



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO E INVESTIGACIÓN

HOSPITAL GENERAL "DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ"

"ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DE LOS GENES *KCNQ1*, *KCNJ11*, *CACNA1D* Y *CACNA1E* QUE CODIFICAN PARA LOS CANALES $K_{V1.9}$, K_{ATP} , $Ca_{v1.3}$ Y $Ca_{v2.3}$, COMO FACTOR DE RIESGO PARA DESARROLLAR DIABETES TIPO 2".

TÉSIS:

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN MEDICINA INTERNA

PRESENTA:

DR. JUAN DANIEL DÍAZ GARCÍA

ASESORES:

DR. RICARDO GONZÁLEZ RAMÍREZ

Departamento de Biología Molecular e Histocompatibilidad.
Hospital General "Dr. Manuel Gea González"

Dra. María Angélica Alfonsina Olivo Díaz

Departamento de Biología Molecular e Histocompatibilidad.
Hospital General "Dr. Manuel Gea González"

Ciudad de México, febrero de 2021



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.

HOSPITAL GENERAL "DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ"

AUTORIZACIONES



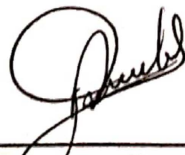
Dr. Héctor Manuel Prado Calleros
Director de Enseñanza e Investigación



Dr. José Pablo Maravilla Campillo
Subdirector de Investigación Biomédica



Dra. Erika Karina Tenorio Aguirre
Profesora titular del Curso de Medicina Interna y Jefa de la División



Dr. Ricardo González Ramírez
Investigador en Ciencias Médicas C, Adscrito al
Departamento de Biología Molecular e Histocompatibilidad.

Este trabajo de tesis con número de registro: 12-92-2019 presentado por el Dr. Juan Daniel Díaz García y se presenta en forma con visto bueno por el tutor principal de la tesis Dr. Ricardo González Ramírez con fecha julio de 2020 para su impresión final.



Dr. José Pablo Maravilla Campillo
Subdirector de Investigación Biomédica



Dr. Ricardo González Ramírez
Investigador Principal

**“ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DE LOS GENES *KCNQ1*, *KCNJ11*, *CACNA1D*
Y *CACNA1E* QUE CODIFICAN PARA LOS CANALES *K_v1.9*, *K_{ATP}*, *CA_v1.3* Y *CA_v2.3*,
COMO FACTOR DE RIESGO PARA DESARROLLAR DIABETES TIPO 2”**

Este trabajo fue realizado en el Hospital General “Dr. Manuel Gea González” en la División de Medicina Interna bajo la dirección del Dr. Ricardo González Ramírez con el apoyo de la Dra. Erika Karina Tenorio Aguirre y adscritos de la División quienes orientaron y aportaron a la conclusión de este trabajo.

COLABORADORES:

Dr. Ricardo González Ramírez
Investigador Principal

Dr. Juan Daniel Díaz García
Investigador Asociado Principal

Dra. María Angélica Alfonsina Olivo Díaz
Investigadora Asociada

Dra. Erika Karina Tenorio Aguirre
Investigadora Asociada

AGRADECIMIENTOS

A Dios:

Por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mi Alma Mater, el Hospital General Dr. Manuel Gea González:

Por haberme permitido ser parte de él y abierto las puertas de su seno científico para poder estudiar esta bondadosa especialidad de Medicina Interna.

A mis profesores:

Que marcaron cada etapa de mi camino, por su gran apoyo y motivación para la culminación de mis estudios profesionales y para la elaboración de esta tesis.

A mi asesor y director de tesis:

Dr. Ricardo González Ramírez. Dra. María Angélica Alfonsina Olivo Díaz y Dra. Erika Karina Tenorio Aguirre; por haberme brindado la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimiento científico, así como también haberme tenido la paciencia para guiarme por medio de su apoyo, tiempo compartido y asesorías y dudas presentadas en la elaboración de la tesis, impulsando el desarrollo de mi formación profesional.

A mis padres:

*Por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo.
Todo este trabajo ha sido posible gracias a ellos.*

ÍNDICE

I.	Resumen.....	07
II.	Introducción.....	08
III.	Material y Métodos.....	13
IV.	Resultados.....	16
V.	Discusión.....	18
VI.	Conclusión.....	21
VII.	Referencias bibliográficas	22
VIII.	Tablas.....	26
IX.	Figuras.....	31

1. RESUMEN

INTRODUCCIÓN: Una de las principales características de la diabetes tipo 2 (DT2) es la falta de secreción de insulina, este proceso se encuentra regulado por varias proteínas, dentro de estas se encuentran los canales de calcio dependientes de voltaje, principalmente los canales Cav1.3, Cav2.3, el canal de potasio dependiente de voltaje Kv1.9 y el canal de potasio dependiente de ATP K_{ATP} , cuyos polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) se han asociado en otras poblaciones con la presencia de DT2. La importancia de estos canales se ha puesto de manifiesto en estudios anteriores donde se han comprobado que cambios en la función de los mismos modifican la secreción de la insulina.

OBJETIVO: Determinar la asociación de los polimorfismos de los genes *KCNQ1*, *KCNJ11*, *CACNA1D* y *CACNA1E*, que codifican para los canales KV1.9, K_{ATP} , Cav1.3 y Cav2.3, con el riesgo de desarrollar diabetes tipo 2.

MATERIAL Y MÉTODOS: Se realizó un estudio de Casos y Controles, comparativo, observacional, ambispectivo y transversal, en el que participaron hombres y mujeres, entre 30 y 90 \pm 2 años de edad, incluyendo pacientes sin DT2 y con diagnóstico confirmado de DT2 de acuerdo con las guías de la Asociación Americana de Diabetes, atendidos en la consulta externa del Servicio de Medicina Interna, del Hospital General "Dr. Manuel Gea González", de septiembre de 2019 a marzo de 2020, a quienes se les tomaron muestras de sangre periférica para la extracción del ADN genómico por el método de fenol/cloroformo y posterior genotipificación, con el sistema iPLEX Assay que requiere el diseño de oligonucleótidos específicos, la amplificación por reacción en cadena de polimerasa y por último detección de los SNPs por espectrometría de masas.

RESULTADOS: En este estudio participaron un total de 90 pacientes, 53 (58%) hombres y 37 (42%) mujeres, dentro de los cuáles se dividieron en dos grupos, 45 casos (con diagnóstico de diabetes tipo 2) y 45 controles (sin diabetes tipo 2). Se estudiaron un total de 16 polimorfismos de 4 genes: *KCNQ1*, *CACNA1D*, *KCNJ11* y *CACNA1E*. Los alelos silvestres fueron los más frecuentes en todos los grupos. Los alelos y genotipos del gen *CACNA1D* (rs9841978G y rs12487452CG) se asociaron con susceptibilidad a diabetes tipo 2, con sus contrapartes correspondientes que fueron de protección. Al igual que el gen *KCNQ1*, los alelos y genotipos rs2237897C, rs2074196G, rs2283228A, rs2237892C, rs163184G, rs2074196GG, rs2283228AA y rs163184GG mostraron una asociación significativa ($p < 0.05$) con la presencia de la enfermedad. Todos los SNPs estudiados se encontraron en el equilibrio de Hardy-Weinberg. Los haplotipos AGCGAC y CCGG fueron de susceptibilidad mientras que GTTCT fue de protección. Tanto los alelos como los genotipos y haplotipos de los genes *CACNA1E* y *KCNJ11*, no mostraron significancia estadística.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN: nuestro estudio indicó la asociación de variantes genéticas bien establecidas de los polimorfismos de los genes *KCNQ1* y *CACNA1D* con la diabetes tipo 2, mostrando que estos representan marcadores importantes en el desarrollo de esta enfermedad y son un factor predisponente ante la alta frecuencia y fuerza de asociación que se observaron en nuestros resultados comparados con otras poblaciones fuera del continente americano, lo que sugiere la susceptibilidad de los individuos a la DT2 que puede conducir a la identificación de pacientes con alto riesgo de desarrollar la enfermedad. Además, este estudio demostró que las variantes de los genes *CACANA1E* y *KCNJ11* en la muestra poblacional estudiada, no tienen una asociación con el desarrollo de la DT2 en comparación con otras áreas geográficas y esto puede ser atribuido a las variaciones y gran heterogeneidad étnica del individuo.

PALABRAS CLAVE: *KCNQ1*; *KCNJ11*; *CACNA1D*; *CACNA1E*; Diabetes tipo 2, Polimorfismo de un solo nucleótido.

2. INTRODUCCIÓN

La diabetes tipo 2 (DT2) se encuentra clasificada como una enfermedad de atención prioritaria en el esquema nacional de salud. Cifras obtenidas por la Encuesta Nacional de Salud (ENSA) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) han puesto de manifiesto como la DT2 ha incrementado su prevalencia en México. De acuerdo con estos resultados, el 10% de la población mexicana tiene esta enfermedad, presentando una mayor incidencia en mujeres (11%) que en hombres (9.7%). Sumado a esto, hay factores de riesgo que predisponen a la población a desarrollar DT2, como la obesidad, el sobrepeso, la inactividad física, sin embargo, existe un factor poco estudiado que ha tenido un gran auge en los últimos años, el factor genético, todos estos factores han contribuido a que ocupe uno de los principales puestos en el número de defunciones por año en nuestro país¹.

La DT2 se caracteriza por una escasa secreción de insulina por las células β pancreáticas, la cual es incapaz de actuar en los tejidos periféricos (resistencia a la insulina), apareciendo así la hiperglucemia. Se conoce desde 1968 que, al aumentar la concentración extracelular de glucosa, la membrana de las células β se despolariza y, esta despolarización activa a varios tipos de canales iónicos que expresan las células β del páncreas generando el disparo de potenciales de acción por estas células, dando lugar a la liberación de insulina².

Para que esta actividad eléctrica ocurra, se requiere de la participación de por lo menos seis tipos de canales iónicos³: 1) Al ingresar la glucosa a la célula esta se metaboliza, produciendo ATP, el cual inactiva a los canales de potasio sensibles a ATP (K_{ATP}), que son los canales que determinan el potencial de la membrana en reposo y son los que convierten la señal metabólica en eléctrica; al inhibirse estos canales, la concentración intracelular de K^+ aumenta promoviendo la activación de los canales transitorios de calcio (TRP). 2) Los canales TRP se activan en las condiciones anteriores y producen una ligera despolarización de la membrana plasmática, los canales TRP son poco selectivos y pueden permear al Ca^{2+} , Na^+ y Mg^{2+} y al entrar estos iones a las células β permiten la activación de otros canales, para continuar con la respuesta generada por la entrada de glucosa. 3) La entrada de iones por parte de los canales TRP permite alcanzar el umbral de activación de los canales de calcio dependientes de voltaje, donde los canales Cav que se activan primero, son los de bajo umbral de activación (LVA), estos canales permiten la entrada de Ca^{2+} que activa a los canales

de sodio dependientes de voltaje (Nav). 4) Los Nav permiten la entrada de Na⁺ y es en este momento cuando se generan los potenciales de acción, lo que permite la activación de otros Cav, los de alto umbral de activación (HVA)^{4,5,6}. 5) Los HVA, aumentan drásticamente la concentración intracelular de Ca²⁺ y esta actividad es la que desencadena la exocitosis de la insulina⁷. 6) Finalmente, la actividad de los canales rectificadores de potasio dependientes de voltaje (Kv) y los canales de potasio dependientes de voltaje sensibles a calcio (BK) repolarizan la membrana plasmática de las células β pancreáticas y esto detiene la secreción de insulina⁸. Por lo tanto, alguna variante genética relacionada en alguno de estos canales, podrían generar mecanismos funcionalmente significativos en la regulación de la secreción de insulina, representando un factor genético de riesgo para el desarrollo de la DT2.

De esta manera, en la actualidad se han intensificado los esfuerzos en todo el mundo por encontrar marcadores genéticos relacionados estrechamente con la DT2, estos marcados son principalmente polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs). La ventaja de estudiar este tipo de marcadores genéticos, es que están asociados a este tipo de enfermedades, debido a que es posible detectar en la secuencia de un gen, diferencias de un nucleótido entre individuos no emparentados^{8,9,10}. El estudio de los SNPs asociados a la DT2 ha cobrado fuerza, porque se quiere tener un grupo de polimorfismos que se puedan utilizar en un futuro cercano como una herramienta en el diagnóstico temprano y control de esta enfermedad¹¹.

En la población mexicana se han realizado varios estudios en búsqueda de SNPs relacionados con la DT2, como los polimorfismos SNP-44, SNP-110, SNP-43, SNP-63 e INDEL-19; de estos, los genotipos SNP-44T/C y SNP-110A/G, en el gen de la calpaína 10 (*CAPN10*), que aumentan el riesgo de desarrollar DT2, con una razón de momios de 2.72¹². Otro de los polimorfismos interesantes es el que se encuentra en el gen del factor de transcripción *TCF7L2*, esta variación también se ha asociado fuertemente con el riesgo a desarrollar DT2 en poblaciones mexicanas y México-americanas; sin embargo, no se conoce con certeza como está relacionado este SNP con la diabetes, pero se cree que este factor de transcripción regula al péptido parecido a glucagón (GLP-1 por sus siglas en inglés) que puede afectar la secreción de insulina¹³.

Como se describió anteriormente, la secreción de insulina depende de la actividad de diversos canales iónicos, en algunos de los cuales se han encontrado SNPs a lo largo de sus genes, uno de los más estudiados es el canal de potasio dependiente de voltaje 1.9 (Kv1.9)¹⁴. Este canal es codificado por en el gen *KCNQ1* (Miembro 1 de la subfamilia Q del canal controlado por voltaje de potasio)¹⁵. *KCNQ1* se localiza en el cromosoma 11p15.5, se expresa en islotes pancreáticos y desempeña un papel central para la repolarización del potencial de acción cardíaca y el transporte de agua y sodio en los tejidos epiteliales¹⁶. *KCNQ1* es extremadamente grande, ya que abarca aproximadamente 40 kb y puede albergar diferentes variantes causales que predisponen al riesgo de diabetes y que se encuentran en diferentes regiones que presentan desequilibrio de ligamiento (LD). El bloqueo del canal Kv1.9 codificado por *KCNQ1* desempeña mecanismos funcionalmente significativos en la regulación de la secreción de insulina, donde diferentes variantes genéticas asociadas con DT2 (rs2237892, rs2237895, rs2237897, rs2283228 y rs163184) fueron identificadas en los últimos años, ubicadas en la región del intrón 15, encontrando diferentes frecuencias alélicas, del 30–40% en asiáticos y solo 10% en europeos^{17,18}.

Por otra parte, el canal K_{ATP} , que consta de las subunidades kir6.2 y SUR1 (receptor a sulfonilureas), regula la secreción de insulina mediante el acoplamiento del estado metabólico de la célula al potencial de membrana, es sensible al ATP y es inhibido por las sulfonilureas. El gen que codifica a este canal es *KCNJ11* (Miembro 11 de la subfamilia J del canal de rectificación interna de potasio), se encuentra ubicado en el cromosoma 11p15.1 y tiene un único marco de lectura abierta que codifica una proteína de 390 aminoácidos. Los ratones "knockout" para el gen *KCNJ11* se caracterizan por tener defectos en la secreción de insulina, en respuesta tanto a glucosa como a tolbutamida¹⁹. En humanos, se han informado asociaciones conflictivas entre una variación alélica común de *KCNJ11*, E23K (G→A, rs5219) y DT2 en varios grupos étnicos. La variación E23K se ha asociado con la DT2 en los caucásicos franceses²³ y en la población japonesa; sin embargo, no se observó una asociación entre E23K y DT2 en un estudio prospectivo finlandés²⁰⁻²³. En la población china se analizaron los polimorfismos E23K (G→A, rs5219) y A190A (C→T, rs5218), para ver si había asociación con DT2 de aparición temprana (< 40 años) e hipertensión, encontrando que los

genotipos E23K-GA o AA pueden aumentar la susceptibilidad a la DT2 de inicio temprano, mientras que los genotipos A190A-TT o E23K-GG pueden aumentar el riesgo de hipertensión^{24,25}.

En relación a los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje, estos median la entrada de Ca²⁺ en las células en respuesta a la despolarización de la membrana. Estos canales están compuestos por una subunidad principal formadora del poro (subunidad α 1) y múltiples subunidades auxiliares. Con respecto al gen que codifica para el canal de calcio dependiente voltaje Cav1.3 (*CACNA1D*: Subunidad Alfa1D del canal de calcio dependiente de voltaje), se han identificado tres SNPs en poblaciones escandinavas asociados con DT2 y alteraciones en la secreción de insulina, este canal junto con otras proteínas regula la secreción de insulina en las células β pancreáticas. El alelo C del SNP rs312480 se asoció con la DT2 y, sobre todo, con la disminución en la secreción de insulina por las células β -pancreáticas de pacientes diabéticos, mientras que rs312486/G y rs9841978/G se asociaron solamente con DT2^{26,27}.

Por otro lado, la subunidad Cav2.3 humana se expresa en células neuronales y células β pancreáticas. En las células β , esta subunidad tiene un papel importante en la coordinación de los procesos dependientes de Ca²⁺, tales como la secreción de insulina. Los estudios en ratones deficientes de Cav2.3 muestran que la alteración de los canales Cav2.3 afecta la tolerancia a la glucosa y la secreción de insulina mientras que las pruebas de tolerancia a la insulina en ratones "knockout" para Cav2.3, señalan una sensibilidad reducida a la insulina²⁸⁻³¹. El canal Cav2.3 humano está codificado por el gen *CACNA1E* (Subunidad Alfa1E del canal de calcio dependiente de voltaje) ubicado en el brazo largo del cromosoma uno, en la banda 23.5 (1q25.3). Se ha descrito ligamiento de la DT2 con el cromosoma 1q25.3 en diversas poblaciones con ancestría con europeos, asiáticos del este y afroamericanos³²⁻³⁷. En un estudio de ligamiento en sujetos Pima se secuenció el gen *CACNA1E*, tipificándose 28 SNPs. Se usó una expresión específica de alelo para evaluar funcionalmente una variante en la región 3' no traducida (3'-UTR). Cinco de las variantes, rs625226, rs3753737, rs798209, rs473200 y +8130G/A, se asociaron nominalmente con DT2 de aparición temprana en una prueba de asociación general. Entre estos SNPs, rs3753737 y +8130G/A también se asociaron nominalmente con la DT2 en un análisis de familias. La variante +8130G/A de la región 3'-UTR se asoció con DT2 de inicio temprano con una razón de momios de 2.09 por copia del alelo

G. Entre los 372 sujetos Pima no diabéticos que se habían sometido a pruebas metabólicas, el alelo de riesgo se asoció con una acción reducida de la insulina que incluía un aumento de las concentraciones plasmáticas de glucosa en ayunas, 30, 60 y 120 minutos y un aumento de la insulina plasmática en ayunas durante una prueba oral de tolerancia a la glucosa, así como una disminución en la tasa de eliminación de glucosa estimulada por la insulina, tanto en las concentraciones de insulina estimuladas fisiológicamente como en las máximas. El análisis funcional de esta variante mostró que el alelo no peligroso tenía una expresión 2.3 veces mayor en comparación con el alelo de riesgo. En conclusión, una variante funcional de *CACNA1E* contribuye a la susceptibilidad a la DT2 al afectar la acción de la insulina^{38,39}.

En 595 sujetos recién diagnosticados con DT2 se tipificaron 10 tag SNPs que cubrían el 93% de la variabilidad común de *CACNA1E*: rs558994, rs679931, rs2184945, rs10797728, rs3905011, rs12071300, rs175338, rs3753737, rs2253388 y rs4652679; y se evaluaron los fenotipos clínicos, la sensibilidad a la insulina mediante la pinza de insulina euglucémica y la función de las células beta mediante el modelado de vanguardia de las curvas de glucosa/péptido C durante la prueba oral de tolerancia a la glucosa. Cinco SNPs (rs10797728, rs175338, rs2184945, rs3905011 y rs4652679) se asociaron con aspectos específicos de la función de las células beta. Los alelos principales de rs2184945 y rs3905011 se asociaron a un control proporcional reducido con un efecto aditivo demostrable. En contraste, solo el alelo principal de rs2253388 se relacionó débilmente con una resistencia a la insulina más grave. La conclusión es que en pacientes con DT2 recién diagnosticada, la variabilidad común de *CACNA1E* está fuertemente asociada a la función de las células beta. La tipificación de *CACNA1E* podría ser de ayuda para inferir el fenotipo funcional de las células beta y para seleccionar un tratamiento personalizado⁴⁰.

Por lo tanto, considerando que varios tipos de canales iónicos participan en la regulación de la secreción de insulina, nuestro planteamiento del problema, es que si los polimorfismos de los genes *KCNQ1*, *KCNJ11*, *CACNA1D* y *CACNA1E* que codifican para los canales Kv1.9, KATP, Cav1.3 y Cav2.3, serán un factor de riesgo asociado para el desarrollo de diabetes tipo 2. Teniendo como objetivo general, determinar dicha asociación de estos polimorfismos con el riesgo de desarrollar esta enfermedad, tipificando y determinando las frecuencias alélicas y genotípicas en pacientes con y sin DT2. Estos hallazgos nos permitirán determinar si los SNPs identificados previamente ayudarían a predecir la DT2 junto con los modelos actuales en la población mexicana.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio de Casos y Controles, fue comparativo (se consideraron dos poblaciones), observacional (solo se observaron los fenómenos sin alterarlos), ambispectivo (información que se recopiló de manera retrospectiva y prospectiva) y transversal (las variables se midieron una vez). Se incluyeron a 90 sujetos de estudio, 45 pacientes con diagnóstico de DT2 y 45 sin este diagnóstico, no pareados.

Universo de estudio: Pacientes adultos de 30 a 90 \pm 2 años de edad que acudieron al Servicio de Medicina Interna del Hospital General "Dr. Manuel Gea González".

Población de estudio:

Casos: Pacientes adultos de 30 a 90 \pm 2 años con diagnóstico de diabetes tipo 2, que acudieron al Servicio de Medicina Interna del Hospital General "Dr. Manuel Gea González", que tenían registros recientes de hemoglobina glucosilada y glucosa en ayunas en el expediente.

Controles: Pacientes adultos de 30 a 90 \pm 2 años de edad sin diagnóstico de diabetes tipo 2, que acudieron al Servicio de Medicina Interna del Hospital General "Dr. Manuel Gea González" por otra enfermedad que, por los datos del expediente clínico, se determinaron como no sistémica y que tenían registros recientes de hemoglobina glucosilada y glucosa en ayunas en el expediente.

Tamaño de la muestra. El tamaño de muestra se calculó con el software Epidat versión 4.2 (<https://www.sergas.es/Saude-publica/EPIDAT>). Para nuestro estudio se calculó un tamaño de muestra no pareada.

En Epidat 4.2, el cálculo del tamaño de muestra para estudiar si existe asociación entre la exposición y la enfermedad en un estudio de casos y controles, se basó en la prueba de Connor RJ⁴¹.

Los factores que intervinieron en el cálculo fueron:

1. Proporción de casos expuestos o prevalencia de la exposición en los casos (P1).
2. Proporción de controles expuestos o prevalencia de la exposición en los controles (P2).
3. Relación de momios a detectar (Odds ratio, OR).

Estos tres valores estuvieron relacionados entre sí del modo siguiente:

$$P_1 = \frac{OR P_2}{(1-P_2) + OR P_2}, P_2 = \frac{P_1}{OR(1-P_1) + P_1}.$$

La expresión quedó finalmente así:

$$OR = \frac{P_1(1-P_2)}{P_2(1-P_1)},$$

por lo que, especificando dos de estos parámetros, el otro quedó perfectamente determinado.

Tomando en cuenta esta información y la incidencia de los SNP en diversas poblaciones (ver marco teórico) se calculó el tamaño de muestra para la población de estudio con los siguientes parámetros, donde la asignación de los casos fue secuencial:

Proporción de casos expuestos	60%
Odds ratio a detectar	2
Nivel de confianza	95%
Resultados	
Potencia	80%
Número de Pares	135

Es importante mencionar que debido a la pandemia producida por el virus SARS-CoV-2 (COVID-19) no se consiguió completar el tamaño de muestra calculado, sin embargo, este estudio se logró realizar con 45 personas sanas (controles) y 45 personas con diagnóstico de DT2 (casos), siendo un total de 90 sujetos de estudio.

Criterios de Inclusión de los Casos:

- Pacientes hombres y mujeres, entre 30 y 90 \pm 2 años, con diagnóstico confirmado de diabetes tipo 2 de acuerdo con las guías de la Asociación Americana de Diabetes⁴² (dos o más análisis en diferente día de hemoglobina glucosilada mayor o igual 6.5% y/o glucosa en ayunas mayor o igual 126 mg/dl), atendidos en la consulta externa del Servicio de Medicina Interna, del Hospital General "Dr. Manuel Gea González", de septiembre de 2019 a marzo de 2020.
- Autorización con consentimiento informado por parte del paciente.

Criterios de exclusión de los Casos:

- Enfermedades hepáticas, tiroideas o reumatológicas documentadas y/o enfermedades crónicas documentadas, como por ejemplo cáncer, que fueron confirmadas de acuerdo al cuadro clínico del paciente y laboratorios de rutina del expediente clínico, solicitados en la consulta externa de medicina interna.

Criterios de Inclusión de los Controles:

- Pacientes hombres y mujeres, entre 30 y 90 \pm 2 años, sin diagnóstico confirmado de diabetes tipo 2 de acuerdo con las guías de la Asociación Americana de Diabetes⁴² (hemoglobina glucosilada menor de 6.5% y glucosa en ayunas menor de 126 mg/dl), atendidos por alguna otra enfermedad no sistémica, según los

datos del expediente clínico, en la consulta externa del Servicio de Medicina Interna, del Hospital General "Dr. Manuel Gea González", de septiembre de 2019 a marzo de 2020.

- Autorización con consentimiento informado por parte del paciente.

Criterios de exclusión de los Controles:

- Enfermedades hepáticas, tiroideas o reumatológicas documentadas y/o enfermedades crónicas documentadas como cáncer, que fueron confirmadas de acuerdo al cuadro clínico del paciente y laboratorios de rutina del expediente clínico solicitados en la consulta externa de medicina interna.

Descripción de los procedimientos:

1. Se seleccionaron y reclutaron a los sujetos de estudio de acuerdo a los criterios de inclusión y exclusión.
2. Se aplicaron las cartas de consentimiento informado.
3. Se revisaron los expedientes clínicos de cada paciente (casos y controles), de donde se tomaron los datos más recientes de hemoglobina glucosilada y glucosa en ayunas.
4. A los pacientes con ayuno de 12 a 14 horas se les tomaron 10 ml de sangre periférica de la vena del antebrazo, utilizando EDTA como anticoagulante.
5. Se extrajo el DNA genómico por el método de fenol/cloroformo.
6. Se realizó la genotipificación, con el sistema iPLEX Assay acoplado al MassARRAY de la compañía Agencia Bioscience: que requiere el diseño de oligonucleótidos específicos, la amplificación por reacción en cadena de polimerasa y por último detección de los SNPs por espectrometría de masas.

Este trabajo cumple con las leyes de salud vigentes en México y aprobado por los Comités de Ética en Investigación e Investigación del Hospital General "Dr. Manuel Gea González". El objetivo del estudio se notificó a todos los participantes, que fueron incluidos solo después de proporcionar su consentimiento informado por escrito.

Análisis estadístico

El cálculo de las frecuencias de alelos y genotipos se realizó mediante el programa PLINK (<http://zzz.bwh.harvard.edu/plink/index.shtml>) y luego se comparó entre pacientes y controles. El

análisis bivariado se realizó con la Chi cuadrada de Pearson y el cálculo de la odds ratio (OR) y los intervalos de confianza del 95% (IC 95%) se realizaron con los softwares SPSS (v24.0) (IBM Corp, Armonk, Nueva York) y Epilnfo v6.1. Se utilizó la prueba exacta de Fisher cuando fue apropiado. La corrección de Bonferroni se calculó con el software SNPSpD (<https://genepi.qimr.edu.au/general/daleN/SNPSpD>), con base en el número efectivo de SNPs. Se determinó que el número efectivo de pruebas independientes fueron 16. Utilizamos un análisis de regresión logística para determinar la asociación de los SNPs de *CACNA1D*, *KCNQ1*, *KCNJ11* y *CACNA1E* con la DT2.

Los haplotipos y bloques de desequilibrio de ligamiento (LD) fueron generados por el método CI usando Haploview (v4.2). El programa en línea que se utilizó para establecer el modelo más informativo de asociación mendeliana (dominante, codominante, recesivo, sobre dominante o aditivo logarítmico) fue SNPStats (<https://www.snpstats.net/start.htm>). Se probaron las frecuencias de genotipo para cada SNP para detectar posibles desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg usando la prueba χ^2 con 1 grado de libertad.

4.RESULTADOS

Características de los grupos

Participaron en el estudio un total de 90 pacientes, 53 (58%) hombres y 37 (42%) mujeres, se dividieron en dos grupos, 45 casos (con diagnóstico de diabetes tipo 2) y 45 controles (sin diabetes tipo 2). La mediana de edad de ambos grupos fue de 48.5 años RIQ (30-62), (30 años en el grupo control y 62 años en el grupo de casos). El 37.7% (34 sujetos de estudio: 29 casos y 5 controles) tenían como antecedente el diagnóstico de hipertensión arterial sistémica. La mediana del índice de masa corporal (IMC) fue de 29.8 kg/m² (RIQ 26.05-32.45) en los pacientes con diabetes tipo 2 y 23.3 kg/m² (RIQ 22.2-25.3) en el grupo control, en general fue de 25.7 kg/m² (22.7-29.8). En los 45 pacientes con DT2, en relación a su control metabólico, presentaron una mediana de hemoglobina glucosilada de 7.8% RIQ (6.75-9.8) y una mediana de glucosa en ayunas de 143 mg/dL RIQ (114-205.5). De este mismo grupo, la mediana del tiempo de diagnóstico de la enfermedad fue de 8 años RIQ (6.5-10) (Tabla 1).

Distribución de alelos, genotipos y haplotipos de los genes *KCNQ1*, *KCNJ11*, *CACNA1D* y *CACNA1E*.

Se estudiaron un total de 16 polimorfismos de 4 genes: *KCNQ1* (rs2283171, rs2074196, rs2237892, rs163184, rs2283228, rs2237897), *KCNJ11* (rs5218, rs5219), *CACNA1D* (rs312480, rs312486, rs9841978, rs12487452) y *CACNA1E* (rs10797728, rs175338, rs3753737, rs2253388) (Tabla 2).

La asociación de los alelos y los genotipos con la DT2, tanto en los casos como en los controles se muestran en las Tablas 3 y 4 respectivamente. Los alelos silvestres fueron los más frecuentes en todos los grupos.

Con respecto al grupo de polimorfismos del gen *CACNA1D*, el alelo rs9841978G y el genotipo rs12487452CG se asociaron con susceptibilidad a diabetes tipo 2, con un OR, 2.61; CI95%: 1.24-5.45, $p=0.0009$ y un OR, 3.83; CI95%: 1.52-9.60, $p=0.003$, respectivamente, mientras que el alelo rs12487452G y el genotipo rs9841978GG mostraron una tendencia de asociación a la enfermedad (OR, 1.85; CI95%: 0.97-3.54, $p=0.06$ y un OR, 2.28; CI95%: 0.95-5.46, $p=0.06$), con sus contrapartes correspondientes que fueron de protección.

En relación al gen *KCNQ1*, los alelos rs2237897C (OR, 1.97; CI95%: 1.04-3.72, $p=0.03$), rs2074196G (OR, 2.6; CI95%: 1.36-4.98, $p=0.003$), rs2283228A (OR, 2.16; CI95%: 1.11-6.22, $p=0.01$), rs2237892C (OR, 1.97; CI95%: 1.04-3.72, $p=0.03$) y rs163184G (OR, 2.17; CI95%: 1.19-3.95, $p=0.01$) tuvieron una asociación importante con la DT2. De igual forma los genotipos rs2074196GG, rs2283228AA y rs163184GG, mostraron una asociación significativa ($p<0.05$) con la presencia de la enfermedad, mientras los genotipos rs2237897CC y rs2237892CC tuvieron una tendencia de asociación con valores $p=0.07$ y OR de 2.16. Tanto los alelos como los genotipos de los genes *CACNA1E* y *KCNJ11*, no mostraron significancia estadística.

Todos los SNPs estudiados se encontraron en el equilibrio de Hardy-Weinberg. En todas las comparaciones de genotipos de los SNPs, prevaleció el modelo codominante. La tasa de éxito general de la técnica de tipificación fue del 98.9%.

El software Haploview v4.2 estableció 33 haplotipos para diabetes tipo 2, (Tabla 5). Cuando se analizaron todos los sujetos con la enfermedad, se encontró que el haplotipo AGCGAC del gen *KCNQ1* fue de susceptibilidad (OR, 2.05; CI95%: 1.01-4.14, $p=0.04$) al igual que haplotipo CCGG

del gen *CACNA1D*, (OR, 2.27; CI95%: 1.13-4.58, p=0.02), mientras que GTTTCT del gen *KCNQ1* fue de protección (OR, 0.32; CI95%: 0.12-0.81, p=0.013),

Desequilibrio de ligamiento (LD)

El gráfico generado en Haploview (v4.2) para determinar el LD (D') para los 16 SNP se presenta en la Figura 1. El cual indica que los SNPs rs2074196, rs2237892, rs163184, rs2283228 y rs2237897 están en fuerte desequilibrio de ligamiento entre ellos, al igual que rs175338 y rs2253388, mientras que rs2283171, rs5218, rs5219, rs312480, rs312486, rs9841978, rs12487452, rs10797728 y rs3753737 parecen ser casi independientes entre sí. En verde están los dos SNPs: rs5218 y rs5219, ubicados en regiones codificantes, el resto de los SNPs se encuentran en regiones intrónicas de los genes (Tabla 1).

5.DISCUSIÓN

La DT2 se encuentra clasificada como una enfermedad de atención prioritaria en nuestro país, con un aumento progresivo de la prevalencia en los últimos años, representando uno de los principales puestos en el número de defunciones por año¹. Por estas razones es necesario hacer frente a esta enfermedad, para lograr una estrategia efectiva debemos modificar los factores ambientales y hábitos de la población. También, tenemos que intensificar el estudio de factores genéticos que puedan ser usados como marcadores que predigan la aparición de esta enfermedad. La DT2 es un trastorno poligénico en el cual pueden existir genes que aumentan el riesgo de presentar la enfermedad en individuos susceptibles. Al estar involucrados una gran variedad de genes, en la actualidad se han intensificado los esfuerzos a nivel mundial por encontrar marcadores genéticos relacionados estrechamente con la enfermedad, estos marcadores son principalmente polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs)⁸⁻¹⁰.

Una de las principales características de la DT2 es la falta de secreción de insulina, este mecanismo de secreción esta finamente controlado por la expresión de varias proteínas y, el mal funcionamiento de estas proteínas o la incorrecta expresión de los genes que codifican a esas proteínas provocan la disminución de insulina secretada y la consecuencia fisiológica es la aparición de la hiperglucemia.

De todas las proteínas que intervienen en este proceso se encuentran los canales de calcio dependientes de voltaje, principalmente los canales Cav1.3 y Cav2.3, el canal de potasio dependiente de voltaje Kv1.9 y el canal de potasio dependiente de ATP K_{ATP}. En algunas poblaciones europeas y asiáticas se han encontrado SNPs asociados a DT2, el impacto que tienen los SNPs sobre la función fisiológica de los canales iónicos se ha puesto de manifiesto en estudios previos donde se ha comprobado que el cambio de una sola base es suficiente para modificar la secreción de la insulina².

Por lo tanto, al existir diferencias étnicas entre las diferentes poblaciones, el objetivo de este estudio fue determinar si existe una asociación entre la presencia de estos polimorfismos de los genes que codifican estos canales con el diagnóstico de la DT2, representando este el primer estudio de SNPs de estos canales iónicos en conjunto, en América latina y por supuesto en población mexicana. Utilizamos un diseño de casos y controles basado en la población en una muestra mexicana, centrándonos en 16 SNPs de los 4 genes *KCNQ1*, *CACNA1D*, *KANJ11* y *CACNA1E*, correspondientes a los canales iónicos mencionados.

El canal de potasio dependiente de voltaje 1.9 (Kv1.9), codificado por el gen *KCNQ1* tiene mecanismos funcionalmente significativos en la regulación de la secreción de insulina¹⁵. En este gen se han reportado que los polimorfismos rs2237892, rs2237897, rs2283228 y rs163184 están asociados con DT2. En estudios previos se identificó que las frecuencias alélicas van del 30–40% en asiáticos y solo 10% en europeos^{17,18}. De manera interesante, nosotros encontramos que en la población mexicana estudiada en este trabajo, las frecuencias alélicas de estos cuatro SNPs fueron del 60-74%, es decir aproximadamente el doble de la población asiática y seis a siete veces comparándolo con la población europea, además nuestros resultados revelaron que los alelos, rs2237892C, rs2237897C, rs2283228A y rs163184G, y los genotipos rs2283228AA y rs163184GG, están asociados con la susceptibilidad a la DT2 con una alta significancia estadística. Es importante destacar, que además de los cuatro SNPs mencionados, en nuestra población, fueron estudiados otros dos SNPs de ese mismo gen *KCNQ*, el rs2283171 y el rs2074196. De estos dos SNPs solo el rs2074196 se encontró asociado a DT2, el alelo rs2074196G, el genotipo rs2074196GG y el haplotipo AGCGAC, tuvieron una asociación importante hacia la enfermedad. Estos resultados son

muy importantes, porque, abren la posibilidad de que estas variantes se puedan estudiar en otras etnias y comparar su impacto con la DT2. Nuestros resultados indican que estos SNPs pueden estar influyendo en el desarrollo de la DT2, como factor predisponente de la enfermedad y que en la población mexicana estudiada pueden tener un rol fundamental como marcador diagnóstico, por su alta frecuencia y asociación.

El canal Cav1.3, codificado por el gen *CACNA1D* fue otro que presentó asociación de susceptibilidad a la DT2, de los SNPs estudiados se encontró el alelo rs9841978G, el genotipo rs12487452CG y el haplotipo CCGG del polimorfismo rs312486, presentaron una asociación con la DT2 estadísticamente significativa con una frecuencia del 85%, 52% y 32.95% respectivamente. Estos SNPs ya se habían identificado en poblaciones escandinavas como factores de riesgo asociados con DT2 y además producen alteraciones en la secreción de insulina, principalmente el alelo C del SNP rs312480 se asoció con la enfermedad y, sobre todo, con la disminución en la secreción de insulina por las células β -pancreáticas de pacientes diabéticos, mientras que rs312486G y rs9841978G se asociaron solamente con DT2^{26,27}. Coincidiendo este último alelo con los resultados en nuestros sujetos de estudio. Es relevante mencionar que estos SNPs han sido muy poco estudiados a nivel mundial, solo se analizaron en población escandinava, por esta razón creemos que, en conjunto con nuestros resultados, marcaran la pauta para realizar estudios más grandes y en diferentes poblaciones geográficas, buscando encontrar una asociación con esta enfermedad.

En relación a los SNPs del gen *CACNA1E*, de acuerdo a la literatura, se ha descrito ligamiento con la DT2 en diversas poblaciones europeas, asiáticos del este y afroamericanos³²⁻³⁷. Un estudio que se realizó población Pima, un grupo indígena que vive en el estado de Arizona (Estados Unidos) y en menor concentración en los estados de Sonora y Chihuahua, encontró que el gen *CACNA1E* contribuye a la susceptibilidad a la DT2 al afectar la acción de la insulina^{38,39}, sin embargo comparado con nuestros resultados, con una población mexicana no ligada a este grupo indígena, tanto los alelos, genotipos y haplotipos de este gen no tuvieron asociación alguna con la DT2, esto pone de manifiesto las diferencias ancestrales entre los diferentes grupos poblacionales en nuestro país, en especial con este reducido grupo Pima.

Por último, el gen *KCNJ11* que codifica al canal de K_{ATP} , en nuestro estudio, se encontró una falta de asociación notable entre los SNPs con la diabetes tipo 2, contrastando con los resultados de otras poblaciones, donde encontraron asociaciones con la enfermedad en varios grupos étnicos como caucásicos franceses, japoneses y chinos²⁰⁻²⁵, resaltando el contraste entre las distintas variantes genéticas en las diferentes etnias y regiones geográficas.

6. CONCLUSIÓN

Nuestro estudio demostró la asociación de variantes genéticas bien establecidas de los polimorfismos de los genes *KCNQ1* y *CACNA1D* con la diabetes tipo 2, mostrando que estos SNPs pueden representar marcadores importantes en el desarrollo de esta enfermedad y son un factor predisponente debido a la alta frecuencia y la fuerza de asociación que se observaron en la población estudiada a diferencia de los resultados obtenidos con otras poblaciones fuera del continente americano, representando este el primer estudio en América latina. Esto sugiere que existe una alta susceptibilidad de nuestra población a desarrollar DT2 cuando se encuentran presentes estos SNPs. Además, en este estudio se encontró que las variantes de los genes *CACANA1E* y *KCNJ11* no están asociadas a la DT2 en la muestra poblacional estudiada, sugiriendo que no son un factor predisponente para desarrollar la DT2 a diferencia de lo encontrado en otras áreas geográficas, poniendo de manifiesto las variaciones y la gran heterogeneidad étnica de los individuos.

El estudio de los SNPs asociados a la DT2 ha cobrado fuerza, y creemos que se requiere tener un grupo de polimorfismos que se puedan utilizar en un futuro cercano como una herramienta en el diagnóstico temprano y control de esta patología, que permita además estudiar los enfoques farmacogenéticos y farmacogenómicos de esta enfermedad silenciosa.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bello-Chavolla O, Rojas-Martinez R, Aguilar-Salinas CA, Hernández-Avila M. Epidemiology of diabetes mellitus in Mexico. *Nutr Rev.* 2017;75 (suppl 1):4-12.
2. Yang SN, Shi Y, Yang G, Li Y, Yu J, Berggren PO. Ionic mechanisms in pancreatic β cell signaling. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71(21):4149-77.
3. Dean PM, Matthews EK. Electrical activity in pancreatic islet cells. *Nature.* 1968;219(5152):389-90.
4. Velasco M, Díaz-García CM, Larqué C, Hiriart M. Modulation of Ionic Channels and Insulin Secretion by Drugs and Hormones in Pancreatic Beta Cells. *Mol Pharmacol.* 2016;90(3):341-57.
5. Braun M, Ramracheya R, Bengtsson M, Zhang Q, Karanauskaite J, Partridge C, et al. Voltage-gated ion channels in human pancreatic beta-cells: electrophysiological characterization and role in insulin secretion. *Diabetes.* 2008;57(6):1618-28.
6. Rorsman P, Braun M. Regulation of insulin secretion in human pancreatic islets. *Annu Rev Physiol.* 2013; 75:155-79.
7. González-Ramírez R, Felix R. Transcriptional regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels. *Acta Physiol (Oxf).* 2018;222(1).
8. Voight BF, Scott LJ, Steinthorsdottir V, Morris AP, Dina C, Welch RP, et al. Twelve type 2 diabetes susceptibility loci identified through large-scale association analysis. *Nat Genet.* 2010;42(7):579-89.
9. Below JE, Gamazon ER, Morrison JV, Konkashbaev A, Pluzhnikov A, McKeigue PM, et al. Genomewide association and meta-analysis in populations from Starr County, Texas, and Mexico City identify type 2 diabetes susceptibility loci and enrichment for expression quantitative trait loci in top signals. *Diabetologia.* 2011;54(8):2047-55.
10. Yasuda SU, Zhang L, Huang SM. The role of ethnicity in variability in response to drugs: focus on clinical pharmacology studies. *Clin Pharmacol Ther.* 2008;84(3):417-23.
11. Li P, Guo M, Wang C, Liu X, Zou Q. An overview of SNP interactions in genome-wide association studies. *Brief Funct Genomics.* 2015;14(2):143-55.
12. Del Bosque-Plata L, Aguilar-Salinas CA, Tusié-Luna MT, Ramírez-Jiménez S, Rodríguez-Torres M, Aurón-Gómez M, et al. Association of the calpain-10 gene with type 2 diabetes mellitus in a Mexican population. *Mol Genet Metab.* 2004;81(2):122-6.

13. Parra EJ, Cameron E, Simmonds L, Valladares A, McKeigue P, Shriver M, et al. Association of TCF7L2 polymorphisms with type 2 diabetes in Mexico City. *Clin Genet.* 2007;71(4):359-66.
14. Jiang Y, Ruta V, Chen J, Lee A, MacKinnon R. The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature.* 2003;423(6935):42-8.
15. Unoki H, Takahashi A, Kawaguchi T, Hara K, Horikoshi M, Andersen G, et al. SNPs in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes in East Asian and European populations. *Nat Genet.* 2008;40(9):1098-102.
16. Yasuda K, Miyake K, Horikawa Y, Hara K, Osawa H, Furuta H, et al. Variants in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet.* 2008;40(9):1092-7.
17. Morris AP. Fine mapping of type 2 diabetes susceptibility loci. *Curr Diab Rep.* 2014;14(11):549.
18. Ma Q, Wang L, Yao H, Wang TT, Ma Y, Su YX, et al. Association Between KCNQ1 Genetic Variants and Type 2 Diabetes in the Uyghur Population. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2015;19(12):698-702.
19. Miki T, Nagashima K, Tashiro F, Kotake K, Yoshitomi H, Tamamoto A, et al. Defective insulin secretion and enhanced insulin action in KATP channel-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Sep 1;95(18):10402-6.
20. Koo BK, Cho YM, Park BL, Cheong HS, Shin HD, Jang HC, et al. Polymorphisms of *KCNJ11* (Kir6.2 gene) are associated with Type 2 diabetes and hypertension in the Korean population. *Diabet Med.* 2007;24(2):178-86.
21. Doi Y, Kubo M, Ninomiya T, Yonemoto K, Iwase M, Arima H, et al. Impact of Kir6.2 E23K polymorphism on the development of type 2 diabetes in a general Japanese population: The Hisayama Study. *Diabetes.* 2007;56(11):2829-33.
22. Lyssenko V, Almgren P, Anevski D, Orho-Melander M, Sjögren M, Saloranta C, et al. Botnia Study Group. Genetic prediction of future type 2 diabetes. *PLoS Med.* 2005;2(12):e345.
23. Hani EH, Boutin P, Durand E, Inoue H, Permutt MA, Velho G, et al. Missense mutations in the pancreatic islet beta cell inwardly rectifying K⁺ channel gene (KIR6.2/BIR): a meta-analysis suggests a role in the polygenic basis of Type II diabetes mellitus in Caucasians. *Diabetologia.* 1998;41(12):1511-5.

24. Zhuang L, Zhao Y, Zhao W, Li M, Yu M, Lu M, et al. The E23K and A190A variations of the KCNJ11 gene are associated with early-onset type 2 diabetes and blood pressure in the Chinese population. *Mol Cell Biochem.* 2015;404(1-2):133-41.
25. Hivert MF, Vassy JL, Meigs JB. Susceptibility to type 2 diabetes mellitus—from genes to prevention. *Nature Reviews Endocrinology.* 2014. 10 (4). 198–205.
26. Catterall WA. Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2000; 16:521-55.
27. Reinbothe TM, Alkayali S, Ahlqvist E, Tuomi T, Isomaa B, Lyssenko V, et al. The human L-type calcium channel Cav1.3 regulates insulin release and polymorphisms in CACNA1D associate with type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2013;56(2):340-9.
28. Williams ME, Marubio LM, Deal CR, Hans M, Brust PF, Philipson LH, et al. Structure and functional characterization of neuronal alpha 1E calcium channel subtypes. *J Biol Chem.* 1994;269(35):22347-57.
29. Schneider T, Wei X, Olcese R, Costantin JL, Neely A, Palade P, et al. Molecular analysis and functional expression of the human type E neuronal Ca²⁺ channel alpha 1 subunit. *Receptors Channels.* 1994;2(4):255-70.
30. Pereverzev A, Mikhna M, Vajna R, Gissel C, Henry M, Weiergräber M, et al. Disturbances in glucose-tolerance, insulin-release, and stress-induced hyperglycemia upon disruption of the Ca(v)2.3 (alpha 1E) subunit of voltage-gated Ca(2+) channels. *Mol Endocrinol.* 2002;16(4):884-95.
31. Matsuda Y, Saegusa H, Zong S, Noda T, Tanabe T. Mice lacking Ca(v)2.3 (alpha1E) calcium channel exhibit hyperglycemia. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;289(4):791-5.
32. McCarthy MI. Growing evidence for diabetes susceptibility genes from genome scan data. *Curr Diab Rep.* 2003;3(2):159-67.
33. Elbein SC, Hoffman MD, Teng K, Leppert MF, Hasstedt SJ. A genome-wide search for type 2 diabetes susceptibility genes in Utah Caucasians. *Diabetes.* 1999;48(5):1175-82.
34. Hsueh WC, St Jean PL, Mitchell BD, Pollin TI, Knowler WC, Ehm MG, et al. Genome-wide and fine-mapping linkage studies of type 2 diabetes and glucose traits in the Old Order Amish: evidence for a new diabetes locus on chromosome 14q11 and confirmation of a locus on chromosome 1q21-q24. *Diabetes.* 2003;52(2):550-7.

35. Wiltshire S, Hattersley AT, Hitman GA, Walker M, Levy JC, Sampson M, et al. A genome-wide scan for loci predisposing to type 2 diabetes in a U.K. population (the Diabetes UK Warren 2 Repository): analysis of 573 pedigrees provides independent replication of a susceptibility locus on chromosome 1q. *Am J Hum Genet.* 2001;69(3):553-69.
36. Vionnet N, Hani EH, Dupont S, Gallina S, Francke S, Dotte S, et al. Genomewide search for type 2 diabetes-susceptibility genes in French whites: evidence for a novel susceptibility locus for early-onset diabetes on chromosome 3q27-qter and independent replication of a type 2-diabetes locus on chromosome 1q21-q24. *Am J Hum Genet.* 2000;67(6):1470-80.
37. Ng MC, So WY, Lam VK, Cockram CS, Bell GI, Cox NJ, et al. Genome-wide scan for metabolic syndrome and related quantitative traits in Hong Kong Chinese and confirmation of a susceptibility locus on chromosome 1q21-q25. *Diabetes.* 2004;53(10):2676-83.
38. Hanson RL, Ehm MG, Pettitt DJ, Prochazka M, Thompson DB, Timberlake D, et al. An autosomal genomic scan for loci linked to type II diabetes mellitus and body-mass index in Pima Indians. *Am J Hum Genet.* 1998;63(4):1130-8.
39. Muller YL, Hanson RL, Zimmerman C, Harper I, Sutherland J, Kobes S; International Type 2 Diabetes 1q Consortium, Knowler WC, Bogardus C, Baier LJ. Variants in the Ca V 2.3 (alpha 1E) subunit of voltage-activated Ca²⁺ channels are associated with insulin resistance and type 2 diabetes in Pima Indians. *Diabetes.* 2007;56(12):3089-94.
40. Trombetta M, Bonetti S, Boselli M, Turrini F, Malerba G, Trabetti E, et al. CACNA1E variants affect beta cell function in patients with newly diagnosed type 2 diabetes. The Verona newly diagnosed type 2 diabetes study (VNDS) 3. *PLoS One.* 2012;7(3):e32755.
41. Connor RJ. Sample size for testing differences in proportions for the paired-sample design. *Biometrics.* 1987; 43:207-11.
42. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes-2019. *Diabetes Care* 2019;42: S1–S187.

8. TABLAS

Tabla 1. Características de los grupos de estudio.

Característica	Total (N=90)	Casos (DT2#) (N=45)	Controles (N=45)
Edad (años) Mediana (RIQ)*	48.5 (30-62)	62 (48.5-68.5)	30 (27-42.5)
Género no. (%)	H=53 (58%) M=37 (42%)	H=22 (51%) M=23 (49%)	H=31 (69%) M=14 (31%)
HTAS no. (%)	34 (37.7%)	29 (64.4%)	5 (11.1%)
IMC (kg/m ²) Mediana (RIQ)	25.7 (22.7-29.8)	29.8 (26.05-32.45)	23.3 (22.2-25.3)
HbA1C (%) Mediana (RIQ)	5.6 (4.9-7.8)	7.8 (6.75-9.8)	4.9 (4.8-5-1)
Glucosa en ayunas (mg/dL) Mediana (RIQ)	95 (86-143)	143 (114-205.5)	86 (77-89)
Tiempo de diagnóstico con DT2 (años) Mediana (RIQ)	-	8 (6.5-10)	-

Diabetes tipo 2. * Rango intercuartil. H: Hombre y M: Mujer. HTAS: Hipertensión arterial sistémica. IMC: Índice de masa corporal. HbA1C: Hemoglobina glucosilada.

Tabla 2. Información de los SNPs estudiados*

Gen	SNP	Cromosoma	Posición en el gen	Alelos reportados	Ubicación
<i>CACNA1D</i>	rs312480	3	53495113	T>C	5' UTR
	rs312486		53511427	G>A / G>C	Intrón
	rs9841978		53696708	G>A	Intrón
	rs12487452		53758384	C>A / C>G	Intrón
<i>KCNQ1</i>	rs2283171	11	2574057	A>G / A>T	Intrón
	rs2074196		2803570	G>T	Intrón
	rs2237892		2818521	C>T	Intrón
	rs163184		2825839	T>C / T>G	Intrón
	rs2283228		2828300	A>C / A>G	Intrón
	rs2237897		2837316	C>T	Intrón
<i>KCNJ11</i>	rs5218	11	17387522	G>A / G>T	Exón Ala-Ala
	rs5219		17388025	T>A / T>C / T>G	Exón Lys-Terminación
<i>CACNA1E</i>	rs10797728	1	181560616	T>A	Intrón
	rs175338		181636029	A>C / A>G	Intrón
	rs3753737		181676091	G>A	Intrón
	rs2253388		181717613	T>A / T>C / T>G	Intrón

*Información tomada de la base de datos dbSNP encontrada en el NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>.

Tabla 3. Frecuencia alélica de los polimorfismos de los genes de los canales iónicos *CACNA1D*, *KCNQ1*, *KCNJ11* y *CACNA1E*.

Gen	Alelos	Casos (%)	Controles (%)	<i>p</i>	OR (95%CI) *	
<i>CACNA1D</i>	rs312480C	97	96	0.72	1.32 (0.29-6.07)	
	rs312480T	3	4	0.72	0.76 (0.16-3.49)	
	rs12487452C	62	68	0.06	0.54 (0.28-1.03)	
	rs12487452G	38	22	0.06	1.85 (0.97-3.54)	
	rs9841978G	85	69	0.0009	2.61 (1.24-5.45)	
	rs9841978A	15	31	0.0009	0.38 (0.18-0.80)	
	rs312486C	85	78	0.20	1.65 (0.76-3.56)	
	rs312486G	15	22	0.20	0.60 (0.28-1.31)	
	<i>KCNQ1</i>	rs2283171A	53	53	0.99	1.08 (0.56-1.81)
		rs2283171G	47	47	0.99	0.99 (0.55-1.80)
rs2237897C		74	59	0.03	1.97 (1.04-3.72)	
rs2237897T		26	41	0.03	0.51 (0.27-0.96)	
rs2074196G		77	57	0.003	2.6 (1.36-4.98)	
rs2074196T		23	43	0.003	0.38 (0.20-0.73)	
rs2283228A		74	57	0.01	2.16 (1.11-6.22)	
rs2283228C		26	43	0.01	0.46 (0.24-0.87)	
rs2237892C		74	59	0.03	1.97 (1.04-3.72)	
rs2237892T		26	41	0.03	0.50 (0.27-0.96)	
rs163184T	40	62	0.01	0.46 (0.25-0.84)		
rs163184G	60	38	0.01	2.17 (1.19-3.95)		
<i>KCNJ11</i>	rs5218G	91	92	0.75	0.84 (0.29-2.43)	
	rs5218A	9	8	0.75	1.19 (0.41-3.42)	
	rs5219C	62	63	0.91	0.96 (0.52-1.77)	
	rs5219T	38	37	0.91	1.04 (0.56-1.90)	
<i>CACNA1E</i>	rs10797728A	81	81	0.41	1.35 (0.66-2.76)	
	rs10797728T	19	19	0.41	0.74 (0.36-1.51)	

Tabla 3. Frecuencia alélica de los polimorfismos de los genes de los canales iónicos *CACNA1D*, *KCNQ1*, *KCNJ11* y *CACNA1E*.

Gen	Alelos	Casos (%)	Controles (%)	<i>p</i>	OR (95%CI) *
	rs2253388C	69	67	0.70	1.13 (0.60-2.12)
	rs2253388T	31	33	0.70	0.89 (0.47-1.66)
	rs3753737A	57	53	0.64	1.15 (0.64-2.08)
	rs3753737G	43	47	0.64	0.87 (0.48-1.57)
	rs175338G	73	70	0.63	1.17 (0.61-2.26)
	rs175338A	27	30	0.63	0.85 (0.44-1.64)

* Odds ratio (95% Intervalo de confianza). Caracteres en negritas y cursivas indican asociación. Caracteres en negritas indican tendencia de asociación. Valor de *p* con chi cuadrada de Pearson, nivel de significancia en $p \leq 0.05$.

Tabla 4. Frecuencia genotípica de los polimorfismos de los genes de los canales iónicos *CACNA1D*, *KCNQ1*, *KCNJ11* y *CACNA1E*.

Gen	Genotipos	Casos (%)	Controles (%)	<i>p</i>	OR (95%CI) *
<i>CACNA1D</i>	rs312480CC	93	91	0.71	1.33 (0.28-6.33)
	rs312480CT	7	9	0.71	0.75 (0.15-3.56)
	rs12487452CC	36	65	0.008	0.31 (0.13-0.74)
	rs12487452CG	52	22	0.003	3.83 (1.52-9.60)
	rs12487452GG	12	13	0.77	0.83 (0.23-2.95)
	rs9841978AA	0	13	0.03	0.06 (0.01-0.10)
	rs9841978GA	30	36	0.54	0.76 (0.31-1.85)
	rs9841978GG	70	51	0.06	2.28 (0.95-5.46)
	rs312486CC	70	60	0.30	1.58 (0.65-3.83)
	rs312486CG	30	36	0.54	0.76 (0.31-1.85)
	rs312486GG	0	4	0.15	0.19 (0.05-0.25)
	<i>KCNQ1</i>	rs2283171AA	32	33	0.87
rs2283171AG		43	40	0.76	1.14 (0.49-2.65)
rs2283171GG		25	27	0.85	0.91 (0.35-2.36)

Tabla 4. Frecuencia genotípica de los polimorfismos de los genes de los canales iónicos *CACNA1D*, *KCNQ1*, *KCNJ11* y *CACNA1E*.

Gen	Genotipos	Casos (%)	Controles (%)	<i>p</i>	OR (95%CI) *
	rs2237897CC	57	38	0.07	2.16 (0.92-5.06)
	rs2237897CT	34	42	0.42	0.70 (0.29-1.67)
	rs2237897TT	9	20	0.14	0.4 (0.11-1.4)
	rs2074196GG	61	33	0.008	3.17 (1.33-7.56)
	rs2074196GT	32	47	0.15	0.53 (0.22-1.26)
	rs2074196TT	7	20	0.06	0.29 (0.07-1.16)
	rs2283228AA	57	33	0.02	2.63 (1.11-6.22)
	rs2283228AC	34	47	0.22	0.59 (0.25-1.39)
	rs2283228CC	9	20	0.14	0.4 (0.11-1.41)
	rs2237892CC	57	38	0.07	2.16 (0.92-5.06)
	rs2237892CT	34	42	0.42	0.70 (0.29-1.67)
	rs2237892TT	9	20	0.14	0.40 (0.11-1.40)
	rs163184GG	39	18	0.02	2.91 (1.09-7.72)
	rs163184TG	43	40	0.76	1.14 (0.49-2.65)
	rs163184TT	18	42	0.01	0.30 (0.11-0.80)
<i>KCNJ11</i>	rs5218GA	18	16	0.74	1.20 (0.39-3.66)
	rs5218GG	82	84	0.74	0.82 (0.27-2.52)
	rs5219CC	41	33	0.45	1.38 (0.58-3.28)
	rs5219CT	43	60	0.11	0.50 (0.21-1.17)
	rs5219TT	16	7	0.16	2.64 (0.63-10.98)
<i>CACNA1E</i>	rs10797728AA	64	53	0.44	1.51 (0.64-3.54)
	rs10797728AT	34	45	0.44	0.65 (0.27-1.53)
	rs10797728TT	2	2	0.48	1.02 (0.06-16.88)
	rs2253388CC	45	42	0.75	1.14 (0.49-2.63)
	rs2253388CT	48	49	0.91	0.95 (0.41-2.19)

Tabla 4. Frecuencia genotípica de los polimorfismos de los genes de los canales iónicos *CACNA1D*, *KCNQ1*, *KCNJ11* y *CACNA1E*.

Gen	Genotipos	Casos (%)	Controles (%)	p	OR (95%CI) *
	rs2253388TT	7	9	0.71	0.75 (0.15-3.56)
	rs3753737AA	27	24	0.76	1.15 (0.44-2.99)
	rs3753737AG	59	58	0.89	1.05 (0.45-2.45)
	rs3753737GG	14	18	0.59	0.73 (0.23-2.30)
	rs175338AA	7	6	0.95	1.05 (0.20-5.51)
	rs175338GA	40	47	0.49	0.74 (0.32-1.74)
	rs175338GG	53	47	0.52	1.31 (0.56-3.03)

* Odds ratio (95% Intervalo de confianza). Caracteres en negritas y cursivas indican asociación. Caracteres en negritas indican tendencia de asociación. Valor de p con chi cuadrada de Pearson, nivel de significancia en $p \leq 0.05$.

Tabla 5. Frecuencia de haplotipos de los polimorfismos de los genes de los canales iónicos *CACNA1D*, *KCNQ1*, *KCNJ11* y *CACNA1E*.

Gen	Haplotipos	Casos (%)	Controles (%)	p	OR (95%CI) *
<i>CACNA1D</i>	CCGC	40.91	40.00	0.902	1.03 (0.57-1.89)
	CCGG	32.95	17.78	0.020	2.27 (1.13-4.58)
	CCAC	9.09	15.56	0.181	0.54 (0.21-1.35)
	CGGC	7.95	8.89	0.822	0.88 (0.31-2.56)
	CGAC	3.41	7.78	0.206	0.42 (0.10-1.67)
	CGAG	1.14	3.33	0.328	0.34 (0.03-3.30)
	CCAG	1.14	3.33	0.328	0.34 (0.03-3.30)
	TGGC	2.27	1.11	0.547	2.07 (0.18-23.24)
<i>KCNQ1</i>	GGCGAC	29.55	20.00	0.140	1.68 (0.84-3.35)
	AGCGAC	30.68	17.78	0.044	2.05 (1.01-4.14)
	ATTTCT	13.64	20.00	0.257	0.63 (0.28-1.40)
	GTTTCT	7.95	21.11	0.013	0.32 (0.12-0.81)
	AGCTAC	9.09	13.33	0.370	0.65 (0.25-1.67)
	GGCTAC	3.41	5.56	0.490	0.60 (0.13-2.59)
<i>KCNJ11</i>	GC	54.55	56.67	0.776	0.92 (0.51-1.66)
	GT	36.36	35.56	0.911	1.04 (0.56-1.91)
	AC	7.95	6.67	0.741	0.20 (0.38-3.75)

Tabla 5. Frecuencia de haplotipos de los polimorfismos de los genes de los canales iónicos *CACNA1D*, *KCNQ1*, *KCNJ11* y *CACNA1E*.

Gen	Haplotipos	Casos (%)	Controles (%)	p	OR (95%CI) *
<i>CACNA1E</i>	AT	1.14	1.11	0.987	1.03 (0.06-16.61)
	AGAC	45.45	38.89	0.446	1.26 (0.69-2.30)
	AGGC	19.32	20.00	0.909	0.96 (0.46-2.01)
	TAGT	12.50	12.22	0.955	1.03 (0.42-2.51)
	AAAT	4.55	10.00	0.162	0.43 (0.13-1.45)
	AGGT	4.55	3.33	0.677	1.38 (0.30-6.35)
	AAGT	4.55	3.33	0.677	1.38 (0.30-6.35)
	TGGT	2.27	2.22	0.991	1.01 (0.14-7.34)
	TAAC	2.27	1.11	0.547	2.07 (0.18-23.24)
	TGAC	1.14	2.22	0.567	0.50 (0.04-5.61)
TGAT	1.14	1.11	0.987	1.02 (0.06-16.61)	

* Odds ratio (95% Intervalo de confianza). Caracteres en negritas y cursivas indican asociación. Caracteres en negritas y subrayado indican protección. Valor de p con chi cuadrada de Pearson, nivel de significancia en $p \leq 0.05$. *CACNA1D*: rs312480-rs312486-rs9841978-rs12487452; *KCNQ1*: rs2283171-rs2074196-rs2237892-rs163184-rs2283228-rs2237897; *KCNJ11*: rs5218-rs5219; *CACNA1E*: rs10797728-rs175338-rs3753737-rs2253388.

9. FIGURAS

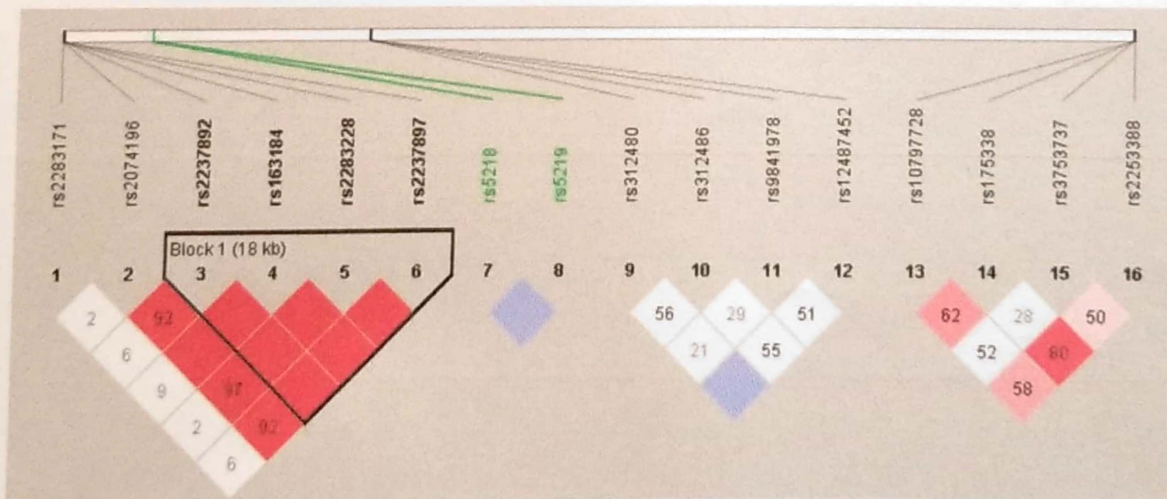


Figura 1. Desequilibrio de ligamiento (LD) entre los SNPs de *CACNA1D*, *KCNQ1*, *KCNJ11* y *CACNA1E* genotificados en la diabetes tipo 2. La gráfica de LD fue creada por HAPLOVIEW 4.2.