



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

ZARAGOZA

**EFECTO DE LOS RS3758391 Y RS1800470
ASOCIADOS A DT2 SOBRE LA EXPRESIÓN DE
LOS GENES *SIRT1* Y *TGF- β 1* EN UNA
POBLACIÓN ADULTA**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

RAMÍREZ VENEGAS MARÍA DE LOS ÁNGELES

DIRECTOR: DR. FERNANDO SUÁREZ SÁNCHEZ

ASESORA: M. EN C. MA. LOURDES VEGA

NAVARRETE



CIUDAD DE MÉXICO

SEPTIEMBRE 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Es tentador preguntarse si esta cadena retorcida
de azúcares con cuentas de bases púricas y
pirimidínicas no será, de hecho, Dios.

James Watson

No tengo ningún talento especial,
lo que soy es apasionadamente curioso.

Albert Einstein

Cuando pienses en rendirte,
recuerda por qué comenzaste.

Anónimo



Dedicatoria

El esfuerzo, energía, paciencia y emoción para concluir este trabajo no hubiese existido sin mi familia, quienes son el motor de mi vida y la razón de que yo me encuentre en esta etapa de mi vida.

Con todo mi amor, les dedico este trabajo y lo que el realizarlo conllevó. Gracias por estar en todo momento, apoyándome en mis decisiones y deseos.

Hilda, Rafael, Diana, Ana, Maribel, Julieta. Los amo

Agradecimientos

Se dice que el ser humano, es social por naturaleza, en mi caso es más que eso, son personas que se vuelven parte de tu vida y ocupan un lugar en tu corazón.

A **Dios**, por ser el pilar de todo, porque la ciencia describe el cómo pero el fin último de las cosas siempre será él. Por darme siempre las herramientas para seguir.

Quiero agradecer individualmente al **Sr. Rafael Ramírez**, quien me ha enseñado a entender que los valores son la base de toda persona y saber el esfuerzo que conlleva obtener lo que quieres, porque no sólo es el hombre que me dio la vida, es quien me apoya en mis sueños más locos y escucha aunque no me entienda.

A la **Sra. Hilda Venegas**, quien a pesar de darle dolores de cabeza y provocarle disgustos, me ha cobijado siempre y en los momentos más difíciles como toda madre.

A mis hermanas **Diana, Ana, Maribel y Julieta**, mis compañeras de vida y que en los momentos más difíciles están ahí, alentándome y compartiéndome sus experiencias.

A **Marco Velázquez**, quien me escuchó y alentó en los momentos durante la carrera en que creía que ya no podía, porque me inspira cada día a saber que puedes lograr lo que quieres a pesar de que todo mundo opine lo contrario.

A mis compañeras durante toda la carrera, estancia de investigación y tesis: **Miriam Hernández, Vanessa Cortés y Gloria Nájera** quienes compartieron los momentos más difíciles y fueron un soporte importante para mí.

Al **Dr. Fernando Suárez**, por la oportunidad para realizar este trabajo y la confianza depositada para el mismo, además de compartirme sus conocimientos y buenas prácticas.

A la **M. en C. Ma. Lourdes Vega, Dra. Raquel Retana, M. en C. Leonor Aguilar y M. en C. Rodrigo Mateos** por sus valiosas aportaciones en mi proyecto de tesis, además de ser profesores muy valiosos que contribuyeron a mi pasión por la ciencia.

A todos los integrantes del laboratorio de la UIMB del CMN SXXI que hicieron posible y amena mi estancia durante casi un año.

A mis compañeros de carrera y quienes se volvieron mis amigos **Arturo Sánchez y Ema Herrera**.

A mi abuelita **Julia Mejía** de quien admiré su fuerza y el gran ser humano que fue en todo momento, mi abuelito **Rafael Ramírez** por ser un hombre ejemplar y a mi abuelito postizo **Apolinar Flores** por enseñarme a través de sus experiencias.

A mis amigos que siempre me han acompañado y escuchado en los momentos más importantes; **Yeltzin Rivas, Aída Montijo, César Reyes, Guadalupe García**.

Agradecimientos institucionales

- A la Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo financiero para el desarrollo del proyecto de investigación en salud “Análisis de la variación en la expresión y splicing del mRNA en pacientes con DT2 y participantes sanos” con clave de registro FIS/IMSS/PROT/G14/1333 del cual deriva este trabajo.
- A la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica del hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional SXXI del IMSS por el espacio, material y equipo prestado para el desarrollo de este trabajo.
- A la Universidad Nacional Autónoma de México que a través de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza me formó como profesionista y brindó los conocimientos necesarios para realizar este trabajo.

Índice

Índice de figuras	ix
Índice de tablas	x
Abreviaturas	xi
1. Resumen	1
2. Introducción	3
3. Marco teórico.....	5
3.1 ¿Qué es la diabetes?	5
3.2 Diabetes tipo 2	5
3.3 Genética de la DT2.....	6
3.4 Polimorfismos de un sólo nucleótido	7
3.5 Expresión genética	8
3.6 SIRT1	12
3.7 TGF- β 1	14
4. Planteamiento del problema.....	17
5. Hipótesis.....	18
6. Objetivo general	18
6.1 Objetivos específicos.....	19

7. Materiales y métodos	19
7.1 Diseño experimental.....	19
7.2 Obtención de las muestras.....	20
7.3 Determinación de parámetros bioquímicos	20
7.4 Extracción de ADN	21
7.5 Discriminación alélica.....	21
7.6 Extracción de ARN	23
7.6.1 Cuantificación del ARN.....	23
7.6.2 Integridad del ARN	23
7.7 Tratamiento con ADNasa I	24
7.8 Síntesis de ADNc	25
7.9 RT-PCR.....	26
7.10 Análisis estadístico.....	28
8. Resultados	29
8.1 Descripción de la muestra	29
8.2 Extracción de ADN	30
8.3 Extracción de ARN	31
8.4 Genotipificación de los rs3758391 y rs1800470	32
8.5 Análisis de expresión genética	34
8.5.1 Expresión relativa de <i>SIRT1</i> vs. genotipo.....	34
8.5.2 Expresión relativa de <i>TGF-β1</i> vs. genotipo	35

8.6 Parámetros antropométricos y bioquímicos vs. genotipo	36
8.6.1 rs3758391 (Gen <i>SIRT1</i>)	36
8.6.2 rs1800470 (Gen <i>TGF-β1</i>)	39
9. Discusión	41
9.1 Parámetros antropométricos y bioquímicos de la población de estudio	41
9.2 Los rs3758391 y rs1800470 están en equilibrio de Hardy-Weinberg	42
9.3 La expresión de <i>SIRT1</i> aumenta en la población homocigota para el alelo T del rs3758391.	43
9.4 La expresión de <i>TGF-β1</i> aumenta en la población heterocigota CT y en la población homocigota para el alelo T del rs1800470.....	44
9.5 Parámetros antropométricos y bioquímicos vs. genotipo del rs3758391.....	46
9.6 Parámetros antropométricos y bioquímicos vs. genotipo del rs1800470.....	47
10. Conclusiones	47
11. Perspectivas	48
12. Referencias	49
13. Anexos	59
13.1 Anexo 1. Carta de consentimiento informado.....	59

Índice de figuras

Figura 1. Representación esquemática de un SNP.....	7
Figura 2. Organización del genoma humano.....	9
Figura 3. Etapas del proceso de transcripción	11
Figura 4. Síntesis y activación de TGF- β 1.....	16
Figura 5. Vía de señalización de TGF- β 1 dependiente de Smad.....	16
Figura 6. Muestras de ADN genómico en un gel de agarosa	31
Figura 7. Muestras de ARN después de un corrimiento electroforético	32
Figura 8. Distribución de frecuencias genotípicas para el rs3758391	33
Figura 9. Distribución de frecuencias genotípicas para el rs1800470	33
Figura 10. Expresión relativa de <i>SIRT1</i> para el rs3758391	35
Figura 11. Expresión relativa de <i>TGF-β1</i> para los genotipos del rs1800470.....	36
Figura 12. Índice cintura-cadera del género masculino vs. genotipo del rs3758391 ...	39
Figura 13. Nivel de triglicéridos vs. genotipo del rs1800470.	41

Índice de tablas

Tabla 1. Descripción de sondas <i>TaqMan</i> ® de <i>Life Technologies</i>	22
Tabla 2. Mezcla de reacción para genotipificación por muestra.....	22
Tabla 3. Condiciones de amplificación para PCR en tiempo real.....	22
Tabla 4. Mezcla de reacción para el tratamiento con ADNasa.....	24
Tabla 5. Mezcla de reacción por muestra para la síntesis de ADNc.	25
Tabla 6. Condiciones para la síntesis de ADNc.	26
Tabla 7. Mezcla de reacción para la RT-PCR por muestra.	26
Tabla 8. Características de los primers empleados en la RT-PCR	27
Tabla 9. Condiciones de amplificación para RT-PCR	28
Tabla 10. Condiciones para la curva de disociación.	28
Tabla 11. Características generales de la población de estudio.	30
Tabla 12. Parámetros bioquímicos y antropométricos agrupados por genotipo para el rs3758391	38
Tabla 13. Parámetros bioquímicos y antropométricos agrupados por genotipo para el rs1800470	40

Abreviaturas

CBP	Proteína de unión a CREB
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
c-fos	Protooncogen fos
c-myc	Protooncogen myc
CREB	Elementos de respuesta a adenosin monofosfato cíclico
CRTC2	Coactivador transcripcional regulado por CREB-2
cSNP	Polimorfismo de un solo nucleótido codificante
C _t	Ciclo umbral
DEPC	Dietil pirocarbonato
ADN	Ácido desoxirribonucleico
DT2	Diabetes tipo 2
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
FOX01	Proteína de la <i>forkhead box</i> 01
G6P	Glucosa 6-fosfato
GWAS	Estudios de Asociación en todo el genoma
HDL	Lipoproteína de alta densidad
IMC	Índice de masa corporal
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
Jun-B	Protooncogen homologo Jun B
kg/m ²	Kilogramo(s) sobre metro cuadrado
LDL	Lipoproteína de baja densidad
mg/dL	Miligramo(s) sobre decilitro
mmHg	Milímetro(s) de mercurio

MODY	Diabetes de la edad madura que se presenta en el joven
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
p300	Proteína 300
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
PGC-1 α	Peroxisoma proliferador activado del receptor- γ coactivador 1 α
PPAR α	Peroxisoma proliferador activado del receptor α
ARN	Ácido ribonucleico
rSNP	Polimorfismo de un solo nucleótido regulador
SIRT1	Sirtuína 1
SNPs	Polimorfismo(s) de un solo nucleótido
srSNP	Polimorfismo de un solo nucleótido ARN estructural
TGF- β 1	Factor de crecimiento transformante beta 1
T _m	Temperatura de fusión
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
UCP2	Proteína desacoplante 2

1. Resumen

La diabetes tipo 2 (DT2) es un desorden metabólico que representa entre el 90 y 95% de todos los casos de diabetes y es uno de los principales problemas de salud pública en el mundo. La DT2 se considera una enfermedad de tipo multifactorial; lo que quiere decir que es un conjunto de factores ambientales y genéticos los que determinan que se detone. A partir de los estudios de asociación genómica (GWAS), se han encontrado marcadores genéticos que han ayudado a entender la genética de la diabetes, algunos de estos, son los polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs).

El SNP rs3758391 se ubica en la región promotora del gen *SIRT1*, del cual se sabe que la proteína que codifica, modula la gluconeogénesis en el hígado y regula la secreción de insulina en células β -pancreáticas. El alelo T ancestral del rs3758391 se ha asociado con el riesgo a padecer DT2 en poblaciones mexicanas.

Por otra parte, se sabe que el SNP rs1800470 se encuentra en el gen *TGF- β 1* el cual se ha considerado fuertemente como un mediador clave en la fibrosis renal asociada a nefropatía diabética. Este SNP provoca el cambio del aminoácido prolina por una leucina y se ha asociado al alelo variante T con el riesgo a desarrollar DT2 y nefropatía diabética en pacientes que ya presentan la enfermedad.

A pesar de que ya se conocen los alelos de riesgo del rs3758391 y rs1800470, no se sabe con precisión el mecanismo de su asociación con la enfermedad. Aunque se cree que una cierta proporción de estos SNPs ejercen su efecto sobre la expresión genética.

En el presente estudio se incluyeron a 127 personas adultas seleccionadas de acuerdo a los criterios de inclusión en la Unidad de Investigación en Bioquímica del Centro Médico

Nacional Siglo XXI, IMSS. A los individuos se les extrajo ADN a partir de sangre periférica y se determinó el genotipo para los rs3758391 y rs1800470.

Después, se obtuvo el ARN y se sintetizó DNAc para determinar la expresión de los genes *SIRT1* y *TGF-β1* a través de una PCR en tiempo real. Posteriormente, se asoció la expresión de los genes *SIRT1* y *TGF-β1* con los genotipos del rs3758391 y rs1800470 respectivamente.

Los resultados demostraron que el alelo T ancestral se asocia con el aumento en la expresión del gen *SIRT1*; también se vio que éste incremento en la expresión del gen es relevante solo hasta poseer dos copias de este alelo.

La expresión aumentada de *SIRT1* observada en este estudio, podría reflejar una mayor actividad de la proteína. Este a su vez, podría permitir la deacetilación de factores de transcripción que son reguladores de la gluconeogénesis que conllevan a un estado de hiperglucemia prolongado y por lo tanto el riesgo de padecer DT2.

En el caso del rs1800470, este estudio demostró que el alelo T variante está relacionado con una mayor expresión del gen *TGF-β1*, además basta una sola copia del alelo de riesgo T para que existan cambios. Las modificaciones en la expresión de *TGF-β1* favorecerán eventos intracelulares que suprimen la expresión de otros genes, entre los cuales se encuentra el gen de la insulina. Además, *TGF-β1* suprime factores que promueven la función óptima de las células β-pancreáticas, determinando así el riesgo de padecer DT2.

Debido a que se observaron cambios en la expresión de *SIRT1* y *TGF-β1* asociados a los alelos de riesgo de los SNPs, debe estudiarse con más detalle la señalización de las proteínas respectivas para entender con mayor detalle su relación con DT2.

2. Introducción

En los últimos años, hemos escuchado la palabra diabetes con más frecuencia. Todos conocemos algún vecino, familiar o amigo que es diagnosticado con diabetes o ha fallecido por esta misma causa. Se estima que en el 2030 habrá 366 millones de enfermos en todo el mundo, aproximadamente 195 millones más que en el año 2000, aunque es importante señalar que existen muchos casos sin diagnosticar (1).

La diabetes es un desorden metabólico caracterizado por hiperglucemia y resistencia a la insulina en tejidos periféricos, así como por la disminución en la capacidad de secreción de la insulina por parte de las células β -pancreáticas (2). En el presente trabajo se estudió específicamente a la diabetes tipo 2 (DT2), ya que representa entre el 90 y 95% de todos los casos reportados de diabetes y es uno de los principales problemas de salud pública en el mundo (3). Tan sólo en México, los estados con mayor incidencia de DT2 son el Estado de México, Ciudad de México, Jalisco y Veracruz (4).

La mayoría de las enfermedades crónico-degenerativas como la DT2, resultan de la interacción de factores ambientales y genéticos (5). Dentro de los factores ambientales, se involucran aspectos como el consumo recurrente de alimentos con alto contenido de carbohidratos y lípidos, la inactividad física, el hábito de fumar, consumo de alcohol, entre algunos más que forman parte del estilo de vida de la sociedad urbana moderna (6,7).

En cuanto a los factores genéticos, distintos grupos de investigación han trabajado para identificar genes y proteínas que presentan alteraciones en su cantidad o función en personas afectadas por DT2 (8), sin embargo, al ser esta enfermedad de tipo poligénica, no sigue patrones hereditarios Mendelianos, por lo que también se le denomina *compleja* (8).

Los SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) son el componente genético de la diabetes que se ha estudiado ampliamente mediante estudios de asociación del genoma completo o GWAS (*Genome Wide Association Study*) en diferentes poblaciones. Los SNPs son cambios de un sólo nucleótido en el ADN que se presentan aproximadamente en 1 de cada 1000 pb y representan el tipo de variación más abundante en las poblaciones humanas (9). Los GWAS han mostrado asociación entre los SNPs y la DT2, aunque una limitante de estos análisis, es que no aportan información sobre los mecanismos alterados que favorecen el desarrollo de la DT2. Un SNP puede representar un cambio en la secuencia de una proteína y por lo tanto alterar su función, o bien puede no cambiar su secuencia y no presentar efecto alguno (9). Por otra parte, los SNPs también pueden modificar la expresión de genes y estos a su vez alterar el fenotipo y por tanto tener un efecto fisiopatológico como la DT2 (9). Los SNPs pueden encontrarse en los promotores de los genes; potenciadores o en lugares específicos que afectan la transcripción y por lo tanto los niveles de expresión genética (10).

Conocer los cambios funcionales asociados a los SNPs es determinante para entender la manera en la que la genética contribuye al desarrollo de la DT2.

Estudios previos en la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica del Centro Médico Nacional SXXI, IMSS abordaron este tema con la intención de determinar la contribución de dos SNPs (rs3758391 y rs1800470) en la transcripción de *SIRT1* y *TGF- β 1* (11,12). En dicho estudio se incluyó una población infantil y se encontró que estos SNPs modifican de manera significativa la expresión genética, sin embargo; algunas limitantes fueron un número reducido de sujetos de estudio, lo que impidió la determinación de la expresión genética en niños con genotipo heterocigoto.

En el trabajo que ahora se propone, se plantea aumentar el número de muestras e incluir al grupo de los heterocigotos para corroborar si estos resultados observados en la

población infantil se reproducen en una población adulta. También se analizará la asociación del genotipo con parámetros bioquímicos de la población.

3. Marco teórico

3.1 ¿Qué es la diabetes?

El término *diabetes* fue introducido por Demetrious de Apamea entre el primer y segundo siglo antes de cristo, el cual aludía a la frase *pasar a través* de debido a que el signo característico que se observaba en los pacientes era poliuria, por lo que se creía que los líquidos pasaban directamente a ser desechados por el organismo (13). Actualmente la diabetes se define como un desorden metabólico caracterizado por hiperglucemia y resistencia a la insulina en tejidos periféricos, además de una disminución en la capacidad de secreción de insulina por parte de las células β -pancreáticas (2). Se conocen diferentes tipos de diabetes, entre las cuales están; diabetes tipo 1, tipo 2, gestacional y otros tipos de diabetes menos comunes como la diabetes monogénica; por ejemplo la diabetes tipo MODY (*Maturity Onset Diabetes of the Young*) que es originada por mutaciones genéticas que producen una severa pérdida de la función del gen implicado. Un ejemplo más de otra diabetes poco común es la secundaria, la cual surge de otras enfermedades que afectan al páncreas (14).

3.2 Diabetes tipo 2

El tipo de diabetes más común es la DT2 ya que representa entre el 90 y 95% de todos los casos de diabetes y es uno de los principales problemas de salud pública en el mundo (3).

La DT2 generalmente se presenta en adultos, pero en los últimos años, se ha visto cada vez más en niños y adolescentes (14). En las etapas iniciales de la enfermedad, el páncreas secreta cantidades adecuadas de insulina, pero debido al desarrollo de resistencia, esta hormona se vuelve ineficaz. Con el tiempo, el daño en el páncreas disminuye la liberación de insulina, lo que significa que la glucosa continúa circulando en sangre sin ser metabolizada. La presencia prolongada de hiperglucemia daña a tejidos dando lugar a complicaciones (15).

La DT2 se considera un desorden multifactorial; lo que quiere decir que es el resultado de múltiples factores de riesgo, tales como; obesidad, mala alimentación, falta de actividad física, edad avanzada, antecedentes familiares, origen étnico, nutrición inadecuada durante la gestación, etc. (16).

En muchos casos, esta enfermedad no es diagnosticada tempranamente, sino hasta después de muchos años, debido a que la hiperglicemia no es lo suficientemente severa para provocar síntomas detectables clínicamente (16). Algunas estimaciones indican que 1 de cada 2 adultos con DT2 no están diagnosticados (15).

3.3 Genética de la DT2

A diferencia de lo que ocurre con la diabetes tipo 1 y los tipos de diabetes monogénica en donde se han localizado genes únicos asociados con la enfermedad, en la DT2 no ha sido posible esta relación única, pues se ha encontrado que diversas mutaciones en más de un gen contribuyen al desarrollo de esta patología. Por lo que a la DT2 se le ha denominado como una *enfermedad multigénica o compleja* (17).

Existen diferentes estrategias para la identificación de los genes asociados a un rasgo determinado, entre las cuales están; estudios de mapeo genético, estudios de expresión diferencial de genes o proteínas, modelos animales donde se inactiva selectivamente la

función de algunos genes en distintos tejidos y los estudios de asociación genómica, los cuales evalúan la posible asociación de miles de marcadores genéticos distribuidos en todo el genoma con la diabetes o rasgos metabólicos relacionados (18,19). A través de estos métodos se han identificado en los últimos años distintos genes y regiones cromosómicas implicadas en el riesgo al desarrollo de DT2.

Los estudios GWAS son un tipo de estudio de asociación genética que permite realizar una proyección extensa y de alta densidad del genoma completo en busca de sitios de asociación significativa con un fenotipo de interés (19). A partir de estos estudios, se han encontrado marcadores genéticos que han ayudado a entender la genética de la diabetes, algunos de estos son los polimorfismos de un solo nucleótido.

3.4 Polimorfismos de un sólo nucleótido

Un polimorfismo de un sólo nucleótido o SNP es el tipo de variación genética más simple y consiste en la sustitución de un solo nucleótido por otro en cualquier secuencia del ADN, que se presentan con una distribución de 1 SNP por cada 1000 pb (figura 1) (9,20). Actualmente se han descrito más de 10 millones de SNPs en todo el genoma, aunque se estima que existen aproximadamente 20 millones de ellos (10).

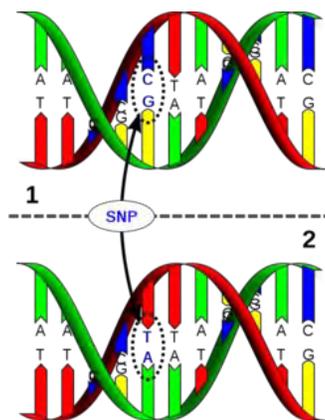


Figura 1. Representación esquemática de un SNP (21).

Estas variaciones en el ADN contribuyen a la variabilidad fenotípica de cada individuo, así como la susceptibilidad a distintas enfermedades (10). El estudio de los SNPs ha contribuido a entender el origen de las poblaciones y así reconstruir parte de la historia evolutiva, también en la medicina forense y en el entendimiento de las enfermedades multigénicas (22).

De acuerdo con su función y su localización en el genoma, los SNPs se han dividido en (10,23):

- rSNPs (*regulatory SNPs*): Se encuentran cerca del sitio de inicio de la transcripción, aunque también pueden hallarse dentro de la región que se transcribe. Alteran los niveles de expresión genética y pueden también alterar a genes no codificantes.
- srSNPs (*structural RNA SNPs*): Se ubican en regiones que se transcriben, por lo que afectan la estructura y función de los ARNs incluyendo el corte y empalme de estos, también se incluye la regulación de la traducción a proteínas.
- cSNPs (*coding SNPs*): Se encuentran en los exones del gen, se subdividen en sinónimos y no sinónimos, estos últimos cambian el aminoácido codificante y por tanto la secuencia de la proteína que se transcribe.

Los tipos de SNPs que se abordarán en el presente estudio son aquellos que modifican la expresión genética.

3.5 Expresión genética

La expresión genética es el proceso por el cual la información genética contenida en el ADN es utilizada para sintetizar moléculas que serán útiles para la célula; éstas suelen ser proteínas o algunos ARNs reguladores (24).

Es particularmente notorio que de todo el genoma, del 70 al 80% corresponde a ADN no codificante (figura 2), el cual comprende secuencias transcripcionalmente inactivas de funciones diversas; entre las que destacan promotores de genes o reguladores de la transcripción. Aunque en muchos casos, su función es desconocida, se piensa que muchas de estas regiones pueden tener un papel en el sistema de regulación genética (25).

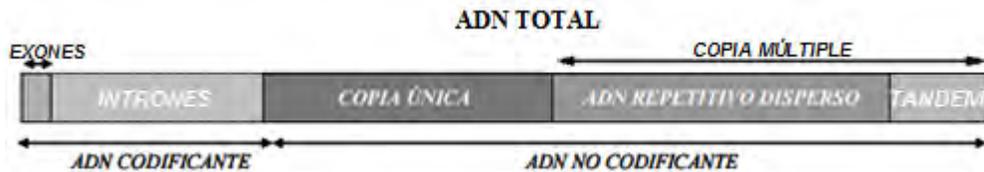


Figura 2. Organización del genoma humano. Adaptado de Alcoceba M, 2010 (25)

Los organismos eucariotas poseen un sistema de regulación de expresión genética muy particular diseñado para que una célula responda a estímulos extracelulares. Este sistema involucra una cadena de eventos que pueden modificarse y adaptarse para satisfacer las necesidades que requiera el organismo. Los eventos pueden ir desde modificaciones en la estructura de la cromatina, hasta la modificación postraduccional de la proteína codificada (26)

A continuación se describe parte del proceso de expresión genética y algunos de los niveles de regulación:

- Condensación de cromatina

La estructura de la cromatina, representa el primer paso para la expresión genética, en este momento la célula elegirá los genes que se transcribirán dependiendo del grado de compactación de esta, así las regiones más laxas serán las zonas activas donde ocurren cambios específicos asociados con el inicio de la transcripción (26).

- Metilación del ADN

La metilación del ADN es un proceso epigenético (cambios que ocurren sin una alteración en la secuencia de nucleótidos del ADN) que participa en la regulación de la expresión genética de dos maneras; directamente al impedir la unión de factores de transcripción e indirectamente propiciando la estructura *cerrada* de la cromatina (27,28).

- Transcripción

La transcripción es la etapa de la expresión genética que se lleva a cabo en el núcleo celular y consiste en la formación de un transcrito primario de ARN complementario a partir de una hebra molde de ADN. Se distinguen tres etapas (figura 3) (29):

1. Iniciación: La enzima ARN polimerasa se une a una secuencia promotora en la doble hebra de ADN para separarla.
2. Elongación: La ARN polimerasa comienza a agregar nucleótidos complementarios para hacer el transcrito de ARN denominado mensajero (ARNm).
3. Terminación: Cuando la polimerasa alcanza el sitio de terminación, se detiene el proceso y el transcrito de ARN y la polimerasa se separa del ADN.

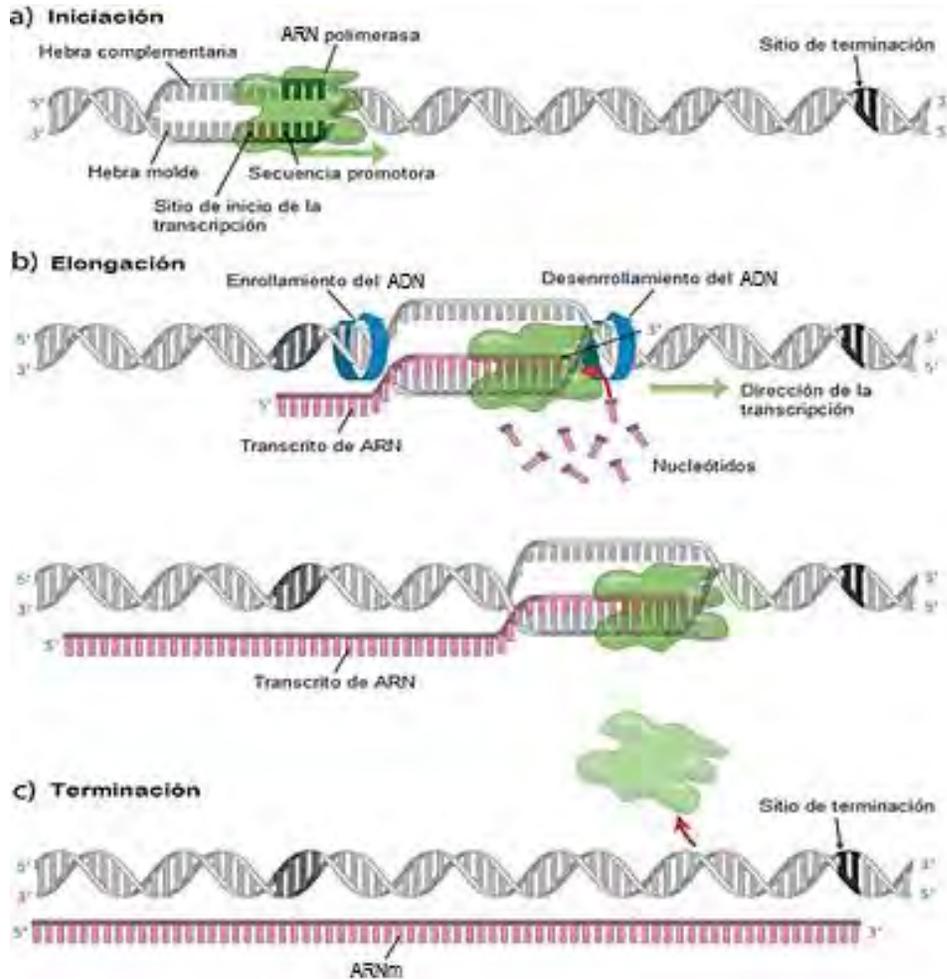


Figura 3. Etapas del proceso de transcripción, a) Iniciación, b) Elongación, c) Terminación (30).

El transcrito primario de ARN resultante, sufre eventos postranscripcionales como eliminación de intrones (*splicing*) y diferentes tipos de poliadenilación en su camino hacia la maquinaria ribosomal, lo que permite que un solo gen dé lugar a más de una secuencia de ARNm y por lo tanto diferentes isoformas de proteínas (26).

- Traducción

El mensaje llevado por el ARNm es convertido en una proteína durante esta etapa, para lo cual es necesario un código genético que es empleado para leer el mensaje y traducirlo en una secuencia de aminoácidos.

Se conocen tres pasos (24):

1. **Iniciación:** Se forma un complejo de iniciación en las subunidades ribosomales que incluye al ARNm y un ARN de transferencia (ARNt) con un codón de iniciación.
2. **Elongación:** Se unen otros ARNts al complejo de iniciación que van adicionando aminoácidos para alargar la cadena polipeptídica mientras el ribosoma se desplaza debajo del ARNm.
3. **Terminación:** Se encuentra un codón de terminación y el péptido formado se libera del ribosoma, simultáneamente el complejo se disocia.

Cuando la síntesis proteica se completa, la proteína se pliega y queda expuesta a modificaciones postraduccionales que contribuirán a su función biológica.

El proceso de la expresión genética en las células eucariotas implica una serie de pasos y puntos de regulación muy específicos, sí se presenta alguna modificación en alguno de ellos, el resultado será una proteína alterada y por tanto un fenotipo diferente.

3.6 SIRT1

Las sirtuínas son una familia de deacetilasas dependientes de NAD^+ presentes en organismos procariontes y eucariontes. Existen siete tipos conocidos en mamíferos, de las cuales SIRT1 (*Silent mating-type Information Regulation 1 homologue 1*) es el miembro más estudiado (31,32).

Se sabe que estas enzimas intervienen en numerosos procesos celulares como el silenciamiento de algunos genes, metabolismo de energía, envejecimiento, funciones endoteliales, regulación epigenética, funciones neuronales, regulación de factores de transcripción, entre otros (31, 32, 33).

A *SIRT1* se le ha atribuido la regulación de varios procesos metabólicos que permiten a la célula adaptarse a situaciones de estrés y por lo tanto tener un papel amortiguador en enfermedades metabólicas (31). Se sabe por ejemplo que esta proteína modula la gluconeogénesis en el hígado a través de la deacetilación de factores de transcripción importantes como *PGC-1 α* , *FOXO1* y *CRTC2*. En ayuno, *CRTC2* es activado a través de la acetilación por el coactivador *CBP/p300*, lo cual promueve la transcripción de genes gluconeogénicos. *SIRT1* también estimula la oxidación de ácidos grasos en coordinación con *PPAR α* , y en células β -pancreáticas regula la secreción de insulina a través de *UCP2* (31).

SIRT1 es una proteína codificada por el gen que lleva el mismo nombre y que se localiza en la posición 10q21.3 (34). En humanos, las variaciones en este gen se han visto relacionadas con obesidad y DT2 en estudios de poblaciones europeas (35,36).

Recientemente, se han identificado 82 SNPs a lo largo de todo el gen *SIRT1* de acuerdo con los datos obtenidos del proyecto *1000 Genomes Project* (37). Dentro de estos, el SNP rs3758391 (alelo T (ancestral), alelo C (variante)); que está ubicado en la región promotora del gen se ha asociado significativamente con el riesgo a padecer DT2 en una población mexicana (38). Esto supone que el rs3758391 modifica mecanismos celulares relacionados con la homeostasis de la glucosa.

De acuerdo a la posición en la que se encuentra el rs3758391 se clasifica como un rSNPs (*regulatory SNPs*) lo que implica que puede cambiar la expresión del gen donde se encuentra. En el caso particular para *SIRT1* se vio que su sobreexpresión está asociada con la proliferación alterada de hepatocitos y además un incremento de la mortalidad de estos causada por daño hepático debido a la acumulación de ácidos biliares (39), mientras que niveles bajos en la expresión del gen en ratones se ha asociado con regeneración defectuosa en el hígado (40), lo que sugiere que ambos

extremos en la expresión de *SIRT1* tiene efectos negativos en la proliferación de las células del hígado y por lo tanto en sus funciones fisiológicas. Por otro lado, se sabe que niveles bajos en la expresión de *SIRT1* en las células β -pancreáticas aumenta los niveles de la proteína UCP2 que a su vez disminuye la secreción de insulina de estas (31,41).

3.7 TGF- β 1

El factor de crecimiento transformante beta-1 (TGF- β 1) es un regulador general de las actividades celulares con múltiples efectos biológicos, pues su expresión regula de manera autócrina o parácrina la diferenciación, proliferación, y el estado de activación celular. Es sintetizado por diferentes estirpes celulares, como linfocitos, macrófagos, fibroblastos, miocitos, astrocitos, células epiteliales, células del riñón, plaquetas y algunas células tumorales (42).

Esta citocina forma parte de una gran familia de reguladores multifuncionales que incluyen a tres isoformas, TGF- β 1, 2 y 3 las cuales comparten homología en su secuencia de aminoácidos y son mediadas por los mismos receptores, aunque tienen distintos patrones de expresión (43).

El miembro más estudiado es TGF- β 1, el cual se ha considerado fuertemente un mediador clave en la fibrosis renal asociada a nefropatía diabética; definida como la acumulación de cantidades anormales de colágeno, fibronectina y otras moléculas que inducen el engrosamiento de la matriz extracelular del glomérulo renal (44). Además el proceso se favorece con el reclutamiento de células inflamatorias, especies reactivas de oxígeno y moléculas del complemento. Entre todos estos factores, las alteraciones en los niveles de TGF- β 1 han sido ligadas mayoritariamente con nefropatía diabética y otras enfermedades crónicas renales (44).

TGF- β 1 también induce otros eventos intracelulares como la regulación de factores de crecimiento que intervienen en la diferenciación celular a través de cambios en la expresión de los genes *jun-B*, *c-fos* y *c-myc* y la activación de proteínas G, adicionalmente participa en la activación o supresión del sistema inmune. Estas funciones dependen del estado de activación celular, de su concentración, del balance de expresión de otras citocinas y de las condiciones fisiológicas de las células sobre las que actúa (42).

Antes de que TGF- β 1 desencadene los eventos mencionados, es secretado en forma inactiva, por lo que pasa por un proceso de activación con ayuda de otras moléculas (figura 4). Posteriormente se comienza con la señalización de TGF- β 1 activo, el cual se une a receptores anclados a la membrana que son específicos para este. Los siguientes pasos dependerán de la vía de señalización que siga la célula, pues se han descrito dos mecanismos posibles; dependiente de Smad (figura 5) y no dependiente de Smad cuyo resultado final en ambas, es la translocación de un complejo proteico al núcleo que se unirá específicamente al ADN de la célula e intervendrá en el proceso de transcripción y por tanto en la expresión genética (42, 44).

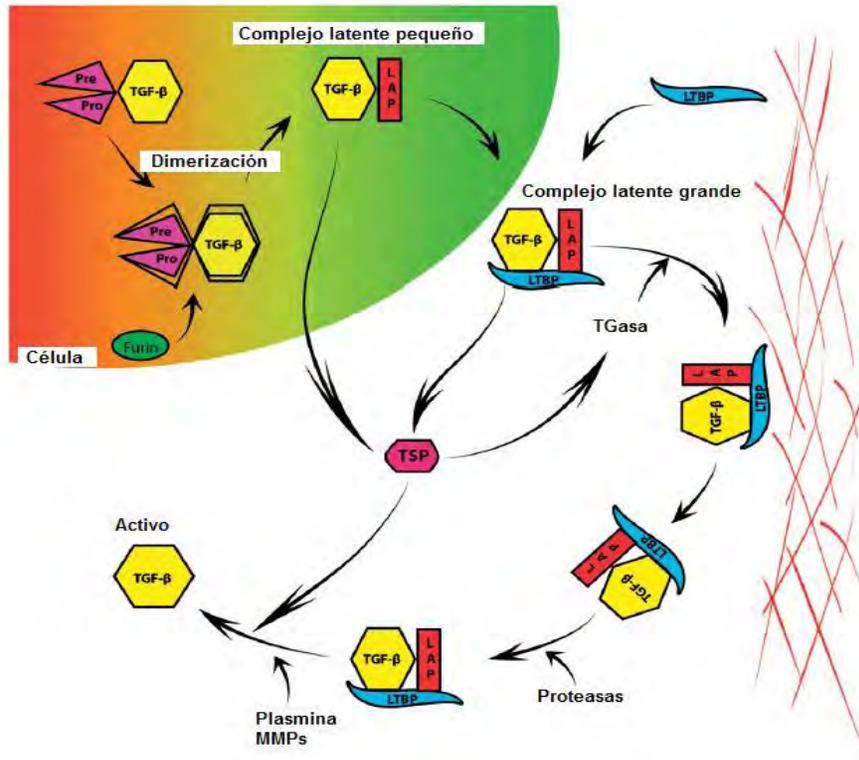


Figura 4. Síntesis y activación de TGF-β1 (44).

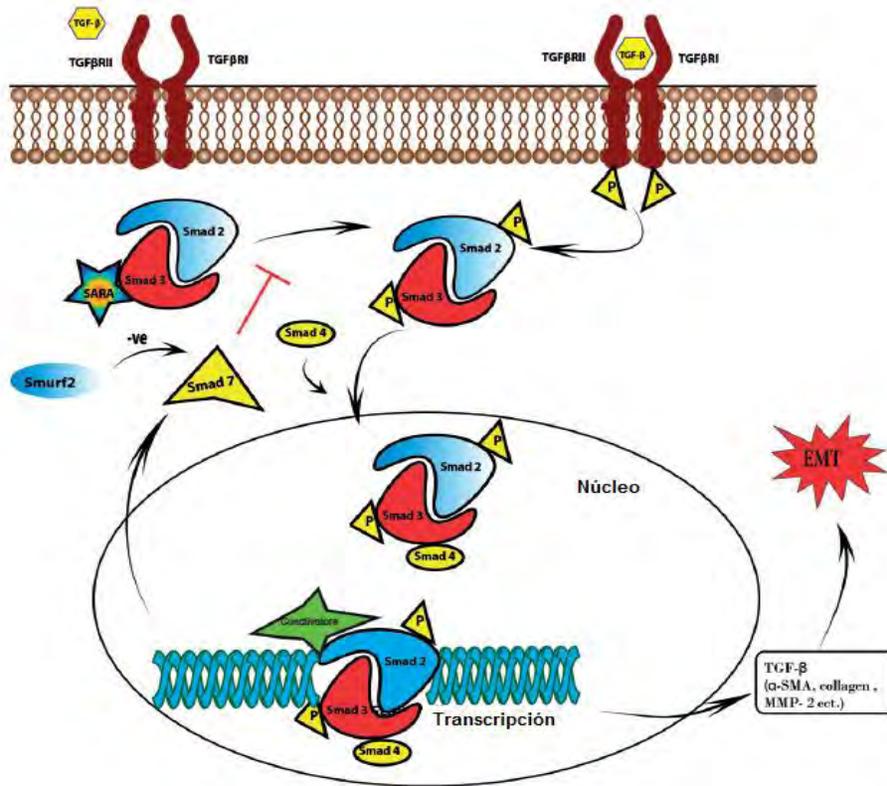


Figura 5. Vía de señalización de TGF-β1 dependiente de Smad (44).

El factor transformante $\beta 1$ es codificado por el gen *TGF- $\beta 1$* que se ubica en la posición 19q13.2 (45). Se han descrito SNPs asociados a DT2 que por su localización o por fuerte desequilibrio de ligamiento (alelos cercanos entre sí en un mismo cromosoma que tienden a heredarse juntos) con otros SNPs, indican una función en la regulación de la expresión de este gen.

El rs1800470 (alelo C (ancestral), alelo T (variante)); es un SNP de tipo *missense* y provoca el cambio del aminoácido prolina a leucina. Adicionalmente, este SNP se encuentra en desequilibrio de ligamiento con otros SNPs, en la región promotora del gen (46).

En un estudio realizado en poblaciones de India se encontró asociación del rs1800470 con el riesgo de padecer DT2 y nefropatía diabética (47), además en un estudio de una población mexicana y en poblaciones de España y Alemania también se asoció al SNP con nefropatía diabética (48, 49,50).

4. Planteamiento del problema

La prevalencia de DT2 ha aumentado en los últimos años. Se estima que en el 2030 habrá 366 millones de enfermos en todo el mundo, aproximadamente 195 millones más que en el año 2000 (1). Además de ser un problema de salud a nivel mundial, la DT2 representa un gasto importante para los sistemas de salud, por lo que los esfuerzos en salud pública para una cultura de prevención es una meta importante por alcanzar.

En los últimos años, muchos reportes sobre la genética de la DT2 se ha centrado en el estudio de la asociación de los SNPs con el riesgo a padecer la enfermedad; sin embargo en la mayoría de los casos, no se conoce el mecanismo de esta asociación, aunque se cree que una cierta proporción de estos SNPs ejercen su efecto sobre la

expresión genética. Las diferencias en la expresión de ciertos genes entre un sujeto y otro pueden modificar el fenotipo y por lo tanto ser la causa de la enfermedad (9).

Conocer las diferencias en la expresión de los genes *SIRT1* y *TGF-β1* permitirá determinar cómo afecta la presencia de los SNPs correspondientes y adicionalmente tratar de dilucidar el mecanismo celular para seguir entendiendo la asociación de los SNPs con la DT2.

En trabajos previos se determinó que la expresión de *SIRT1* fue mayor en niños que presentan el genotipo de riesgo TT ($p=0.017$) (11). Por otra parte, la expresión de *TGF-β1* aumentó en niños obesos con el genotipo de riesgo TT ($p=0.003$) (12). Aunque, debido a limitaciones en el tamaño de la muestra en dicho estudio, no se pudo determinar la expresión de estos genes en el grupo heterocigoto, por lo que quedaron interrogantes por resolver: ¿Cuál es el efecto de la presencia de una sola copia del alelo de riesgo sobre la expresión genética de *SIRT1* y *TGF-β1*?, ¿El efecto de los SNPs rs3758391 y rs1800470 sobre la expresión genética sufre modificaciones con la edad? ¿En la población adulta, los genotipos de los rs3758391 y rs1800470 se asocian con alteraciones en parámetros bioquímicos relevantes en DT2?

5. Hipótesis

Los SNPs rs3758391 y rs1800470 asociados a DT2, tienen efecto sobre la regulación de la transcripción de los genes *SIRT1* y *TGF-β1* respectivamente y por lo tanto modificarán su expresión.

6. Objetivo general

Determinar en una población adulta, si los SNPs rs3758391 y rs1800470 asociados a DT2, modifican la expresión de los genes *SIRT1* y *TGF-β1* respectivamente.

6.1 Objetivos específicos

- Identificar el genotipo de muestras de ADN de una población adulta usando sondas *Taqman* para los rs3758391 y rs1800470.
- Determinar la expresión de los genes *SIRT1* y *TGF-β1*.
- Analizar la asociación entre la expresión genética de los genes *SIRT1* y *TGF-β1* y los parámetros bioquímicos; glucosa, colesterol, triglicéridos, HDL colesterol, LDL colesterol y colesterol total.

7. Materiales y métodos

7.1 Diseño experimental

Tipo de estudio:

- Observacional prospectivo
- Transversal descriptivo

Población de estudio: Personas adultas seleccionadas de acuerdo a los criterios de inclusión en la Unidad de Investigación en Bioquímica del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

Criterios de inclusión:

- Glucosa en ayuno igual o menor a 126 mg/dL
- Cualquier género
- Pacientes no relacionados (sin consanguinidad)
- Los participantes deberán tener entre 35 y 60 años de edad.
- Con consentimiento informado autorizado

Variables:

- Independiente: Genotipo
- Dependiente: Expresión genética

7.2 Obtención de las muestras*

Los participantes que cumplieran con los criterios de inclusión, asistieron a la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS donde se les informó sobre los objetivos del proyecto dándoles un consentimiento informado (Anexo 13.1). A todos los individuos que firmaron el documento, se procedió a tomarles la muestra de sangre periférica.

Se colectaron 12 mL de sangre periférica en tres tubos con anticoagulante EDTA. La muestra de un tubo se empleará para la extracción de ADN genómico, cuantificar glucosa y determinar parámetros bioquímicos. La muestra del segundo y tercer tubo será para la extracción de ARN total. Todos los participantes se presentaron con un ayuno de 8 h.

7.3 Determinación de parámetros bioquímicos*

Se realizó la determinación de la química sanguínea para conocer el estado de salud de los participantes. El nivel de glucosa se midió a través del método de la glucosa oxidasa. También se realizaron las determinaciones de colesterol total y las fracciones de alta (HDL) y baja densidad (LDL) y triglicéridos, empleando el equipo *ILAB 350 de Instrumentation Laboratory®*.

*Estos procedimientos se realizaron previamente en el laboratorio de Unidad de Investigación Médica en Bioquímica del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

7.4 Extracción de ADN

La extracción del ADN genómico, se realizó en el Banco de ADN de la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS a partir de 127 muestras de sangre total congelada de personas adultas previamente seleccionadas de acuerdo a los criterios de inclusión.

La extracción se realizó de forma automática usando el equipo *AutoGenFlex STAR* y el kit *FlexiGene® DNA AGF3000* siguiendo las recomendaciones del fabricante.

El principio del método de extracción de este equipo consistió en agregar un amortiguador de lisis inicial a la muestra de sangre para romper membranas celulares y separar a los núcleos celulares por centrifugación. Posteriormente el *pellet* se resuspendió y se incubó en solución amortiguadora de desnaturalización que contenía una sal caotrópica y proteasa para separar el ADN de las proteínas. Después, el ADN se precipitó con isopropanol y se lavó con etanol al 70%, finalmente se secó y resuspendió en un amortiguador de hidratación.

Una vez se obtuvo el ADN aislado, se cuantificó y midió su pureza por espectrofotometría UV. Además, para observar la calidad del ADN se realizó un corrimiento electroforético de cada muestra en un gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio. La intensidad de las bandas correspondientes se observó en un transiluminador UV.

7.5 Discriminación alélica

Con el fin de determinar el genotipo de cada muestra para el rs1800470 y rs3758391, se realizó una genotipificación con sondas *Taqman* (tabla 1) usando el kit *TaqMan®*

Genotyping Master Mix de *Applied Biosystems* y el equipo *7900HT Fast Real-Time PCR System* con el Software *SDS.4*.

SNP	ID (Life Technologies)	Alelo -Fluoróforo
rs3758391	C__3003909_10	T - VIC C - FAM
rs1800470	C__22272997_10	C - FAM T - VIC

Tabla 1. Descripción de sondas *TaqMan*® de *Life Technologies*.

Se preparó una mezcla de reacción para cada muestra por analizar (tabla 2) y se depositó en una placa óptica de 384 pozos. La PCR en tiempo real se realizó en el equipo *7900HT Fast Real-Time PCR System* con el Software *SDS.4* utilizando las condiciones de amplificación establecidas (tabla 3).

Componente	Volumen por muestra (µL)
<i>TaqMan Genotyping Master mix (2X)</i>	2.5
Sonda <i>TaqMan (20X)</i>	0.25
DNA (20 ng/µL)	2.25
Volumen total	5

Tabla 2. Mezcla de reacción para genotipificación por muestra.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	No. de ciclos
Pre-tratamiento	50	2:00	1
Desnaturalización inicial	95	10:00	1
Desnaturalización	95	0:15	40
Alineación/extensión	60	1:00	

Tabla 3. Condiciones de amplificación para PCR en tiempo real.

Una vez concluidos los ciclos, se obtuvieron gráficas de discriminación alélica que ayudaron a identificar el genotipo de cada muestra.

7.6 Extracción de ARN

La extracción de ARN de cada muestra se realizó de forma manual a partir de una capa leucocitaria obtenida a partir de 4 mL de sangre total conservada en *TriPure Isolation Reagent* de Roche a -70 °C.

El método consistió en la adición de 2 mL de *TriPure Isolation Reagent*®, el cual es una solución que contiene fenol y tiocianato de guanidina. Este último reactivo se encarga del rompimiento de membranas celulares. Enseguida se agregó cloroformo y después de centrifugar se obtuvo la fase acuosa donde permanece el ARN.

El ARN se precipitó agregando isopropanol y manteniendo la muestra a -70 °C por al menos 1 h. Después de centrifugar, se realizaron dos lavados con etanol al 75%, se dejó secar y se resuspendió en agua DEPC.

7.6.1 Cuantificación del ARN

Dos de las características que se deben verificar después de extraer el ARN son; la concentración y pureza obtenida. Estos parámetros se midieron en un espectrofotómetro *EPOCH* midiendo las relaciones 260/280 y 260/230 para determinar la pureza del ARN así como su concentración.

7.6.2 Integridad del ARN

La tercera característica y no menos importante con la que debe cumplir el ARN obtenido, es la integridad, lo cual se observó con el corrimiento electroforético de cada

muestra en un gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio. La intensidad de las bandas correspondientes al ARN ribosomal se observaron en un transiluminador UV.

7.7 Tratamiento con ADNasa I

Las muestras de ARN que cumplieron con las características de calidad (buena concentración, pureza e integridad) fueron tratadas con la enzima ADNasa I, la cual se encargó de eliminar trazas de ADN que permanecían en las muestras.

Se utilizó el kit *Thermo Scientific DNasa molecular biology*. Se preparó la mezcla de reacción indicada en la tabla 4 para cada muestra:

Componente	Cantidad
Muestra de ARN	0.6 µg
Amortiguador 10X con MgCl ₂	1 µL
ADNasa I (1U/µL)	1 U
Agua DEPC	Hasta completar 10 µL
Volumen final	10 µL

Tabla 4. Mezcla de reacción para el tratamiento con ADNasa

Una vez que se tuvieron las mezclas de reacción, se incubaron a 37 °C por 30 min, trascurrido el tiempo se agregó 1 µL de EDTA 50 µM a cada muestra para inactivar la enzima y finalmente incubarla a 65 °C por 10 minutos.

Se comprobó que las muestras tratadas no tuvieran trazas de ADN realizando una PCR de punto final con ADN Polimerasa. No se observó amplificación de los genes de estudio.

7.8 Síntesis de ADNc

Para realizar los análisis de expresión de los genes de interés, es necesario usar como molde ADN complementario (ADNc) el cual es sintetizado a partir de ARNm monocatenario con ayuda de la enzima transcriptasa inversa, que funciona como una ADN polimerasa agregando los nucleótidos complementarios al ARN para sintetizar ADN.

Se sintetizó ADNc de todas las muestras de ARN tratadas con ADNasa I para lo cual se usó el kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* de *Applied biosystems* y se preparó la mezcla de reacción señalada en la tabla 5 para cada muestra.

Componente	Volumen por muestra (μL)
10X RT Buffer	2
25X dNTP mix 100 mM	0.8
10X RT Random primers	2
MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50U/ μL)	1
Agua DEPC	4.2
Volumen final	10

Tabla 5. Mezcla de reacción por muestra para la síntesis de ADNc.

A cada muestra de ARN libre de ADN que contenía 10 μL , se le adicionaron 10 μL de la mezcla de reacción para posteriormente introducirlas en el termociclador bajo las condiciones indicadas en la tabla 6.

	Ciclos			
	1	2	3	4
Temperatura (°C)	25	37	85	4
Tiempo (min)	10	120	5	∞

Tabla 6. Condiciones para la síntesis de ADNc.

Una vez concluidos los 4 ciclos se almacenaron las muestras a -70°C.

7.9 RT-PCR

El análisis de expresión relativa se realizó a través de una reacción de PCR en tiempo real usando el kit *Thermo Scientific Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)* y el equipo *7900HT Fast Real-Time PCR System*.

La mezcla de reacción del kit contenía lo siguiente; *Taq DNA Polimerasa Hot Start*, dNTP's, una solución salina que funciona como amortiguador, el fluoróforo *SYBR Green I* que se une al ADN de doble cadena y *Rox passive reference dye* como un fluoróforo de referencia pasiva.

Se preparó la siguiente mezcla de reacción para cada muestra (tabla 7):

Componente	Vol/muestra (µL)
Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)	2.5
<i>Forward Primer</i>	0.5
<i>Reverse Primer</i>	0.5
Muestra cDNA	1.5
Volumen final	5

Tabla 7. Mezcla de reacción para la RT-PCR por muestra.

Los primers que se usaron fueron diseñados utilizando la herramienta informática *Primer-BLAST* de NCBI (National Center for Biotechnology) considerando las siguientes características:

- Tamaño entre 18 y 30 pares de bases
- %G-C de 50 a 60
- T_m entre 50-65°C
- T_m similar entre el Forward y Reverse primer.
- Evitar complementariedad entre los primers.

Los primers que fueron empleados en la RT-PCR se muestran en la tabla 8:

Gen	Primer	Secuencia	T_m	Tamaño del amplicón
<i>TGF-β1</i>	Forward	5' GCTGAGGTATCGCCAGGAAT 3'	59.6	119
	Reverse	5' TACCTGAACCCGTGTTGCTC 3'	60	
<i>SIRT1</i>	Forward	5' ACAGGTTGCGGGAATCCAAA 3'	60.2	155
	Reverse	5' GTTCATCAGCTGGGCACCTA 3'	59.8	
<i>PGK1*</i>	Forward	5' CAAGAAGTATGCTGAGGCTGTCA 3'	60.6	68
	Reverse	5' CAAATACCCCCACAGGACCAT 3'	59.7	

*Gen de referencia

Tabla 8. Características de los primers empleados en la RT-PCR

La mezcla de reacción se colocó para cada muestra en una placa óptica de 384 pozos para posteriormente introducirla al equipo de PCR en tiempo real y realizar la amplificación utilizando las siguientes condiciones indicadas en la tabla 9.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	No. de ciclos
Pre-tratamiento	50	2:00	1
Desnaturalización inicial	95	10:00	1
Desnaturalización	95	0:15	40
Alineación/extensión	60	1:00	

Tabla 9. Condiciones de amplificación para RT-PCR

Adicionalmente se realizó una curva de disociación para los productos de amplificación con las siguientes condiciones de la tabla 10:

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	No. de ciclos
Desnaturalización	95	0:15	1
Hibridación	60	0:15	1
Desnaturalización	95	0:15	1

Tabla 10. Condiciones para la curva de disociación.

Concluidos los ciclos, se analizaron las curvas de amplificación y disociación obtenidas; se calculó el valor de C_t para cada muestra y se obtuvieron los niveles de expresión para cada genotipo.

7.10 Análisis estadístico

Se obtuvieron los parámetros bioquímicos para la población de estudio y se reportaron como media \pm desviación estándar o mediana [cuartil 3 – cuartil 1] según fue caso.

El riesgo cardiovascular es la probabilidad que tiene una persona de sufrir un evento cardiovascular en un periodo de 10 años. Se utilizó un método de puntuación para medirlo, el cual considera variables como edad, sexo, HDL colesterol, colesterol total, presión arterial, hábito de fumar y enfermedades metabólicas como la diabetes (51,52).

El índice cintura-cadera se obtuvo dividiendo lo que mide en centímetros el perímetro de la cintura a la altura de la última costilla flotante, y el perímetro máximo en centímetros de la cadera a nivel de los glúteos (53).

Por otro lado, se formaron tres grupos según el genotipo obtenido para cada SNP y se asociaron con los niveles de expresión para cada grupo. Se aplicó la prueba estadística *ANOVA de un factor* para determinar si existen diferencias significativas en la expresión de *SIRT1* y *TGF-β1* entre los tres grupos formados. Adicionalmente, se aplicó la prueba estadística *t-Student* para comparar la expresión entre dos grupos, realizando combinaciones entre los grupos para la comparación.

Finalmente, se determinaron los parámetros bioquímicos para cada grupo formado según el genotipo, y se determinó a través de pruebas estadísticas *ANOVA* y *t-Student* si existía diferencia en algún parámetro bioquímico.

Los análisis se realizaron con el software estadístico IBM SPSS Statistics 20.

8. Resultados

8.1 Descripción de la muestra

Se emplearon 127 muestras de adultos con edad promedio de 47 ± 8 años. En la tabla 11 se muestran los parámetros antropométricos (IMC, circunferencia de cintura, índice cintura-cadera, presión arterial sistólica, presión arterial diastólica y riesgo cardiovascular) y los parámetros bioquímicos (glucosa, triglicéridos, HDL colesterol, LDL colesterol y colesterol total) de la población estudiada. En el momento del estudio, los participantes no habían sido diagnosticados con DT2. Sin embargo; el IMC, índice cintura-cadera y LDL colesterol se encontraban por encima de los valores de referencia.

Parámetro	n=127	Valores de referencia
Edad (años)	47 ± 8 *	-
IMC (kg/m ²)	28.2 [25.3-32.5]	< 25 (54)
Índice cintura-cadera	M: 0.88 [0.84-0.92] H: 0.95 [0.92-1.00]	M: < 0.85 H: < 0.90 (53)
Presión arterial sistólica (mmHg)	110 [110-125]	≤ 120 mmHg (55)
Presión arterial diastólica (mmHg)	80 [70-80]	≤ 80 mmHg (55)
Riesgo cardiovascular	4.1 [2.3-7.3]	< 10 (52)
Glucosa (mg/dL)	94 [84-107]	< 126 mg/dL (56)
Triglicéridos (mg/dL)	132 [100-188]	< 150 mg/dL (57)
HDL colesterol (mg/dL)	M: 48 ± 14* H: 38 ± 7 *	M: > 50 mg/dL H: > 40 mg/dL (58)
LDL colesterol (mg/dL)	128 ± 32 *	< 110 mg/dL (59)
Colesterol total (mg/dL)	183 ± 44 *	< 200 mg/dL (59)

Tabla 11. Características generales de la población de estudio. Los datos se representan como mediana [Q1-Q3], excepto los señalados. * = Media ± Desviación Estándar; M= Mujeres; H= Hombres; IMC= Índice de Masa Corporal.

8.2 Extracción de ADN

Se extrajo satisfactoriamente el ADN de 127 muestras de sangre total congelada de los pacientes seleccionados en el estudio. Se obtuvieron concentraciones de entre 150 y 200 µg/mL del material genético, con una relación 260/280 de 1.8 y 1.9, lo cual indicó que estaba libre de contaminantes; en cuanto a la integridad, también fue buena y se demostró con el corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio (figura 6).



Figura 6. Muestras de ADN genómico en un gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio.

8.3 Extracción de ARN

En cuanto al ARN obtenido, se logró extraer de 100 a 300 $\mu\text{g/mL}$ a partir de cada muestra. La pureza dada por la relación 260/280, arrojó valores de entre 1.8 y 1.9. La integridad del ARN se apreció a través de un gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio, en el cual se observan las subunidades 18S y 28S características de este ácido nucleico (figura 7).

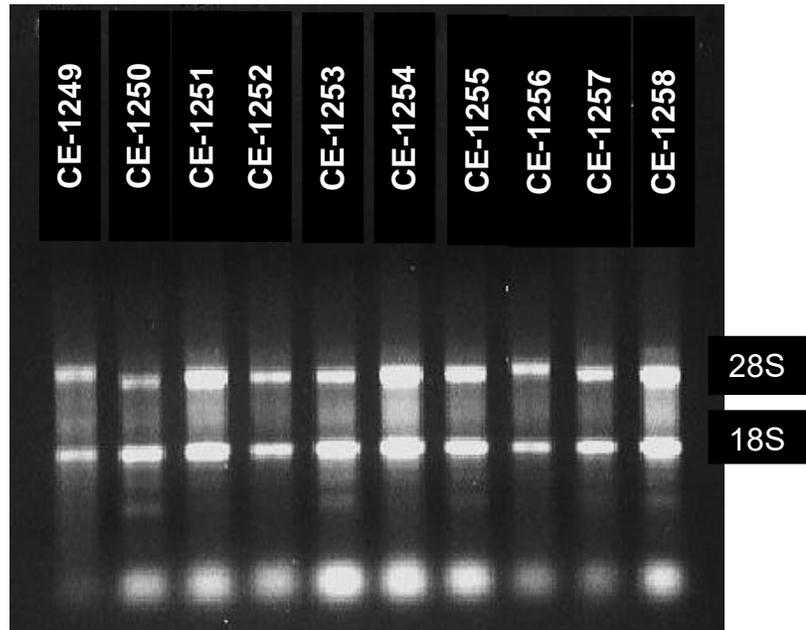


Figura 7. Muestras de ARN después de un corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio.

8.4 Genotipificación de los rs3758391 y rs1800470

Después de realizar la genotipificación para cada SNP se obtuvo la siguiente distribución de frecuencias: Para el rs3758391 40.9% homocigotos en el alelo ancestral (TT), 44.9% heterocigotos (TC) y 14.2% homocigotos para la variante (CC) (figura 8), mientras que para el rs1800470 se obtuvieron 30.2% homocigotos para el alelo ancestral (CC), 52.4% heterocigotos (TC) y 17.5% homocigotos para la variante (TT) (figura 9). Posteriormente, se determinó si las frecuencias genotípicas cumplían con el Equilibrio de Hardy-Weinberg, obteniéndose los siguientes valores para la distribución de Chi-cuadrada; $\chi^2=0.14$ ($p=0.709$) para el rs3758391 y $\chi^2=0.53$ ($p=0.467$) para el rs1800470 (60); por lo tanto, ambos SNPs están en equilibrio de Hardy-Weinberg.

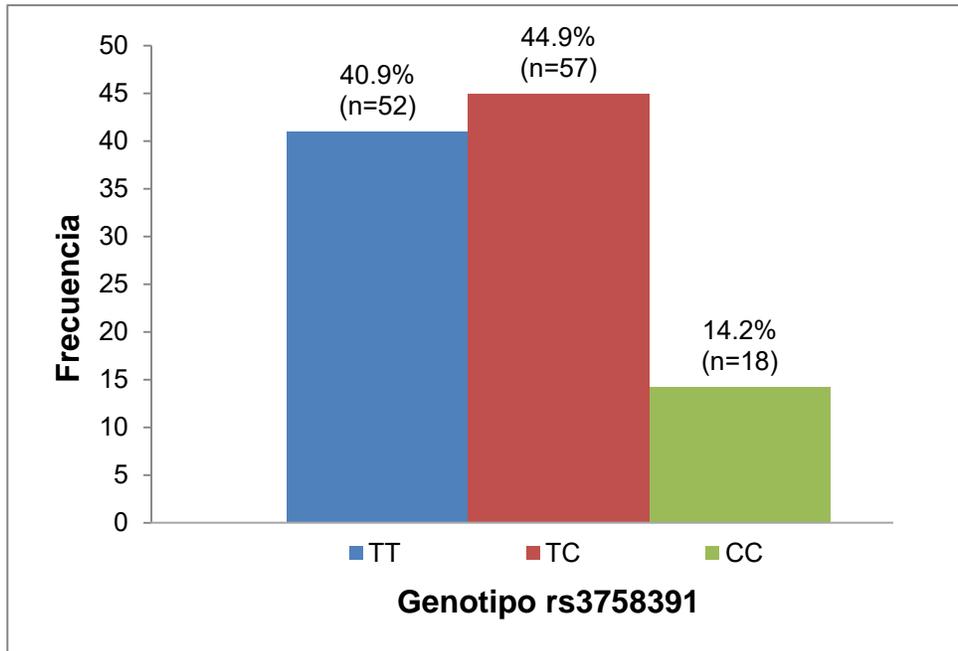


Figura 8. Distribución de frecuencias genotípicas para el rs3758391 T>C. n=127

La muestras están en equilibrio de Hardy-Weinberg (p=0.709).

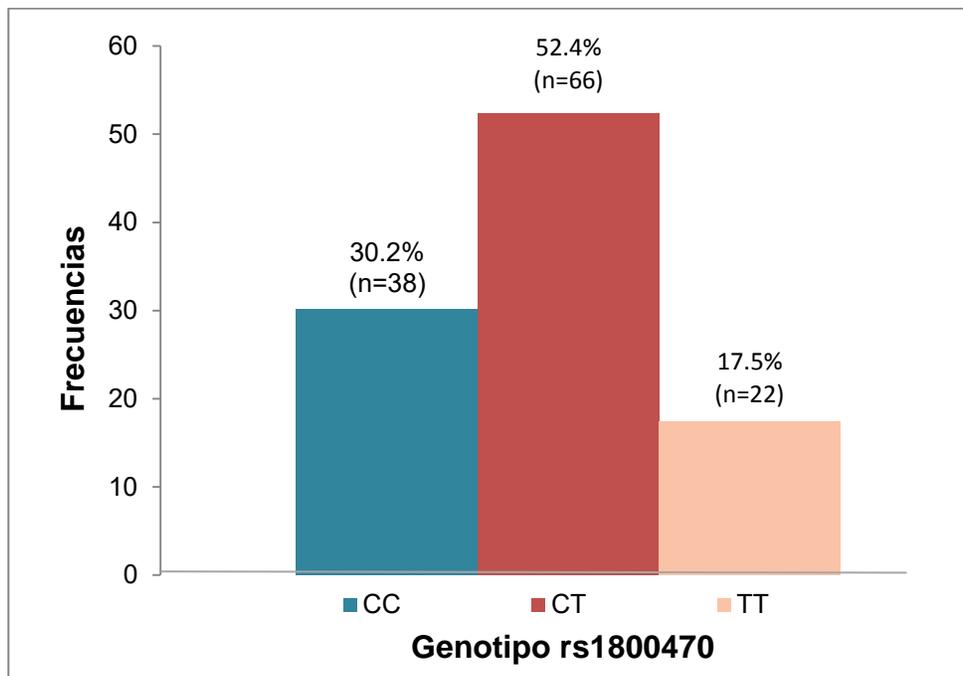


Figura 9. Distribución de frecuencias genotípicas para el rs1800470 C>T n=126

Las muestras están en equilibrio de Hardy-Weinberg (p=0.467).

8.5 Análisis de expresión genética

8.5.1 Expresión relativa de *SIRT1* vs. genotipo

Se determinó la expresión de *SIRT1* para 52 muestras totales agrupadas según el rs3758391; 17 homocigotos para el alelo ancestral (TT), 18 heterocigotos (TC) y 17 homocigotos para el alelo variante (CC) (figura 10). La expresión se calculó en unidades relativas de expresión, con respecto al gen endógeno *PGK1*. Se usó al homocigoto para la variante (CC) como referencia para el análisis de expresión, debido a que el alelo C no ha sido asociado con DT2 en la población mexicana (38).

Después de asegurarse que los niveles de expresión por genotipo seguían una distribución normal, se aplicó la prueba estadística *ANOVA de un factor*, para determinar si existía diferencia en la expresión de *SIRT1* con respecto al genotipo; los resultados señalaron diferencias significativas entre los tres grupos ($p=0.006$), por lo que se aplicó una *t-Student* para corroborar las diferencias; esta última prueba confirmó las diferencias entre los grupos TT y CC ($p=0.001$), además se observa que la expresión de *SIRT1* en el grupo homocigoto para el ancestro (TT) es el doble de la expresión para CC (1.8 ± 0.6).

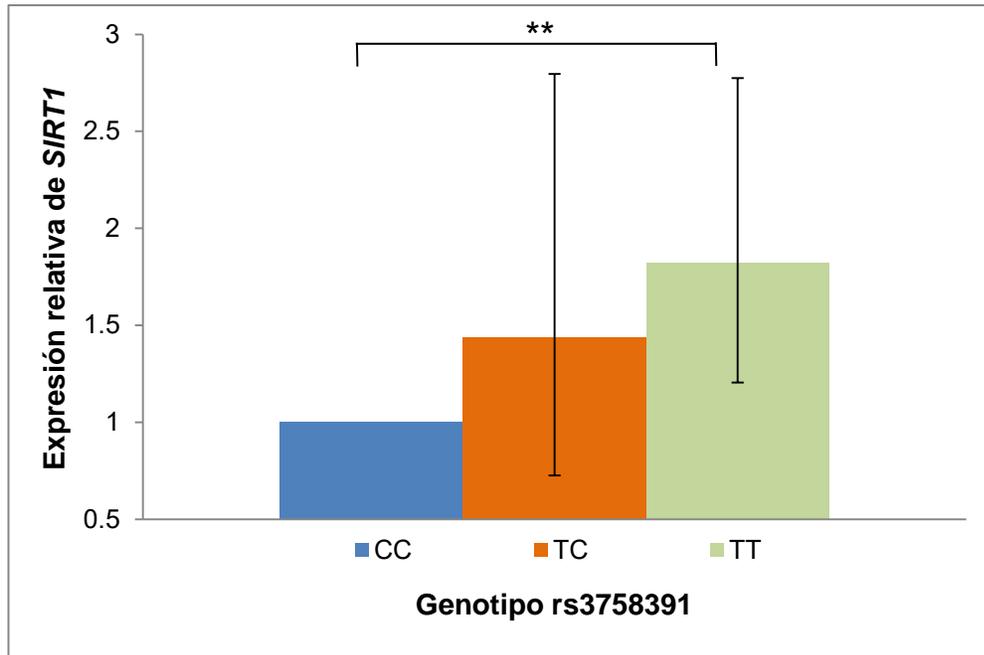


Figura 10. Expresión relativa de *SIRT1* para el rs3758391 T>C. TT (n=17), TC (n=18), CC (n=17). **p=0.001 TT vs CC análisis por *t-Student*.

8.5.2 Expresión relativa de *TGF-β1* vs. genotipo

Se determinó la expresión relativa del gen *TGF-β1* con respecto al gen endógeno *PGK1* en 66 muestras del ADNc sintetizado previamente a partir de las muestras de ARN. Las muestras se agruparon según su genotipo para el rs1800470, por lo que resultaron 22 homocigotos para el alelo ancestral (CC), 22 heterocigotos (CT) y 22 homocigotos para el alelo variante (TT) (figura 11).

Debido a que los datos seguían una distribución normal, se aplicó la prueba estadística *ANOVA de un factor* para determinar si existían diferencias entre los tres grupos en la expresión de *TGF-β1* con respecto al genotipo. Los resultados señalaron diferencias significativas entre los tres grupos (p=0.018), por lo que a través de una *t-Student* se determinó que existían diferencias significativas entre los grupos CC y TT (p=0.005), además se encontró que el grupo CC también es estadísticamente diferente al grupo heterocigoto CT (p=0.047).

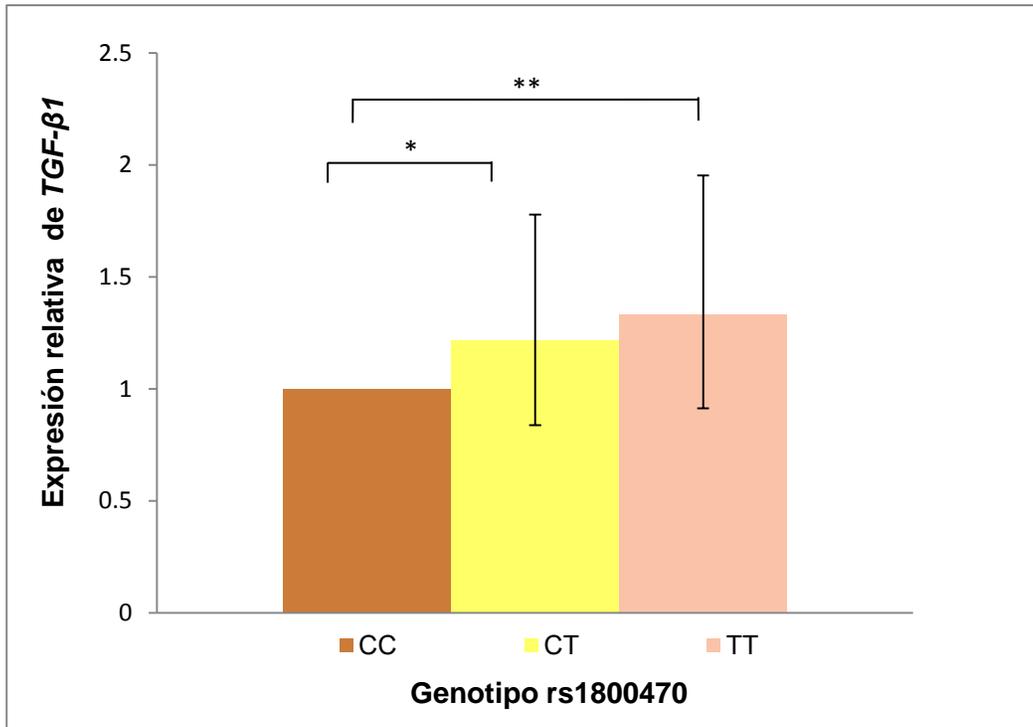


Figura 11. Expresión relativa de *TGF-β1* para los genotipos del rs1800470 C>T. CC (n=22), CT (n=22), TT (n=22). **p=0.005 CC vs TT, *p=0.047 CC vs CT análisis por *t-Student*.

8.6 Parámetros antropométricos y bioquímicos vs. genotipo

8.6.1 rs3758391 (Gen *SIRT1*)

Para buscar una posible asociación de los alelos del rs3758391 con algún parámetro antropométrico o bioquímico, se agruparon las muestras de acuerdo al genotipo; TT, CT y CC. Los grupos se compararon haciendo uso de la prueba *ANOVA de un factor* (para variables con distribución normal) o *Kruskal-Wallis* (para variables que no muestran distribución normal) según fue el caso. Los resultados se muestran en la tabla 12.

No se observan diferencias significativas en parámetros asociados con DT2 como son; IMC, glucosa, triglicéridos, colesterol, presión arterial y riesgo cardiovascular. Sin embargo, se aprecian diferencias estadísticamente significativas en el índice cintura

cadera, específicamente en el género masculino ($p=0.022$), por lo que a través de la prueba estadística *U de Mann Whitney* (la variable no sigue una distribución normal) se confirmó que existe aumento significativo del índice cintura-cadera en el grupo heterocigoto (CT) respecto al homocigoto para el alelo ancestral (TT) ($p=0.004$). Estos resultados se encuentran en la figura 12.

	rs3758391			
	TT	TC	CC	p
Parámetro	n=52 M=37, H=15	n=57 M=43, H=14	n=18 M=11, H=7	-
Edad (años)	47 ± 8	46 ± 8	49 ± 10	0.310*
IMC	27.8 [23.5-32.2]	28.5 [25.5-33.0]	27.0 [24.7-31.3]	0.353†
Índice cintura-cadera	M: 0.88 [0.84-0.91] H: 0.93 [0.89-0.96]	M: 0.88 [0.84-0.91] H: 0.98 [0.95-1.02]	M: 0.90 [0.84-0.95] H: 0.95 [0.93-1.00]	0.628† 0.022†
Presión arterial sistólica (mmHg)	120 [110-130]	110 [110-120]	110 [110-120]	0.343†
Presión arterial diastólica (mmHg)	80 [70-80]	80 [70-80]	75 [70-80]	0.811†
Riesgo cardiovascular	4.3 [2.6-6.9]	3.1 [2.2-8.1]	6.5 [3.2-10.7]	0.377†
Glucosa (mg/dL)	96 [86-109]	96 [87-107]	87 [82-96]	0.244†
Triglicéridos (mg/dL)	131 [91-182]	143 [110-201]	119 [94-161]	0.265†
HDL colesterol (mg/dL)	M: 50 ± 14 H: 37 ± 6	M: 47 ± 13 H: 35 ± 12	M: 45 ± 14 H: 39 ± 5	0.523* 0.632*
LDL colesterol (mg/dL)	126 ± 34.5	130.5 ± 32	122.8 ± 25	0.607*
Colesterol total (mg/dL)	180 ± 44	189.5 ± 46.8	170.2 ± 26.5	0.212*

Tabla 12. Parámetros bioquímicos y antropométricos agrupados por genotipo para el rs3758391 T>C. El alelo asociado a riesgo es T. El valor de p representa la comparación entre los tres grupos. * = Prueba estadística ANOVA de un factor; † = Prueba estadística Kruskal-Wallis; M= Mujeres; H= Hombres.

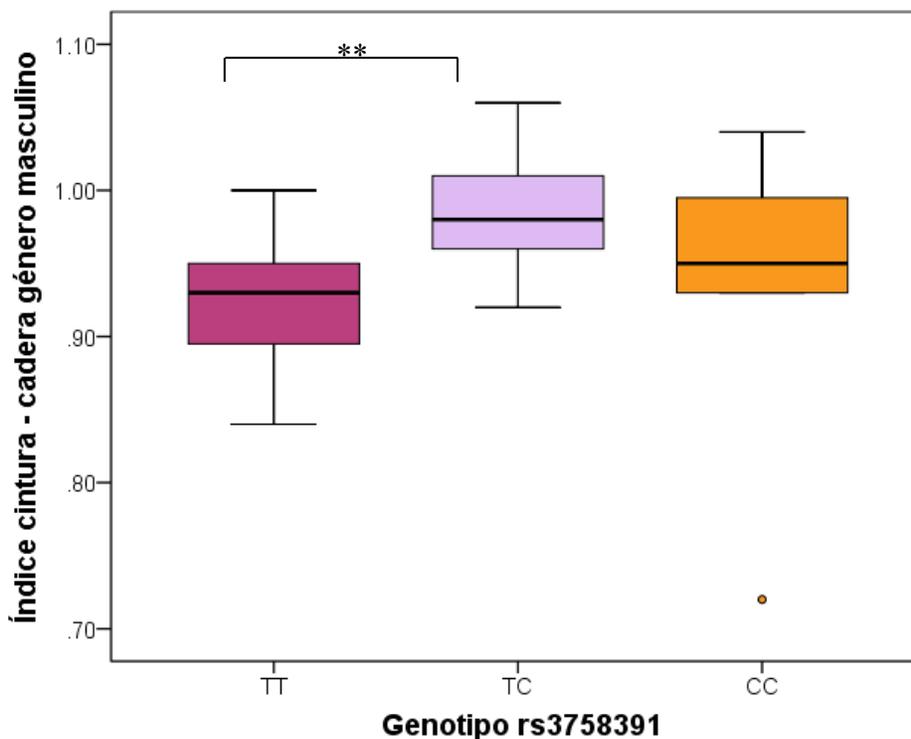


Figura 12. Índice cintura-cadera del género masculino vs. genotipo del rs3758391.

**p=0.004 TT vs TC análisis por *U de Mann Whitney*.

8.6.2 rs1800470 (Gen *TGF-β1*)

Se formaron tres grupos de acuerdo al genotipo para el rs1800470 (CC, CT y TT) y se compararon de acuerdo a parámetros antropométricos y bioquímicos a través de la prueba estadística *ANOVA de un factor* o *Kruskal-Wallis*. Los resultados se muestran en la tabla 13.

No se observan diferencias significativas para ninguna de las variables. Sin embargo, los niveles de triglicéridos, muestran una tendencia a aumentar en individuos homocigotos para el alelo C (p=0.056), por lo que se aplicó la prueba estadística *U de Mann-Whitney* (la variable no tenía una distribución normal) para conocer con mayor precisión la diferencia entre los grupos. La prueba demostró diferencias significativas (p=0.028) entre los grupos CC vs CT (figura 13).

	rs1800470			
	CC	CT	TT	p
Parámetro	n=38 M=21, H=17	n=66 M=52, H=14	n=22 M=18, H=4	-
Edad (años)	47 ± 8	46 ± 9	50 ± 8	0.177*
IMC	27.9 [25.0-32.4]	28.3 [26.0-32.9]	26.4 [24.4-32.0]	0.397†
Índice cintura-cadera	M: 0.89 [0.86-0.93] H: 0.93 [0.91-0.99]	M: 0.88 [0.84-0.91] H: 0.96 [0.93- 0.98]	M: 0.89 [0.84-0.93] H: 0.98 [0.90-1.00]	0.599† 0.618†
Presión arterial sistólica (mmHg)	113 [110-130]	110 [105-120]	115 [100-130]	0.641†
Presión arterial diastólica (mmHg)	80 [70-80]	75 [70-80]	80 [70-80]	0.892†
Riesgo cardiovascular	5.8 [3.1-8.8]	3.2 [1.8-7.3]	4.1 [2.3-5.9]	0.089†
Glucosa (mg/dL)	94 [89-108]	96 [84-109]	89 [81-102]	0.180†
Triglicéridos (mg/dL)	157 [112-232]	130 [96-168]	121 [87-185]	0.056†
HDL colesterol (mg/dL)	M: 50 [42-63] H: 38 [34-40]	M: 44 [36-56] H: 37 [34-42]	M: 49 [38-59] H: 39 [28-45]	0.196† 0.987†
LDL colesterol (mg/dL)	133 ± 28	125 ± 36	125 ± 26	0.487*
Colesterol total (mg/dL)	190 [163-217]	175 [150-205]	179 [152-210]	0.208†

Tabla 13. Parámetros bioquímicos y antropométricos agrupados por genotipo para el rs1800470 C>T. El alelo asociado a riesgo es T. El valor de p representa la comparación entre los tres grupos. * = Prueba estadística ANOVA *de un factor*; † = Prueba estadística *Kruskal-Wallis*; M= Mujeres; H= Hombres.

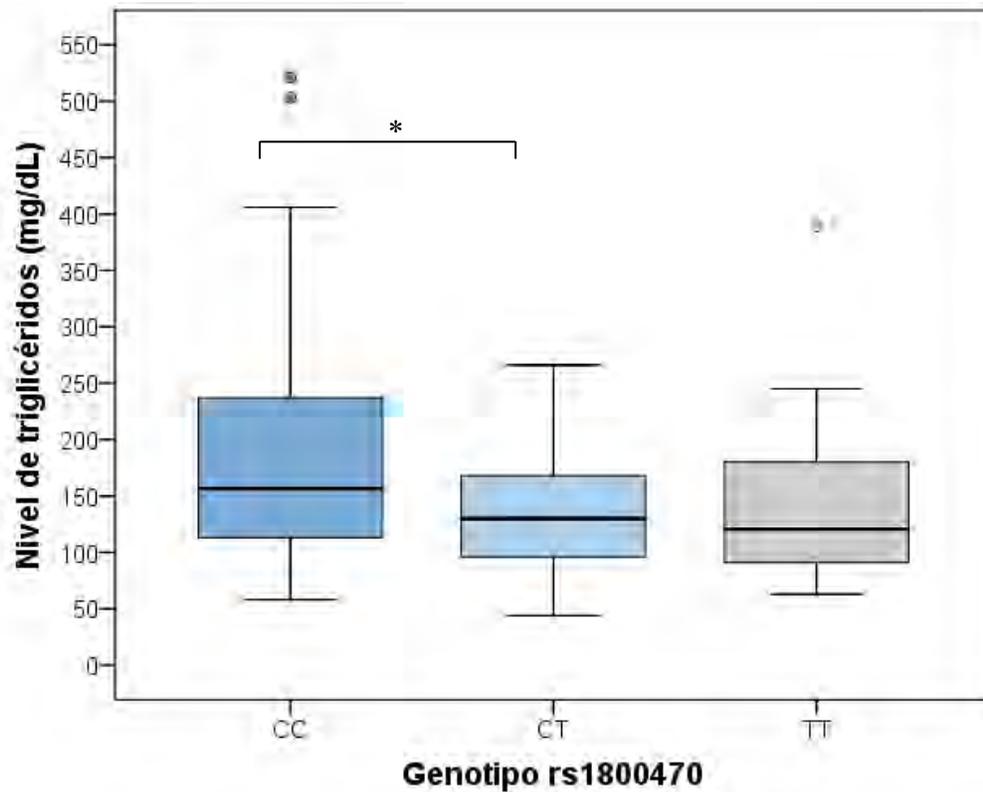


Figura 13. Nivel de triglicéridos vs genotipo del rs1800470. * $p=0.028$ CC vs CT análisis por *U de Mann Whitney*.

9. Discusión

9.1 Parámetros antropométricos y bioquímicos de la población de estudio

Existen parámetros antropométricos (IMC, circunferencia de cintura, índice cintura-cadera, presión arterial y riesgo cardiovascular) y bioquímicos (glucosa, triglicéridos, HDL colesterol, LDL colesterol y colesterol total) que han sido relacionados con el riesgo a padecer DT2. La alteración de uno o varios de estos factores son indicadores de la existencia de anomalías en el metabolismo de los carbohidratos y lípidos principalmente, por lo que la medición de éstos ayuda a la detección temprana de prediabetes o DT2 en individuos asintomáticos (61).

En el presente estudio, se incluyeron individuos que no habían sido diagnosticados con DT2; sin embargo, se observan algunos parámetros ligeramente alterados, lo que implica que una proporción de estos individuos tiene altas posibilidades de desarrollar esta enfermedad en un futuro. Este aumento en el riesgo, puede parcialmente atribuirse a que la edad promedio de los participantes es de 47 ± 8 años (tabla 11). Diversos estudios han determinado con certidumbre que ser mayor de 45 años es un factor de riesgo para DT2 (56,62).

Por otra parte, el IMC resulto ser de 28.2 [25.3 – 32.5]. Este resultado, en conjunto con un elevado índice cintura-cadera tanto en hombres como en mujeres, indican que este grupo de personas ya presentan factores de riesgo para DT2 por ejemplo; una acumulación anormal de grasa abdominovisceral que conlleva a obesidad y por lo tanto riesgo a padecimientos cardiovasculares, lo cual ya se han visto fuertemente asociados en múltiples trabajos (53,54,59). Además de esto, los niveles de LDL colesterol están por encima del valor de referencia, mientras que el HDL colesterol por debajo, lo cual coincide con la predisposición que se ha visto en la población mexicana para presentar dislipidemias (63,64).

Estos valores de los parámetros antropométricos y bioquímicos nos indican que a pesar de que la población estudiada no ha sido diagnosticada con DT2, ya presenta factores de riesgo para dicha enfermedad.

9.2 Los rs3758391 y rs1800470 están en equilibrio de Hardy-Weinberg

Se calculó la distribución de Chi-cuadrada para los SNPs rs3758391 y rs1800470, encontrándose que los polimorfismos cumplen con las distribuciones esperadas según el

equilibrio de Hardy-Weinberg (figura 8 y 9). Esto indica que la elección de las muestras en este estudio fue adecuada.

El cumplimiento del Equilibrio de Hardy-Weinberg, implica que las proporciones genotípicas obtenidas no cambia de generación en generación, a menos que haya algún factor externo en la población que haga que este equilibrio se modifique (65). Esta ley se ha tomado como un criterio para conferir validez a las asociaciones genotipo-fenotipo en los estudios de asociación genómica, que en este caso sería la asociación con el riesgo a padecer DT2 (66).

9.3 La expresión de *SIRT1* aumenta en la población homocigota para el alelo T del rs3758391.

Los resultados señalan cambios estadísticamente significativos en la expresión del gen *SIRT1* al comparar al genotipo CC vs TT ($p=0.001$); además para el grupo de los heterocigotos (TC) también se observa un aumento en la expresión. Aunque este aumento no es estadísticamente significativo respecto al comparador (CC). Este resultado indica que el aumento en la expresión del gen es relevante solo hasta poseer dos copias del alelo de riesgo (alelo T). Es importante hacer notar que la mayor dispersión en la expresión se encontró en el grupo de los heterocigotos.

Los cambios en la expresión de *SIRT1* en relación con el genotipo del rs3758391 que se observaron en la población adulta de este estudio, concuerdan con un trabajo previo a éste, realizado en una población infantil, donde se observó aumento en la expresión del gen cercano al doble con respecto al comparador (CC) (1.99 ± 0.68) (12). Estos hallazgos indican que existe una relación entre el genotipo de riesgo para DT2 y el incremento de expresión del gen, además esta relación no se modifica con la edad de los individuos y solo depende de su genotipo. Sin embargo, un estudio realizado en adultos mayores (56

a 92 años de edad) indica cambios en los niveles de la proteína SIRT1, en comparación con niños y adultos de mediana edad (de 3 a 55 años de edad). Por lo que establecen, que los cambios en los niveles de SIRT1 son controlados durante un largo periodo de tiempo en la vida de los individuos y su expresión incrementa dramáticamente en edad avanzada (67,68).

El aumento en la expresión de *SIRT1* observado en este estudio, podría reflejar una mayor actividad de la proteína. Por lo que este a su vez, permitiría la deacetilación de factores de transcripción que son reguladores clave para la activación de la gluconeogénesis. Por ejemplo; *CREB* y su coactivador *CRTC-2* que a su vez estimulan a genes promotores gluconeogénicos como *PEPCK* y *G6P* cuya función es mantener los niveles de glucosa elevados durante estados de ayuno (31,69,70). Por lo tanto, aunque la elevación de la gluconeogénesis en ayuno puede tener un efecto positivo, su expresión crónica estaría estimulando genes gluconeogénicos que conllevan a un estado de hiperglucemia prolongado y por lo tanto el riesgo de padecer DT2 (69, 71).

Por otro lado, los análisis de expresión en este estudio se realizaron en muestras de sangre, por lo que sería necesario analizar la asociación del genotipo de riesgo TT con la expresión de *SIRT1* en otros tejidos de importancia en DT2 como páncreas, hígado y tejido adiposo para determinar si se observa la misma relación entre genotipo y expresión, además de realizar una cuantificación de la actividad de SIRT1 en los individuos estudiados.

9.4 La expresión de *TGF-β1* aumenta en la población heterocigota CT y en la población homocigota para el alelo T del rs1800470.

Los cambios en la expresión de *TGF-β1* obtenidos en la población adulta de este trabajo, coinciden con el estudio previo a este, realizado en una población infantil, donde se

observó aumento en la expresión del gen en el grupo TT (2.0 ± 0.2) al compararlo con el grupo CC de referencia (11). A pesar que el incremento observado para el grupo TT en este trabajo es menor (1.3 ± 0.5), la diferencia es estadísticamente significativa ($p=0.005$) respecto a la referencia. Por otra parte el grupo heterocigoto (CT) también muestra aumento estadísticamente significativo, por lo que basta una sola copia del alelo de riesgo T para que exista un efecto en la expresión de *TGF- β 1*.

Los resultados de la expresión observados tanto en la población infantil del estudio anterior, como en la población adulta de este trabajo, señalan que la expresión del gen *TGF- β 1* no es dependiente de la edad. Sin embargo, se ha visto en algunas células cerebrales de ratones que *TGF- β 1* aumenta conforme la edad y en algunos casos, con el estado de inflamación (72,73); aunque una posible explicación del contraste en la expresión genética en estos estudios, es que los ensayos de expresión se realizaron en muestras de sangre y se debe tomar en cuenta que, cada célula tiene patrones de expresión únicos para un mismo gen según sus necesidades fisiológicas, por lo que sería de interés explorar más detalladamente la asociación entre la expresión genética y la edad.

El aumento en la expresión del gen *TGF- β 1* y niveles altos de la proteína en suero asociados al alelo T del rs1800470, ya se ha observado en poblaciones de India y México (47,48). Estos cambios en la expresión de *TGF- β 1* favorecerán eventos intracelulares que suprimen la expresión de otros genes, entre los cuales se encuentra el gen de la insulina, el cual se ha sugerido es blanco de *TGF- β 1* y a través de Smad3 ocupa el promotor de este gen para reprimir su transcripción (74). Además, *TGF- β 1* suprime a factores que promueven la función óptima de las células β -pancreáticas, determinando así el riesgo de padecer DT2 en los individuos (75).

A pesar que en el estudio no se incluyen pacientes con DT2, se puede inferir que la presencia del alelo T del rs1800470, promueve la sobreexpresión de *TGF-β1*. Esto a su vez puede exacerbar en estos individuos el desarrollo de fibrosis renal y albuminuria, llevando al desarrollo de nefropatía diabética, una complicación muy común en pacientes con DT2 (76).

9.5 Parámetros antropométricos y bioquímicos vs. genotipo del rs3758391

El único parámetro que mostró diferencias significativas fue el índice cintura-cadera para el género masculino, en el cual se observa que el grupo heterocigoto (TC) presenta el valor más alto y es estadísticamente diferente respecto al grupo TT ($p=0.004$) (figura 12).

Debido a que el índice cintura-cadera es una medida antropométrica que refleja la distribución de la grasa intraabdominal, un aumento en este parámetro indica que los individuos heterocigotos para el rs3758391 presentan obesidad abdominal que se asocia con anomalías metabólicas como disminución de la tolerancia a la glucosa y sensibilidad disminuida de insulina y por tanto un mayor riesgo a padecer DT2 (53, 77).

Los resultados del estudio indican un aumento en el índice cintura-cadera en el grupo TC, este grupo presenta una sola copia del alelo de riesgo T. Es incierta la razón de este comportamiento, ya que no corresponde con los análisis de expresión del gen *SIRT1* realizados en los mismos individuos, donde se observó que es necesario poseer dos copias del alelo T para un aumento significativo en la expresión. Adicionalmente, el grupo que presentó el menor índice cintura-cadera fue el homocigoto para el alelo de riesgo T. Cabe señalar que el número de muestras para este análisis fue pequeño (127 muestras en total), por lo que es necesario aumentar el número de participantes, para que el poder estadístico de los datos sea mayor y por lo tanto, tener resultados más confiables.

9.6 Parámetros antropométricos y bioquímicos vs. genotipo del rs1800470

A pesar de que la población de estudio no tiene diagnóstico de DT2, presentan ligeras alteraciones en el perfil lipídico, que como se ha reportado conllevan a enfermedades cardiovasculares, una de las comorbilidades asociadas a DT2. A estas alteraciones se les denomina *dislipidemia diabética* y está relacionada con resistencia a la insulina y obesidad visceral (78,79).

En este trabajo, no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los parámetros considerados. Sin embargo, el valor de p al comparar los niveles de triglicéridos entre los genotipos fue de 0.056, por lo que se decidió realizar comparaciones por pares mediante *U de Mann Whitney* (los datos no tenían distribución normal). Este análisis mostró diferencias significativas entre los grupos CC vs CT ($p=0.028$) (figura 13).

Trabajos previos utilizando un mayor número de muestras y pacientes con DT2 en una población mexicana han reportado que el alelo T del rs1800470 está asociado con niveles altos de colesterol y triglicéridos (48). Por lo que para corroborar esta asociación en este estudio, sería necesario replicar el estudio de asociación entre los parámetros bioquímicos y el genotipo del rs1800470 con un mayor número de muestras para aumentar el poder estadístico.

10. Conclusiones

- La población de estudio presentó alteraciones en el IMC, índice cintura-cadera y LDL colesterol a pesar de no tener un diagnóstico de DT2.
- El genotipo TT del rs3758391 se asoció con un aumento en la expresión del gen *SIRT1*.

- El alelo T del rs1800470 se asoció con un aumento en la expresión del gen *TGF-β1*. Además la presencia de una sola copia de este alelo es suficiente para observar cambios significativos en la expresión del gen.
- La expresión de los genes *SIRT1* y *TGF-β1* no depende de la edad, solo se modificó por el genotipo del rs3758391 y rs1800470 respectivamente.

11. Perspectivas

- Replicar el estudio de asociación entre el alelo de riesgo T del rs3758391 y los niveles de expresión de *SIRT1* en otros tejidos como páncreas, hígado y tejido adiposo.
- Profundizar en el papel que juega *SIRT1* en el estudio de la activación a nivel transcripcional de genes gluconeogénicos.
- Medir la expresión del gen de insulina y compararlo con la expresión de *TGF-β1* para entender su señalización y por lo tanto su relación con DT2.
- Incluir un número mayor de muestras para aumentar el poder estadístico de los estudios de asociación entre los alelos de los SNPs estudiados y los parámetros bioquímicos y antropométricos.

12. Referencias

1. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 2004; 27(5): 1047-1053.
2. Aguilar CA, Hernández S, Hernández M, Hernández JE. Acciones para enfrentar a la diabetes. Documento de postura. México: Intersistemas; 2015: 27.
3. Olokoba AB, Obateru OA, Olokoba LB. Type 2 diabetes mellitus: a review of current trends. *Oman Med. J.* 2012; 27(4): 269-273.
4. Dirección General de Epidemiología. Boletín Epidemiológico. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Sistema único de información. Secretaría de Salud. 2016; 40(33): 43.
5. Bell CG, Walley AJ, Froguel P. The genetics of human obesity. *Nat. Rev. Genet.* 2005; 6(1): 221-234.
6. Longnecker MP, Daniela JL. Environmental contaminants as etiologic factors for diabetes. *Environ Health Perspect.* 2001; 109(1): 871-876.
7. Bi Y, Wang T, Xu M, Xu Y, Li M, Lu J, Zhu X, Ning G. Advanced research on risk factors of type 2 diabetes. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 2012; 28(1): 32-39.
8. Farmer Y, Avard D. Factores genéticos de la diabetes tipo 2: los avances científicos del proyecto DGDG. *Diabetes Voice.* 2008; 53(1): 31-33.
9. Hernández J, Martínez J, Valverde V. Polimorfismos reguladores y su participación en la patogenia de enfermedades complejas en la era posgenómica. *Salud Pública de México.* 2009; 51(3): s455-s462.
10. Ramírez J, Vargas G, Tovilla C, Fragoso JM. Polimorfismos de un solo nucleótido: Implicaciones funcionales de los SNP reguladores (rSNP) y de los SNP-ARN estructurales (srSNP) en enfermedades complejas. *Gac. Méd. de Méx.* 2013; 149(1): 220-228.

11. Morales VJ. Expresión genética de SIRT1, CAPN10 y VEGFA en una población infantil de la Ciudad de México. [Tesis]. México: Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. 2016; 53.
12. Soon M. Efecto de los parámetros bioquímicos y genómicos sobre la expresión génica de TGF- β 1, IGF2BP2 y SOD2 en una población infantil mexicana [Tesis]. México: Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. 2015; 65,67.
13. Eknoyan G, Nagy J. A history of Diabetes Mellitus or how a disease of the kidneys evolved into kidney disease. Adv. in Chr. Kid. Dise. 2005; 12(2): 223-229.
14. Diabetes in control. International Textbook of Diabetes Mellitus, 4^a ed. Excerpt #2: Classification of Diabetes Mellitus and Other Categories of Glucose Intolerance Part 2 of 6 [sitio web]. New Jersey: Diabetes in control [actualizado en diciembre de 2015; consultado 5 de enero de 2017]. Disponible en: <http://www.diabetesincontrol.com/classification-of-diabetes-mellitus/>
15. International Diabetes Federation. Atlas de la diabetes de la FID. 7^a ed. Venezuela: Karakas Print. 2015; 22-23.
16. World Health Organization. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Geneva: World Health Organization. 1999; 2-6.
17. Cruz M, García J, López E, Valladares A, Sánchez R, Wachter N, Aguilar R, Kumate J. Genes candidatos marcadores de susceptibilidad a la DT2. Rev. De Edu. Bioq. 2005; 24(3,4): 81-86.
18. Tusié MT. El componente genético de la DT2. Mensaje bioquímico. Depto. De Bioquímica, UNAM. 2008; 32(1): 59-66.

19. Sevilla SD. Metodología de los estudios de asociación genética. Rev. Insuf. Card. 2007; 2(3): 111-114.
20. Komar A. Single Nucleotide Polymorphisms. Methods and protocols. New York: Humana Press; 2009: 3-4.
21. International Society of Genetic Genealogy Wiki. Single-nucleotide polymorphism [sitio web]. International Society of Genetic Genealogy (ISOGG). [actualizado en enero de 2017; acceso 20 de Enero de 2017]. Disponible en: http://isogg.org/wiki/Single-nucleotide_polymorphism
22. Checa MA. Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex. 2007; 3(20): 213-221.
23. Sadee W, Wang D, Papp AC, Pinnsonneault JK, Smith RM, Moyer RA, Johnson AD. Pharmacogenomics of the RNA world: Structural RNA polymorphisms in drug therapy. Clin. Pharmacol. Ther. 2011; 89(3): 355-365.
24. La página de bioquímica médica. Control de la expresión génica en eucariotas [sitio web]. The medical biochemistry page, LLC. [actualizado el 30 de abril de 2016; acceso 24 de enero de 2017]. Disponible en: <http://themedicalbiochemistrypage.org/es/gene-regulation-sp.php>
25. Alcoceba M. Estudio de polimorfismos genéticos en la evolución clínica de pacientes sometidos a trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos [tesis doctoral]. Salamanca: Universidad de Salamanca, Departamento de Medicina. 2010; 5.
26. Cruz D. Conferencia. Regulación de la expresión génica en eucariontes. [sitio web]. Instituto de Gastroenterología. [acceso 24 de enero de 2017]. Disponible en: http://fbio.uh.cu/sites/genmol/confs/conf7/index_euc.htm
27. Mesa V, Barros P, Medina C. Metilación del ADN: Marcador diagnóstico y pronóstico de cáncer. Gac. Méd. Méx. 2006; 1(142): 81-82.

28. Rodríguez M, Téllez N, Cerbón M, López M, Cervantes A. Metilación del ADN: un fenómeno epigenético de importancia médica. *Rev Invest. Clin.* 2004; 56(1): 56-71.
29. Clancy S. DNA transcription. *Nature Education.* 2008; 1(1): 41.
30. Nature Education. DNA transcription [sitio web]. *Nature Education* 2013. [acceso 25 de enero de 2017]. Disponible en: http://www.nature.com/scitable/resource?action=showFullImageForTopic&imgSrc=/scitable/content/ne0000/ne0000/ne0000/ne0000/105291889/44350_36b.jpg
31. Nakagawa T, Guarente L. Sirtuins at a glance. *J. Cell Sci.* 2011; 124(6): 833-838.
32. Bellet M, Masri S, Astarita G, Sassone P, Della M, Servillo G. Histone deacetylase SIRT1 controls proliferation, circadian rhythm, and lipid metabolism during liver regeneration in mice. *J. Biol. Chem.* 2016; 44(291): 23318-23329.
33. Hallows W, Lee S, Denu J. Sirtuins deacetylate and activate mammalian acetyl-CoA synthetases. *PNAS.* 2006; 27(103): 10230-10235.
34. Nacional Center for Biotechnology Information. SIRT1 sirtuin 1 [Homo sapiens (human)] [sitio web]. NCBI. [actualizado el 29 de enero de 2017; acceso 30 de enero de 2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/23411>
35. Zillikens M, Meurs J, Rivadeneira F, Amin N, Hofman A, Oostra B, Sijbrands E, Witteman J, Pols H, Duijin C, Uitterlinden A. SIRT1 Genetic variation is related to BMI and risk to obesity. *Diabetes.* 2009; 58(1): 2828-2834.
36. Zillikens M, Meurs J, Sijbrands E, Rivadeneira F, Dehghan A, Leeuwen J, Hofman A, Duijin C, Witteman J, Uitterlinden A, Pols H. SIRT1 genetic variation and mortality in type 2 diabetes: interaction with smoking and dietary niacin. *Free. Radic. Biol. Med.* 2009; 46(1): 836-841.

37. Lin R, Yan D, Zhang Y, Liao X, Gong G, Hu J, Fu Y, Cai W. Common variants in SIRT1 and human longevity in a Chinese population. *BMC Med. Genet.* 2016; 17(31): 2-7.
38. Cruz M, Valladares A, García J, Ross K, Edwards M, Ángeles J, Ortega C, Escobedo J, Burguete A, Wachter N, Ambriz R, Rivera R, D'artote A, Peralta J, Parra E, Kumate J. 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(1): 261-270.
39. García J, Barbier L, Fernández S, Gutierrez V, Monte M, Halilbasic E, Herranz D, Álvarez L, Aspichueta P, Marin J, Trauner M, Mato J, Serrano M, Beraza N, Chantar M. SIRT1 controls liver regeneration by regulating bile acid metabolism through farnesoid X receptor and mammalian target of rapamycin signaling. *Hepatology.* 2014; 59(1): 1972-1983.
40. Jin J, Lakova P, Jiang Y, Medrano E, Timchenko N. The reduction of SIRT1 in livers of old mice leads to impaired body homeostasis and to inhibition of liver proliferation. *Hepatology.* 2011; 54(1): 989-998.
41. Bordone L, Motta M, Picard F, Robinson A, Jhala U, Apfeld J, McDonagh T, Lemieux M, McBurney M, Szilvasi A, Easlson E, Lin S, Guarente L. Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic β cells. *Plos biol.* 2006; 2(4): 210-220.
42. Peralta O, Lagunas A, Madrid V. Factor de crecimiento transformante beta-1: Estructura, función y mecanismos de regulación en cáncer. *Salud Pública de Méx.* 2001; 4(43): 340-351.
43. Poniatowski A, Wojdasiewicz P, Gasik R, Szukiewicz D. Transforming Growth Factor Beta Family: Insight into the role of growth factors in regulation of fracture healing biology and potential clinical applications. *Mediators Inflamm.* 2015; 2015(1): 1-17.

44. Sutariya B, Jhonsa D, Saraf M. TGF- β : the connecting link between nephropathy and fibrosis. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2016; 38(1): 39–49.
45. Nacional Center for Biotechnology Information. TGFB1 transforming growth factor beta 1 [Homo sapiens (human)]. [sitio web]. NCBI. [actualizado el 5 de febrero de 2017; acceso 6 de febrero de 2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7040>
46. Ward L, Kellis M. HaploReg: A resource for exploring chromatin states, conservation, and regulatory motif alterations within sets of genetically linked variants. *Nucleic Acids Res*. 2012; 40(D1): D930-D934.
47. Raina P, Sikka R, Kau R, Sokhi J, Matharoo K, Singh V, Bhanwer A. Association of Transforming Growth Factor Beta-1 (TGF- β 1) genetic variation with type 2 diabetes and end stage renal disease in two large population samples from North India. *OMICS: J. Inte. Biol*. 2015; 5(19): 306-317.
48. Valladares A, Martínez J, Rosas M, García J, Utrera D, Gómez R, Escobedo J, Parra J, Cruz M. Association of polymorphisms within the transforming growth factor- β 1 gene with diabetic nephropathy and serum cholesterol and triglyceride concentrations. *Nephrology*. 2010; 15(1): 644-648.
49. Babel N, Gabdrakhmanova L, Hammer MH, Schoenemann C, Skrypnikov V, Poliak N, Volk HD, Reinke P. Predictive value of cytokine gene polymorphisms for the development of end-stage renal disease. *J. Nephrol*. 2006; 19(6): 802-807.
50. Coll E, Cormand B, Campos B, González D, Iñigo P, Botey A, Poch E. Association of TGF-beta1 polymorphisms with chronic renal disease. *J. Nephrol*. 2004; 17(6): 794-799.
51. Álvarez A. Las tablas de riesgo cardiovascular. Una revisión crítica. *MEDIFAM*, 2001; 3(11): 122-139.
52. Consejo de Salubridad General. Detección y estratificación de factores de riesgo cardiovascular. *Guía de Práctica Clínica*. 2012: 4.

53. World Health Organization. Waist circumference and waist-hip ratio. Geneva: World Health Organization. 2008: 27,30.
54. Organización Mundial de la Salud. Obesidad y sobrepeso. [sitio web]. Organización Mundial de la Salud. [acceso 24 de Abril de 2017]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>
55. Organización Mundial de la Salud. Preguntas y respuestas sobre hipertensión. [sitio web]. Organización Mundial de la Salud. [acceso 27 de Abril de 2017]. Disponible en: <http://www.who.int/features/qa/82/es/>
56. Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010. Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes. Diario Oficial de la Federación. 24 de Marzo de 2009.
57. Mérida FJ, Moreno EE. Manual para técnico superior de laboratorio clínico y biomédico. Madrid: Médica Panamericana; 2015: 557.
58. American Heart Association. ¿Qué significan mis niveles de colesterol? [sitio web]. American Heart Association [acceso 5 de Mayo de 2017]. Disponible en: http://www.heart.org/idc/groups/heartpublic/@wcm/@hcm/documents/downloadable/ucm_480466.pdf
59. Gómez A, Casas MC, Gómez P. Ángel. Interpretación Clínica del Laboratorio. 8ª ed. Colombia: Médica Panamericana; 2014: 147-150.
60. Rodriguez S, Gaunt T, Day I. Hardy-Weinberg Equilibrium Testing of Biological Ascertainment for Mendelian Randomization Studies. [sitio web]. American Journal of Epidemiology. [acceso 31 de Marzo de 2017]. Disponible en: <http://www.oege.org/software/hardy-weinberg.html>

61. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes 2017. *Diabetes Care*. 2017; 40(1): S11-S15.
62. Instituto Nacional de Salud Pública. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino. ENSANUT MC. 2016: 46-53.
63. Weissglas D, Aguilar C, Nikkola E, Deere KA, Cruz-Bautista I, Arellano-Campos O, Muñoz-Hernandez LL, Gomez-Munguia L, Ordoñez-Sánchez ML, Reddy PM, Lusic AJ, Matikainen N, Taskinen MR, Riba L, Cantor RM, Sinsheimer JS, Tusie-Luna T, Pajukanta P. Genomic study in Mexicans identifies a new locus for triglycerides and refines European lipid loci. *J. Med. Genet.* 2013; 50(5): 298-308.
64. Parra E, Mazurek A, Gignoux C, Sockell A, Agostino M, Morris A, Petty L, Hanis C, Cox N, Valladares A, Below J, Cruz M. Admixture mapping in two Mexican samples identifies significant associations of locus ancestry with triglyceride levels in the BUD13/ZNF259/APOA5 region and fine mapping points to rs964184 as the main driver of the association signal. *PLoS ONE*. 2017; 12(2): 1-16.
65. Nussbaum R, McInnes R, Williard H. Thompson & Thompson. *Genética en medicina*. 5ª ed. Barcelona: Masson; 2005: 103-111.
66. Barbadilla A. *Genética de poblaciones. Conceptos: Desviación H-W*. [sitio web]. Universidad Autónoma de Barcelona. [acceso 31 de Marzo de 2017]. Disponible en: <http://bioinformatica.uab.es/base/base3.asp?sitio=geneticapoblacion&anar=concep&item=DesvH-W>.
67. Kilic U, Gok O, Erenberk U, Dundaroz MR, Torun E, Kucukardali Y, Elibol-Can B, Uysal O, Dundar T. A Remarkable Age-Related Increase in SIRT1 Protein Expression

against Oxidative Stress in Elderly: SIRT1 Gene Variants and Longevity in Human. PLoS ONE. 2015; 10(3): 1-19.

68. Arda H, Li L, Tsai J, Torre E, Rosli Y, Peiris H. Age-dependent pancreatic gene regulation reveals mechanisms governing human β -cell function. Cell Metab. 2016; 23(5): 909-920.

69. Cantó C, Auwerx J. Targeting SIRT1 to improve metabolism: all you need is NAD⁺? Pharmacol. Rev. 2012; 64(1): 166-187.

70. Vilà L, Roca C, Elias I, Casellas A, Lage R, Franckhauser S, Bosch F. AAV-mediated *sirt1* overexpression in skeletal muscle activated oxidative capacity but does not prevent insulin resistance. Mol. Ther. Methods Clin. Dev. 2016; 16072(5): 1-9.

71. Sreter RA, Conkright MD, Katoh Y, Best JL, Canettieri G, Jeffries S, Guzman E, Niessen S, Yates JR, Takemori H, Okamoto M, Montminy M. The CREB coactivator TORC2 functions as a calcium- and cAMP sensitive coincidence detector. Cell. 2004; 119(1): 61-74.

72. Doyle K, Cekanaviciute E, Mamer L, Buckwalter S. TGF β signaling in the brain increases with aging and signals to astrocytes and innate immune cells in the weeks after stroke. J. of Neuroinflammation. 2010; 7(62): 1-13.

73. Tichauer J, Flores B, Soler B, Eugeni-von L, Ramírez G, Von Bernhardi R. Age-dependent changes on TGF β 1 Smad3 pathway modify the pattern of microglial cell activation. Brain Behav. Immun. 2014; 37(1): 187-196.

74. Lin H, Lee J, Yadav H, Kamaraju AK, Liu E, Zhigang D, Vieira A, Kim SJ, Collins H, Matschinsky F, Harlan DM, Roberts AB, Rane SG. Transforming Growth Factor- β /Smad3

Signaling Regulates Insulin Gene Transcription and Pancreatic Islet β -Cell Function J. Biol. Chem. 2009; 18(284): 12246-12257.

75. Dhawan S, Dirice E, Kulkarni R, Bhushan A. Inhibition of TGF- β Signaling Promotes Human Pancreatic β -Cell Replication. Diabetes. 2016; 65(1): 1208-1218.

76. Hathaway CK, Gasim AM, Grant R, Chang AS, Kim HS, Madden VJ, Bagnell CR Jr, Jennette JC, Smithies O, Kakoki M. Low TGF β 1 expression prevents and high expression exacerbates diabetic nephropathy in mice. PNAS. 2015; 112(11): 5815-5820.

77. Montalbán J. Índice cintura/cadera, obesidad y estimación del riesgo cardiovascular en un centro de salud de Málaga. Medicina de Familia. 2001; 3(2): 208-215.

78. Cuevas A, Alonso R. Dislipidemia diabética. Rev. Med. Clin. Condes. 2016; 27(2): 152-159.

79. Carmena R. Riesgo elevado de disfunción lipoproteica en la diabetes mellitus tipo 2. Rev. Esp. Cardiol. Supl. 2008; 8(C): 19-26.

13. Anexos

13.1 Anexo 1. Carta de consentimiento informado

INSTITUTO 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: Identificación de biomarcadores en prediabetes y diabetes tipo 2 mediante nuevas tecnologías metabólicas y metagenómicas.

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. En este proyecto, proponemos analizar en suero y orina sustancias producidas durante el metabolismo, obtener información sobre la flora microbiana intestinal e investigar la variación genómica en una muestra compuesta por 100 individuos con concentraciones normales de glucosa, 100 individuos con alteración de la glucosa en ayunas (prediabetes), y 100 individuos con diabetes. Con ello se pretende identificar nuevos factores de riesgo para parecer diabetes, y encontrar nuevos biomarcadores que puedan ser utilizados para predecir la enfermedad. Dada la alta prevalencia de diabetes en México, esto es de gran importancia desde el punto de vista de la salud pública. Para la realización del estudio estamos invitando a que participen individuos con y sin diabetes, por lo que usted pudiera ser un buen candidato. 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. También se le solicita una muestra de orina (se le proporcionará el tubo para la recolección de la muestra) y una muestra de material fecal (se le proporcionará el frasco y las indicaciones). 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 información personal (e.g. nombre, dirección, teléfono) será cuidadosamente resguardadas en el Laboratorio de la Unidad de Investigación en Bioquímica. En todas las bases de datos electrónicas, así como las muestras que

serán analizadas experimentalmente, 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.

Las muestras de DNA de la sangre y de las heces, plasma y orina se analizarán en nuestra Unidad de Investigación y parte de estas muestras se enviarán al laboratorio del Dr. Esteban Parra en el Departamento de Antropología de la Universidad de Toronto en Mississauga, ON, Canadá, para realizar otros estudios científicos que permitirán conocer como los estilos de vida actual han contribuido al desarrollo de obesidad e incremento de diabetes tipo 2 en nuestro país. Su muestra se identificará solamente con un código alfanumérico y su información personal y de contacto permanecerá resguardada en la “Unidad de Investigación Médica en Bioquímica”.

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, el Dr. Jesús Peralta Romero, 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 de los análisis de plasma, orina y heces contribuirán al avance en el conocimiento de los factores que incrementan la susceptibilidad al desarrollo de la diabetes tipo 2, y ayudaran a descubrir biomarcadores para mejorar nuestros modelos predictivos.

6. Resultados

- Evaluación clínica completa realizada por médicos especialistas.
- Resultados de laboratorio clínico impresos
- Explicación de los resultados y asesoría médica.
- 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.

Su usted decide participar y posteriormente deseara retirarse del estudio, usted lo puede hacer previa solicitud por escrito al Investigador Principal sin que esto afecte la atención que usted recibe por parte del IMSS. De igual manera usted podrá solicitar por escrito la destrucción de las muestras que no hayan sido utilizadas hasta el momento que usted decide retirar su consentimiento. Toda la información/resultados recabados antes de su retiro se consideraran parte de la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica y no podrán ser eliminados.

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. Miguel Cruz López investigador responsable, quién asignará su caso ante alguno de los médicos en turno para cualquier aclaración. El teléfono es el 56276900 ext. 21477o 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: comite.eticainv@imss.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 a un mejor 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 alícuotas de DNA (no comercialización, no ruptura del anonimato), las muestras de suero y orina, así como

las heces 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 alícuota de DNA, la muestra de orina y de heces para estudios futuros que pudieran realizarse dentro de los 10 años siguientes.

No autorizo se almacene la alícuota 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