual se analizaron niños y adultos procedentes de 268 familias en el año 2015, reportó que un total de 14 variantes monogenicas serían las causantes de un 15% de nefrolitiasis y nefrocalcinosis, entidades predisponentes a la ERC, siendo las más asociadas las pertenecientes al gen *SLC7A9*. ⁽³⁴⁾ Por otra parte estudios de GWAs asociados a metabolitos alterados en la ERC reportan que distintas variantes del gen *SLC7A9* pueden conducir al daño renal severo, siendo reportado que el gen *SLC7A9* es el segundo de mayor importancia con alteraciones en las concentraciones de metabolitos asociadas con la severidad de daño renal, se reportó una asociación de la disminución de las concentraciones séricas de lisina y valina con tasa de filtrado glomerular. Este hallazgo es importante ya que se ha reportado que distintas proteínas pueden sufrir glicación secundario a los productos de glucosilación avanzada (AGEs), se ha reportado que uno de los residuos que sufren mayores alteraciones en los pacientes con DM2 secundaria a AGE es la lisina ⁽³⁵⁾, las alteraciones en este aminoácido también han sido asociadas en alteraciones cardiovasculares ⁽³⁶⁾.

Si bien la ERC se entiende como una enfermedad de origen multifactorial es importante identificar cual sería el factor más importante desencadenante.

Se ha reportado en diferentes poblaciones que al menos 95 variantes del gen SLC7A9 han sido implicadas en el desarrollo de cistinuria, la cistina al no ser reabsorbida ocasiona la cristalización con la formación de cálculos, esto implicado en el desarrollo de ERC. ⁽³⁷⁾ Con fines pronósticos de la severidad del paciente sería importante medir en un futuro en los portadores de la variante rs4805834 del gen SLC7A9 la hiperexcreción de arginina, lisina y ornitina, metabolitos también reportados en complicaciones de renales en pacientes con DM2 y la presencia de la variante, además existe evidencia que estas variantes polimórficas interactúan con la presencia de cálculos renales incluso en personas jóvenes, conllevando a un deterioro progresivo de la tasa de filtrado glomerular. ⁽³⁸⁾

La mayoría de las variantes polimórficas del gen SLC7A9 se han reportado en regiones exónicas, sin embargo, la variante rs4805834 se encuentra en región intrónica, por lo tanto podría estar asociada en el mecanismo de acción de otra variante cercana al gen. Una de la variante del gen SLC7A9 el rs12460876 presenta un mayor factor de riesgo y severidad al desarrollo de ERC cuando está cercana a la variante rs8101881. ⁽³⁹⁾

Hasta la fecha distintas variantes de este gen SLC7A9 se han postulado como un marcador de riesgo al desarrollo de ERC independientemente de la presencia de diabetes, sin embargo aún falta realizar estudios de replicación en distintas poblaciones para validar estos hallazgos. ⁽⁴⁰⁾

Es importante para un futuro implementar estudios de cohorte en el grupo de los controles para tener un mejor entendimiento del comportamiento de las variables asociadas a la ERC en sujetos con DM2 a lo largo de 2 años como mínimo.

En el presente estudio la variante rs17730281 del gen *WDR72* no fue asociado a ERC en la población estudiada, es importante mencionar que esta variante ha sido poco estudiada en la población mexicana, y hasta la fecha no había sido analizada con ERC en población mexicana. Las frecuencias alélicas de la presencia de la variable de riesgo ha sido reportada como baja, en el presente estudio se mostró un adecuado equilibrio de Hardy Weimberg y una frecuencia alélica similar a la reportada en las librerías genéticas.

Por otra parte, el gen *WDR72* ha sido asociado fuertemente a la amelogenesis imperfecta es una enfermedad genética que se presenta con formación anormal del esmalte o capa externa de los dientes.⁽⁴¹⁾ Sin embargo recientes estudios de GWAS se ha reportado que la proteína alterada de la variante rs17730281 del gen *WDR72* se ha asociado con rasgos de alteración a nivel renal del BUN. El gen *WDR72* se ha asociado con funciones pleiotropicas en parámetros asociados al funcionamiento renal como lo son BUN, creatinina sérica y TFG, en un estudio de GWAS de 51,327 sujetos asiáticos. ^(42,43)

El consorcio europeo CDKgen en el año 2010 por medio de un metanálisis de GWAS en 67,073 individuos con previos análisis de ancestralidad europea, reporto que el gen *WDR72* afecta la secreción y producción de creatinina. ⁽⁴⁴⁾ Esta variante parece estar asociada a la hiperglucemia crónica confiere un mayor riesgo de complicaciones asociadas con la diabetes a largo plazo como la nefropatía diabética. Medida como glucosa en ayuno y hemoglobina glucosilada (HbA1c) medidas son un marcador ampliamente utilizado para el control glucémico en la diabetes tratamiento y seguimiento. Un estudio de asociación del genoma reciente reveló cuatro loci genéticos, que se asocia con los niveles de HbA1c en adultos con diabetes tipo 1, entre ellos el polimorfismo de un solo nucleótido del gen *WDR72*. Mostrándose como una variante de riesgo asociada a reducción de los niveles de HbA1c. Por lo tanto, se necesitan más estudios en otras poblaciones para dilucidar si estas nuevas variantes de secuencia, pueden afectar el control glucémico en la diabetes tipo 2. ⁽⁴⁵⁾

Esta asociación o no de la variante con distintos efectos pleitrópicos asociadas a la ERC puede ser debida a la ancestralidad, esto es al tipo de etnicidad de cada individuo, además se ha reportado que el gen *WDR72* presenta distintos sitios de splicing alternativo lo que modifica su transcripción, por lo tanto es importante replicar las variantes asociadas del gen con distintos fenotipos asociados a ERC.

CONCLUSION

Las variantes genéticas rs17730281 del gen *WDR72* y rs4805834 del gen *SLC7A9* se encuentran en equilibrio de Hardy Weimberg en la población analizada en el presente estudio.

El análisis por modelos de herencia mendeliana, dominante, codominante y recesivo no mostro asociación de la presencia de las variantes rs17730281 del gen *WDR72* y rs4805834 del gen *SLC7A9* con ERC.

En análisis de la presencia de las variantes rs17730281 del gen *WDR72* y rs4805834 del gen *SLC7A9* ajustado por variables conocidas como factor de riesgo a desarrollo de ERC no mostro asociación.

A pesar de haber sido reportadas las variantes genéticas rs17730281 del gen *WDR72* y rs4805834 del gen *SLC7A9* a ERC en otras poblaciones, incluso con efectos pleitrópicos en la población mexicana no fue asociada, esto puede ser debido a la ancestralidad del mexicano.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. National Kidney Foundation. K/DOQI Kidney Disease Outcome Quality Initiative. *Am J Kidney Dis.* 2002;39(Suppl 1):S1-S266.
2. Levey AS, Atkins R, Coresh J, et al. Chronic kidney disease as a global public health problem: Approaches and initiatives — a position statement from Kidney Disease Improving Global Outcomes. *Kidney Int.* 2007;72:247-259.
3. Méndez DA, Méndez BF, Tapia YT, et al. Epidemiología de la insuficiencia renal crónica en México. *Dial Traspl.* 2010;31(1):7-11.
4. Lemes PF, Dos Santos PR, Ferrari GS, et al. Knowledge of diabetes mellitus: Does gender make a difference? *Osong Public Health Res Perspect* 2014; 5: 199–203.
5. Fassett RG, Robertson IK, Mace R, et al. Palliative care in end-stage kidney disease. *Nephrology (Carlton)* 2011; 16: 4–12.
6. Grace BS, Clayton P, McDonald SP. Increases in renal replacement therapy in Australia and New Zealand: Understanding trends in diabetic nephropathy. *Nephrology (Carlton)* 2012; 17: 76–84.
7. Herrera-acosta J. Hipertensión arterial y nefropatía diabética. La terapéutica basada en evidencia. *Arch. Cardiol. Med.* 2003; 73: S66–9.
8. Larking RG, Dunlop ME. The link between hyperglycaemia and diabetic nephropathy. *Diabetologia.* 1992;35:499-504.
9. Schrier RW, Estacio RO, Esler A. Effects of aggressive blood pressure control in normotensive type 2 diabetic patients on albuminuria, retinopathy and strokes. *Kidney Int.* 2002; 61:1086-97.
10. Krolewski AS, Quinn M, Angelico MC. Familial factors determine the development of diabetic nephropathy in patients with IDDM. *Diabetologia.* 1996;39:940-5.
11. Mogensen CE, Chachati A, Christensen CK, et al: Microalbuminuria: A nearly marker of renal involvement in diabetes. *Uremia Invest* 9:85-95, 1985.

12. Chen H, Wei F, Wang L, Wang Z, Meng J, Jia L, Sun G, Zhang R, Li B, Yu H, Pang H, Bi X, Dong H, Jiang A, Wang L. MTHFR gene C677T polymorphism and type 2 diabetic nephropathy in Asian populations: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med*. 2015.
13. Xiong X, Lin XK, Xiao X, Qin DP, Zhou DY, Hu JG, Liu Y, Zhong XS. Association between MTHFR C677T polymorphism and diabetic nephropathy in the Chinese population: an updated meta-analysis and review. *Nephrology (Carlton)*. 2015
14. An L, Jiang H, Tang RN. The ACACB gene rs2268388 polymorphism is associated with nephropathy in Caucasian patients with diabetes: a meta-analysis. *Ren Fail*. 2015
15. Jump Bush WS, Moore JH (2012). "Chapter 11: genome-wide association studies". In Lewitter, Fran; Kann, Maricel. *PLoS Comput Biol* 8 (12): e1002822. doi:10.1371/journal.pcbi.1002822. PMC 3531285. PMID 23300413 Bush WS, Moore JH (2012).
16. Chambers JC, Zhang W, Lord GM, van der Harst P, Lawlor DA, Sehmi JS, Gale DP, Wass MN, Ahmadi KR et al. Genetic loci influencing kidney function and chronic kidney disease in man. *Nat Genet*. 2010 May ; 42(5): 373–375.
17. Okada Y, Sim X, Go MJ, Wu JY, Gu D, Takeuchi F, Takahashi A, Maeda S, Tsunoda T, Chen P, Lim SC, Wong TY, Liu J, et al. Meta-analysis identifies multiple loci associated with kidney function-related traits in east Asian populations. *Nat Genet*. 2012 Jul 15;44 (8):904-9.
18. Dyda F, Klein DC, Hickman AB. GCN5-related N-acetyltransferases: a structural overview. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 2000; 29:81–103.
19. Kharasch ED. Adverse drug reactions with halogenated anesthetics. *Clin Pharmacol Ther*. 2008; 84:158–162.
20. Lash LH, Fisher JW, Lipscomb JC, Parker JC. Metabolism of trichloroethylene. *Environ Health Perspect*. 2000; 108(2):177–200
21. Chambers J, Weihua Zhang, Graham M Lord, Pim van der Harst, Debbie A et al. Genetic loci influencing kidney function and chronic kidney disease in man. *Nat Genet*. 2010 May ; 42(5): 373–375)
22. Mattoo A, Goldfarb DS. Cystinuria. *Semin Nephrol*. 2008; 28:181–191.

23. Kataoka, K. et al. Evi1 is essential for hematopoietic stem cell self-renewal, and its expression marks hematopoietic cells with long-term multilineage repopulating activity. *J. Exp. Med.* 208, 2403–2416 (2011)
24. Hemmelgarn, B. et al. Adapting the Charlson comorbidity index for use in patients with ESRD. *American Journal of Kidney Diseases.* 42, 125-132. 2003.
25. Fried, L. et al. Charlson Comorbidity Index as a Predictor of Outcomes in Incident peritoneal dialysis patients. *American Journal of Kidney Diseases.* 37, 337-342. 2001.
26. Smemo S. et al. Connecting the regulatory genome. *Nature Genetics* 48, 479–480 2016
27. Checa M.A., Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 20, 213-221, 2007
28. Klug W.S. et al., *Conceptos de genética* 887-893, 2006.
29. Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. 2-2, 70-78 2013
30. Flores-Alfaro E et al., Diseños de investigación en epidemiología genética *Rev Panam Salud Publica* 31(1), 2012
31. Moreno-Altamirano A. et al., Principales medidas en epidemiología. salud pública de México. 42-4, 2000
32. Wong K., Mein R., Wass M., Flintner F., Pardy C., Bultitude M., Thomas K1. The genetic diversity of cystinuria in a UK population of patients. *BJU Int.* 2015 Jul; 116(1):109-16.
33. Franceschini N., Haack K., Almasy L., Laston S., Lee E., Best L., Fabsitz R., MacCluer JW., Howard BV., Umans JG., Cole SA. Generalization of associations of kidney-related genetic loci to American Indians. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2014 Jan; 9(1):150-8.
34. Halbritter J., Baum M., Hynes A., Rice S., Thwaites D., Gucev Z., Fisher B., Spaneas L., Porath J., Braun D. Fourteen monogenic genes account for 15% of nephrolithiasis/nephrocalcinosis. *J Am Soc Nephrol.* 2015 Mar; 26(3):543-51.

35. Greifenhagen U., Frolov A., Blüher M., Hoffmann R. Site-specific analysis of advanced glycation end products in plasma proteins of type 2 diabetes mellitus patients. *Anal Bioanal Chem.* 2016 Aug; 408(20):5557-66.
36. Linssen P., Henry R., Schalkwijk C., Dekker J., Nijpels G., Brunner-La Rocca H., Stehouwer C. Serum advanced glycation endproducts are associated with left ventricular dysfunction in normal glucose metabolism but not in type 2 diabetes: The Hoorn Study. *Diab Vasc Dis Res.* 2016 Jul; 13(4):278-285.
37. Koulivand L., Mohammadi M., Ezatpour B., Salehi R., Markazi S., Dashti S. Kheirollahi M. Mutation analysis of SLC3A1 and SLC7A9 genes in patients with cystinuria. *Urolithiasis.* 2015 Oct; 43(5):447-53.
38. Koulivand L., Mohammadi M., Ezatpour B., Kheirollahi M. Cystinuria in a patient with a novel mutation in SLC7A9 gene. *Iran J Kidney Dis.* 2015 Jan; 9(1):63-6.
39. Rueedi R., Ledda M., Nicholls A., Salek R., Marques-Vidal P., Morya E., Sameshima K., Montoliu I., Da Silva L., Collino S., Martin F., Rezzi S., Steinbeck C. Genome-wide association study of metabolic traits reveals novel gene-metabolite-disease links. *PLoS Genet.* 2014 Feb 20;10(2):e1004132.
40. Franceschini N., Haack K., Almasy L., Laston S., Lee E., Best L., Fabsitz R., MacCluer JW., Howard BV., Umans JG., Cole SA. Generalization of associations of kidney-related genetic loci to American Indians. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2014 Jan; 9(1):150-8.
41. Hentschel J, Tatun D, Parkhomchuk D, Kurth I, Schimmel B, Heinrich-Weltzien R, Bertzbach S, Peters H, Beetz C. Identification of the first multi-exonic WDR72 deletion in isolated amelogenesis imperfecta, and generation of a WDR72-specific copy number screening tool. *Gene.* 2016 May 31;590(1):1-4.
42. Chambers J., Weihua Zhang., Graham M Lord, Pim van der Harst, Debbie A et al. Genetic loci influencing kidney function and chronic kidney disease in man. *Nat Genet.* 2010 May ; 42(5): 373–375)

43. Franceschini N., Haack K., Almasy L., Laston S., Lee E., MacCluer J., Howard B., Umans J., Cole S. Generalization of Associations of Kidney-Related Genetic Loci to American Indians. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2014 Jan 7; 9(1): 150–158.
44. Köttgen A, Pattaro C, Böger CA, Fuchsberger C, Olden M, Glazer NL. New loci associated with kidney function and chronic kidney disease. *Nat Genet.* 2010 May;42(5):376-84.
45. Jens K Hertel, Stefan J., Helge R., Carl G., Kristian M., Hveem K., Molven A. Evaluation of four novel genetic variants affecting hemoglobin A1c levels in a population-based type 2 diabetes cohort (the HUNT2 study). *BMC Med Genet.* 2011; 12: 20.

ANEXO I.

**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES "DR. BERNARDO SEPULVEDA"
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI**

CUESTIONARIO HOJA DE REGISTRO DE DATOS

FECHA _____ **FOLIO:** _____

I. FICHA DE IDENTIFICACIÓN

1. Nombre _____ 2. NSS _____

2. ANTECEDENTES HEREDOFAMILIARES DE DIABETES MELLITUS: SI _____ NO _____

3. ANTECEDENTES HEREDOFAMILIARES DE INSUFICIENCIA RENAL CRONICA

SECUNDARIO A DIABETES MELLITUS 2: SI _____ NO _____

4. DIAGNOSTICO DE DIABETES MELLITUS DE ACUERDO A GUIAS ADA SIN NEFROPATIA

DIABETICA: SI _____ NO _____

Glucosa en ayuno: _____ mg/dl Hb Glucosilada: _____ %

5. DIAGNOSTICO DE IRC EN TERAPIA DE SUSTITUCION RENAL (HD O DP) SECUNDARIA A

NEFROPATIA DIABETICA: SI _____ NO _____

6. TIEMPO EN AÑOS DE DIAGNOSTICO DE DIABETES MELLITUS TIPO 2: _____

Complicaciones de Diabetes: Retinopatía: SI _____ NO _____ Neuropatía: SI _____ NO _____ Gastropatía: SI _____

NO _____ Cardiopatía: SI _____ NO _____

7. DIAGNOSTICO DE HIPERTENSION ARTERIAL TA MAYOR A 140-90MMHG O EN

TRATAMIENTO: SI _____ NO _____ TA _____

8. TRATAMIENTO CON IECA O ARA: SI _____ NO _____ Fármaco y

dosis: _____

9. TIEMPO DE DIAGNOSTICO DE HIPERTENSION ARTERIAL SISTEMICA: _____ AÑOS

10. TRATAMIENTO CON DIETA Y EJERCICIO: SI _____ NO _____

11. Hipertrigliceridemia TG > 150MG/DL: SI _____ NO _____

12- Hipercolesterolemia CT mayor a 200mg/dl: SI _____ NO _____

13. IMC: _____ Peso _____ Talla _____ Cintura _____ Cadera _____ Índice

C/C _____

5: ERC

a) Edad de diagnostico de ERC: _____ EC: _____ KDOQI Etiología: _____

b) Debutación Clínica: _____

c) c) Tiempo de Evolución de DM a su diagnostico: _____

d) Tiempo de Evolución hasta el momento de ERC: _____

e) Tratamiento actual: _____

VALORACIONES:

1. Oftalmología (Fondo de Ojo).

Indice de comorbilidad de Charlson (CCI)

- Edad:

- Antecedente de:

- Infarto agudo al miocardio
- Insuficiencia cardiaca congestiva
- Enfermedad vascular periférica
- Enfermedad cerebrovascular
- Demencia
- Enfermedad pulmonar crónica
- Patología del tejido conectivo
- Enfermedad ulcerosa

- Patología hepática ligera
- Patología hepática moderada o grave
- Diabetes
- Diabetes con lesión orgánica
- Hemiplejía
- Patología renal (moderada o grave)
- Neoplasias
- Leucemias
- Linfomas malignos
- Metástasis sólida
- SIDA

Puntuación

Realizó:

ANEXO II.



**HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO
CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO
ACUERDO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN**

NOMBRE DE LA INSTITUCIÓN: Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS)

NOMBRE DEL ESTUDIO: ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS DE UN SOLO NUCLEÓTIDO EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2 Y ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA TERMINAL

NOMBRE DE LA PERSONA A CARGO DEL ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN (MEDICO DEL ESTUDIO O INVESTIGADOR PRINCIPAL): Dra. Dominga Jiménez Guzmán

DIRECCIÓN DEL CENTRO DEL ESTUDIO: Hospital de Especialidades Dr. Bernardo Sepúlveda. Centro Médico Nacional SIGLO XXI

NÚMEROS TELEFÓNICOS 56276900 ext 21755

NOMBRE DEL PACIENTE: _____
México, D.F. a _____

Usted está siendo invitado a participar en el estudio de investigación denominado "Asociación del Polimorfismo de un solo nucleotido con Insuficiencia Renal Crónica en pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2" el cual tiene como objetivo determinar la prevalencia de los polimorfismos ya comentados y evaluar si existe asociación con IRC secundario a Nefropatía Diabética en pacientes de nuestro medio y en dado caso puedan ser utilizados como marcadores de riesgo al comparar grupos de pacientes con DT2.

PARTICIPACIÓN O RETIRO

Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Si usted decide no participar, de cualquier manera recibirá la atención médica que suele recibir en el IMSS, y se le ofrecerán los procedimientos establecidos dentro de los servicios de atención médica del IMSS.

Si en un principio desea participar y posteriormente cambia de opinión, usted puede abandonar el estudio en cualquier momento. El abandonar el estudio en momento que quiera no modificará de ninguna manera los beneficios que usted tiene como derechohabiente del IMSS.

Usted puede hacer las preguntas que desee al inicio o a lo largo del estudio a las personas encargadas del estudio.

Si usted acepta participar en este estudio obtendremos una única muestra de sangre tomada necesariamente para su control un volumen que no rebasa los 10 mililitros de sangre (equivalente a dos cucharadas cafetera). Como ocasionalmente sucede en las tomas de muestras de sangre puede presentar dolor en sitio de punción, requerir más de una punción por toma, formación de moretón, inflamación o infección en el sitio de punción. Sin embargo le reiteramos que la toma de muestras será solo una determinación.

¿QUIÉN UTILIZARÁ Y COMPARTIRÁ INFORMACIÓN SOBRE MI PARTICIPACIÓN EN ESTE ESTUDIO?

Su nombre no será divulgado fuera del hospital en donde usted está siendo tratado (a). La información que proporcione se almacenará en diferentes sitios bajo un número de código, sin que aparezca su nombre u otra información que le identifique. Sin embargo, nosotros podremos identificarle si fuera necesario por motivos de investigación. Conforme a los lineamientos de las buenas prácticas clínicas, el investigador del estudio mantendrá su información personal por al menos 5 años.

Existen leyes nacionales e internacionales que obligan al médico del estudio a proteger la privacidad de sus registros médicos. Los investigadores, harán todos los pasos razonables para asegurar la confidencialidad y protección estricta de su información personal.

Usted tiene el derecho de ver sus registros. No obstante, si firma esta forma, quizás no pueda ver o copiar algunos de sus registros hasta después de que todos los participantes hayan sido incluidos en el estudio.

PAGO POR SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO

- Usted **NO** recibirá pago alguno por participar en este estudio.

Si firma esta forma:

- a) Usted da permiso al médico y el personal del estudio de elaborar sus registros médicos, realizar algunas preguntas y toma de muestras de sangre venosa.
- b) Usted da permiso al médico de compartir sus registros con otros investigadores involucrados en este estudio. Estas personas utilizarán sus registros para revisar el estudio, para verificar la seguridad y los resultados del estudio.
- c) Usted da permiso al médico y al personal del estudio de utilizar algunos hechos derivados de su participación en este estudio en libros, revistas, diarios y reuniones científicas. Si esto pasara nadie utilizará su nombre u otra información que pudiera emplearse para identificarle.
- d) Usted da permiso, al médico del estudio de compartir todos sus registros y esta forma de consentimiento informado con la secretaria de salud (SSA), autoridades del IMSS y otras agencias de gobierno o regulatorias en los Estados Unidos Mexicanos y otros países. El médico del estudio puede también compartir sus registros médicos con el comité de revisión de investigación, con el grupo de revisión o con el comité de ética local de este hospital o clínica. Estas agencias pueden emplear sus registros para verificar la información del estudio, cómo están haciendo el estudio los investigadores, la seguridad de los participantes y los resultados del estudio.

Si Usted tiene dudas o preguntas sobre sus derechos al participar en un estudio de investigación, puede comunicarse con los responsables del **Comité de Ética de Investigación de la CNIC del IMSS Av. Cuauhtémoc 330, 4° piso, bloque "B" de la Unidad de Congresos, Colonia Doctores, C.P. 06720, México D.F.** comision.etica@imss.gob.mx y/ o con los investigadores asociados Dra. Dominga Jiménez Guzmán y Dr. Emmer García Maldonado al teléfono 56 27 69 00 extensiones 21753 y 21755.

Declaración de Consentimiento

Se me ha explicado con claridad en qué consiste este estudio, además he leído (o alguien me ha leído) el contenido de este formato de consentimiento. Se me han dado la oportunidad de hacer preguntas y todas mis preguntas han sido contestadas a mi satisfacción. Se me ha dado una copia de este formato.

Al firmar este formato estoy de acuerdo en participar en la investigación que aquí se describe.

Nombre del Participante

Firma del Participante

Fecha

Firma del encargado de obtener el consentimiento informado

Le he explicado el estudio de investigación al participante y he contestado todas sus preguntas. Considero que comprendió la información descrita en este documento y libremente da su consentimiento a participar en este estudio de investigación.

Firma del encargado de obtener el CI

Fecha

Firma del testigo

Mi firma como testigo certifica que el/la participante firmó este formato de consentimiento informado en mi presencia, de manera voluntaria.

Nombre del Testigo

Parentesco con participante

Firma del Testigo

Fecha
