



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO rs1256031 DEL
RECEPTOR BETA DE ESTRÓGENOS EN PACIENTES
CON DIABETES TIPO 2**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

EMA ELVIRA HERRERA LÓPEZ



DIRECTOR: DR. ADÁN VALLADARES SALGADO

ASESOR: DR. OSVALDO DANIEL CASTELÁN MARTÍNEZ

MÉXICO, Ciudad de México, 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 está 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.

*Nos esse quasi nanos, gigantium
humeris incidentes, ut possimus
plura eis et remotiora videre, non
utique proprii visus acumine, aut
eminentia corporis, sed quia in
altum subvenimur et extollimur
magnitudine gigantea.*

Bernardus Carnotensis

**Somos como enanos a los
hombros de gigantes. Podemos
ver más, y más lejos que ellos, no
porque la agudeza de nuestra
vista ni por la altura de nuestro
cuerpo, sino porque somos
levantados por su gran altura.**

Bernardo de Chartres

DEDICATORIAS

A **DIOS**, por ser el arquitecto de mi vida, que está conmigo a cada paso que doy, fortalece mi corazón e iluminar mi mente.

A mi **MADRE** Mirna, a quien además de deberle la vida es un ejemplo de responsabilidad, paciencia, bondad, tenacidad y sobre todo de amor. Por haberme apoyado en todo momento y alentarme a nunca renunciar ante cualquier adversidad. Te amo.

A mi **PADRE** Max, por apoyarme en todo momento, comprenderme y enseñarme a trabajar para alcanzar los objetivos en la vida. Te amo.

A mi **HERMANO** Manuel, por sus palabras de aliento y cariño. Por haberme escuchado y aconsejado. Te quiero mucho.

A **DAVID** mi amor y mejor amigo, por todo su cariño, comprensión y sabiduría. Por haber compartido conmigo la época más bella y difícil de mi vida. Gracias.

A mi **ABUELITA** Dioema, que siempre está en mi corazón y a mi **ABUELITO** Enrique, por sus palabras de cariño y motivación.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a la **Unidad de Investigación Médica en Bioquímica** del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional “Siglo XXI” del Instituto Mexicano del Seguro Social, por albergarme en su laboratorio brindándome las facilidades para realizar y concluir este trabajo.

Al **Dr. Adán Valladares Salgado**, quien bajo su dirección se ha efectuado el presente trabajo, por su paciencia y asesoramiento en los aspectos de la investigación y tesis, además de haber depositado en mí su confianza.

Al **Dr. Osvaldo Daniel Castelán Martínez**, por sus valiosos consejos, su constante apoyo, motivación y las largas horas de conversaciones científicas, las cuales fueron fructíferas para el desarrollo de la investigación. Además, por brindarme la oportunidad de desarrollarme en el ámbito científico.

A todos los integrantes del laboratorio de la UIMB: Dr. Jaime, Dr. Fernando, Diana, Karina, pero en especial a **Ángeles, Gloria, Miriam y Vanessa**, por haberme brindado su amistad y compartido su comida.

A los sinodales del jurado por su valiosa contribución a este trabajo.

Dra. Martha Legorreta Herrera.

Q.F.B. Ixel Venecia González Herrera.

M. en C. Rosa Elba Galván Duarte.

A la **UNAM** mi *alma máter*, por abrirme las puertas del conocimiento, la cultura, pero más importante haberme enseñado a pensar.

A la **FES Zaragoza** por desarrollar en mí, la capacidad de resistencia.

ÍNDICE	Página
1. Introducción.....	10
2. Marco teórico.....	12
2.1. Diabetes.....	12
2.2. Epidemiología de la diabetes tipo 2	13
2.3. Los estrógenos y sus funciones.....	16
2.4. Los estrógenos y la homeostasis de la glucosa.....	19
2.5. Receptores de estrógenos	20
2.6. Los receptores de estrógenos en el control de la energía y la homeostasis de la glucosa.....	21
2.7. Relación entre el receptor β de estrógenos y la DT2.....	23
2.8. Polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs)	25
2.9. SNPs en el gen para el receptor β de estrógenos y rs1256031.....	26
2.10. Ancestría de la población mexicana	27
2.11. Generalidades de la PCR	28
2.12. Genotipificación por PCR en tiempo real	29
3. Planteamiento del problema.....	32
4. Hipótesis.....	33
5. Objetivos	33
5.1 Objetivo general.....	33

5.2 Objetivos particulares	33
6. Material y métodos	34
6.1 Tipo de estudio y universo de trabajo	34
6.1.1 Criterios de inclusión.....	34
6.1.1.1. Criterios de inclusión de casos.....	34
6.1.1.2. Criterios de inclusión de los controles	35
6.1.2. Criterios de exclusión.....	35
6.1.3. Criterios de eliminación.....	35
6.2. Procedimientos.....	36
6.2.1. Selección de las muestras	36
6.2.2. Evaluación de la pureza del ADN	36
6.2.3. Determinación de la concentración de ADN	36
6.2.4. Realización de las diluciones de ADN	37
6.2.5. Determinación de la proporción de ancestría.	37
6.2.6. Genotipificación de los alelos del polimorfismo rs125603.....	37
6.2.7. Análisis estadístico	39
6.2.8. Cálculo de tamaño de muestra	40
6.2.9. Consideraciones éticas.....	41
7. Resultados	42

8. Discusión.....	47
9. Conclusión.....	51
10. Perspectivas.....	51
11. Referencias	52
12. Anexos	58
12.1. Características y datos de los reactivos.....	58
12.2. Carta de consentimiento informado	59
12.3. Autorización de la comisión nacional de investigación científica	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Los 10 primeros países según el número de adultos con diabetes.....	13
Figura 2. Número estimado de personas con diabetes en el mundo y por región en 2015 y 2040 con edades entre 20 y 79 años.....	14
Figura 3. Tendencia en la prevalencia de diabetes por grupos de sexo.....	15
Figura 4. Prevalencia de diabetes tipo 2 según el grupo de edad, tipo de diagnóstico y género.....	15
Figura 5. Origen de los estrógenos circulantes y tisulares.....	17
Figura 6. Vías del metabolismo de los estrógenos.....	18
Figura 7. Sitios principales donde actúan los receptores de estrógenos, promoviendo una homeostasis de la glucosa y la energía.....	22
Figura 8. Modelo propuesto para la acción del E2 sobre las células β del páncreas para la secreción de insulina.....	24
Figura 9. Ubicación del rs1256031 dentro del cromosoma 14 en la posición 64279461 en el genoma humano.....	26
Figura 10. Proceso del ensayo de genotipificación usando tecnología TaqMan®.....	31
Figura 11. Condiciones de la reacción de PCR.....	38
Figura 12. Curvas del aumento de la fluorescencia para el polimorfismo rs1256031 y de temperatura durante la corrida de PCR.....	44
Figura 13. Discriminación alélica para el polimorfismo rs1256031.....	45

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Secuencia de la sonda y su respectivo marcador de fluorescencia.....	38
Cuadro 2. Reactivos y cantidades para realizar PCR en tiempo real.	39
Cuadro 3. Características clínicas de los pacientes con DT2 y los controles población de estudio.	43
Cuadro 4. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo rs1256031.	45
Cuadro 5. Asociación del polimorfismo rs1256031 del gen receptor β de estrógenos con DT2 en un modelo dominante y codominante.	46
Cuadro 6. Riesgo ajustado por las variables confusoras en un modelo recesivo.	46

1. Introducción

En la última década, la prevalencia de diabetes ha aumentado con mayor velocidad en países de ingresos bajos y medios con respecto a los de ingresos altos. En este sentido, México ocupa el sexto lugar en prevalencia de pacientes con diabetes,¹ situación que llama a fortalecer las estrategias y dirigir la investigación para comprender la fisiopatología de la enfermedad.^{2, 3}

La diabetes es una enfermedad metabólica, crónico degenerativa, multifactorial y poligénica, con grados variables de predisposición hereditaria y con participación de diversos factores ambientales ^{3, 4}

Los estrógenos son hormonas esteroideas, derivadas del colesterol, de naturaleza no polar con capacidad de difundir al interior de las células.⁵ Estas hormonas interactúan con los receptores de estrógenos (RE), los cuales pertenecen a la familia de receptores nucleares, son factores de transcripción que regulan la expresión génica. Existen al menos 3 tipos de RE, receptor de estrógenos α (RE α), receptor de estrógenos β (RE β) y un receptor de estrógenos acoplado a proteína G -1 conocido como GPR30.^{6, 7} Los RE participan en el control del metabolismo energético y de la glucosa, tanto en condiciones de salud como de enfermedad.⁶

En las células β pancreáticas, los receptores de estrógenos se expresan y modulan el equilibrio entre la secreción de insulina y la concentración de glucosa en sangre, mediante el aumento de la síntesis de insulina y la proliferación de células β en el páncreas.⁸ Asimismo, cuando se activa RE β estimula al canal de K sensible a ATP de forma sinérgica por un mecanismo que se desconoce hasta el momento.⁹

Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, acrónimo en inglés de Single Nucleotide Polymorphism) son las variaciones genéticas más comunes encontradas en el genoma humano.¹⁰ Algunos de ellos desempeñan un papel biológico importante en la fisiopatología de enfermedades complejas como la diabetes tipo 2 (DT2). El impacto de los SNPs puede darse a nivel del gen, del ARNm e incluso a la misma proteína.¹¹ La presencia de polimorfismos en los genes que codifican a los RE α , RE β y otros componentes del sistema de RE se han asociado con un mayor riesgo a obesidad, DT2, así como al aumento de la densidad mineral ósea y mamaria.¹²

En 2015, diversos SNPs encontrados en el gen *RE α* se asociaron con el aumento de la glucemia y con el riesgo a padecer DT2.¹³ Este reporte nos permitió formular la siguiente pregunta de investigación ¿los polimorfismos presentes en el gen *RE β* afectaran la homeostasis de la glucosa y en consecuencia modificar el riesgo a desarrollar DT2? El propósito del presente trabajo fue determinar si el polimorfismo rs1256031 presente en el gen que codifica para el RE β está asociado con el riesgo al desarrollo de DT2.

2. Marco teórico

2.1. Diabetes

La diabetes es una enfermedad metabólica, crónica degenerativa, multifactorial y poligénica, con grados variables de predisposición hereditaria y con participación de diversos factores ambientales.^{3,14} Esta enfermedad se caracteriza por una hiperglucemia crónica debida a la deficiencia en la producción o acción de la insulina que afecta al metabolismo de carbohidratos, proteínas y grasas.⁴ La diabetes puede clasificarse en cuatro categorías generales:

- **Diabetes tipo 1:** debido a la destrucción autoinmune de las células beta del páncreas, por lo que conduce a la absoluta deficiencia de insulina.
- **Diabetes tipo 2:** debido a un déficit progresivo de la secreción de insulina, así como resistencia a la hormona.
- **Diabetes gestacional:** se caracteriza por la hiperglucemia que se presenta en el segundo o tercer trimestre de embarazo y se desconoce la etiología específica de esta enfermedad.
- **Tipos específicos de diabetes debido a otras causas:**
 - Síndromes monogénicos de diabetes: diabetes neonatal y la diabetes de inicio de la madurez de los jóvenes (MODY).
 - Enfermedad del páncreas exocrino: fibrosis quística.
 - Inducidas por fármacos: como el uso de glucocorticoides en el tratamiento del VIH/SIDA o después de un trasplante de órganos.^{15, 16}

2.2. Epidemiología de la diabetes tipo 2

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) la epidemia de la diabetes es una amenaza mundial. En el mundo, 415 millones de adultos entre 20 a 79 años padecen diabetes, de los cuales están sin diagnosticar 193 millones, figura 2.^{2,3,17}

En 2015 se registraron 5 millones de muertes debidas a la diabetes,^{17,18} de las cuales alrededor de 80% ocurrieron en países de ingresos bajos o medios que en su mayoría se encuentran menos preparados para enfrentar esta epidemia.⁽¹⁹⁾ Además, es una carga económica para cada país en el mundo. Solamente, en el 2015 costó entre 673 millones y 1197 millones de dólares estadounidenses de gastos en atención sanitaria ¹⁷ Si no se detiene este aumento, para 2040 habrá 642 millones de personas viviendo con la enfermedad (Figura 2).^{17,18}

De acuerdo con la Federación Internacional de Diabetes, China, India, Estados Unidos, Brasil, Rusia y México son, en ese orden los países con mayor número de personas diagnosticadas con diabetes (Figura 1).²⁰

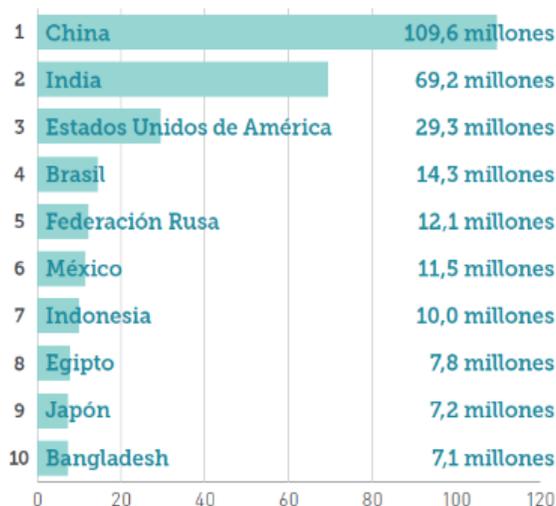


Figura 1. Los 10 primeros países según el número de adultos con diabetes. Imagen obtenida de: Atlas de la diabetes de la FID, 7ª ed. 2015. Disponible en: <http://www.diabetesatlas.org/>¹⁷



Figura 2. Número estimado de personas con diabetes en el mundo y por región en 2015 y 2040 con edades entre 20 y 79 años. Imagen obtenida de: Atlas de la diabetes de la FID, 7ª ed. 2015. Disponible en: <http://www.diabetesatlas.org/>¹⁷

En México, las complicaciones de la diabetes representan la segunda causa de muerte en mujeres y la segunda en hombres con una edad promedio de 66.7 años,⁴ este dato sugiere que los pacientes con DT2 tienen una reducción de 10 años en la esperanza de vida.¹ Los datos de la última Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) evidencia el aumento del 62.1% de la prevalencia de esta enfermedad desde el año 2000.^{21, 22} En nuestro país la prevalencia de diabetes en la población es del 9.4% según cifras del año 2016 (Figura 3).²²

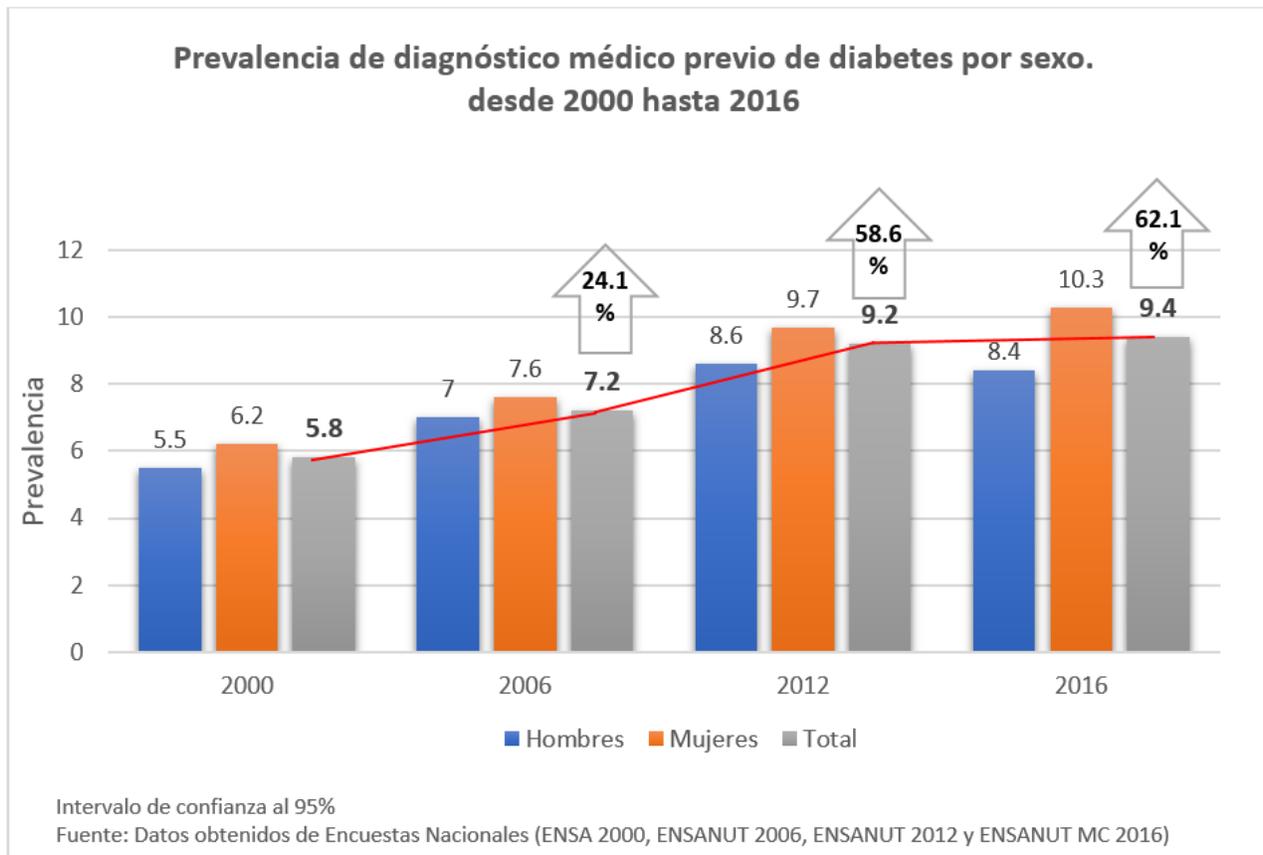


Figura 3. Tendencia en la prevalencia de diabetes por grupos de sexo. Fuente: Datos de la Encuestas Nacionales (ENSA 2000, ENSANUT 2006, ENSANUT 2012 y ENSANUT MC 2016)

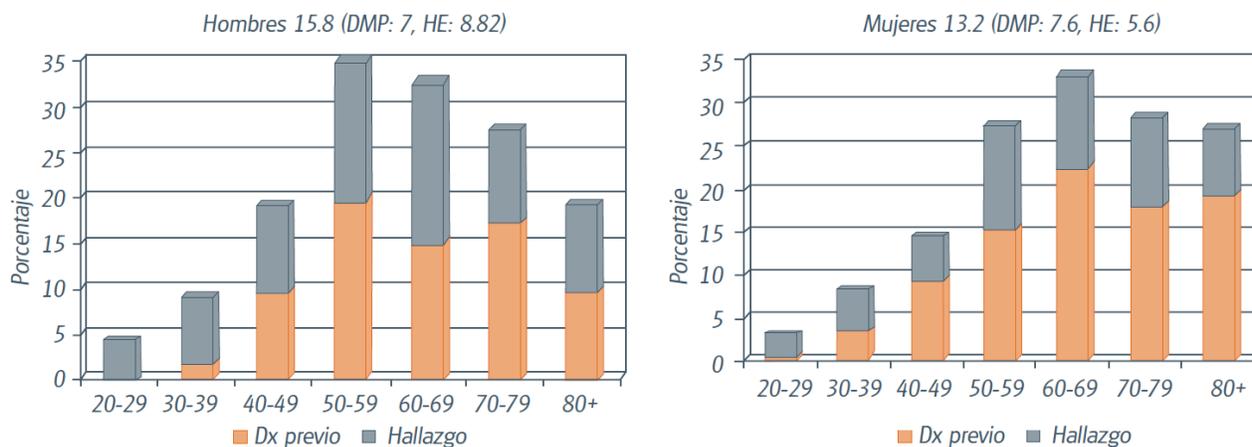


Figura 4. Prevalencia de diabetes tipo 2 según el grupo de edad, tipo de diagnóstico y género. Fuente: Datos de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012 (ENSANUT 2012)

La incidencia de la diabetes incrementa con la edad.²³ En la población masculina de 50 a 59 años presentó la más alta. En cambio, en las mujeres la mayor prevalencia se presentó a una edad de 60 a 69 años (figura 4).²⁴

2.3. Los estrógenos y sus funciones

Los estrógenos son hormonas esteroideas, derivadas del colesterol, de naturaleza no polar con capacidad de difundir al interior de las células.⁵ Existen 3 tipos de estrógenos: el estriol (E3), el estradiol (E2) y la estrona (E1).²⁵ Un cuarto estrógeno de reciente descubrimiento es el estetrol (E4).²⁶

En mujeres en edad reproductiva y con ciclos menstruales regulares, los ovarios son el sitio principal de la síntesis de estrógenos, predominando el E2 y funciona como una hormona circulante que actúa en los tejidos diana distantes.²⁷ se presenta en la figura 5A. Sin embargo, en mujeres postmenopáusicas y en hombres la síntesis se realiza en sitios extragonadales tales como mama, cerebro, hueso y tejido adiposo,²⁷⁻²⁹ como se aprecia en la figura 5B.

Las hormonas E1 y E2 se sintetizan mediante la aromatización de la androstenediona y de la testosterona respectivamente (Figura 6). El E3 se sintetiza a partir de la E1 a través de un intermediario de 16 α -Hidroxiestrona. El E4 es sintetizado en el hígado fetal, pero su función actualmente es desconocida. Aunque en algunos tejidos los estrógenos se pueden sintetizar bajo demanda, los estrógenos se pueden almacenar en forma de sulfato de estrona.²⁶

Los estrógenos regulan diferentes procesos fisiológicos como el crecimiento celular, mantenimiento de las características sexuales secundarias de las mujeres, durante el embarazo, en el ciclo menstrual ovulatorio y en procesos metabólicos.³⁰

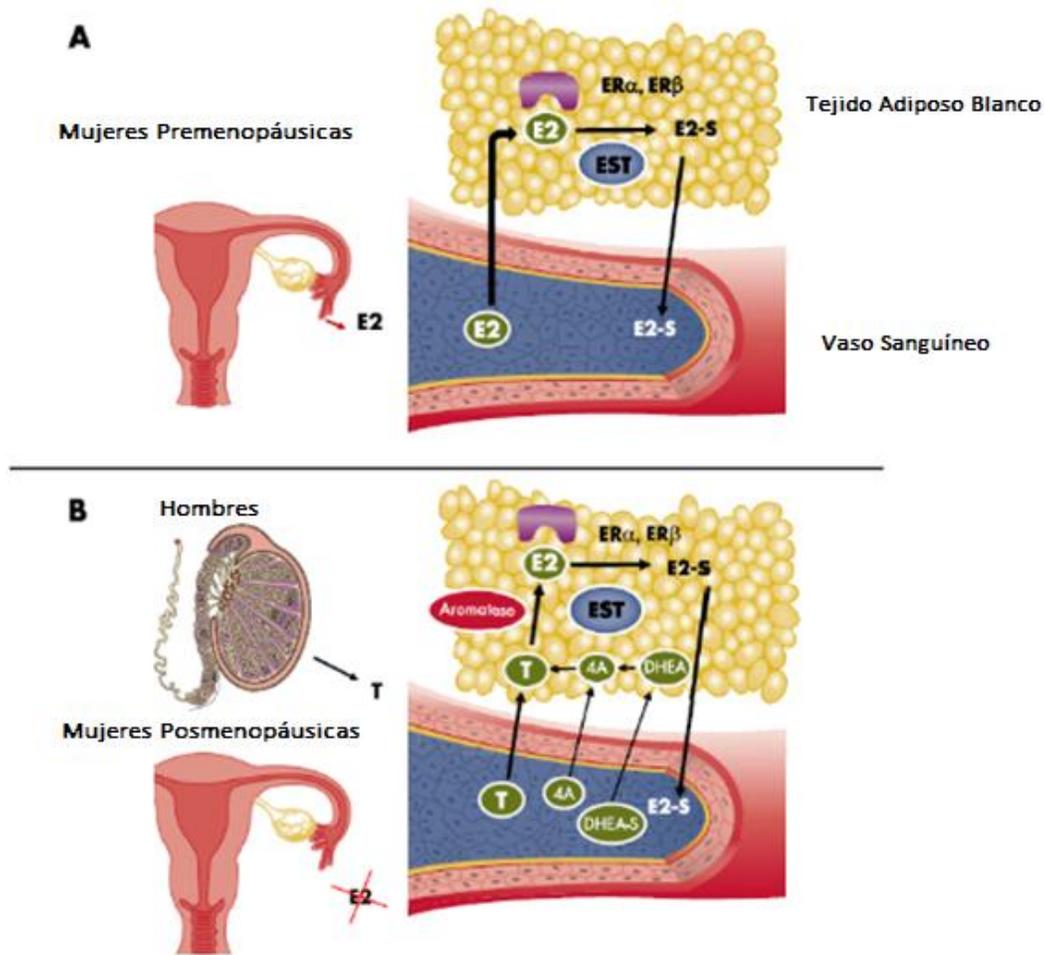


Figura 5. Origen de los estrógenos circulantes y tisulares. **A**, en las mujeres premenopáusicas sanas, el estradiol (E2) es producido por los ovarios y funciona como una hormona circulante que actúa sobre los tejidos diana distantes. Representado aquí por el tejido adiposo blanco. **B**, en mujeres postmenopáusicas y en hombres, el E2 no funciona como una hormona circulante; más bien se sintetiza en sitios extragonadales a partir de precursores androgénicos circulantes tales como testosterona (T) androstenediona (4A) o dehidroepiandrosterona (DHEA). La acción estrogénica celular depende de: 1) la señalización y la sensibilidad del RE; 2) La actividad de las enzimas como la aromatasa implicadas en la biosíntesis de E2; y 3) la inactivación en sulfato de E2 (E2-S) por la sulfotransferasa de estrógeno. *Imagen modificada de The Role of Estrogens in Control of Energy Balance and Glucose Homeostasis.*²⁷

momento se han reportado al menos 3 RE, dos factores de transcripción activados por ligando, RE α y RE β con una homología del 95% de aminoácidos, y un receptor de estrógenos acoplado a proteína G -1 (GPER1) conocido como GPR30, este último actúa de manera independiente de los RE α y β .⁶ Otro receptor de estrógenos que no está totalmente descrito es el RE X, del cual sólo se conoce su existencia en el cerebro.³¹

Además de los efectos del E2 en las células y fisiología en condiciones de salud, los estrógenos también juegan un papel importante en varios procesos patológicos incluyendo cáncer, enfermedades metabólicas, cardiovasculares y neurodegenerativas, inflamación y osteoporosis principalmente.²⁹

2.4. Los estrógenos y la homeostasis de la glucosa

Los estrógenos se han relacionado con el balance energético y el metabolismo de la glucosa.³² La prevalencia de la diabetes es menor en mujeres premenopáusicas y aumenta después de ésta. La hipótesis de este dimorfismo de género sugiere que la hormona estradiol (17 β -estradiol o E2), que se encuentra en mayor concentración en las mujeres en etapa fértil, protege a las células β pancreáticas de la lipotoxicidad, del estrés oxidativo y de la apoptosis.³³

Los estrógenos, sobre todo E2, modulan la sensibilidad y la biosíntesis de la insulina como consecuencia se presenta una mejor homeostasis de la glucosa. En mujeres con ciclos menstruales irregulares o muy largos la incidencia de DT2 es mayor con respecto a las mujeres con ciclos regulares.³⁴ Se ha observado que los

niveles de insulina se incrementan en las ratas preñadas, en respuesta al aumento de los niveles de hormonas sexuales.³⁵

En los seres humanos, el E2 invierte el efecto de la menopausia en el metabolismo de glucosa e insulina dando como resultado un aumento en la secreción de insulina y una mejora en la resistencia a ésta.³⁶

2.5. Receptores de estrógenos

En 1986 se secuenció el RE, hasta este momento se consideraba a esta molécula como la única capaz de mediar los efectos de los estrógenos en las células blanco. Diez años después, se descubrió un segundo receptor que recibió el nombre de receptor β de estrógenos (RE β),³⁷ mientras que el primer receptor se denominó receptor α de estrógenos (RE α).

Estudios *in vitro*, muestran que ambos receptores se sintetizan durante la fase G1 y G2 en el ciclo celular y contienen 6 dominios funcionales, denominados de la A a la F. Además, presentan gran homología en los dominios de unión al DNA (región C) y al ligando (región E), mientras que las regiones D y F no están bien conservadas.³⁸ El RE α está codificado en el brazo largo del cromosoma 6, mientras que el RE β en el brazo largo del cromosoma 14. La expresión de estos genes está determinada por los niveles de ARNm y por su unión a ligando que varían en cada tipo de tejido. Lo que indica que cada receptor tiene un papel biológico distinto.³⁹ El RE α tiene una afinidad 5 veces mayor por E2 que el RE β , ambos receptores requieren formar heterodímeros para activar la transcripción.¹²

La presencia de polimorfismos en los genes que codifican a los RE α , RE β y otros componentes del sistema de RE pueden aumentar el riesgo a: obesidad, DT2, el aumento de la densidad mineral ósea y mamaria.¹²

2.6. Los receptores de estrógenos en el control de la energía y la homeostasis de la glucosa.

El desarrollo de ratones knockout para el RE α y RE β han demostrado la participación de estos receptores en la regulación de muchos procesos para el control del homeostasis energética. Esto incluye la disminución del apetito y el gasto energético, sensibilidad de la insulina en el hígado y en el músculo, crecimiento y distribución de los adipocitos en el cuerpo, así como la función de las células β pancreáticas (Figura 7.).^{6, 32} Se observó un aumento de peso significativo en los ratones que carecían del RE α .

En ratones knockout tanto para el RE α (RE α KO) y la enzima aromatasa (ArKO), se observó una resistencia a la insulina y obesidad. El estado de resistencia a la insulina se puede originar por la ausencia del RE α , ya que este receptor está relacionado con el metabolismo de la glucosa en diferentes tejidos que incluyen el musculo esquelético, el tejido adiposo, el hígado, el cerebro y el páncreas endocrino. La expresión de GLUT4, puesto que es el más eficiente transportador de glucosa mediado por insulina, en la membrana celular del musculo esquelético es extremadamente reducida en RE α $-/-$, no afectada en RE β $-/-$ y elevado en ratones ArKO.⁴⁰ El aumento de la expresión de GLUT4 en el musculo esquelético, promueve la expresión y secreción de la insulina en las células β pancreáticas.³²

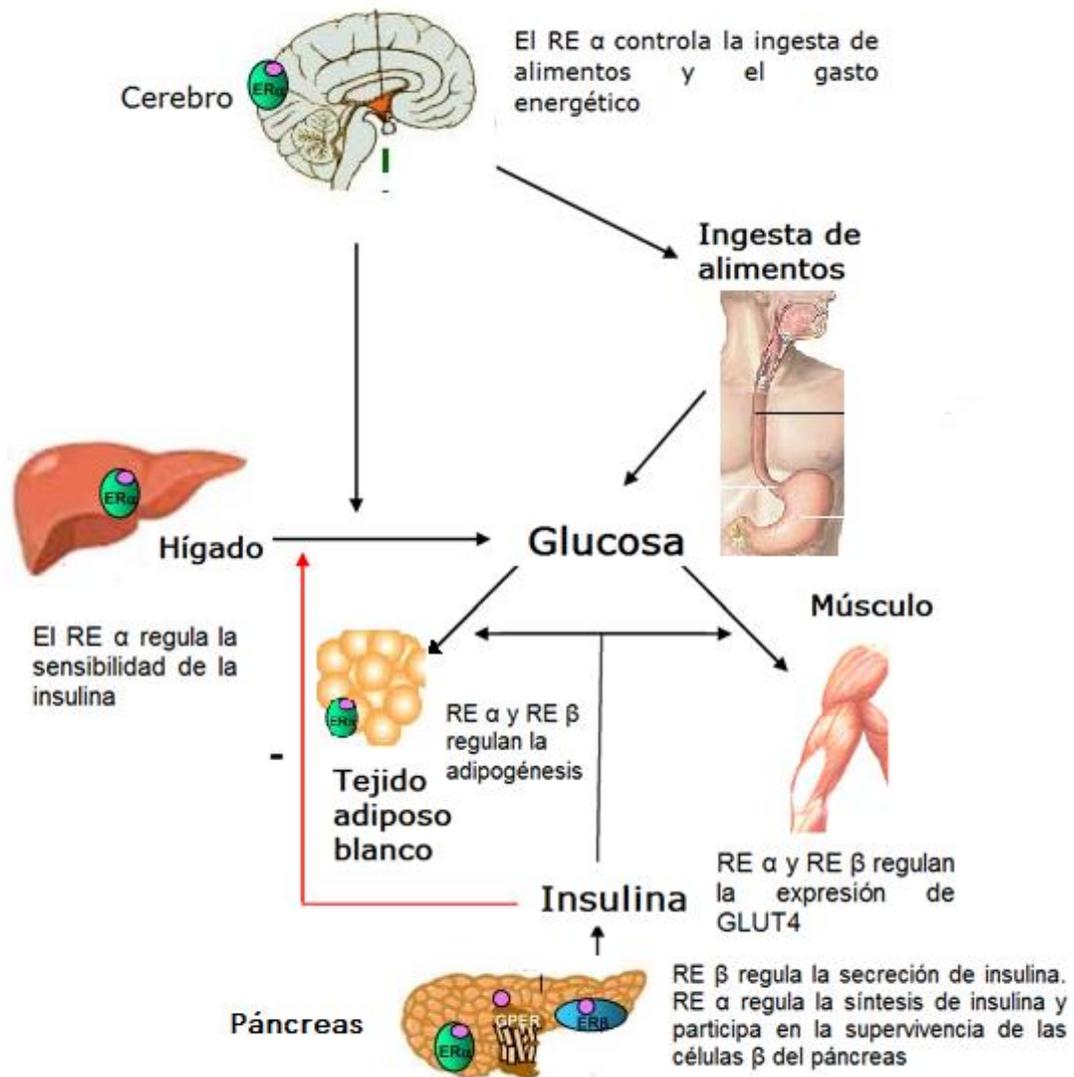


Figura 7. Sitios principales donde actúan los receptores de estrógenos, promoviendo una homeostasis de la glucosa y la energía. *Imagen modificada de: The role of estrogen receptors in the control of energy and glucose homeostasis.*³²

2.7. Relación entre el receptor β de estrógenos y la DT2

La insulina y el glucagón son dos hormonas involucradas en la homeostasis de la glucosa. La insulina reduce los niveles de glucosa en sangre, mientras de manera opuesta el glucagón aumenta los niveles de glucosa en sangre. La liberación de las hormonas insulina y glucagón es dependiente del aumento intracelular de iones calcio ($[Ca^{2+}]_i$), aunque el estímulo y la secreción es más fuerte en las células β pancreáticas que en las α .^{40, 41}

Las células β pancreáticas son eléctricamente excitables. La actividad eléctrica consiste en oscilaciones en el potencial de membrana. El acoplamiento clásico, estímulo-secreción que provoca la liberación de la insulina, implica el cierre de los canales de los iones potasio regulados por ATP (K_{ATP}) por el metabolismo de la glucosa, que aumenta intracelularmente la razón ATP/ADP.⁴² Este cierre provoca la despolarización de la membrana que activa los canales de Ca^{2+} sensibles al voltaje. Como consecuencia se origina una oscilación patrón del desencadenado una secreción pulsátil de insulina.^{41, 43}

En las células β pancreáticas, el RE β es responsable del efecto insulínico rápido del E2 cuando se administra en concentraciones fisiológicas tanto en *in vitro* como *in vivo*.^{9, 42, 44}

Cuando se forma el complejo RE β -E2 desencadena la síntesis de guanosín monofosfato cíclico (cGMP) que a su vez activa a la proteína G cinasa (PKG), este aumento provoca el cierre de los canales K_{ATP} , promueve la despolarización de la membrana plasmática y la entrada de Ca^{2+} a la célula. También mejora la

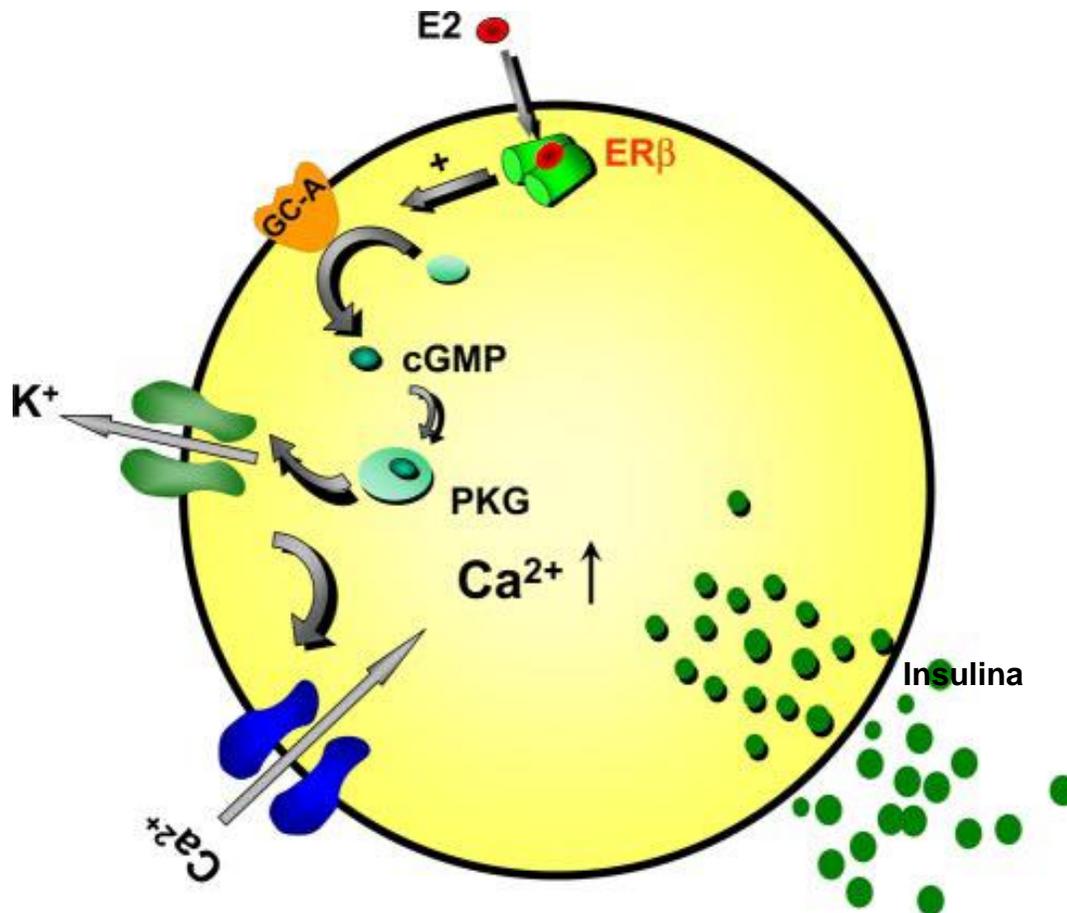


Figura 8. Modelo propuesto para la acción del E2 sobre las células β del páncreas para la secreción de insulina. La glucosa entra en las células β pancreáticas cuando aumenta la concentración de ésta en la sangre. El aumento de la relación ATP/ADP por el metabolismo intracelular de la glucosa, provoca el cierre de los canales de K_{ATP} . Subsecuentemente, se presenta una despolarización de la membrana que provoca la apertura de los canales de Ca^{2+} , aumenta la entrada de $[Ca^{2+}]_i$ y origina la secreción de la insulina. En sinergia con la glucosa, cuando E2 se enlaza al RE β activa al receptor guanilil ciclasa (GC-A) a través de un mecanismo aún desconocido. Como consecuencia, disminuye la actividad de los canales de K_{ATP} debido a que aumenta la síntesis de guanosín monofosfato cíclico (cGMP) lo que a su vez activa la proteína G cinasa (PKG) y el aumento de ésta provoca el cierre de los canales de K_{ATP} . Aumenta la secreción de insulina. *Imagen modificada de: Rapid Regulation of K_{ATP} Channel Activity by 17β -Estradiol in Pancreatic β -Cells Involves the Estrogen Receptor β and the Atrial Natriuretic Peptide Receptor.*³²

señalización de $[Ca^{2+}]_i$ para la movilización y posteriormente la exocitosis de las vesículas que contienen insulina. Como resultado aumenta la secreción de insulina (Figura 8).^{32, 41, 45}

2.8. Polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs)

Polimorfismo significa literalmente “muchas formas”; son la causa de la diversidad genómica dentro de una misma especie, hacen que cada individuo sea único e irrepetible.¹⁰ El genoma humano contiene 25 000 genes y solo el 5 % participa en codificar la información.^{46, 47}

Los SNP se ubican en diferentes sitios del gen como en la región promotora, en los intrones que modulan la estabilidad de una proteína, en sitios de corte y empalme donde ocurre la eliminación de intrones y unión de exones en regiones intergénicas. Para considerarse como polimorfismo la frecuencia de uno de sus alelos en la población debe ser superior al 1%^{11, 48, 49}

Los SNP representan las variantes genéticas más comunes encontradas en el genoma humano, debido a su amplia distribución, estos polimorfismos se localizan en cualquier parte de la estructura de los genes y el genoma.¹¹ Actualmente se han encontrado 10 millones de SNP, aunque se estima que existen aproximadamente 38 millones de ellos, con una frecuencia de aproximadamente un SNP por cada 100 – 300 nucleótidos.⁵⁰

Las aplicaciones del estudio de los SNPs son diversas, por un lado, sirven para tratar de explicar el origen de las poblaciones y así reconstruir parte de la historia evolutiva. Por otro lado, tienen gran aplicación en campos como la medicina forense y el estudio de las enfermedades mutigénicas.⁴⁹ Asimismo, existen variaciones funcionales que pueden producir alguna enfermedad o susceptibilidad a ésta, como en la diabetes tipo 1 y 2, la hipertensión arterial y el síndrome metabólico, entre otras.^{48,49}

2.9. SNPs en el gen para el receptor β de estrógenos y rs1256031

Se han registrado más de 650 SNP en el gen del RE β en la base de datos del Centro Nacional de Biotecnología (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>), una parte se encuentran en los intrones, de los cuales existen más de 30 SNP y se sitúan en el 5' de la región no traducida, incluye la región del promotor y más de 40 SNP presentes en la región 3' del gen RE β .^{51, 52}

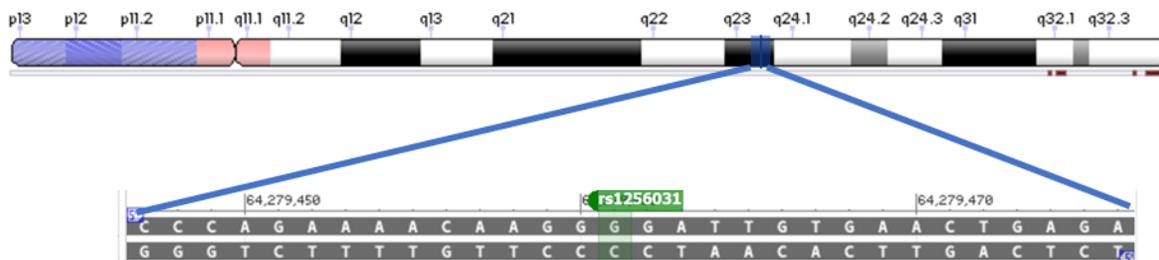


Figura 9. Ubicación del rs1256031 dentro del cromosoma 14 en la posición 64279461 en el genoma humano. Imagen modificada de: Centro Nacional para la Información Biotecnológica para las ciencias de la salud. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/view/?q>⁵³

El SNP rs1256031 es una variable intrónica (SNPi) para el RE β , se encuentra en el cromosoma 14 en la posición 64279461 en el genoma humano, con un cambio de nucleótido C/T, es C el alelo ancestral. Se ha reportado una frecuencia alélica para la población mexicana radicada en la ciudad de Los Ángeles USA, de 0.55 para el alelo ancestral C y 0.45 para la variante T (Figura 9).⁵³

Sin embargo, se podría afectar al procesamiento y la estabilidad del transcrito, lo que modificaría la señalización cuando el E2 se une al RE β .⁵²

Los diversos SNP en el gen RE β pueden influir en la susceptibilidad a diversas patologías, los SNP rs1256049 y rs4986938 se han asociado a trastornos menstruales con disfunción ovulatoria en mujeres chinas con genotipo homocigoto. Además, el SNP rs1256031 se ha asociado con el aumento de la masa ventricular izquierda y el grosor ventricular.⁵²

El E2 influye en la homeostasis de la glucemia mediante la síntesis y secreción de la insulina; efecto realizado a través de la activación de RE α y β . Aunque se desconoce hasta el momento el mecanismo para ésta homeostasis. Recientemente, en la población egipcia, se observó que diversos SNP en el gen RE α , se asocian con el aumento de la glucemia y con la diabetes tipo 2.¹³ Debido a que RE β también tiene una influencia en la homeostasis de la glucosa.

Esto llevó a proponer que el SNP rs1256031, un polimorfismo presente en el gen para RE β , podría influir en la actividad del RE β y disminuir la liberación de la insulina mediada por la glucosa, en las células β del páncreas.

2.10. Ancestría de la población mexicana

La mayoría de la población mexicana contemporánea consiste en mestizos, que son un grupo con fondo genético principalmente de nativos americanos los cuales son habitantes de México, europeos (principalmente de España) y una menor cantidad africano (proveniente de esclavos del oeste de África)⁵⁴. La DT2 es una enfermedad compleja en donde el riesgo varía notablemente entre los grupos de población.

En los Estados Unidos, las personas que tienen ancestros europeos poseen un menor riesgo de DT2 que las personas con ancestría de nativos americanos, latino y afroamericanos. Los nativos americanos son 2.2 veces más propensos a desarrollar la enfermedad.⁵⁴ En México se ha observado que las personas con ancestría de nativo americano tienen mayor riesgo de desarrollar la enfermedad que los de ancestría europea.^{3, 55}

2.11. Generalidades de la PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés, *polymerase chain reaction*), es una técnica que desarrollo Kary Mullis en 1983.⁵⁶ El objetivo de la PCR es obtener muchas copias de un fragmento de ADN, para después poder visualizarlo y utilizarlo en otras aplicaciones.⁵⁷

Para llevar acabo está reacción se necesita: un **ADN molde**, el cual es aquel fragmento que se desea amplificar, una **polimerasa de ADN** obtenida de *Aquaticus thermus*. Es una enzima capaz de generar una copia de ADN a partir del ADN molde. La reacción se lleva a cabo en un **amortiguador de Tris-HCl** (pH entre 8.3 – 8.8) apropiado para el funcionamiento de la enzima polimerasa. Además, como cofactores de la polimerasa se añaden **cationes divalentes**, generalmente en forma de cloruro de magnesio (**MgCl₂**). Las enzimas ADN polimerasas únicamente son capaces de añadir nucleótidos al extremo 3' libre de una doble cadena de ADN. Son necesarios por tanto moléculas cortas (entre 10 y 30 bases) de ADN de cadena sencilla. Estas moléculas son los **cebadores o primers** de la reacción. Los cebadores son los que van a delimitar el fragmento a amplificar. **Desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTP's)**, las enzimas ADN polimerasas

sintetizan una cadena complementaria a la cadena molde mediante la incorporación de nucleótidos al extremo 3' libre del cebador que se ha unido a la cadena.^{56, 57}

Las principales fases de la PCR son:

- **Desnaturalización.** Consiste en separar la doble hebra de ADN y convertirla en hebra sencilla. Típicamente se usa una temperatura de 95°C - 97°C, por 15 a 40 segundos el tiempo depende del tamaño del genoma.
- **Hibridación.** Los cebadores previamente diseñados, reaccionan con la hebra sencilla de ADN y se hibridan en lugares específicos por complementariedad de bases. Para esto, se baja la temperatura a 55°C por 30 segundos. La temperatura y el tiempo puede variar entre cebadores.
- **Extensión, polimerización o elongación.** Una Polimerasa de ADN extiende los cebadores, en el espacio comprendido entre ambos cebadores, y coloca los dNTP's desde el extremo 5'al 3' y lee el ADN molde de 3' a 5'. De esta forma sintetiza la secuencia complementaria de las hebras de ADN molde.⁵⁷

2.12. Genotipificación por PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real (o PCR cuantitativa) surgió para cuantificar moléculas de ADN y ARNm⁵⁶. En la PCR en tiempo real se emplean sondas marcadas con fluorocromos. Las sondas de hidrólisis, frecuentemente empleadas en esta técnica, son oligonucleótidos que presentan fluorocromos en ambos extremos y tienen una secuencia complementaria a parte del fragmento de ADN que se quiere amplificar. Uno de los fluorocromos actúa como donador de fluorescencia en el extremo 5' y el otro como aceptor de esta fluorescencia en el extremo 3'.⁵⁶ La ADN polimerasa se desplaza sobre la cadena de ADN sintetizando la cadena complementaria a partir

de un fragmento que sirve de molde. Al llegar al punto en el que la sonda se ha hibridado, la hidroliza. El fluorocromo del extremo 5' de la sonda (el donador) es liberado. El fluorocromo aceptor no puede entonces absorber la fluorescencia del donador por estar alejado de él espacialmente. Un detector realiza la medida de esta emisión de fluorescencia, que es proporcional a la cantidad de ADN presente, y la representa gráficamente (Figura 10).^{58, 59}

Además de proporcionar información cuantitativa, la PCR en tiempo real presenta otra serie de ventajas frente a la PCR en punto final.⁵⁹ La fundamental es su mayor sensibilidad lo que disminuye el riesgo de falsos negativos. El hecho de que los datos sean tomados en la fase exponencial del proceso asegura que ningún componente limite el proceso de amplificación.⁵⁸ También es más rápida y tiene menos probabilidad de contaminación con lo que disminuyen los falsos positivos. Son muchas las aplicaciones de esta técnica en el campo de la medicina. Cabe destacar la cuantificación viral, la cuantificación de la expresión de genes, el control de la eficacia de fármacos, la detección de agentes infecciosos, el diagnóstico de tumores y la detección de polimorfismos.^{57, 59}

Las sondas TaqMan consisten en un par de cebadores de PCR pre-optimizados y dos sondas para discriminación alélica. Se utilizan para amplificar y detectar alelos específicos en ADN genómico. Ver figura 10

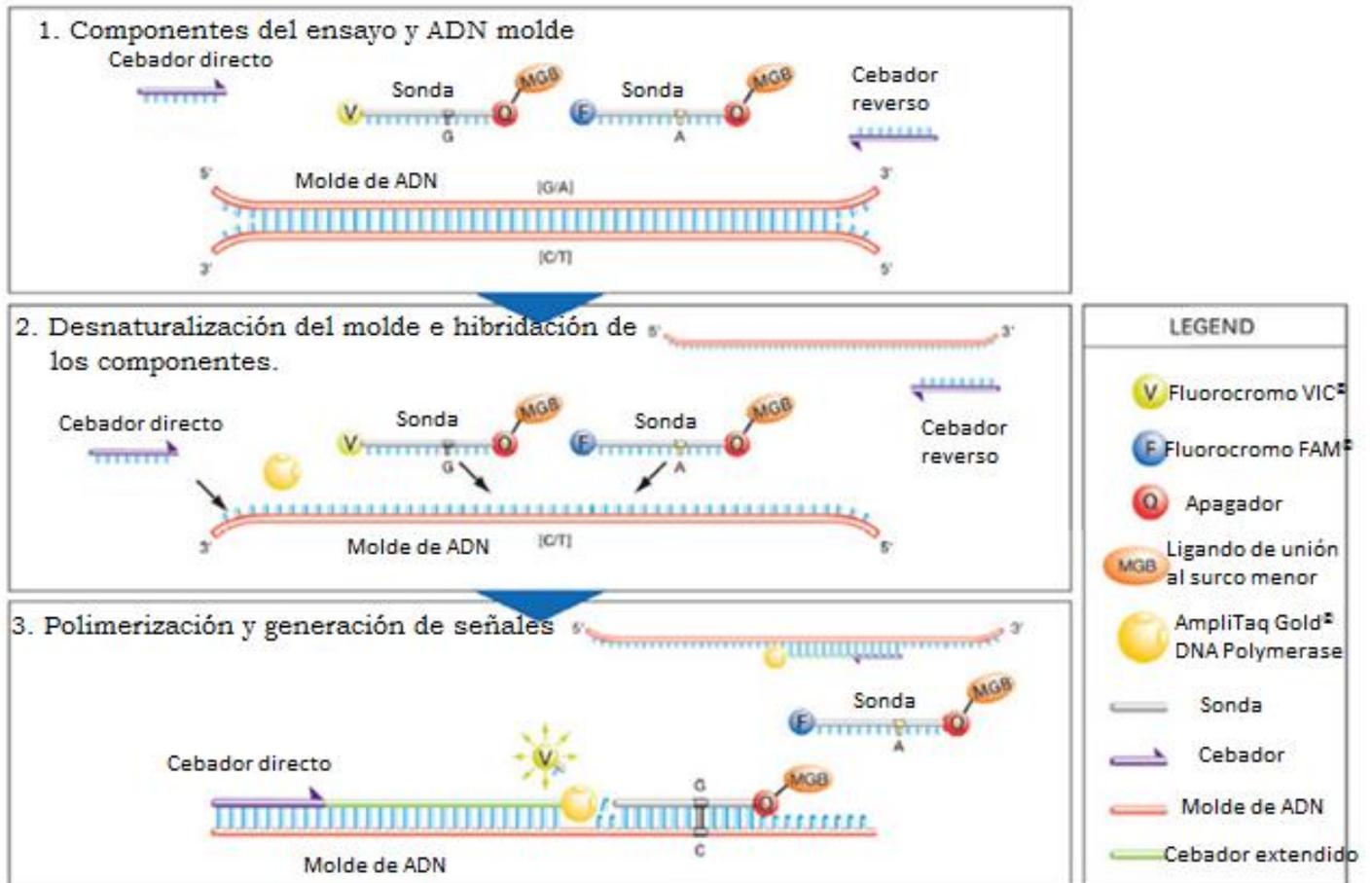


Figura 10. Proceso del ensayo de genotipificación usando tecnología TaqMan®.

Imagen modificada de: Applied Biosystems™ TaqMan® real-time PCR <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/pcr/real-time-pcr/qpcr-education/how-taqman-assays-work.html>

3. Planteamiento del problema

En México, las complicaciones de la diabetes representan la primera causa de muerte en mujeres y la segunda en hombres con una edad promedio de 66.7 años, lo que sugiere una reducción de 10 años en la esperanza de vida debido a la enfermedad.⁴ En el contexto global, nuestro país ocupa el sexto lugar en prevalencia de pacientes con DT2.¹⁷ Este hecho, sugiere que la población mexicana tiene predisposición genética a padecer la enfermedad y nos obliga a investigar los factores fisiopatológicos que están involucrados en el desarrollo de la DT2⁵⁴ con la intención de implementar acciones preventivas y dirigidas específicamente a los tratamientos.

El E2 en conjunto con sus receptores RE α y β tienen un papel importante en la homeostasis de la glucosa, puesto que ambos receptores se expresan en las células β del páncreas, cuyos efectos son el aumento en la síntesis y liberación de insulina, aunque también se ha reportado que la estimulación del RE β promueve la proliferación de células β .⁶⁰

Un estudio realizado en el año 2015, en población egipcia, demuestra que los polimorfismos de un solo nucleótido en el gen del RE α , están asociados con un aumento en la glucemia en ayunas y por ende una mayor prevalencia de la DT2, esto se debe a que gran parte de los SNP pueden afectar al gen, al ARNm e incluso a la misma proteína, que en este caso era RE α .¹³ Dado que el RE β también está asociado con el metabolismo de la glucosa, probablemente también un SNP pueda estar asociado con la DT2

Por lo anterior, se planteó la pregunta siguiente: ¿Existirá una asociación con respecto al polimorfismo de un solo nucleótido rs1256031 en el gen para el receptor β de estrógenos con la predisposición a desarrollar DT2? Por lo tanto, el presente protocolo identificará si existe una asociación entre la variante genética rs1256031 y el riesgo a desarrollar diabetes tipo en la población mexicana.

4. Hipótesis

El polimorfismo rs1256031 está asociado con la predisposición a desarrollar diabetes tipo 2.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Determinar la asociación del polimorfismo rs1256031 con la predisposición a desarrollar diabetes tipo 2.

5.2 Objetivos particulares

5.2.1 Realizar el proceso de genotipificación mediante el uso de sondas TaqMan.

5.2.2 Establecer la asociación de las variantes del genotipo para el polimorfismo rs1256031 para el RE β .

6. Material y métodos

6.1 Tipo de estudio y universo de trabajo

Estudio de casos y controles de personas derechohabientes del Instituto Mexicano del Seguro Social. Las muestras de ADN se recolectaron para el proyecto escaneo del 2011⁶¹ en el Hospital de Especialidades “Dr. Bernardo Sepúlveda Gutiérrez”, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS. Se incluyeron cuatrocientos veintisiete pacientes con DT2 en este estudio, así como doscientos ochenta y cuatro controles sin DT2

6.1.1 Criterios de inclusión

6.1.1.1. Criterios de inclusión de casos

- Los casos fueron pacientes con DT2 diagnosticados mediante los criterios de la Asociación Americana de Diabetes: glucosa en ayuno igual o mayor a 126 mg/dL (7.0 mmol/L).
- Cualquier género.
- Pacientes adultos con edad al diagnóstico menor a los 55 años de edad y en promedio la edad actual para inclusión es de 40 a los 60 años.
- Derechohabiente del IMSS con vigencia e derechos actualizada al momento del ingreso.
- No tener algún familiar que participe en el estudio.
- Pacientes que aceptaron participar en el estudio y firmaron el consentimiento informado.

6.1.1.2. Criterios de inclusión de los controles

- Personas entre 40 a 60 años de edad, sin criterios que los ubiquen con síndrome metabólico (Criterio internacional de ATP III).
- Glucosa en ayuno de 12 horas por debajo de 100 mg/dL y que la curva de tolerancia este por debajo de los 140 mg/dL después de las 2 horas de la ingesta de 75 g de glucosa.
- Ambos géneros.
- No tener algún familiar que participe en el estudio.
- Que aceptaron participar en el estudio y firmaron el consentimiento informado.

6.1.2. Criterios de exclusión

- Derechohabientes con vigencia transitoria o estacional.
- Pacientes que tengan otras enfermedades que puedan reducir la sobrevida o puedan confundir la ocurrencia de eventos (SIDA, cirrosis hepática, cualquier neoplasia maligna, etc.)
- Sujetos que no cuentan con domicilio permanente o que no puedan localizarse por vía telefónica sea en su propia casa o con un familiar.
- Las mujeres en etapa de climaterio

6.1.3. Criterios de eliminación

- Pacientes que hayan retirado su consentimiento informado.

6.2. Procedimientos

6.2.1. Selección de las muestras

El protocolo fue aprobado por la Comisión Nacional de Investigación Científica (CNIC) del IMSS. Con el número de registro: R-2011-785-018.

Los muestras se seleccionaron de los pacientes reclutados para el protocolo de escaneo del 2011.⁶¹ Se revisó la base de datos para identificar a los pacientes que cumplen los criterios del presente estudio y se descongeló el material genético para evaluar si está en condiciones óptimas para realizar la genotipificación.

6.2.2. Evaluación de la pureza del ADN

La pureza del ADN se evaluó mediante la medición de dos absorbancias, una a la longitud de onda de 260 y otra a 280. Este procedimiento se realizó con el equipo “Epoch Microplate Spectrophotometer” y el “Take3™ Micro-Volume Plate”; se utilizó el software “Gen5™ Microplate Data Analysis” (BioCell, Winooski, USA). Se consideraron puras sólo aquellas muestras con una razón 260/280 igual a 1.8 – 2.0

6.2.3. Determinación de la concentración de ADN

La cuantificación se llevó a cabo usando el “Epoch Microplate Spectrophotometer” y el “Take3™ Micro-Volume Plate”; utilizando el software “Gen5™ Microplate Data Analysis” (BioCell, Winooski, USA). La medición se realizó utilizando 2 µL. Las muestras se homogenizaron por agitación en vórtex de 3 a 5 minutos.

6.2.4. Realización de las diluciones de ADN

La dilución del ADN se llevó a cabo inmediatamente después de la cuantificación, éstas muestras se les agregó agua inyectable hasta tener un volumen final de 100 μL y una concentración de $100 \text{ ng}/\mu\text{L} \pm 9 \text{ ng}/\mu\text{L}$. Posteriormente se cuantificaron nuevamente las diluciones y se corroboró que se encontraran en este rango.

6.2.5. Determinación de la proporción de ancestría.

El porcentaje del componente genético parental de cada participante, se obtuvo de un estudio previo, que utilizó el microarreglo AxiomLat1 de Affymetrix (Santa Clara, CA, USA).

6.2.6. Genotipificación de los alelos del polimorfismo rs125603

La genotipificación se realizó por PCR en tiempo real, se utilizó un ensayo Taqman® previamente estandarizado. Se utilizó una sonda TaqMan® SNP Genotyping Assays, con clave de identificación: C_7573245_20 para el SNP rs1256031, PN 4351379, Lot: P160309-010 F01, a una concentración 40x y un volumen 187 μL , suficiente para aproximadamente 1500 reacciones, la secuencia de la sonda se presenta en el cuadro 1.

Las muestras se genotipificaron con el equipo. 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, California, USA) con ayuda del software de discriminación alélica. Se inició con la activación de la enzima uracilo-N-glucosilasa (UNG) a 50 °C durante 2 minutos, después la activación de la enzima polimerasa Taq junto con la desnaturalización primaria del ADN a 95 °C por 10 minutos y posteriormente 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 15 segundos, hibridación y extensión a 60 °C por 1 minuto, para finalizar con la extensión final a 60 °C por 1

minuto. Lo anterior descrito se muestra en la figura 11. Las condiciones de reacción y los reactivos utilizados se muestran en el cuadro 2.

Las características de los reactivos utilizados para la reacción se encuentran en la tabla 1 A.

Cuadro 1. Secuencia de la sonda y su respectivo marcador de fluorescencia.

Sonda	Fluorocromo
TCTAAACACAGCCCAGAAAACAAGG[A]GATTGTGAACTGAGACCCTCCTAGC	VIC
TCTAAACACAGCCCAGAAAACAAGG[G]GATTGTGAACTGAGACCCTCCTAGC	FAM

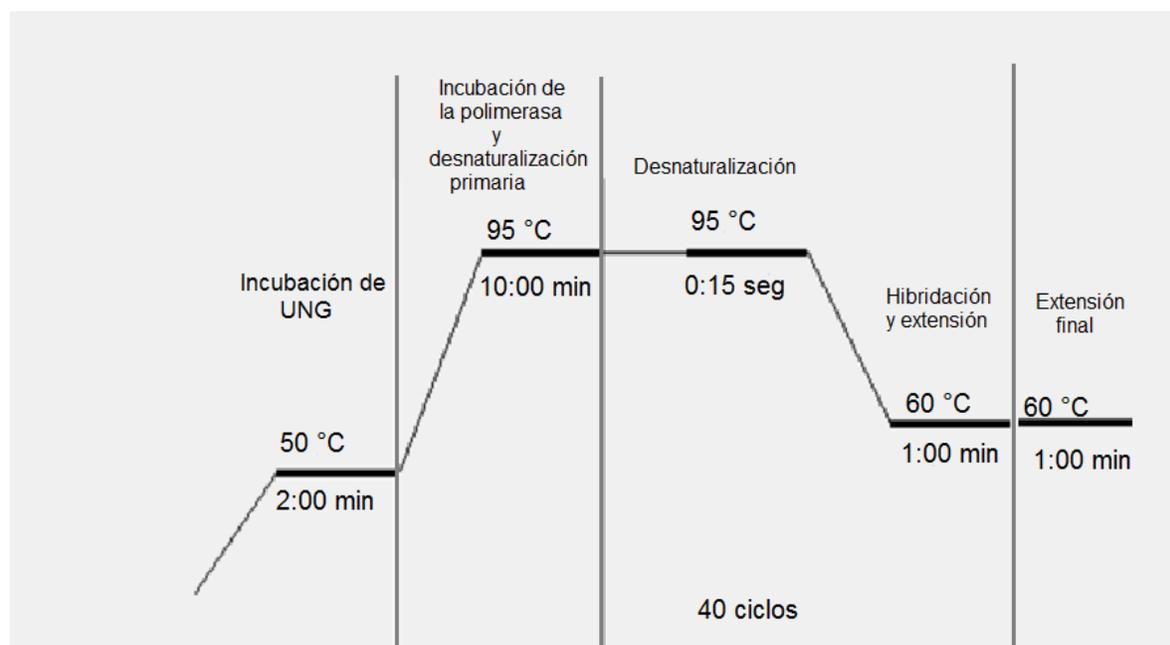


Figura 11. Condiciones de la reacción de PCR.

Cuadro 2. Reactivos y cantidades para realizar PCR en tiempo real.

	Volumen para 1 reacción	Volumen para 96 reacciones
Mezcla universal TaqMan® II con UNG	3.0 µL	288 µL
Sonda TaqMan® SNP 40X	0.125 µL	12 µL
ADN 100 ng/µL	0.5 µL	48 µL
H₂O	1.375 µL	132 µL

UNG: Uracil-N-glucosilasa

6.2.7. Análisis estadístico

Las variables cuantitativas se analizaron por medio de la prueba de hipótesis de Kolmogorov-Smirnov, sesgo y curtosis para determinar el tipo de estadística analítica a realizar. Se realizó estadística descriptiva; debido a que las variables tienen libre distribución se usó la mediana como medida de tendencia central y el rango como medida de dispersión. Mientras que las variables cualitativas se expresaron como frecuencias y porcentajes.

Los datos clínicos y bioquímicos (como índice de masa corporal, índice cintura cadera y concentración de glucosa) se contrastaron entre los casos y controles. Se utilizó la prueba de χ^2 para las variables cualitativas mientras que las variables cuantitativas fueron contrastadas con la prueba de U-Mann-Whitney debido a que las variables tienen libre distribución.

Se evaluó el equilibrio de Hardy-Weinberg de los genotipos de la variante rs1256031 se usó el programa disponible en <http://www.oege.org/software/hwe-mr->

calc.shtml. Los intervalos de confianza al 95% de los alelos y los genotipos se estimaron con GraphPad QuickCalcs (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

Se determinó la asociación de los alelos y genotipos con el riesgo de desarrollar DT2 se estimaron Odds Ratio (OR) con intervalos de confianza del 95% para cada uno de los genotipos y alelos. Los resultados de OR se ajustaron por medio de una regresión logística múltiple, el análisis incluyó a los genotipos e identificadas en el contraste de los casos y controles.

Se tomó como estadísticamente significativas a las diferencias cuando la $p < 0.05$. Para el análisis de asociación de alelos y genotipos se consideró estadísticamente significativos cuando el intervalo de confianza al 95% del OR y del OR ajustado no cruce la unidad.

6.2.8. Cálculo de tamaño de muestra

Se estimó un tamaño de muestra de 220 casos y 220 controles para demostrar una asociación con un OR de 1.5 por medio del programa Quanto versión 1.2.4 (University of Southern California, EUA). Los datos utilizados tuvieron un poder del 80%, un alfa de 0.05, una frecuencia alélica para el alelo menor entre 0.30 y 0.45, un riesgo basal de la población a desarrollar DT2 de 0.092 y el cálculo fue realizado en dos colas. El modelo seleccionado fue de tipo aditivo.

6.2.9. Consideraciones éticas

Para participar en el estudio, los pacientes firmaron un consentimiento informado que se explican los objetivos, procedimientos, los beneficios y riesgos que implica el estudio. Dentro de los objetivos del estudio se describe que el ADN se puede utilizar en un futuro para probar nuevas hipótesis genéticas y se le solicita autorización al participante para utilizarlo. El formato de consentimiento informado se presenta en el anexo 12.2.

Los estudios no tienen ningún costo para el paciente. La invitación a participar se realizó por el monitor clínico del estudio y fue independiente a sus médicos tratantes.

Los registros se encuentran codificados con un número de folio en la base de datos que no permiten la identificación de los pacientes. Además, las muestras recolectadas están codificadas y resguardadas por la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica del IMSS.

El protocolo fue aprobado por el Comisión Nacional de Investigación Científica (CNIC) del IMSS con folio de Registro R2011-785-018.

7. Resultados

Se incluyeron cuatrocientos veintisiete pacientes con DT2 en este estudio, así como doscientos ochenta y cuatro controles sin DT2. Las características de ambos grupos se muestran en el cuadro 3. Los pacientes con DT2 tuvieron una mediana de edad ($p= 0.0001$) y un índice de masa corporal (IMC) ($p= 0.0001$) mayor con respecto a los controles. Entre los grupos de estudio, no se observaron diferencias en el índice cintura cadera (ICC), ni en el porcentaje del componente genético parental o ancestría amerindia, europeo y africano. El género predominante en el grupo control fue el femenino (66.0%), mientras que en los casos la proporción entre los géneros fue similar (48.2% para femenino y 51.8% para masculino).

La figura 12, muestra las curvas de aumento de la fluorescencia para los marcadores VIC y FAM para el polimorfismo rs1256031 durante la amplificación por PCR en tiempo real. Se considera una amplificación cuando las curvas rebasan el umbral de la fluorescencia ROX. También, se observa en la parte inferior de la figura 7 las temperaturas correspondientes a cada ciclo. Los resultados de cada amplificación se procesaron con el software SDS 2.3 para mostrar su genotipo como se observa en la figura 13.

Las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo rs1256031 entre los pacientes con DT2 y los controles se muestran en el cuadro 4. No se encontró estratificación poblacional tanto en los casos ($\chi^2= 2.24$; $p= 0.134$) como en los controles ($\chi^2= 0.7$; $p= 0.403$), ambos se encuentran en equilibrio de Hardy Weinberg. Interesantemente, los homocigotos TT se encuentran en menor proporción en los pacientes con DT2 con respecto a los controles (9.6% vs 15.5%).

No se detectaron diferencias en las proporciones con el genotipo heterocigoto ni con los alelos, lo anterior descrito se presenta en el cuadro 4.

Cuadro 3. Características clínicas de los pacientes con DT2 y los controles población de estudio.

	DT2 (n = 427)	Control (n= 284)	
	mediana (RIQ)	mediana (RIQ)	p*
Edad (años)	52 (8.00)	48 (9.00)	0.0001
IMC (Kg/m²)	29.91 (6.78)	27.2 (4.88)	0.0001
ICC (cm)	0.92 (0.10)	0.91 (0.12)	0.654
Glucosa (mg/dL)	140.0 (81.0)	87.0 (14.0)	0.0001
Ancestría			
NAM (%)	0.655 (0.217)	0.639 (0.240)	0.792
Europeo (%)	0.306 (0.197)	0.321 (0.229)	0.758
Africano (%)	0.032 (0.025)	0.032 (0.030)	0.578
	n (%)	n (%)	p**
Sexo (femenino)	137 (48.2%)	282 (66.0%)	0.0001

*U-Mann Whitney; ** χ^2 ; IMC: índice de masa corporal; ICC: índice de cadera cintura; NAM: nativo americano, RIC: rango intercuartílico.

En el cuadro 5 se muestra la asociación entre los genotipos y la DT2. Los pacientes portadores del genotipo TT presentaron una reducción en el riesgo a padecer DT2 con respecto a los pacientes portadores del genotipo CC (OR= 0.579, [IC95%, 0.356-0.941]. La reducción del riesgo no se observó en pacientes portadores del genotipo heterocigoto. En el modelo de alelo dominante tampoco se observó una reducción en el riesgo a padecer la enfermedad.

Debido a que la edad, el índice de masa corporal y el sexo son variables confusoras, los valores de OR se ajustaron. Después del ajuste los portadores del genotipo TT

mantuvieron su reducción en el riesgo a padecer la DT2 (OR= 0.533, IC95% [0.309-0.918]), cuadro 6. Para los heterocigotos y en el modelo de alelo dominante no se observaron modificaciones en los resultados después del ajuste.

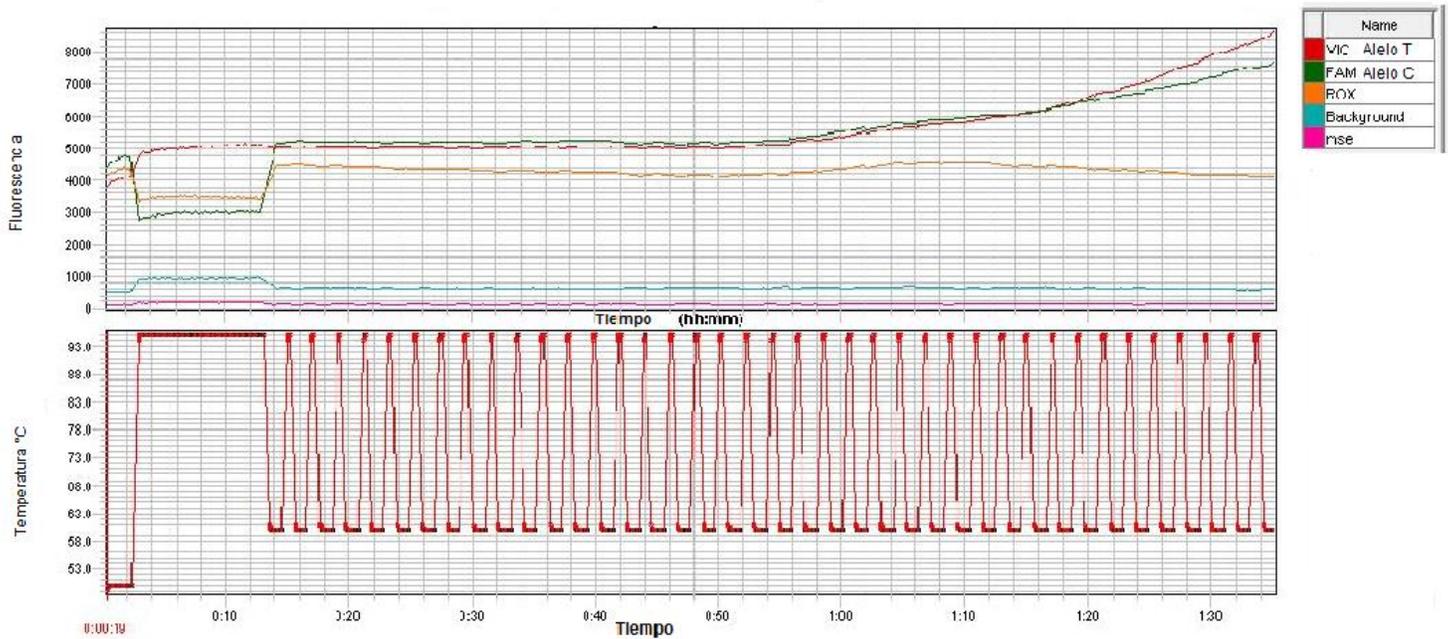


Figura 12. Curvas del aumento de la fluorescencia para el polimorfismo rs1256031 y de temperatura durante la corrida de PCR. Obtenida del Software de discriminación alélica SDS 2.3. 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, California, USA) en el laboratorio de la UIMB del CMN siglo XXI, IMSS.

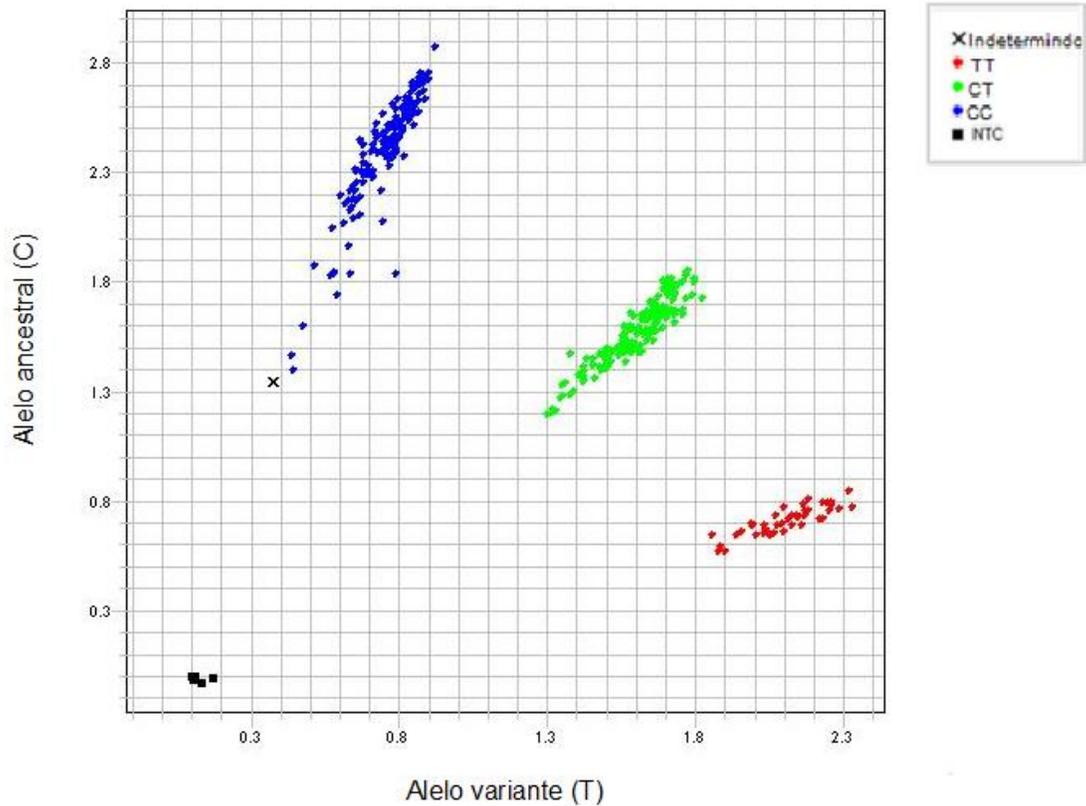


Figura 13. Discriminación alélica para el polimorfismo rs1256031. Obtenida del Software de discriminación alélica SDS 2.3. 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, California, USA) en el laboratorio de la UIMB del CMN siglo XXI, IMSS.

Cuadro 4. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo rs1256031.

Genotipo*	DT2		Control	
	n	Frecuencia observada	n	Frecuencia observada
CC	182	0.426	113	0.398
CT	204	0.478	127	0.447
TT	41	0.096	44	0.155
Alelos				
C	568	0.665	353	0.621
T	286	0.335	215	0.379

*Equilibrio de Hardy-Weinberg para DT2 ($\chi^2=2.24$; $p=0.134$) y los controles ($\chi^2=0.7$; $p=0.403$). Las frecuencias observadas se encuentran en equilibrio.

Cuadro 5. Asociación del polimorfismo rs1256031 del gen receptor β de estrógenos con DT2 en un modelo dominante y codominante.

Genotipo	OR (IC 95%)	p*	OR** (IC 95%)	p*
CC	1		1	
CT	0.997 (0.722 – 1.377)	1.000	0.922 (0.647 – 1.312)	0.651
TT	0.579 (0.356 – 0.941)	0.033	0.533 (0.309 – 0.918)	0.023
CT+TT	0.890 (0.655 – 1.207)	0.485	0.831 (0.588 – 1.150)	0.252

* χ^2 , **Ajustado por edad, IMC y sexo.

Cuadro 6. Riesgo ajustado por las variables confusoras en un modelo recesivo.

Variable	OR	IC 95%	
		Inferior	Superior
Edad	0.882	0.845	0.921
IMC	0.875	0.830	0.921
Sexo	2.488	1.559	3.970
rs1256031 (TT)	0.533	0.309	0.918

IMC: índice de masa corporal

8. Discusión

En México, el número de muertes por DT2 en el intervalo de edad comprendido de 30 a 69 años, es de 23 100 fallecimientos por año para hombres y 22 000 para mujeres.⁶² Es la segunda causa de muerte en nuestro país.⁶³ La etiología de la diabetes tipo 2 es compleja, heterogénea y comprende factores ambientales que promueven el desarrollo de anormalidades metabólicas, que ocurren en los distintos órganos y tejidos.⁶⁴ Al igual que otras enfermedades multifactoriales, en la DT2 las hormonas juegan un papel importante en el desarrollo y progresión de la enfermedad.⁶⁰

Los receptores de estrógenos, tanto RE α como RE β , desempeñan un papel fundamental en la regulación del metabolismo de la glucosa. Estos receptores se expresan en una gran cantidad de células, entre las que destacan las células del musculo esquelético, tejido adiposo y las células β pancreáticas.^{40, 60}

Las mujeres premenopáusicas son más sensibles a la insulina con una mejor tolerancia a la glucosa y son menos propensas al desarrollo de la resistencia a la insulina en comparación con los hombres, asimismo, muestran un incremento en la expresión de GLUT4.⁶⁵ El porcentaje de mujeres incluidas en el grupo control presenta un mayor porcentaje de mujeres (66%) que las incluidas en los casos (48%). Por esta razón, el valor del riesgo fue ajustado por edad y sexo.

En relación a la población estudiada, se observó que el grupo con DT2 presenta un IMC más elevado que el grupo control, de 29.9 y 27.2 respectivamente; esto se debe a que los pacientes con DT2, previo a la enfermedad, desarrollan obesidad y este es un factor de riesgo. Esto se ha descrito desde el año 2003 en

diversos estudios epidemiológicos y clínicos, que han demostrado la asociación entre la DT2 y los factores que influyen a su desarrollo como son la edad, género, índice de masa corporal, índice cintura cadera, hipertensión arterial y presencia de concentraciones de insulina alterados en ayunas.⁶⁶⁻⁶⁸

La presencia de estratificación en una población con alto grado de mestizaje, es un factor importante de confusión en los estudios de asociación realizados en estas poblaciones. De hecho, la muestra de la Ciudad de México muestra fuertes evidencias de estratificación debido al mestizaje.^{54, 55} Para evitar asociaciones falsas, se determinaron las proporciones del componente genético nativo americano, europeo y africano. No se encontró diferencia en ambos grupos de estudio (DT2 y controles), lo que significa que éstos fueron genéticamente homogéneos, por lo cual este factor no influyó en la asociación encontrada con el rs1256031.

Al momento de evaluar el OR del polimorfismo rs1256031 con los grupos de DT2 y controles, las variables de IMC, edad y sexo que tienen un efecto significativo sobre el riesgo a la DT2, se ajustaron por medio de una regresión logística múltiple.

La frecuencia para el alelo menor (MAF, por sus siglas en inglés) para el polimorfismo rs1256031 en pacientes con DT2 provenientes de la población mestiza de la Ciudad de México, son menores que las reportadas para la población mexicana mestiza radicada en la ciudad de Los Ángeles California en el proyecto HapMap (0.335 vs 0.449).⁵³ De forma interesante, la MAF es mayor en las poblaciones caucásicas (0.500). En el 2007 Martínez-Marignac y cols., identificaron diversos factores de riesgo genéticos implicados en rasgos y enfermedades entre

ellas la DT2. Encontraron que la DT2 es al menos dos veces más frecuente en las poblaciones nativas americanas, comparadas con poblaciones caucásicas europeas.^{66, 67} Está podría ser una posible explicación por la cual la frecuencia de este polimorfismo es mayor en poblaciones caucásicas, según lo reportado en HapMap. Sería interesante explorar esta misma asociación, ahora con pacientes caucásicos europeos.

El efecto protector podría deberse a que el polimorfismo rs1256031 se encuentra en un intron cercano al promotor del gen *RE β*, esta localización sugiere una función reguladora en la transcripción o el procesamiento del transcrito primario, así como, en modificar la estabilidad del ARNm. Estas circunstancias pueden modificar la expresión de la proteína mediante la producción de nuevas isoformas.¹³ En consecuencia, las isoformas podrían tener una mayor afinidad a E2 o algún otro agonista selectivo para este receptor, por ejemplo el BPA.⁹ Aunque esta hipótesis de aumento de la afinidad por presencia del SNP rs1256031 se debe demostrar.

Nuestros resultados son los primeros en señalar la asociación de los portadores del genotipo TT de la variante genética rs1256031 con la reducción al riesgo a padecer DT2 en la población mestiza mexicana. Esto podría deberse a que el alelo TT es recesivo dado que, en el heterocigoto no se observa este efecto. Esto contribuye a expandir el conocimiento de los factores genéticos involucrados en el desarrollo de DT2.

En la población egipcia se ha observado que los pacientes con DT2 portadores de los polimorfismos rs2234693 y rs9340799 presentes en el gen *RE α* presentan mayores concentraciones plasmáticas de glucosa en ayunas, colesterol

y LDL-C, así como una menor concentración de HDL-C con respecto a los portadores de los genotipos silvestres.¹³ Esta evidencia confirma que la activación de RE α y β están involucradas en la fisiopatología de la DT2. El impacto de las variantes genéticas rs2234693 y rs9340799 en los pacientes con DT2 mexicanos no se ha estudiado.

Otros SNPs codificados en el gen *RE β* , como son el rs4986938 y rs928554, se han analizado para determinar la susceptibilidad a padecer enfermedades metabólicas como las dislipidemias y síndrome metabólico, sin embargo, no mostraron asociación.¹³

El polimorfismo rs1256031 se ha asociado con un mayor riesgo de enfermedad vertebral y mayor susceptibilidad de fracturas en mujeres, (OR = 1.36, IC95% 1.08-1.70).⁶⁹ También se ha asociado con una disminución de la densidad mineral ósea en hombres caucásicos específicamente en el fémur.⁷⁰ De igual forma, se asoció con un mayor espesor de la pared de la masa ventricular izquierda en mujeres.⁷¹ Incluso se ha asociado con el riesgo a presentar carcinoma epitelial de ovario (OR = 1.75, [IC95%,: 1.17–2.63]).⁵¹ Wise y cols. describieron la asociación de este SNP con osteoartritis de mano.⁽⁷²⁾ Ninguna de estas asociaciones se ha analizado en la población mexicana.

9. Conclusión

Los portadores del genotipo TT del polimorfismo rs1256031 presentan una reducción en el riesgo a desarrollar diabetes tipo 2.

10. Perspectivas

- Medir la expresión del receptor de estrógenos beta.
- Medir los niveles de estrógenos a los participantes, de igual forma se sugiere realizar una asociación entre la variante y dos poblaciones femeninas, una en etapa fértil y otra en etapa del climaterio.
- Determinar el papel del polimorfismo rs1256031 en el desarrollo de síndrome metabólico.
- Realizar la misma asociación con pacientes europeos caucásicos.

11. Referencias

1. Hernández-Ávila MP, Reynoso-Noverón N. Diabetes mellitus en México. El estado de la epidemia. *Salud Públ. Méx.* 2013;55:s129- s36.
2. UNAM. En México, una de cada 14 muertes es provocada por la diabetes: Rector Grave 2016 [sede Web]. México: UNAM [visitado 7 de noviembre del 2016]. Disponible en: www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2016_060.html
3. Cruz M, Valladares-Salgado A, Garcia-Mena J, Ross K, Edwards M, Angeles-Martinez J, et al. Candidate gene association study conditioning on individual ancestry in patients with type 2 diabetes and metabolic syndrome from Mexico City. *Diabetes Metab Res Rev.* 2010;26(4):261-70.
4. Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010. Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus., (23-10-2010).
5. Nilsson SM, Mäkelä S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G. Mechanisms of Estrogen Action. *Physiol. Rev.* 2001;81(4):1535 - 65.
6. Cahua-Pablo JA, Flores-Alfaro E, Cruz M. Receptor de estrógenos alfa en obesidad y diabetes. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 2016;54(4):521-30.
7. Paterni I, Granchi C, Katzenellenbogen JA, Minutolo F. Estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta): subtype-selective ligands and clinical potential. *Steroids.* 2014;90:13-29.
8. Barros RP, Machado UF, Gustafsson JA. Estrogen receptors: new players in diabetes mellitus. *Trends Mol Med.* 2006;12(9):425-31.
9. Soriano S, Alonso-Magdalena P, Garcia-Arevalo M, Novials A, Muhammed SJ, Salehi A, et al. Rapid insulinotropic action of low doses of bisphenol-A on mouse and human islets of Langerhans: role of estrogen receptor beta. *PLoS One.* 2012;7(2):e31109.
10. Torrades S. Diversidad del genoma humano: los polimorfismos. *Genética* 2002;21(5):122-26.
11. Ramírez-Bello JV-A, Tovilla-Zárate G, Fragoso C. Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP): implicaciones funcionales de los SNP reguladores (rSNP) y de los SNP-ARN estructurales (srSNP) en enfermedades complejas. *Gac Méd Méx.* 2013;149:220-8
12. Sánchez-Suárez PB-B, L. Receptores estrogénicos alfa y beta en cáncer de mama. *Biol Molec Clín* 2003;1:159 - 61.
13. Motawi TM, El-Rehany MA, Rizk SM, Ramzy MM, El-Roby DM. Genetic polymorphism of estrogen receptor alpha gene in Egyptian women with type II diabetes mellitus. *Meta Gene.* 2015;6:36-41.
14. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2017; 40(suppl1):s6-s35

15. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2014;37 (Suppl 1):S81-90.
16. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care*. 2016;39 (Suppl 1):S13-22
17. Federation ID. Atlas de la Diabetes de la FID. 2015:8-16.
18. Organization WH. Global report on diabetes. [sede Web] Ginebra, 2016 [actualizada el 3 de noviembre de 2016, visitada 13 de diciembre de 2016] Disponible en : <http://www.who.int/diabetes/global-report>.
19. Federación ID. La Diabetes en países de ingresos altos, medios y bajos. [sede web] E.U., 2015 [visitada diciembre del 2016] Disponible en: <http://www.idf.org/diabetesatlas/5e/es/diabetes-en-paises-de-ingresos-altos-medios-bajos?language=es>.
20. Federation ID. Atlas de Diabetes [sede Web] E.U., 2016 [visitada 5 de septiembre de 2016.] Disponible en: <http://www.idf.org/diabetesatlas/5e>.
21. Olaiz FG, Rivera J, Shamah L, et al. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. *Instituto Nacional de Salud Publica*, 2013;55
22. Rivera J, Shamah L, et al. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016, *Instituto Nacional de Salud Publica* 2016
23. INEGI. Estadísticas del INEGI del 2016: [sede Web] México 14 de noviembre del 2016; [actualizada 2013, visitada 12 enero del 2017] Disponible en: <http://fmdiabetes.org/estadisticas-diabetes-inegi-2013/>
24. Rojas-Martínez MR, Jiménez-Corona A, Franco A, Aguilar-Salinas CA. Epidemiología de la Diabetes Mellitus en México. Acciones para enfrentar a la diabetes Documento de postura. *Academia Nac Med Méx*.2015;1:28-37.
25. Locía-Espinoza JH-A, M. E. Arande-Abreu, G. E. . El papel de los estrógenos y sus receptores en la prevención y promoción de enfermedades proliferativas de la glándula prostática. *Rev Neu Uni Veracruz* 2013;10.
26. Thomas MP, Potter BV. The structural biology of oestrogen metabolism. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2013;137:27-49.
27. Mauvais-Jarvis F, Clegg DJ, Hevener AL. The role of estrogens in control of energy balance and glucose homeostasis. *Endocr Rev*. 2013;34(3):309-38.
28. Simpson ER, Misso M, Hewitt KN, Hill RA, Boon WC, Jones ME, et al. Estrogen--the good, the bad, and the unexpected. *Endocr Rev*. 2005;26(3):322-30.
29. Jia M, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA. Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2015;29(4):557-68.
30. Franco YM-F, Lemini C. Mecanismos de acción de los efectos protectores de los estrógenos sobre el sistema cardiovascular. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*. 2003;46(3):101 - 8

31. Toran-Allerand CD. Minireview: A plethora of estrogen receptors in the brain: where will it end? *Endocrinology*. 2004;145(3):1069-74.
32. Ropero AB, Alonso-Magdalena P, Quesada I, Nadal A. The role of estrogen receptors in the control of energy and glucose homeostasis. *Steroids*. 2008;73(9-10):874-9.
33. Foryst-Ludwig A, Kintscher U. Metabolic impact of estrogen signalling through ERalpha and ERbeta. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010;122(1-3):74-81.
34. Case AM, Reid RL. Menstrual Cycle Effects on Common Medical Conditions. *Comp Ther*. 2010;27(1):65-71.
35. Costrini NV, Kalkhoff RK. Relative effects of pregnancy, estradiol, and progesterone on plasma insulin and pancreatic islet insulin secretion. *J Clin Invest*. 1971;50:992-9.
36. Bitoska I, Krstevska B, Milenkovic T, Subeska-Stratrova S, Petrovski G, Mishevaska SJ, et al. Effects of Hormone Replacement Therapy on Insulin Resistance in Postmenopausal Diabetic Women. *Open Access Maced J Med Sci*. 2016;4(1):83-8.
37. Gilles B, Tremblay AT, Neal G, Copeland,, Debra J, Gilbert NAJ, Fernand Labrie, Vincent Giguère. Cloning, Chromosomal Localization, and Functional Analysis of the Murine Estrogen Receptor b. *Molecular Endocrinology*. 1997;11(3):353-65.
38. Nilsson S, Koehler KF, Gustafsson JA. Development of subtype-selective oestrogen receptor-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 2011;10(10):778-92.
39. Mosselman SP, J. Dijkema, R. . ER B identification and characterization of a novel human estrogen receptor *FEBS Letters*. 1996;392:49-53.
40. Le May C, Chu K, Hu M, Ortega CS, Simpson ER, Korach KS, et al. Estrogens protect pancreatic beta-cells from apoptosis and prevent insulin-deficient diabetes mellitus in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(24):9232-7.
41. Soriano S, Ropero AB, Alonso-Magdalena P, Ripoll C, Quesada I, Gassner B, et al. Rapid regulation of K(ATP) channel activity by 17{beta}-estradiol in pancreatic {beta}-cells involves the estrogen receptor {beta} and the atrial natriuretic peptide receptor. *Mol Endocrinol*. 2009;23(12):1973-82.
42. Ashcroft FM HD, Ashcroft SJ. Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta-cells. *Nature*. 1984;312:446-8..
43. Quesada I, Todorova MG, Alonso-Magdalena P, Beltra M, Carneiro EM, Martin F, et al. Glucose induces opposite intracellular Ca²⁺ concentration oscillatory patterns in identified alpha- and beta-cells within intact human islets of Langerhans. *Diabetes*. 2006;55(9):2463-9.
44. Nadal A RJ, Laribi O, Leon-quinto T, Andreu E, Ripoll, C ea. Rapid insulinotropic effect of 17beta-estradiol via a plasma membrane receptor. *FASEB J*. 1998;12:1341-8.

45. Meyer MR, Clegg DJ, Prossnitz ER, Barton M. Obesity, insulin resistance and diabetes: sex differences and role of oestrogen receptors. *Acta Physiol (Oxf)*. 2011;203(1):259-69.
46. Consortium IHGS. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 2004;431.
47. Goldsmith P. Press releases. 04.12.17 Rare "knockout" gene mutations in humans help scientists determine gene function: Broad Institute of MIT and Harvard; 2017 Disponible en: <https://www.broadinstitute.org/news/rare-%E2%80%9Cknockout%E2%80%9D-gene-mutations-humans-help-scientists-determine-gene-function>.
48. Altshuler D CM, Lander ES. Genetic Mapping in Human Disease. *SCIENCE*. 2008;322(881-8).
49. Checa- Caratachea MA. Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. *Rev Inst Nac Enf Resp Méx* 2007;20(3):213-21.
50. Abecasis GR, Altshuler D, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, et al. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature*. 2010;467(7319):1061-73.
51. Lurie G, Wilkens LR, Thompson PJ, McDuffie KE, Carney ME, Terada KY, et al. Genetic polymorphisms in the estrogen receptor beta (ESR2) gene and the risk of epithelial ovarian carcinoma. *Cancer Causes Control*. 2009;20(1):47-55.
52. Nott SL, Huang Y, Fluharty BR, Sokolov AM, Huang M, Cox C, et al. Do Estrogen Receptor beta Polymorphisms Play A Role in the Pharmacogenetics of Estrogen Signaling? *Curr Pharmacogenomics Person Med*. 2008;6(4):239-59.
53. National Center for Biotechnology Information. Information NCfB Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs1256031 [sede Web] U.S [actualizado mazo 2017, acceso mayo 2017] Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1256031.
54. Martinez-Marignac VL, Valladares A, Cameron E, Chan A, Perera A, Globus-Goldberg R, et al. Admixture in Mexico City: implications for admixture mapping of type 2 diabetes genetic risk factors. *Hum Genet*. 2007;120(6):807-19.
55. Parra EJ, Cameron E, Simmonds L, Valladares A, McKeigue P, Shriver M, et al. Association of TCF7L2 polymorphisms with type 2 diabetes in Mexico City. *Clin Genet*. 2007;71(4):359-66.
56. 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. *Inv Disc*.2(2):70-8.
57. Alves-Valones MA, Lima-Guimaraes R, Cavalcanti Brndao LA, Eleutério de Souza PR. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a reviem. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2009;40:1-11.
58. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*. 2006;27(2-3):95-125.

59. Bentley-Hewitt KL, Hedderley DI, Monro J, Martell S, Smith H, Mishra S. Comparison of quantitative real-time polymerase chain reaction with NanoString(R) methodology using adipose and liver tissues from rats fed seaweed. *N Biotechnol.* 2016;33(3):380-6.
60. Barros RP, Gustafsson JA. Estrogen receptors and the metabolic network. *Cell Metab.* 2011;14(3):289-99.
61. Lyssenko V, Groop L. Genome-wide association study for type 2 diabetes: clinical applications. *Curr Opin Lipidol.* 2009;20(2):87-91.
62. Organization WH. Diabetes: perfiles de los países 2016 de México.[sede Web] Ginebra: [Consultado Enero del 2016] Disponible en: <http://www.who.int/diabetes/country-profiles/es/>.
63. Rojas Martínez MR, et al. Epidemiología de la diabetes mellitus en México". Acciones para enfrentar a la diabetes. 2015 Disponible en: <http://www.anmm.org.mx/publicaciones/CANivANM150/L15-Acciones-para-enfrentar-a-la-diabetes.pdf>.
64. Tusie-Luna MT, Huerta-Chagoya A, Vázquez Cárdenas P, Cruz-López M. . La Genómica en la predicción de la diabetes tipo 2. Acciones para enfrentar a la diabetes Documento de postura. *Academia Nac Med Méx* 2015;1:145-70.
65. Zhou L CH, Xu P, Cong LN, Sciacchitano S, Li Y, et al. Action of insulin receptor substrate-3 (IRS-3) and IRS-4 to stimulate translocation of GLUT4 in rat adipose cells. *Mol Endocrinol.* 1999;13(3):505-14.
66. Vázquez Chávez, Moreno Vazquez. K, et al. Incidencia y factores de riesgo para desarrollo de intolerancia a la glucosa y diabetes mellitus tipo 2 en población mexicana previamente normoglucémica. *Rev End Nut.* 2003;11(1):28-33.
67. González Chávez AUL, J. Lavielle Saramago, M. et al. . Comparación de índices antropométricos como predictores de riesgo cardiovascular y metabólico en población aparentemente. *Rev Mex Card* 2011;22(2):59-67.
68. González-Juárez LF-F, Vélez-Márquez M. Valoración de factores de riesgo para DM 2 en una comunidad semiurbana de la Ciudad de México. *Rev Enferm IMSS.* 2004;12(2):65-70.
69. Kerkhof HJ, Meulenbelt I, Carr A, Gonzalez A, Hart D, Hofman A, et al. Common genetic variation in the Estrogen Receptor Beta (ESR2) gene and osteoarthritis: results of a meta-analysis. *BMC Med Genet.* 2010;11:164.
70. Shoji Ichikawa DLK, Munro Peacock, Michelle L. Johnson, Dongbing Lai, Siu L., Hui CCJ, Tatiana M. Foroud, and Michael J. Econs. Polymorphisms in the Estrogen Receptor β (ESR2) Gene Are Associated with Bone Mineral Density in Caucasian Men and Women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(11):5921-7.
71. Stephanie L. Nott YH, Brian R. Fluharty, Anna. et.al. Do Estrogen Receptor β Polymorphisms Play A Role in the Pharmacogenetics of Estrogen Signaling? *Curr Pharmacogenomics Person Med.* 2008;6(4):239-59.

72. Wise BL, Demissie S, Cupples LA, Felson DT, Yang M, Shearman AM, et al. The relationship of estrogen receptor-alpha and -beta genes with osteoarthritis of the hand. *J Rheumatol.* 2009;36(12):2772-9.

12. Anexos

12.1. Características y datos de los reactivos.

Tabla 1 A. Características de los reactivos utilizados para la PCR en tiempo real.

Reactivos	Contenido	Concentración	Datos
Mezcla universal TaqMan® II con UNG	<ul style="list-style-type: none"> • ADN Polimerasa AmpliTaq Gold®, UP (Ultra Pure) • dNTPs (con dUTP) • Referencia Pasiva ROX™ • Uracil-N glucosilasa (UNG) • Buffer Tris-HCl (pH entre 8.3 – 8.8) optimizado. • Glicerol • NaCl • MgCl₂ 	Se suministra a una concentración 2X	Part No.: 4440039 Lot No.: 1408027 Exp. Date: 19 de mayo 2016 CAS # 56-81-5 Glicerol CAS # 1185-53-1
Sonda TaqMan® SNP	<ul style="list-style-type: none"> • Los iniciadores están diseñados, sintetizados y formulados por el servicio Custom TaqMan® Genomic Assays, por lo que su secuencia y concentración son secreto de fabricación. • Sondas MGB (ligando de unión al surco menor) TaqMan® prediseñados con el marcaje de los fluorocromos FAM™ y VIC™ 	187µL 40X	C_7573245_20 rs1256031 PN4351379 EXP.03/2021 83F01 Lot: P160309-010 F01 Rack ID: 186984627_1 Sales Order: 186984627 Delivery No.: 862011186
H₂O	Agua inyectable estéril.	1000 mL	
Agua inyectable PISA			

12.2. Carta de consentimiento informado



MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
Coordinación de Investigación en Salud
Comisión Nacional de Investigación Científica
Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, Hospital
de Especialidades CMN siglo XXI

Carta de Consentimiento Informado

México D.F. a _____

1. **Nombre del estudio:** Escaneo genómico completo del paciente con diabetes tipo 2 para la búsqueda de nuevos marcadores de asociación con la enfermedad. Registro No. de Registro R-2011-785-018

2. Propósito del estudio.

Lo (a) estamos invitando a participar en un estudio de investigación que se lleva a cabo en la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, Hospital de Especialidades, del Instituto Mexicano del Seguro Social, Siglo XXI. El estudio tiene como propósito conocer la composición genética (herencia genética de sus padres) de la población que vive en la Ciudad de México y la búsqueda de secciones de material genético, asociadas a la diabetes tipo 2, para identificar las posibles regiones de susceptibilidad a padecer la enfermedad. Esta condición de susceptibilidad genética se ha puesto de manifiesto por los estilos de vida actual: mala alimentación (consumo excesivo de grasa y azúcares) y la falta de actividad física, que contribuyen al desarrollo de obesidad, hipertensión y la aparición cada vez más temprana de la diabetes. Ante esta situación que estamos enfrentando en México, es prioritario conocer más sobre estos genes cuya relación con la diabetes está descrita en el estudio.

Para la realización del estudio estamos invitando a que participen individuos con y sin diabetes, por lo que pensamos que usted pudiera ser un buen candidato. Al igual que usted, más de 3000 pacientes con diabetes tipo 2 que son atendidos en las clínicas del IMSS y 2300 donadores de sangre, serán invitados a participar en el estudio.

En el entendido que su participación es completamente voluntaria, le pedimos que por favor lea la información que le proporcionamos y haga las preguntas que desee antes de decidir si quiere o no participar.

3. Procedimientos

Si usted acepta participar en el estudio, deberá presentarse en el laboratorio de la Unidad de Investigación en Bioquímica, en ayuno de 12 horas, para la toma de la muestra de sangre de 10 mL (el equivalente a 2 cucharaditas) para los estudios bioquímicos que incluyen: determinación de azúcar y lípidos (grasas) y la obtención del DNA para los estudios genéticos (marcadores de herencia presentes en los humanos) y así conocer los potenciales riesgos a padecer enfermedades como la diabetes tipo 2. Además, incluiremos otras valoraciones clínicas como la medición de su peso y talla, la presión arterial, cuestionarios generales (lugar donde vive, escolaridad e ingreso mensual) y antecedentes heredofamiliares de enfermedades. Algunas de las preguntas pudieran ser incómodas de contestar,

usted está en todo su derecho de no responder. Todo el procedimiento nos llevará aproximadamente 20 a 30 minutos.

Posterior al análisis de los resultados, nos comprometemos a entregarle una evaluación médica en un periodo de ocho días después de la toma de la muestra sanguínea.

Queremos aclararle que su muestra será cuidadosamente resguardada en el Laboratorio de la Unidad de Investigación en Bioquímica y la identidad de cada participante estará protegida usando un código numérico en lugar de su nombre. Nunca manejaremos nombres o proporcionaremos los datos a ninguno de los colaboradores del estudio. Esta información solamente será conocida en nuestra Unidad de investigación por el responsable del proyecto.

4. Riesgos y molestias

El protocolo de investigación no representa ningún riesgo para la salud de los participantes, quizás un riesgo mínimo en la toma de muestras sanguíneas. Entre las posibles molestias están el dolor o la posibilidad de la formación de un "moretón" en el sitio de la punción. Si usted llegara a sufrir alguna complicación, la Dra. Aurora Mejía Benítez, podrá atenderlo o aclarar sus dudas.

5. Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio.

No recibirá ningún pago por su participación en este estudio, tampoco representa un gasto para usted. Al aceptar participar, tendrá una evaluación médica completa y estudios de laboratorio completos para conocer sus niveles de azúcar (glucosa) y grasas (lípidos) en la sangre. Si los resultados son anormales, usted recibirá una carta con el consejo médico para que lo atiendan en su clínica correspondiente. Los resultados del estudio genético, contribuirán al avance en el conocimiento de cómo nuestros genes (herencia) nos dan susceptibilidad al desarrollo de la diabetes tipo 2.

6. Resultados

- a) Evaluación clínica completa realizada por médicos especialistas (nefrólogos, neurólogos y médico internista).
- b) Resultados de laboratorio clínico impresos
- c) Explicación de los resultados y asesoría médica.
- d) Carta con el consejo médico para su clínica correspondiente.

7. Participación o retiro del estudio

Su participación en el estudio es completamente voluntaria. Si usted decide no participar, seguirá recibiendo la atención médica brindada por el IMSS. La decisión que tome no afectará su derecho a obtener los servicios de salud que recibe en nuestra Institución.

8. Privacidad y Confidencialidad

La información que nos proporcione (nombre, teléfono y dirección) será guardada de manera confidencial y por separado al igual que las respuestas a los cuestionarios y las pruebas clínicas. El equipo de investigadores sabrá que usted está participando en este estudio y nadie más tendrá acceso a la información proporcionada. Cuando los resultados de este estudio sean publicados o presentados en conferencias, no se dará información que pudiera revelar su identidad. A cada participante se le asignará un número para identificar sus datos.

9. Garantía de atención médica en caso necesario

En caso de presentarse una emergencia derivada del estudio, usted puede dirigirse a su clínica de adscripción y/o marcar al teléfono 56276900 ext. 21477 de lunes a viernes.

10. Personal de contacto para dudas y aclaraciones sobre el estudio

Si tiene preguntas o quiere hablar con alguien sobre este estudio de investigación puede comunicarse de 8:00 a 16:00 hrs, de lunes a viernes con el Dr. Adán Valladares Salgado investigador responsable, al teléfono: 56276900 ext. 21477 o acudiendo directamente a la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica ubicada en el primer piso del Hospital de Especialidades en el Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS. Dirección: Av. Cuauhtémoc 330 Colonia Doctores, C.P. 06725, México D.F.

11. Personal de contacto para dudas sobre sus derechos como participante en un estudio de investigación

Si usted tiene dudas o preguntas sobre sus derechos al participar en un estudio de investigación, puede comunicarse con los responsables de la Comisión de Ética en Investigación del IMSS, a los Tel. 56276900-21216, de 9 a 16:00 hrs de lunes a viernes.; o si así lo prefiere al correo electrónico: conise@cis.gob.mx. La Comisión de Ética se encuentra ubicada en el Edificio del Bloque B, Unidad de Congresos piso 4, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Av. Cuauhtémoc 330 Colonia Doctores, C.P. 06725, México D.F.

12. Declaración de consentimiento informado

Declaro que se me han informado los posibles riesgos si acepto participar, como la formación de un moretón en el sitio de la punción. También se me ha informado sobre los beneficios tales como la evaluación integral por el médico participante, la entrega de los resultados por escrito y la recomendación médica en caso de observar alguna complicación. Además se me explicó que podré contribuir al estudio genético para el conocimiento sobre la susceptibilidad a padecer diabetes tipo 2 que tenemos los mexicanos. Se me explicó ampliamente que todos mis datos serán manejados de forma anónima y confidencial, también tengo la libertad de abandonar el estudio al momento que lo considere. El investigador principal y el equipo médico, se han comprometido a darme información oportuna sobre cualquier pregunta y los riesgos y beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación o con mi enfermedad.

Además, los investigadores se comprometen al uso no lucrativo y responsable de las alicuotas de DNA (no comercialización, no ruptura del anonimato) por parte de las instancias que participan dentro y fuera del IMSS.

Por favor marque con una X una de las opciones cajas que se presentan abajo (únicamente debe indicar la opción que corresponda)

Sí autorizo se almacene la alicuota de DNA para estudios futuros que pudieran realizarse dentro de los 10 años siguientes.

No autorizo se almacene la alicuota de DNA para estudios futuros que pudieran realizarse dentro de los 10 años siguientes.

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 el estudio de investigación.

Nombre del encargado de obtener el consentimiento informado

Firma del encargado de obtener el CI

Fecha

Firma de los testigos

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

Nombre y dirección del Testigo 1

Parentesco con participante

Firma del Testigo

Fecha

Nombre y dirección del Testigo 2

Parentesco con participante

Firma del Testigo

Fecha

12.3. Autorización de la comisión nacional de investigación científica

IMPRIMIR DICTAMEN



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS
UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN Y POLÍTICAS DE SALUD
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD

"2011, Año del Turismo en México"

17 de mayo del 2011

Ref. 09-B5-61-2800/201100/

00839

Dr. Cruz López Miguel
Unidad de Investigación Médica en Bioquímica Siglo XXI
Nivel Central

Presente:

Informo a usted que el protocolo titulado: **Escaneo genómico completo del paciente con diabetes tipo 2 para la búsqueda de nuevos marcadores de asociación con la enfermedad**, fue sometido a la consideración de esta Comisión Nacional de Investigación Científica.

Los procedimientos propuestos en el protocolo cumplen con los requerimientos de las normas vigentes, con base en las opiniones de los vocales de la Comisión de Ética y Científica, se ha emitido el dictamen de **AUTORIZADO**, con número de registro: R-2011-785-018.

De acuerdo a la normatividad institucional vigente, deberá informar a esta Comisión en los meses de Junio y Diciembre de cada año, acerca del desarrollo del proyecto a su cargo.

Atentamente,
Dr. Fabio Salamanca Gómez
Presidente
Comisión Nacional de Investigación Científica

Anexo comentarios:

~~SM/~~ iah. F-CNIC-2010-72

IMSS

SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

4ª planta Edificio "B" de la Unidad de Investigación en Coordinación de Investigación en Salud, Dirección de Prestaciones Médicas, Instituto Mexicano del Seguro Social, Av. Cuernavaca 380 Col. Doctores México 06720. 56276000 ext. 31311 fcnic@imss.gob.mx