



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
IZCALLI.

“ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS DEL GEN *CDKALI* CON
SÍNDROME METABÓLICO Y DIABETES TIPO 2.”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A :
JAVIER ANGELES MARTÍNEZ

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. ADÁN VALLADARES SALGADO.

ASESOR: M. en C.

ANALaura VÁZQUEZ MARTÍNEZ.



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis :

"Asociación de polimorfismos del gen CDKAL1 con síndrome metabólico y diabetes tipo 2".

que presenta el pasante: Javier Angeles Martínez
con número de cuenta: 40301096-3 para obtener el título de :
Químico Farmacéutico Biólogo

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

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 30 de JUNIO de 2009

PRESIDENTE	<u>QFB. Ma. Esther Revuelta Miranda</u>	
VOCAL	<u>Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo</u>	
SECRETARIO	<u>MC. Ana Laura Vázquez Martínez</u>	<u>Ana Laura Vázquez Martínez</u>
PRIMER SUPLENTE	<u>QFB. Rosalba Bonilla Sánchez</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>MC. Maritere Domínguez Rojas</u>	

DEDICATORIAS

A **DIOS**, por ser el arquitecto de mi vida, quien me concede paz, armonía y el amor para continuar sirviendo a nuestros semejantes.

A mis **PADRES**, por sus sabios consejos y por alentarme a continuar en los momentos en que el cansancio invadía mi cuerpo.

A **EYE** y **VALE** que son la fuente de mi inspiración y el motivo para continuar superándome.

A mis **HERMANOS** por su comprensión y constante apoyo.

A mis dos **ÁNGELES** que siempre estarán con migo.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento al doctor Adán Valladares Salgado, bajo cuya dirección se ha efectuado este trabajo, por su constante apoyo y asesoramiento en todos los aspectos de la investigación y elaboración de esta tesis así como por la confianza depositada en mí.

A la M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez por todo su apoyo incondicional para la realización de esta tesis.

A la Dra. Margarita Gutiérrez por su ayuda y por los consejos brindados en el momento adecuado.

A mi Hermano Clemente, por su esfuerzo para que yo siguiera adelante y por la confianza que ha depositado en mí.

A mis Hermanas Esther, Claudia y Rosario por creer en mí.

A Macrina Flores, Valentín Bravo y sus hijas Cynthia y Saayra, por su apoyo incondicional y por darme lo más valioso de ellos.

A la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional "Siglo XXI" del Instituto Mexicano del Seguro Social, por albergarme en su laboratorio dandome las facilidades para realizar y concluir este trabajo.

A todos los integrantes del laboratorio de la UIMB: Nayelli Cano, Hilda, Evelin, Marisol, Ired, Eloisa, Emmanuel, Jairo, Miriam Cortes, Miriam Gonzáles, Fabiola, Dra. Mungia, Dra. Genoveva, Dra. Margarita Diaz y al Dr. Daniel Saavedra, por su gran compañerismo.

A mis amigos del laboratorio Rox, Tere, Edith, Eduardo y Emilio; pero muy en especial a Rosalía por ayudarme a madurar y a aprender a darle el verdadero valor a la vida.

A mis amigos de la FES-C: Bety, Marisol, Aida, Rogelio, Paty, Ariana, Bere, Hugo, Maria, Nelly, Ana, Viri, Mardug y Jonathan quienes compartieron muchos de los momentos malos y sobre todo buenos de mi estancia en esta máxima casa de estudios.

A los sinodales del jurado por su valiosa contribución al trabajo.

- QFB. Ma. Esther Revuelta Miranda
- Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo
- MC. Ana Laura Vázquez Martínez
- QFB. Rosalba Bonilla Sánchez
- MC. Maritere Domínguez Rojas

A la **UNAM** que me dio tanto por tan poco, en especial a la FES Cuautitlán que día a día se esfuerza para formar grandes profesionales.

Cuanto más vivo, más me doy cuenta de la importancia de la actitud en la vida. Actitud para mí es más importante que los hechos. Más importante que el pasado, que la educación, que el dinero, que las circunstancias, que los fracasos, que el éxito, que lo que piensan o hacen los demás. Es más importante que la apariencia, un don o una habilidad. Hará o destruirá una empresa, una iglesia, un hogar. Lo más sorprendente es que cada día podemos decidir nuestra actitud. No podemos cambiar el pasado...no podemos cambiar el hecho de que la gente se comporta de un cierto modo. No podemos cambiar lo inevitable. Lo único que podemos hacer es usar lo que tenemos, y esa es nuestra actitud. Estoy convencido de que la vida consiste en un diez por ciento de lo que te pasa y un noventa por ciento como tu reaccionas hacia ella. Y así es, somos responsables de nuestra actitud.

Charles Swindoll

Reír a menudo y mucho; ganar el respeto de gente inteligente y el cariño de los niños, conseguir el aprecio de críticos honestos y aguantar la traición de falsos amigos; apreciar la belleza; encontrar lo mejor en los demás; dejar el mundo un poco mejor, sea con un niño saludable, una huerta o una condición social redimida; saber que por lo menos una vida ha respirado mejor porque tú has vivido. Eso es tener éxito.

Ralph Waldo Emerson

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
1. ABREVIATURAS.	01
2. RESUMEN.	02
3. MARCO TEÓRICO.	
3.1. Glucosa.	03
3.2. Síndrome Metabólico (SM).	04
3.2.1. Fisiopatología del SM.	05
3.2.2. Diagnóstico de SM.	05
3.2.3. ¿Qué definición utilizamos?	07
3.3. Diabetes.	09
3.3.1. Prevalencia de la Diabetes en México.	10
3.3.2. Diabetes tipo 2 (DT2).	13
3.3.3. Diagnóstico y factores de riesgo de DT2.	14
3.3.4. Impacto económico de la DT2.	15
3.4. Genética de SM y DT2.	16
3.5. Polimorfismos de un Solo Nucleótido (SNPs).	18
3.6. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR en tiempo Real).	19
3.7. Ciclinas y cinasas.	19
3.8. Gen <i>CDKALI</i> .	20
4. JUSTIFICACIÓN.	24
5. OBJETIVOS.	25
5.1. Objetivo General.	
5.2. Objetivos Particulares.	
6. HIPÓTESIS.	26
7. DESARROLLO EXPERIMENTAL.	
7.1. Población de estudio.	27
7.2. Selección de controles y pacientes.	27

Grupo 1: Control

Criterios de inclusión.

Criterios de exclusión.

Grupo 2: Pacientes con Síndrome Metabólico

Criterios de inclusión.

Criterios de exclusión.

Pág

Grupo 3: Pacientes con Diabetes Tipo 2

Criterios de inclusión.

Criterios de exclusión.

7.3. Material y Métodos.	28
7.3.1. Estudios bioquímicos.	
7.3.2. Análisis estadístico.	
8. RESULTADOS.	31
9. DISCUSIÓN.	40
10. CONCLUSIONES.	43
11. BIBLIOGRAFÍA.	44
12. Sitios electrónicos.	51
13. ANEXOS	
13.1 Fundamento de las Sondas TaqMan.	52
13.2 Obtención de material biológico.	53
Extracción de DNA	
13.3 Cuantificación y determinación de integridad de DNA.	54
13.4 Amplificación por PCR tiempo real del fragmento correspondiente a los SNPs del gen <i>CDKAL1</i> de estudio.	55
Técnica TaqMan para SNPs en el software S.D.S. versión para el equipo HT7900.	
Programación para discriminación alélica en el software S.D.S. versión 2.2.2 para el equipo HT7900.	
13.5 Esquema de trabajo y valores de referencia para pruebas bioquímicas.	58

ÍNDICE DE TABLAS.

	Pág
Tab 1. Síndrome metabólico, evaluación clínica.	06
Tab 2. Criterios de diagnóstico para síndrome metabólico.	08
Tab 3. Cifras de perímetro abdominal.	09
Tab 4. Clasificación etiológica de la diabetes mellitus.	10
Tab 5. Criterios para el diagnóstico de diabetes.	15
Tab 6. Características clínicas de los participantes de los grupos de estudio.	31
Tab 7. Frecuencias genotípicas, alélicas y equilibrio de Hardy-Weinberg de los 3 SNPs ubicados en el intrón 5 del gen CDKAL1 en el cromosoma 6p22.3.	32
Tab 8. Tabla de asociación de las frecuencias genotípicas obtenidas de los grupos de estudio para los 3 SNPs con un intervalo de confianza del 95%.	33
Tab 9. Tabla de asociación alélica de los 3 SNPs en estudio, comparando el grupo Control con SM y DT2.	34
Tab 10. Asociación de los parámetros bioquímicos con los genotipos obtenidos del grupo control.	36
Tab 11. Asociación de las características clínicas con los genotipos de los tres SNPs de estudio con SM.	37
Tab 12. Asociación de los parámetros antropométricos de los genotipos de los 3 SNPs con el grupo con DT2.	38
Tab 13. Asociación de parámetros antropométricos en mujeres con los 3 SNPs en el grupo con SM.	38
Tab 14. Asociación de parámetros antropométricos en mujeres con los 3 SNPs en el grupo con DT2.	39
Tab 15. Asociación de parámetros antropométricos en hombres con los 3 SNPs en el grupo con DT2.	39

ÍNDICE DE FIGURAS.

	Pág
Fig. 1. Comparación de prevalencia de diabetes mellitus en dos encuestas nacionales 1993 y 2000.	11
Fig. 2. Proyecciones mundiales de las personas con diabetes.	12
Fig. 3. Cronograma de identificación de nuevas variantes que confieren a la susceptibilidad a padecer DT2.	13
Fig. 4. Localización del gene CDKAL1 en el cromosoma 6.	21
Fig. 5. Propuesta de la localización subcelular de proteínas que codifican genes asociados con diabetes.	22
Fig. 6. Esquema general de interacción de genes asociados con DT2.	23
Fig. 7. Esquema general de trabajo.	30

1. ABREVIATURAS

AACE:	“American Association of Clinical Endocrinologists”.
AHA:	Asociación Americana del Corazón (American Heart Association).
ATP	Adenosintrifosfato.
C-LDH	Lipoproteínas de Alta Densidad.
C-LDL	Lipoproteínas de Baja Densidad.
DT2:	Diabetes tipo 2.
EGIR:	Grupo Europeo para el Estudio de Resistencia a la Insulina.
GLUT:	Transportador de glucosa (glucose transporters).
HOMA:	“Homeostasis Model Assessment”.
IDF:	Federación Internacional de Diabetes.
IMC	Índice de Masa Corporal.
NCEP ATP III:	Grupo Nacional de Educación en Colesterol.
RFLP	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción.
RI:	Resistencia a la Insulina.
SGLT:	Transportador de sodio y glucosa (sodium glucose transporters).
SM:	Síndrome Metabólico.
SNP:	Polimorfismos de un Solo Nucleótido (Single Polymorphism Nucleotide).
SSO	Oligonucleótidos de secuencia específica (Sequence Specific Oligonucleotides)
SSP	Primers de secuencia específica (Sequence Specific Primers)
VLDL	Lipoproteínas de muy alta densidad.
WHO:	Organización Mundial de la Salud (OMS).

2. RESUMEN

El rápido aumento de la prevalencia de diabetes tipo 2 (DT2) ha sido un problema importante de salud pública en todo el mundo, incluyendo México. La prevalencia de la diabetes en México ha aumentado casi 10 veces en los últimos 25 años y es actualmente uno de los países que reporta una de las más altas incidencias en todo el mundo (10,9%). Esto sugiere que la población mexicana muestra mayor susceptibilidad a desarrollar la diabetes tal vez por el tipo y el número de genes implicados, la influencia de factores ambientales como cambios de estilo de vida y la migración de las zonas rurales a zonas urbanas, y la adquisición de hábitos alimenticios más occidentalizados (Tusié, 2005).

Nuestro objetivo principal fue el realizar un estudio de frecuencias genotípicas y alélicas de 3 polimorfismos del gen *CDKALI* en grupos de pacientes con síndrome metabólico (SM), DT2 y sujetos control de la ciudad de México, para identificar una posible asociación con estos padecimientos. La identificación, mediante el análisis genético, de los genes implicados en el desarrollo de estas enfermedades constituye un poderoso instrumento para revelar la clave de las rutas que están involucradas en su predisposición y progresión. La *n* estimada para cada uno de los grupos de estudio fue de 500 en cada uno de los siguientes grupos: SM, DT2 y Control; los grupos se formaron dependiendo del resultado de sus características clínicas y antropométricas, posteriormente se genotipificó a cada uno de ellos con los tres SNPs en estudio (rs7754840, rs9465871 y rs10946398) por medio de la técnica PCR en tiempo real utilizando el equipo 7900HT con sondas TaqMan de Applied Biosystems.

Las frecuencias genotípicas de nuestros grupos de estudio se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg. Las frecuencias alélicas y genotípicas no muestran asociación con SM y DT2 obteniendo valores de $P > 0.05$. Sin embargo, el análisis de asociación de estos SNPs con las características clínicas de cada grupo mostró asociaciones. El grupo con SM mostró asociación con la edad ($P=0.028$), insulina ($P=0.048$), HOMA2 %B ($P=0.032$) y HOMA2-IR ($P=0.020$) con el rs10946398 y cuando separamos nuestro estudio con base en el género se encontró la asociación con IMC ($P=0.045$) en mujeres con respecto al rs7754840. En el grupo con DT2 se localizaron asociaciones con IMC relacionado con el rs7754840 ($P=0.034$) y el rs10946398 ($P=0.021$), el género con el rs7754840 ($P=0.029$) el rs10946398 ($P=0.010$) cuando se separó por género se mostró la asociación de TAD ($P=0.042$) con el rs9465871 en hombres y se mantuvo la asociación con IMC ($P=0.028$) con el rs10946398 en mujeres. El grupo control mostró la asociación del rs10946398 con TG ($P=0.03$) debido a que en el grupo control hay parámetros bioquímicos y clínicos que no cumplen con una persona sana pero tampoco reúne los requisitos para clasificarlos en alguno de nuestros grupos de estudio.

Dada la relevancia de estos padecimientos en la salud de la comunidad se requiere encontrar estrategias científicas que acorten los tiempos en la generación de conocimientos y que permitan diseñar modelos de prevención y tratamiento. La meta se alcanzará cuando estos modelos sean operables a través de programas asistenciales y se logre disminuir la frecuencia de estas entidades.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Glucosa

La glucosa tiene un papel importante dentro de la regulación de energía en el organismo y esta depende principalmente de la insulina producida en páncreas, que mantiene los niveles compatibles con la vida. El glucagón, glucocorticoides, catecolamina y hormona del crecimiento (Marc *et al.*, 2002) regulan las cantidades de ésta en el organismo. En las células beta del páncreas se encuentran reguladores de glucosa que funcionan como sensores que tiene la capacidad de percibir pequeños cambios, respondiendo de inmediato con una secreción de insulina proporcional. En condiciones normales, si existe mayor demanda por una elevación mantenida de la glucosa, aumenta la sensibilidad a ella y es capaz de estimular la replicación de las células beta. Estos efectos tienen una distinta secuencia temporal: en segundos responde a los cambios de glucemia, en minutos aumenta la sensibilidad y en semanas se adapta incrementando la masa celular.

Para la producción del adenosintrifosfato (ATP), compuesto indispensable en muchas de las reacciones que se llevan a cabo en la célula, se necesitan varios sustratos energéticos, entre los cuales la glucosa es el de mayor importancia. Debido a que ésta no difunde a través de la bicapa lipídica, debe ser transportada al interior de la célula. Este transporte lo realizan dos grupos de proteínas: los transportadores SGLT o transportadores de glucosa y sodio (sodium glucose transporters) y los transportadores GLUT o transportadores de glucosa (glucose transporters) (Díaz *et al.*, 2002). La captación de glucosa es el paso limitante en su utilización y almacenamiento. La insulina estimula su transporte dentro del músculo y el tejido adiposo debido al incremento en la concentración del GLUT-4 (Transportador de glucosa 4) en la superficie celular, esta acción de la insulina, incrementa de 10 a 40 veces la glucosa transportada por las células. Dentro de las células musculares la glucosa es rápidamente fosforilada por la hexocinasa para ser almacenada como glucógeno en el hígado debido a la activación de la glucógeno sintasa u oxidada para generar ATP por la activación de enzimas como la piruvato cinasa. En el adipocito, la glucosa es transformada y almacenada principalmente como lípidos, debido a su incremento en el citosol y a la activación de enzimas de síntesis lipídica; la insulina inhibe la lipólisis en las células del tejido adiposo principalmente a través de la inactivación de la lipasa y en el hígado inhibe la producción y liberación de glucosa, debido al bloqueo de la gluconeogénesis y glucogenólisis (Saltiel *et al.*, 2001).

Debido a la presencia de diversas alteraciones en el transporte y consumo de glucosa por el organismo existen enfermedades multifactoriales como el SM y DT2 que han tenido

auge durante el siglo pasado y han tomado una gran magnitud en el presente convirtiéndose en pandemias.

3.2 Síndrome Metabólico.

El *Síndrome Metabólico* es una entidad clínica que se presenta en personas con predisposición, determinada genéticamente y condicionada por factores ambientales. Se caracteriza por la presencia de resistencia a la insulina e hiperinsulinemia asociados a trastornos del metabolismo de carbohidratos, cifras elevadas de presión arterial, alteraciones lipídicas (hipertrigliceridemia, descenso del C-HDL, aumento de C-LDL, aumento de ácidos grasos libres y lipemia postprandial) y obesidad (Grundy *et al.*, 2005), asociado a un incremento de 5 veces en la prevalencia de DT2 y es considerado un elemento importante en la epidemia actual de diabetes, de manera que se ha convertido en un problema de salud pública en todo el mundo (Paul *et al.*, 2005, Rodríguez, 2002). Este padecimiento afecta a cerca de una cuarta parte de la población mayor de 40 años en México.

Reaven (Reaven, 1988) fue quien por primera vez postuló la asociación de estas entidades clínicas con la resistencia a la insulina y describió el síndrome X, actualmente conocido como SM o síndrome de resistencia a la insulina. La DT2 se es un estado de resistencia a la insulina y por lo tanto en forma estricta, el beneficio práctico de establecer el diagnóstico de este síndrome, es cuando éste se realiza en forma temprana, antes del diagnóstico de la misma (Lerman *et al.*, 2004).

Como ya lo hemos mencionado la insulina tiene una función central en la regulación del metabolismo. Un defecto en su secreción o acción tiene múltiples y complejas consecuencias metabólicas. Himsworth, en la década de los 30-40, estudió la respuesta a la insulina en diferentes grupos de individuos y demostró que era frecuente encontrar una menor sensibilidad a la acción de la insulina en pacientes obesos y/o diabéticos. El advenimiento del radioinmunoensayo, confirmó que las concentraciones de insulina se encontraban habitualmente elevadas en pacientes obesos y/o con intolerancia a carbohidratos o en aquellos con diabetes de reciente diagnóstico. Durante las décadas de 1970 y 1980 se crearon diversos métodos incluyendo la pinza metabólica que miden directa o indirectamente la secreción y acción de la insulina. Estos avances han permitido entender mejor el papel que tiene la resistencia a la insulina en la fisiopatología de la diabetes y su asociación con la hipertensión arterial, las dislipidemias, la aterosclerosis, el síndrome de ovario poliquístico y algunos estados pro coagulantes (Reaven, 1998, Ford *et al.*, 2002).

3.2.1 Fisiopatología del SM.

En la fisiopatología del SM se cubren alteraciones del metabolismo glucolipídico, estados proinflamatorios y protrombóticos. El vínculo entre todas ellas se atribuye a la resistencia a la insulina (RI), favorecida por el aumento de ácidos grasos libres, muchas veces relacionado con el sobrepeso. Este estado provoca trastornos en la utilización de glucosa celular, así como desregulación de su producción hepática. El metabolismo lipídico presenta también las consecuencias de la RI, que desembocan en las alteraciones características del SM: hipertrigliceridemia y niveles bajos de C-HDL (Laclaustra *et al.*, 2005).

La fisiopatología del SM aún está en estudio. Se propone que la mayor actividad lipolítica de la grasa abdominal provoca aumento de la síntesis de triglicéridos. La acumulación de ácidos grasos de cadena larga en el hígado, músculo y algunas áreas cerebrales sumada a la toxicidad pancreática ejercida por estos ácidos grasos constituye factores fundamentales en las modificaciones metabólicas que permiten la aparición de este síndrome (Flordellis *et al.*, 2005).

Como parte del modelo se sugiere que el aumento de los ácidos grasos puede provocar: disminución de la captación periférica de glucosa al inhibir la unión de los transportadores Glut-4 a la membrana celular, disminución de la secreción de insulina por las células β del páncreas (efecto lipotóxico) y aumento de la síntesis de triglicéridos hepáticos y VLDL que condicionan la generación de LDL pequeñas y densas (Davidsson *et al.*, 2005).

3.2.2 Diagnóstico de SM.

La causa del SM no se conoce con certeza, se postulan tres posibles etiologías:

1. Obesidad.
2. Alteraciones en el metabolismo del tejido adiposo con resistencia a la insulina.
3. Factores independientes (moléculas de origen hepático, vascular, inmunológico) que median en la aparición de componentes específicos del SM.

Otros factores como el envejecimiento, un estado proinflamatorio y cambios hormonales también pueden contribuir al desarrollo de éste. A continuación se enlistan diferentes factores asociados con un mayor riesgo de desarrollar el SM (Ginsberg, 2000).

- Sobrepeso, particularmente si la distribución del mismo es central.
- Estilo de vida sedentario.
- Edad mayor de 40 años.

- Etnicidad: Latinos, Hispanoamericanos, Afroamericanos, grupos nativos americanos, Americanos de origen asiático y residentes de las islas del pacifico, tienen mayor riesgo.
- Historia familiar con DT2, hipertensión arterial o enfermedad cardiovascular.
- Historia de intolerancia a carbohidratos o diabetes gestacional.
- Acantosis nigricans.
- Síndrome de ovario poliquístico.
- Esteatosis hepática no alcohólica.

No se ha precisado si efectivamente la resistencia a la insulina es un factor causal o simplemente un marcador asociado a todas estas alteraciones metabólicas o si el mayor riesgo es parcialmente debido a ésta o a la suma de todos los factores de riesgos que participan en forma individual en este síndrome (Ginsberg, 2000). En el **tabla 1** se incluyen los parámetros a evaluar en todo paciente con sospecha de SM.

Tabla 1. Síndrome metabólico evaluación clínica (Lerma *et al.*, 2004).

Estado de tolerancia a la glucosa	} Curva de tolerancia a la glucosa oral	• Requiere de 8 h de ayuno y una curva de tolerancia oral a la glucosa.
• Glucosa de ayuno alterada/ intolerancia a la glucosa.		
• Resistencia a la insulina	→	• Aún no recomendada en la practica clínica cotidiana (insulina en ayuno)
Índice de Masa Corporal	→	Requiere de medición de peso y talla.
Circunferencia de cintura	→	Circunferencia del abdomen a nivel del ombligo
Relación cintura/cadera	→	Circunferencia de la cadera a nivel de la cresta iliaca
Triglicéridos	→	Requiere ayuno mínimo de 8 horas.
Colesterol-HDL	→	Requiere de muestra de sangre en ayunas
Tensión arterial	→	Dos determinaciones después de que el paciente permanece sentado por 5 minutos.

Es común encontrar resultados contradictorios al hablar del SM por las múltiples definiciones y criterios diagnósticos establecidos acerca del mismo y la ausencia de un marcador genético o prueba diagnóstica específica.

3.2.3 ¿Qué definición utilizamos?

Mientras los criterios para diagnosticar DT2, obesidad, e hipertensión arterial son claros, no ocurre lo mismo con el SM. Diferentes grupos de investigadores han desarrollado las definiciones existentes y los criterios clínicos para el SM (**Tabla 2**). Actualmente se conocen las del Grupo Europeo para el estudio de la Resistencia a la Insulina (EGIR), la OMS (Alberti *et al.*, 1998), y grupos del NCEP ATP III (Executive

Summary of The Third Report of The NCEP ATP III, 2001) entre otros; todos coinciden en que los componentes básicos del SM son: obesidad, resistencia a la insulina, dislipidemia e hipertensión. Sin embargo, emplean diferentes parámetros para medir estas alteraciones (Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults, 2001).

La Federación Internacional de Diabetes (IDF) propuso una nueva definición, posteriormente a finales del año 2005, la American Heart Association (AHA) difunde unas guías de práctica clínica para orientar al médico especialista y de atención primaria sobre el diagnóstico y manejo de SM en adultos.

Estas guías concluyen que aunque los criterios del ATP III son útiles, requieren ciertas modificaciones de acuerdo a la población en estudio (Grundy *et al.*, 2005). Se incluye como factor anormal la hipertensión arterial tanto diastólica como sistólica, o el tratamiento para esta patología, según las recomendaciones de la IDF. De acuerdo con lo recomendado por la Sociedad Americana de Diabetes, los niveles de glucosa en ayunas se reducen de 110 mg/dL a 100 mg/dL. Los niveles de triglicéridos y colesterol HDL siguen con la definición de ATP III; sin embargo, se incluyen aquellos pacientes con tratamiento específico para tales dislipidemias. Con respecto a lo sugerido por la IDF, se aceptan las diferencias étnicas en cuanto el perímetro abdominal (**tabla 3**), las cuales deben ser ajustadas según el grupo poblacional evaluado (Lombo *et al.*, 2007).

El diagnóstico para SM en este estudio está basado en los criterios establecidos por la AHA 2005, ya que estos criterios son los que más se acoplan a nuestra población.

La importancia de hacer el diagnóstico de SM radica en que cuando está presente en un paciente es indicador de un elevado riesgo a padecer enfermedades tales como la DT2 y enfermedad cardiovascular o algún otro trastorno asociado con el SM. Por otra parte, cuando coexisten solamente algunos de los factores simultáneamente (no se cumplen todos los criterios para diagnosticar el síndrome) es un alerta para mantener la vigilancia del paciente.

Tabla 2. Criterios diagnósticos de síndrome metabólico (Susanne, 2007, Pineda, 2008).

Criterio	OMS (1998)	EGIR (1999)	ATP III (2001)	AACE (2003)	IDF (2005)	AHA/NHLBI (2005)
RI	AGA ¹ , IC ² , DT2 ³ o sensibilidad disminuida a la insulina ⁴ .	Insulina plasmática > perc 75. Dos más de los siguientes	Ninguno Tres o más de los siguientes.	AGA o IC más cualquiera de los siguientes según juicio clínico.	Ninguno	Ninguno Tres o más de los siguientes.
Obesidad	Dos más de los sig. H:RCC ⁵ ≥0.9 M:RCC≥0.85 y/o IMC ≥ 30	H: PA ⁶ ≥94 cm M: PA ≥80 cm	H: PA ≥102 cm M: PA ≥88 cm	IMC ≥ 25	PA elevada según cuadro III más dos de los siguientes.	H: PA ≥102 cm M: PA ≥88 cm
Dislipidemia	TG≥150mg/dL y/o H: HDL≤35mg/dL. M:HDL≤39 mg/dL.	TG ⁷ ≥150mg/dL y/o HDL ⁸ ≤39mg/dL.	TG≥150mg/dL y/o H: HDL≤40mg/dL. M:HDL≤50 mg/dL.	TG≥150mg/dL y/o H: HDL≤40mg/dL. M:HDL≤50 mg/dL.	TG≥150mg/dL o con medicamentos para ↓TG H:HDL≤40mg/dL. M:HDL≤50 mg/dL o medicamentos para aumentar HDL.	TG≥150mg/dL o con medicamentos para ↓TG H: HDL≤40mg/dL. M:HDL≤50 mg/dL o medicamentos para aumentar HDL.
Presión Arterial	≥140/90 mmHg	≥140/90 mmHg ó con antihipertensivos.	≥130/85 mmHg	≥130/85 mmHg	≥130/85 mmHg o en tratamiento antihipertensivo	≥130/85 mmHg o en tratamiento antihipertensivo
Glucemia	AGA, IC o DT2	AGA, IC O DT2	≥ 110 mg/dL incluyendo DT2.	AGA, IC pero no DT2	≥ 110 mg/dL incluyendo DT2.	≥ 110 mg/dL o con medicamentos anti - diabéticos incluyendo DT2.
Otros	Microalbuminuria			Otras características de IR Apéndice 1.		

1. AGA: Alteración de glucosa en ayuno 2. IC: Intolerancia a carbohidratos 3. DT2: Diabetes tipo 2 4. Condiciones de hiperinsulinemia euglucémica con toma de glucosa en el cuartil inferior 5. RCC: Relación cintura/cadera 6. PA: Perímetro Abdominal. 7. Triglicéridos 8. HDL: Lipoproteínas de alta densidad.

Tabla 3. Cifras de perímetro abdominal (Pineda, 2008).

Grupo étnico/región	genero	perímetro abdominal (cm)
Europeos	Hombres	≥94
	Mujeres	≥80
EUA	Hombres	≥102
	Mujeres	≥88
Asia sudeste/chinos	Hombres	≥90
	Mujeres	≥80
Latinoamericanos (incluida Colombia)*	Hombres	≥90
	Mujeres	≥80

*No hay estudios pero se recomienda usar los límites de la población asiática.

3.3 Diabetes.

La diabetes mellitus es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizada por hiperglicemia, resultado de defectos en la secreción o acción de la insulina, o ambos. La hiperglicemia crónica en la diabetes esta asociada con daño, disfunción y falla de varios órganos, especialmente de ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos (Report of The Expert Committe on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2007).

Los pacientes con diabetes presentan alteraciones progresivas con el deterioro de la tolerancia a la glucosa, tanto en la sensibilidad a la insulina como en la funcionalidad de la célula beta. Los principales síntomas de la hiperglucemia son la poliuria, polidipsia, pérdida de peso, algunas veces polifagia y la visión borrosa (SSA, 2000) y esta se clasifica en cuatro grupos principalmente (**tabla 4**), la asignación del tipo de diabetes para una persona a menudo depende de las circunstancias presente en el momento del diagnóstico, y muchas las personas diabéticas no encajan fácilmente en un sola clase.

La gran mayoría de los casos de diabetes se dividen en dos grandes categorías etiopatogénicas. En una categoría, la diabetes tipo 1, la causa es una deficiencia de la secreción de insulina. Las personas en mayor riesgo de desarrollar este tipo de diabetes puede ser a menudo identificadas por las pruebas serológicas de un proceso patológico autoinmune que ocurre en los islotes pancreáticos y genéticos marcadores.

En la otra, mucho más frecuente categoría, la DT2, la causa es una combinación de resistencia a la insulina de acción y una compensación insuficiente de insulina respuesta secretora (Report of The Expert Committe on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2007).

Tabla 4. Clasificación etiológica de la diabetes (American Diabetes Association, 2007).

- Diabetes tipo 1 (Destrucción de células β , por lo general conduce a la deficiencia absoluta de insulina).
 - Mediada por el sistema inmune.
 - Idiópatica.
- Diabetes tipo 2 (puede variar entre la acción o acción de la insulina o ambas)
- Diabetes de otros tipos específicos:
 - Defectos genéticos de la función de las células β
 - Defectos genéticos en la acción de la insulina
 - Enfermedades pancreáticas.
 - Trastornos hormonales (endocrinopatías).
 - Pancreopatías secundarias a medicamentos o sustancias químicas.
 - Anormalidades moleculares de la insulina o sus receptores celulares.
 - Formas poco frecuentes de diabetes mediada por inmunidad
 - Algunos otros síndromes genéticos.
- Diabetes gestacional

Los pacientes con cualquier forma de diabetes pueden requerir tratamiento con insulina en algún momento de su enfermedad. El uso de esta no sirve para clasificar al paciente.

3.3.1 Prevalencia de diabetes en México y el Mundo.

La Encuesta Nacional de Salud 2000 encontró una prevalencia de DM2 de 10.9% en la población mexicana. (Velásquez *et al.*, 2002) Este dato representa un incremento con lo reportado por la Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas en 1993: 8.2% con DM2 (ENEC 1993, **Fig. 1**). Y se espera que existan 11.7 millones de mexicanos con diabetes para el año 2025 (IDF, 2003).

Un análisis reciente del Estudio de Diabetes de la Ciudad de México encontró que 16% de mujeres y 14.2% de hombres desarrollaron el SM en 6 años de seguimiento, y de éstos, 46% de mujeres y 44% de hombres desarrollaron DM2 (Han *et al.*, 2002). La incidencia de DT2 (aproximadamente 1% anual) de este estudio es alarmante. La cohorte de este estudio es de un estrato socioeconómico bajo, por lo que su generalización al resto de la población es cuestionable, pero demanda una valoración pronta. Aunque no existe una estimación de la prevalencia del SM en población mexicana, el aumento en el sobrepeso/obesidad en época reciente probablemente se acompaña de un aumento de tal síndrome, lo cual coincide con el aumento en DT2. A su vez, el incremento en la mortalidad por cardiopatía isquémica en México, observado en las últimas décadas tiene una contribución importante derivada del aumento en DT2 (Carrillo *et al.*, 2006).

Un estudio realizado en México, indica que la diabetes es la tercera causa de mortalidad general y la primera causa de mortalidad en grupos de personas de 55 - 64 años de edad (Barquera *et al.*, 2003).

En sólo cuatro años (de 2000 a 2004), la proporción de la mortalidad general por diabetes y enfermedades cardiovasculares se elevó del 24.9 a 28.7% en hombres y del 33.7 a 37.8% en mujeres. Como consecuencia desde el año 2000 la cardiopatía isquémica y la diabetes son las dos causas de muerte más frecuentes en México (Córdova *et al.*, 2008).

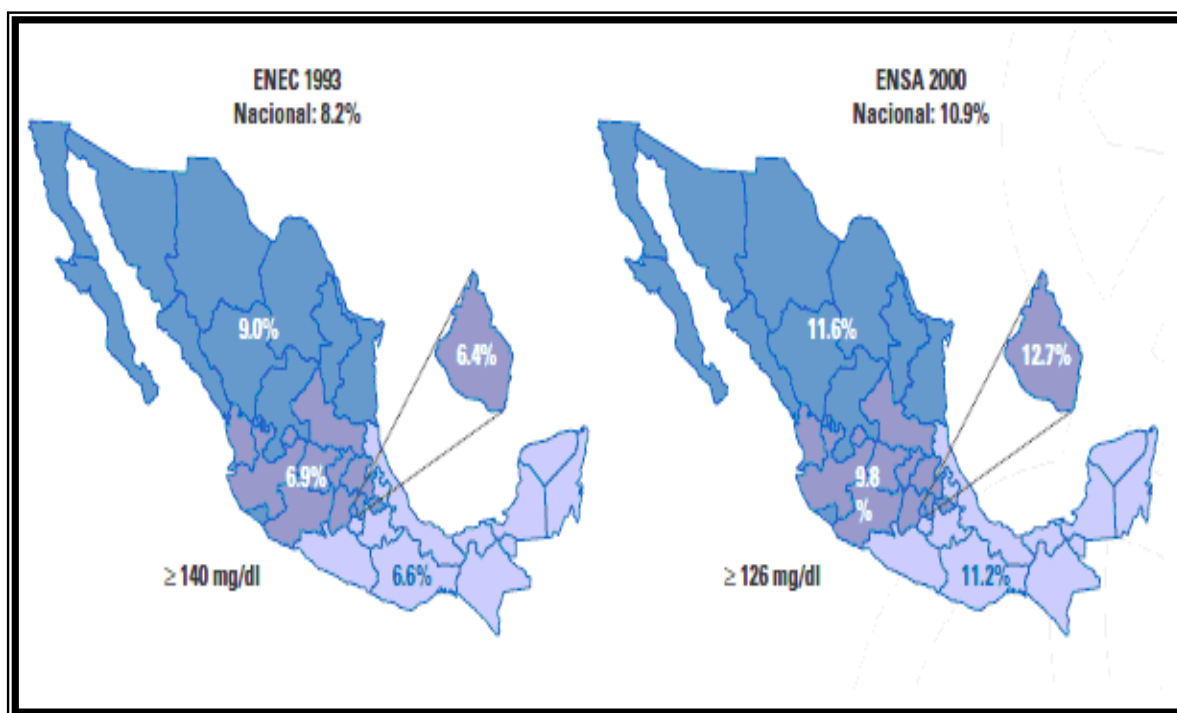


Fig. 1. Comparación de prevalencia de diabetes mellitus en dos encuestas nacionales 1993 y 2000 (ENEC 1993/ ENSA 2000/ CNVE / SSA).

La diabetes mellitus durante mucho tiempo considerada una enfermedad de menor importancia de salud en el mundo, ahora está tomando su lugar como una de las amenazas principales para la salud humana en el siglo XXI, por esto ha surgido la necesidad urgente de determinar estrategias para prevenir la epidemia global emergente de DT2 (Zimmet, 2000). Los cambios relevantes en el medio ambiente, la conducta como la modernización de la sociedad contemporánea y las formas de vida humana son acompañados por el aumento de los índices de obesidad y diabetes tanto en países desarrollados, como aquellos en vías de desarrollo, México entre ellos. En menos de cuatro décadas la diabetes se ha convertido en el problema de salud principal de México y por la distribución de edad de la población y el predominio cada vez mayor de la obesidad y síndrome metabólico en niños son indicadores de la alta prevalencia a futuro (Rull, 2005). De tal forma, es necesario dilucidar la interrelación de estas entidades, los mecanismos patogénicos que favorecen el desarrollo de estos padecimientos y como ya mencionamos establecer medidas preventivas (Trejo, 2004), además, un esfuerzo enorme será requerido para educar a la población y a

los médicos para mejorar el diagnóstico y el tratamiento de pacientes con diabetes (Rull, 2005).

En 2007, más del 80% de los 246 millones de personas con diabetes viven en países de ingresos bajos y medios, en donde los recursos sanitarios son limitados (**Fig. 2**). Además, las personas pertenecientes al grupo de edad de jóvenes adultos forman hoy el grueso de la población mundial que vive con DT2; alrededor del 46% de los adultos con diabetes pertenece al grupo de edad que va de los 49 a los 59 años (Peter, 2007).

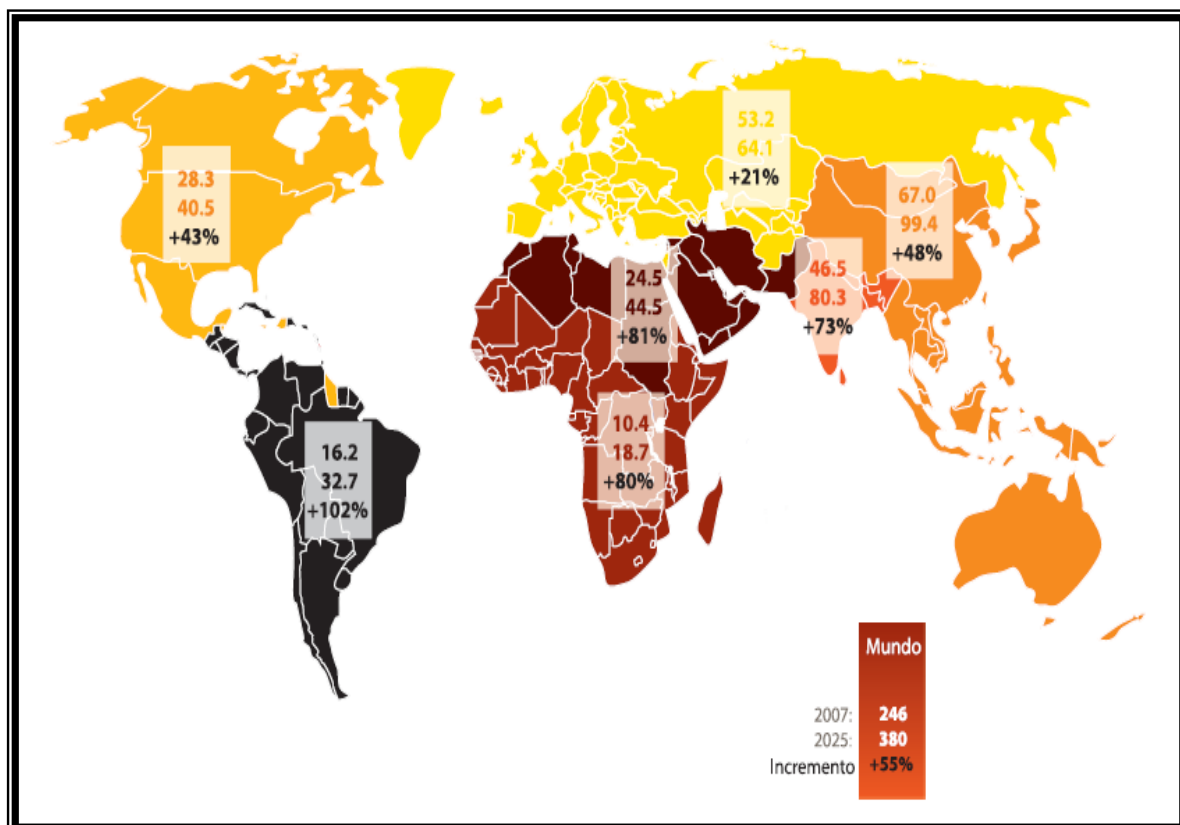


Fig. 2. Proyecciones mundiales de las personas con diabetes (Grupo de edad entre 20 y 79 años), 2007-2025 (millones) (Peter, 2007).

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica que lleva a complicaciones incluyendo enfermedad cardíaca, insuficiencia renal, retinopatía. La DT2, caracterizada por resistencia a la insulina en su tejido blanco, es epidémica de sociedades industrializadas y se asocia fuertemente a obesidad; sin embargo, los mecanismos por los cuales los adipocitos causan el incremento a la resistencia a la insulina es todavía confuso (Claire, 2001).

En estas últimas décadas se han hecho avances en la identificación de genes que confieren susceptibilidad o resistencia a la diabetes (**Fig. 3**). Regiones identificadas a través de enfoques de genes candidatos se encuentran en negro, y los estudios de

asociación en todo el genoma encuentran en rojo. Las regiones que se muestra en azul (WFS1, IFIH1, TCF7L2) fueron identificados a través de estudios de búsqueda en todo el genoma que, aunque es amplia, no se ha completado. Se debe tener en cuenta que en muchos casos aún no está claro si los genes son en realidad la lista de causalidad, ya que las variantes dentro de la región pueden estar asociadas a través de otros genes cercanos.

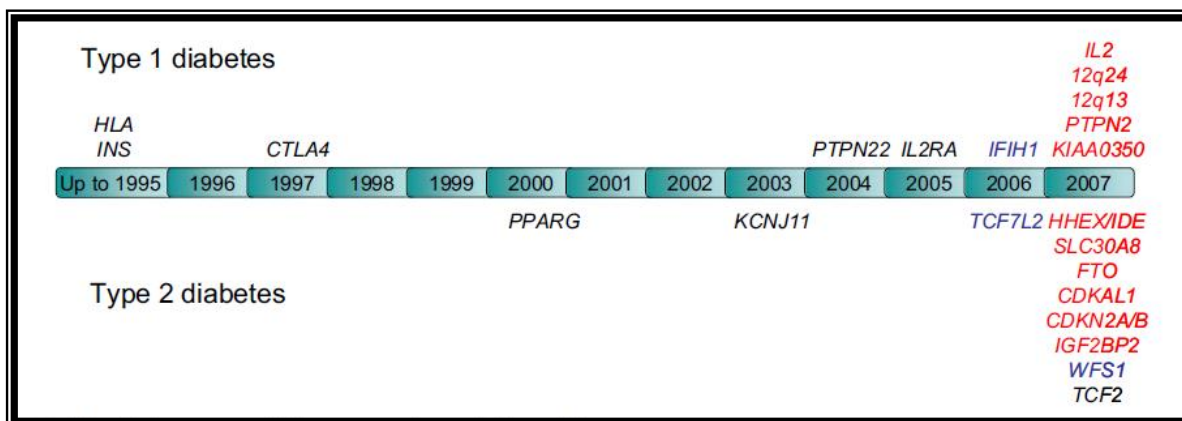


Fig. 3. Cronograma de identificación de nuevas variantes que confieren a la susceptibilidad a padecer DT2 (Frayling *et al.*, 2007).

3.3.2 Diabetes Tipo 2 (DT2).

La Diabetes Tipo 2 (DT2) es un síndrome multifactorial que involucra factores genéticos, nutricionales y ambientales, la expresión de la enfermedad depende de muchos genes que tienen pequeños efectos y muestran una predisposición familiar, lo cual es un fuerte indicativo para involucrar genes de susceptibilidad en la enfermedad (Tilburg *et al.*, 2001) que no únicamente interaccionan con otros, sino además con factores ambientales; aunque esta predisposición puede ser determinada por muchas combinaciones de variaciones genéticas (genotipos). La hiperglicemia crónica en la diabetes esta asociada con daño, disfunción y falla de varios órganos, especialmente de ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos (Report of The Expert Committe on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2007). Los principales síntomas de hiperglucemia son: poliuria, polidipsia, pérdida de peso, algunas veces polifagia y visión borrosa (SSA 2000). Dando como resultado un origen complejo y multifactorial, asociándose principalmente con obesidad, concentración elevada de triglicéridos, baja concentración de C-HDL y resistencia a la acción de la insulina (Cruz *et al.*, 2005). Las personas con DT2 son independientes de insulina exógena, pero pueden requerirla para el control de los niveles

de glucosa sanguínea si estos no se alcanzan con dieta y agentes hipoglucemiantes orales (Zimmet *et al.*, 2001).

La DT2 es la más frecuente con una prevalencia mayor al 90 % de todos los casos reportados, seguida por la del tipo 1 con una frecuencia entre 4 al 7 % (King *et al.*, 1998). La hiperglicemia induce una permanente estimulación exacerbada de la maquinaria secretora de las células beta, lo cual termina en una hiperinsulinemia y/o hipoinsulinemia por agotamiento (Nesher *et al.*, 1999). Varios estudios han sugerido que en la DT2 la gluconeogénesis está aumentada, lo cual determina una alta producción de glucosa endógena que culmina con hiperglicemia (Giacari *et al.*, 1998).

c) Diagnóstico y factores de riesgo de DT2.

La patogénesis de la DT2 es aún desconocida y es el resultado de combinaciones de defectos genéticos, factores nutricionales y ambientales. Los principales factores de riesgo para este padecimiento son: obesidad, dislipidemias, hipertensión arterial, historia familiar de diabetes, Diabetes gestacional, Dieta rica en carbohidratos, Factores hormonales y vida sedentaria (Cruz *et al.*, 2002). En el 2007 el Report of The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2007 publicó una tabla en donde describe los criterios de diagnóstico para diabetes (**Tabla 5**).

Los factores de riesgo para la intolerancia a la glucosa y para la DT2 son los siguientes:

- Historia familiar de DT2.
- Sobrepeso IMC > 25.0 , Obesidad IMC > 30.0
- Cambio en el índice de masa corporal (IMC < 25 kg/m² a IMC > 27 kg/m² o mayor en un tiempo menor a un año).
- Hábitos de vida sedentarios.
- Antecedentes de diabetes gestacional.
- Historia de hipertensión arterial.
- Hipertrigliceridemia.
- Aumento de las C-LDL
- Descenso de las C-HDL
- Nivel socioeconómico bajo.
- Exposición intrauterina a DG ó DT2.
- Carga genética.
- Hábitos alimenticios.

- Ingesta de ciertos medicamentos.
- Asociación a otros síndromes genéticos.

Tabla 5. Criterios para el diagnóstico de diabetes (American Diabetes Association, 2007).

1. Síntomas de diabetes y la concentración de la glucosa plasmática casual.
200 mg/dL (11.1 mmol/L).
Casual se entiende como cualquier hora del día sin tener en cuenta el tiempo desde la última comida. Los síntomas clásicos de la diabetes incluyen poliuria, polidipsia y pérdida de peso inexplicable.
2. Glucosa en ayuno:
Más de 126 mg/dL (7.0 mmol/L).
El ayuno se define como la no ingesta calórica durante por lo menos 8 horas.
3. Glucosa posprandial de 2 horas.
200 mg/dL (11.1 mmol/L). durante la OGGT (oral glucose tolerance test) o curva de tolerancia a la glucosa oral.
La prueba debe ser realizada según lo descrito por la OMS, utilizando una carga de glucosa que contenga el equivalente a 75g de glucosa anhidrida disuelta en agua.

Nota: En ausencia de hiperglicemia, estos criterios deben ser confirmados repitiendo las pruebas algún otro día. La tercera medida (OGGT) no esta recomendada para uso clínico de rutina.

3.3.4 Impacto económico de la DT2.

La DT2 es una de las principales causas de incapacidad prematura, ceguera, insuficiencia renal terminal y amputaciones. Es una de la 10 causas mas frecuentes de hospitalización en adultos (Rull *et al.*, 2005).

La diabetes costó 15,118 millones de dólares a México durante el 2000 (Barcelo *et al.*, 2003). El costo directo de su tratamiento fue de 1,974 millones de dólares. Se emplearon 1,108 millones en el tratamiento de la enfermedad y la prevención de sus complicaciones. Sin embargo, el mayor porcentaje del presupuesto se destinó al pago de las complicaciones crónicas o los costos directos debidos a la incapacidad prematura y la mortalidad. Estos datos demuestran que la inversión efectuada en el tratamiento no ha sido eficaz. Es evidente que se requiere una conducta distinta a la vigente para confrontar el reto que representa la diabetes (Córdova *et al.*, 2008).

Arredondo y Zúñiga (Arredondo *et al.*, 2004) estimaron la carga económica que impondrá la diabetes ante el sistema mexicano de salud durante el 2005. Ellos estimaron el costo total de 317 millones de dólares. El costo directo de esta enfermedad fue de 140 millones de dólares. Dada por la atención medica rutinaria (11.64%), terapia con medicamentos (38.77%), hospitalización (11.64%) y tratamiento de sus complicaciones (32.18%). El resultado de los costos de las complicaciones crónicas fue de 45 millones de dólares. La neuropatía diabética abarcó el 73% de esta cantidad, seguida por los costos de

la retinopatía (11%), de enfermedades cardiovasculares (10%), de la neuropatía (3.6%) y de las enfermedades periférico vasculares (2.4%). Una mayor cantidad será requerida para enfrentar los costos directos (117 millones de dólares) derivado de costos de la mortalidad e incapacidades. El impacto de estas estimaciones es más significativo para los individuos que no poseen seguridad social y que cubren ellos mismos sus gastos (el 40% de todos los mexicanos). Estas estimaciones reflejan el tamaño del desafío que enfrenta el sistema de seguridad social mexicano. Arredondo y Zúñiga estiman que la carga estará específicamente sobre en Instituto Mexicano del Seguro Social (Arredondo *et al.*, 2004).

Según los datos del Programa de Salud Nacional 2001-2006, el Sistema Mexicano de Salud Pública proporciona atención al 90% de la población y esta formado principalmente por las siguientes instituciones de salud: Secretaria de Salud, Instituto Mexicano del Seguro Social y el Instituto del Seguro Social al Servicio de los Trabajadores del Estado. Es importante destacar el hecho que el IMSS proporciona los servicios a la población asegurada y cubre el 45%, el ISSSTE a los trabajadores asegurados del estado cubriendo el 5% y la SSA a la población sin seguro que es el 40% de la población, el 10% restante son atendidos por el sector privado (Arredondo *et al.*, 2005).

Datos obtenidos en la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006 corroboraron que entre las principales causas de enfermedad y muerte se mantuvo la DT2, ya que aún con los programas de prevención y control de de este padecimiento. La prevalencia de diabetes por diagnóstico médico previo en adultos a nivel nacional fue de 7%, y fue mayor en las mujeres (7.3%) que en los hombres (6.5%). El sobrepeso y la obesidad son problemas que afectan a cerca del 70% de la población, este incremento porcentual debe tomarse en consideración sobre todo debido a que el sobrepeso y la obesidad son factores importantes de riesgo para el desarrollo de enfermedades crónicas, incluyendo las cardiovasculares, diabetes y cáncer (Olaíz *et al.*, 2006).

3.4 Genética de SM y DT2.

Como consecuencia de la interacción entre los cambios de actividad física y los procesos metabólicos ocurridos en el hombre del paleolítico (50,000 a 10,000 A.C.), se favoreció la aparición de un genotipo ahorrador al seleccionarse los genes que aseguran una maquinaria enzimática capaz de generar una buena reserva de glucógeno muscular y de triglicéridos en el tejido adiposo, que son sustratos requeridos para sobrevivir en un hábitat hostil. Es decir que los ciclos de actividad-reposo, alimentación-ayuno, incidieron en el proceso metabólico, modificándose la expresión del “pool” genético favoreciendo los procesos bioquímicos que permiten conservar, restituir y almacenar el glucógeno muscular.

Neel (Neel, 1962) propuso el término de genes ahorradores para referirse a esta selección de un genotipo que asegure por una parte la eficiente utilización y almacenamiento de la energía consumida durante los períodos de abundancia y por otra la sobre vivencia de la especie, gracias a esa reserva energética acumulada durante los períodos de escasez.

Esta dotación genética, no modificada al menos desde hace 10.000 años, debió enfrentar hace menos de 200 años un patrón distinto de disponibilidad de alimentos. Con la industrialización aparecen alimentos en abundancia, que se caracterizan por poseer una alta densidad calórica y un bajo contenido en fibra dietética, y al mismo tiempo la actividad física deja de ser un factor esencial para conseguir estos recursos. El consumo calórico aumentado y la presencia de genes ahorradores que permiten el uso eficiente de esta energía pueden explicar el aumento de peso y la predisposición a la aparición de enfermedades crónicas no transmisibles como obesidad, DT2 y síndrome metabólico (Minihane *et al.*, 2000).

La hipótesis del “fenotipo ahorrador” (Hales *et al.*, 1992, Barker, 1995) plantea que la nutrición tanto intrauterina como infantil, es capaz de programar una expresión génica para favorecer la vida. Se protege al cerebro frente a otros tejidos, lo que conduce a una programación metabólica condicionada por la escasez del sustrato bioenergético. Los modelos experimentales de malnutrición intrauterina, (Martín *et al.*, 2000), y en particular de déficit proteico, han demostrado claramente una alteración en la estructura-función del páncreas con disminución de las células β de los islotes de Langerhans y una menor capacidad secretora de insulina (Cherif *et al.*, 2001). Esta programación celular afecta igualmente la regulación del gasto energético (Yura *et al.*, 2005, Jaquet *et al.*, 2001).

De acuerdo a esta hipótesis la desnutrición, que se caracteriza por un bajo peso al nacer, provocaría una programación in útero que explicaría la aparición de la mayor parte de la obesidad, el síndrome metabólico y la DT2. En un adulto que nació con bajo peso para la edad gestacional y que luego ha sido expuesto a un ambiente de abundancia alimentaría (Jaquet *et al.*, 2001, Ravelli *et al.*, 1976, Ravelli *et al.*, 1999). Aún más, las evidencias de numerosos estudios indican que esta programación no se limita a la primera generación (Martín *et al.*, 2000, Drake *et al.*, 2004).

Los estudios epidemiológicos realizados en personas que se supone poseen genotipo ahorrador (Indios Pima) y en grupos humanos con fenotipo ahorrador, como las personas sometidas a desnutrición aguda por hambruna, (población de Holanda durante la ocupación de la Alemania Nazi), aportan evidencias que sustentan ambas hipótesis (Knowler *et al.*, 1991, Ravelli *et al.*, 1999).

Visto así, el hombre moderno es el producto de confrontar un “viejo genoma” con un nuevo medio ambiente que ofrece exceso de nutrientes que, al ser ingeridos, pueden almacenarse eficientemente en el tejido adiposo (TA) y como resultado aparecen la obesidad y el riesgo aumentado a sufrir enfermedades degenerativas crónicas (Anderson *et al.*, 2001, Carey *et al.*, 1997).

Al poseer una carga genética que condicione a la delgadez, es un factor de protección contra la obesidad y el síndrome metabólico y que en contraposición las evidencias epidemiológicas y experimentales indican que la malnutrición por déficit durante las primeras etapas de la vida, particularmente en el período fetal, aumenta el riesgo a desarrollar obesidad y síndrome metabólico cuando se asegura el libre acceso a una dieta inadecuada y rica en calorías.

3.5 Polimorfismos de un Solo Nucleótido (SNPs).

El polimorfismo genético hace referencia a la existencia en una población de múltiples alelos de un gen. Un polimorfismo es una variación en la secuencia de bases, de un lugar determinado del DNA, puede consistir en la sustitución de una simple base nitrogenada o puede ser más complicado, por ejemplo, la repetición de una secuencia determinada de DNA estos se han utilizado para el estudio de asociación de variaciones en el genoma con enfermedades multifactoriales (Voronko *et al.* 2008).

Los polimorfismos de un solo nucleótido, o SNPs (Single polymorphism nucleotide), son las variaciones de la secuencia del DNA que ocurren cuando un solo nucleótido se altera (A, T, C, o G) en la secuencia del genoma. Para que una variación sea considerada un SNP, debe ocurrir en por lo menos el 1% de la población. Los SNPs, componen cerca del 90% de toda la variación genética humana, se presentan cada 100 a 300 bases a lo largo de 3 mil millones de bases del genoma humano. Dos de cada tres SNPs implican el reemplazo de una citosina (C) por una timina (T). Los SNPs pueden aparecer en el promotor, en las regiones codificantes y las regiones no codificantes del gene. Muchos SNPs aparentemente no tiene ningún efecto sobre la función de la célula, pero se ha demostrado su influencia en la susceptibilidad o resistencia a enfermedades así como en la respuesta a fármacos específicos.

Los SNP se localizan en las regiones codificantes, en intrones y en promotores. Los SNPs que se localizan en exones, pueden o no producir un cambio en el aminoácido. Los que se encuentren en regiones no codificantes pueden tener consecuencias en el proceso de traducción, sobre todo en procesos como el “splicing”, la unión de factores de transcripción o modificando la secuencia de RNA no codificante.

A diferencia de los SNPs, donde la expresión de enfermedades es influida por una mutante alélica en un punto específico de un gen, en las enfermedades comunes como el SM y la DT2 su expresión depende de muchos sitios puntuales del genoma y para el estudio de estos existen diversas técnicas como: PCR en tiempo real, SSO, SSP, RFLP entre otras (Jonathan *et al.*, 2001).

3.6 PCR en Tiempo Real.

El análisis de polimorfismos genéticos permite identificar genes que confieren susceptibilidad o resistencia a las enfermedades complejas (Iniesta *et al.*, 2005). Existen muchos métodos para su detección, pero en el presente trabajo sólo se utilizará la tecnología de sondas TaqMan (Applied Biosystems Foster City, USA) su función se fundamenta en la reacción de **PCR en Tiempo Real** (Anexo 1). Esta técnica se basa en la detección de un reportero fluorescente en cada ciclo de la reacción, por lo que el monitoreo es en tiempo real. La señal de fluorescencia se incrementa de una forma directamente proporcional a la cantidad de producto de amplificación. Esto nos permite realizar análisis de componentes basándonos en la amplificación durante los primeros ciclos de la reacción y no al final de la misma, como con el PCR convencional (Gustavo *et al.*, 2007).

3.7 Cinasas y Ciclinas.

Los controladores maestros de la replicación del DNA y la mitosis son unas pocas proteínas cinasas heterodiméricas, que contienen una subunidad reguladora y una subunidad catalítica. Estas cinasas regulan las cantidades de múltiples proteínas que participan en la regulación del DNA y la mitosis, mediante la fosforilación de estas últimas en sitios reguladores específicos, con la activación de unas y la inhibición de otras para coordinar sus actividades (Hervey *et al.*, 2000). Los complejos acontecimientos macromoleculares del ciclo celular eucarionte son regulados por una pequeña cantidad de proteínas cinasas heterodiméricas. Las concentraciones de las subunidades reguladoras de estas cinasas, llamadas ciclinas, aumentan y disminuyen en fase con el ciclo celular. Sus subunidades catalíticas se denominan cinasas dependientes de ciclinas (CDK), porque carecen de actividad de cinasa a no ser que se asocien con una ciclina.

La CDK5 es una cinasa dependiente de ciclina 5 CDK5 es una proteína cinasa pequeña de serina/treonina reconocida como una molécula esencial en el cerebro. Además, tiene algunos efectos extraneuronales y se piensa que tiene un papel en la fisiopatología de las células-beta y predisposición a la DT2. Las semejanzas en las alteraciones patológicas en los tipos de las células afectadas (células beta para diabetes y neuronas para Alzheimer) resultaron en la identificación de un nuevo significado en la patología de las células beta

pancreáticas. Se ha demostrado que CDK5 y su activador p35 que inicialmente se creía que eran específicos para tejido cerebral, estaban también presentes en las células beta pancreáticas (Ubeda *et al.*, 2004). Datos obtenidos por Shuichi Okada (Okada *et al.*, 2008) indican que CDK5 tiene un papel importante en la fosforilación y estimulación en la producción de insulina. CDK5 a diferencia de otros miembros de la familia de las CDK no está involucrada en la evolución del ciclo celular (Amy *et al.*, 2004).

Los recientes estudios han demostrado que esta cinasa regula la secreción de insulina estimulada por glucosa. La inhibición de CDK5 aumenta la secreción de insulina bajo condiciones de glucosa alta (Kohsuke *et al.*, 2007), esto es referido a que un aumento crónico de glucosa produce una sobre activación de CDK5 en las células β pancreáticas (Lilja *et al.*, 2001) y proporciona alteraciones funcionales por la deficiencia de p35 un activador de CDK5 (Fan *et al.*, 2005) que dan como resultado la deficiencia en la producción de insulina y por lo tanto puede tener un papel en la patogénesis de la DT2 (Ubeda *et al.*, 2006).

3.8 Gen CDKAL1

Proteína 1-como 1 asociada a la subunidad reguladora de la cinasa 5 dependiente de ciclina (CDKAL1 por sus siglas en inglés “cyclin-dependent kinase 5 regulatory subunit-associated protein 1-like 1”). Este gen está ubicado en el cromosoma 6p22 (**Fig. 4**). Este gen codifica una proteína de 65 kD y comparte semejanza con el dominio de la proteína 1 asociada a la subunidad reguladora de CDK5 (CDK5RAP1) (The Wellcome Trust Case Control Consortium, 2007), que inhibe específicamente la activación de CDK5 por la subunidad reguladora 1 de CDK5 (CDK5R1). CDK5, tiene algunos efectos extraneuronales y se piensa que tiene un papel en la fisiopatología de las células beta y predisposición a la DT2, la expresión de CDKAL1 en islotes pancreáticos humanos respalda la noción de que CDKAL1 y CDK5 están relacionados mediante vías de señalización en las células beta que conduce a la resistencia a la insulina (Scout *et al.*, 2007, Pascoe *et al.*, 2007, Diabetes Genetics Initiative of Broad Institute of Harvard and MIT, Lund University, and Novartis Institutes for BioMedical Research 2007). La inhibición del complejo CDK5/p35 previene una disminución en la expresión del gen de la insulina como resultado de la glucotoxicidad. Se cree que CDKAL1 tiene un papel en la inhibición del complejo CDK5/p35 en las células beta pancreáticas similar al de CDK5RAP1 en tejido neuronal (Steinthorsdottir *et al.*, 2007).

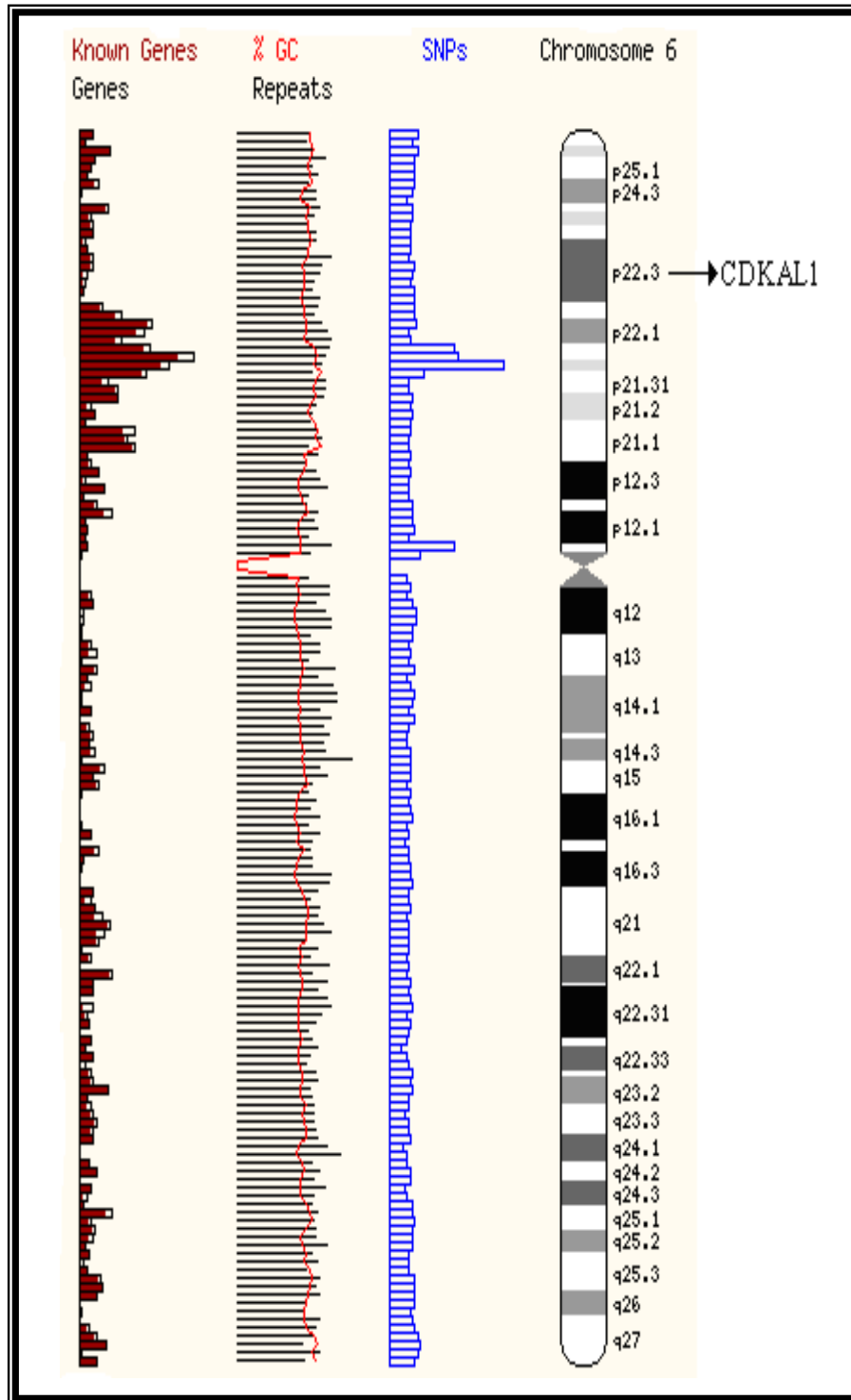


Fig. 4. Localización del gene CDKAL1 en el cromosoma 6.

En la **Fig. 5** se muestra un esquema de la célula beta pancreática que muestra la propuesta de localización subcelular de proteínas que codifican genes asociados a diabetes. Cada uno de estos genes tienen una función diferente dentro de la regulación de esta célula: GCK codifica para glucocinasa, el sensor de glucosa de la célula beta. KCNJ11 codifica para el canal de potasio Kir6.2 dependiente de ATP, que interactúa con el receptor

de sulfonilurea SUR1, codificado por ABCC8, para regular la entrada de potasio en la membrana de la célula. WFS1 codifica wolframina, una proteína que regula el transporte de calcio en el retículo endoplasmático. SLC30A8 codifica para el transportador ZnT-8 responsable de la el transporte de zinc en la secreción de gránulos de insulina. CDKAL1 y CDKN2A / B están implicados en la vía de las cinasas dependiente de ciclina, por lo que pueden influir en la regeneración de células beta.

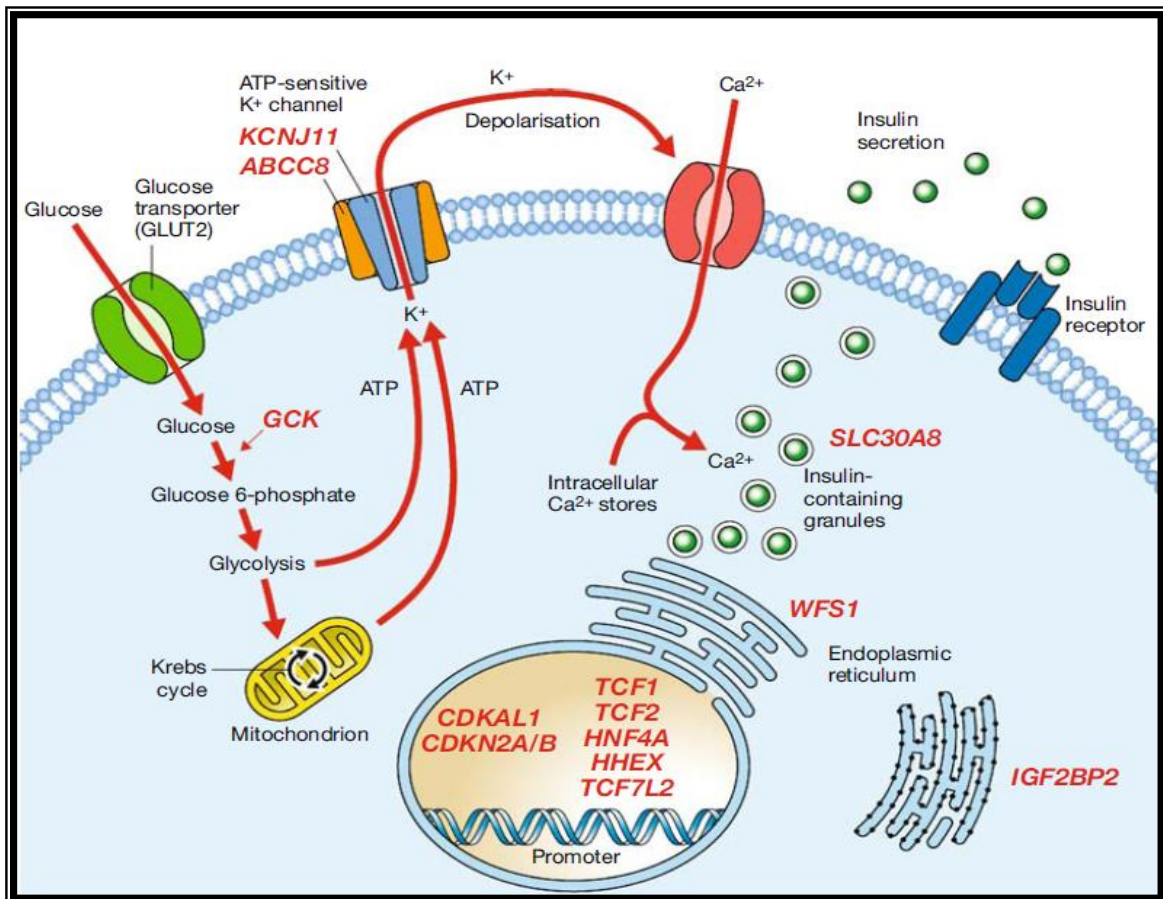


Fig. 5. Propuesta de la localización subcelular de proteínas que codifican genes asociados con diabetes (Flores, 2008).

IGF2BP2 codifica una proteína que se une a mRNA de IGF2 y lo dirige a determinados sitios subcelulares para la síntesis de proteínas. Cabe señalar que muchos de estos genes se expresan también en otros tejidos humanos (Flores, 2008).

Dado que la DT2 es una enfermedad multifactorial que es regida por diversos cambios en los hábitos de vida, condiciones ambientales y en variantes genéticas específicas de etnias o poblaciones, que pueden favorecer a la susceptibilidad a padecer o desarrollar esta enfermedad. Estas últimas no tienen un impacto directo o único dentro del organismo sino que interaccionan con otras variantes que indirectamente son las que

4. JUSTIFICACIÓN

Uno de los grandes problemas que enfrenta actualmente la humanidad, es el hecho de que la evolución biológica no va a la par con la evolución cultural. La maquinaria biológica (estructura tisular-orgánica-corporal, procesos metabólicos, etc.) es la misma que la de los antecesores de hace miles de miles de años, pero las costumbres y estilos de vida cambian rápidamente (Pineda, 2008). Debido a todo esto, han surgido diferentes padecimientos relacionados con el metabolismo de las personas, ocasionadas por múltiples factores, algunas de estos son el SM y DT2.

Dada la importancia de la DT2 en la población mexicana y el creciente aumento en la prevalencia de SM resulta interesante estudiar el gen candidato de susceptibilidad *CDKAL1*, y en particular, los polimorfismo rs7754840, rs9465871 y rs10946398, ya que éstos se ha descrito en otras poblaciones como marcadores de riesgo para desarrollar DT2 pero no para SM.

Las frecuencias de estos polimorfismos en la población mexicana; hasta la fecha no ha sido estudiadas y su conocimiento es importante para evaluar su posible interacción con la enfermedad, en la población mexicana específicamente, y su repercusión en las características clínicas y bioquímicas de la población (estados dislipidémicos y obesidad), y a la vez poder determinar si para esta población, estos polimorfismos pueden ser considerados como factores de riesgo en el desarrollo de estas enfermedades.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL:

Realizar un estudio de frecuencias genóticas de 3 polimorfismos del gen *CDKAL1* en individuos clínicamente sanos (grupo control), pacientes con síndrome metabólico y pacientes con diabetes tipo 2, habitantes de la ciudad de México, para identificar una posible asociación entre las variantes del gen *CDKAL1* con estos padecimientos.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Obtener medidas antropométricas de cada participante.
2. Realizar pruebas bioquímicas y de gabinete para clasificar a los 3 grupos de estudio.
3. Crear un banco de DNA de los individuos participantes en el estudio.
4. Determinar si existe asociación de los genotipos entre el grupo de sanos comparado con el grupo de SM y con el grupo DT2.
5. Determinar si existe alguna correlación entre los datos bioquímicos, antropométricos y genéticos entre los grupos de estudio.

6. HIPÓTESIS

Sí existen diferencias en las frecuencias genotípicas y alélicas de los 3 polimorfismos presentes en el gen *CDKALI*, entonces existirá asociación con alguno de los grupos de estudio.

7. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

7.1 Población de Estudio

Se canalizaron al Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional “Siglo XXI” del IMSS, pacientes con DT2 de Unidades de Medicina Familiar del IMSS, del área metropolitana de la Ciudad de México.

Para tener un grupo de sujetos control se reclutaron individuos donadores de sangre del banco de sangre del Centro Médico Nacional “Siglo XXI” del IMSS; previa autorización y llenado de los cuestionarios correspondientes, para corroborar su estado de salud y sus antecedentes diabéticos. Este proyecto fue autorizado por la comisión de investigación en Salud y por el Comité de Ética del Hospital de Especialidades.

7.2 Selección de Pacientes y Controles

Grupo 1: Control.

Tamaño de la muestra: 500 individuos que cumplan con los siguientes criterios:

Criterios de Inclusión

1. Edad de 40-70 años.
2. Género indistinto.
3. Glucosa sanguínea en un ayuno no menor de 8 horas, entre 80-100 mg/dL.
4. Firma de la carta de consentimiento de informado.

Criterios de Exclusión:

1. Personas con alteraciones en sus pruebas bioquímicas (personas con SM)
2. Personas con antecedentes familiares de diabetes.
3. Pacientes con relación consanguínea (hermanos, primos, etc.)

Grupo 2: Paciente con SM.

Tamaño de la muestra: Se estimó para 500 individuos que cumplan con los siguientes criterios, pero sólo se reclutaron 423 individuos:

Criterios de Inclusión

1. Cumplir con 3 de los criterios de diagnóstico para SM descritos por AHA.
2. Edad de 40-70 años.
3. Género indistinto.
4. Firma de la carta de consentimiento de informado.

Criterios de Exclusión:

1. Pacientes con relación consanguínea (hermanos, primos, etc.)

2. Personas con DT2.

Grupo 3: Pacientes con DT2.

Tamaño de la muestra: 500 individuos que cumplan con los siguientes criterios de inclusión:

Criterios de Inclusión

1. Diabéticos tipo 2.
2. Edad de 40-70 años.
3. Género indistinto.
4. Firma de la carta de consentimiento de informado.

Criterios de Exclusión:

1. Pacientes con relación consanguínea (hermanos, primos, etc.)

7.3 Material y Métodos

Se aplicó un cuestionario de antecedentes clínicos de todos los participantes el cual incluyó; datos personales (dirección, teléfono, estado civil, etc.). Se tomaron las medidas antropométricas como son: peso, talla, cintura y cadera para calcular el índice de masa corporal (IMC), que es el peso corporal en kilogramos del dividido entre la estatura en metros, elevada al cuadrado (kg/m^2) para clasificar a los individuos como de peso normal (IMC <25), sobrepeso (IMC $>25<30$) y obesidad (IMC >30). El índice cintura cadera (ICC) que es la medida de la cintura en centímetros dividida entre la medida de la cadera en centímetros. También se midió la presión arterial diastólica y presión arterial sistólica (TAD y TAS) cuyos valores normales deben de estar por debajo de 130/85 mmHg respectivamente, según los criterios mencionados en la Norma Oficial (NOM-015-SSA2-1994).

Se tomaron muestras sanguíneas de cada uno de los participantes para la obtención de suero y células mononucleares para extraer el DNA (Anexo 2). Se determinaron diferentes parámetros de química sanguínea como glucosa, colesterol total, lipoproteínas de baja densidad (LDL) y alta densidad (HDL), triglicéridos e insulina en ayuno. El DNA obtenido se cuantificó y se verificó su pureza e integridad (Anexo 4), se amplificó por PCR tiempo real y la técnica TaqMan para SNPs en el software S.D.S. versión 2.2.2 para el equipo 7900HT el fragmento donde se encontraron las variaciones, dándonos resultados en graficas de discriminación alélica que proporciona el equipo de forma automatizada. Con esta información se realizó una base de datos de todos los participantes (Anexo 5).

Estudios Bioquímicos

Todas las pruebas bioquímicas se realizaron en el multianalizador Synchron CX4Δ de manera automatizada utilizando suero como fluido biológico. Los estudios bioquímicos que se realizaron fueron los siguientes: glucosa, colesterol, LDL, HDL triglicéridos e insulina. Las técnicas así como las especificaciones para cada una de las determinaciones se muestran en el Anexo 6.

Para el caso de la insulina, ésta se determinó por radio quimioluminiscencia (immunolite USA Francia)

Análisis Estadístico.

El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS Versión 11.0 (Chicago Illinois, USA). Se tomó como significativo cualquier valor de $P < 0.05$, los datos se reportan como la media \pm DE (una desviación estándar).

Las variables continuas se contrastaron por medio de la prueba ANOVA. Para comparar 2 grupos, se usó la prueba “t” de Student.

Se compararon las frecuencias de los genotipos con la prueba χ^2 ; se estimaron razones de momios (“Odds Ratio”) y sus intervalos de confianza al 95 % (CI 95 %). Se estimó la resistencia a la insulina (HOMA2-IR) y la función de las células β . (HOMA2 %B) usando la calculadora diseñada por Oxford en el año 2002 y que se puede tener libre acceso siguiendo el procedimiento de Matthews 1985, con base en las concentraciones de glucosa (mmol/L) e insulina. Siendo estos parámetros los de mayor interés por las asociaciones reportados en otras poblaciones. Todo este trabajo se resume en el esquema de trabajo que se muestra en la figura 7.

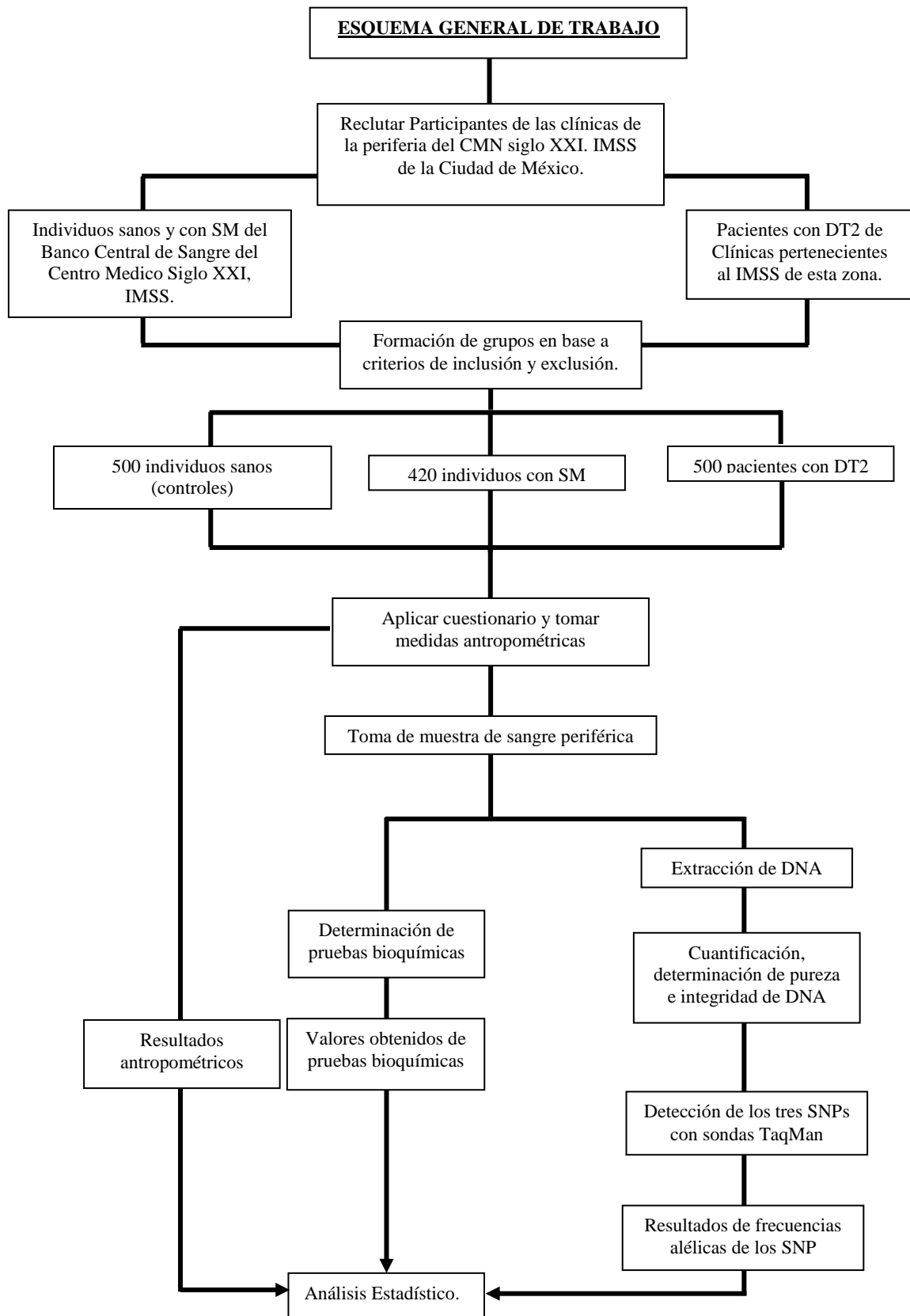


Fig. 7. Esquema general de trabajo

8. RESULTADOS

Las características clínicas (parámetros antropométricos y bioquímicos) de los grupos participantes están resumidas en la **Tabla 6**. La diferencias estadísticas entre los tres grupos de estudio son ampliamente significativas ($p<0.0001$) ya que se trata de tres poblaciones clínicamente diferentes. El género no interfirió en los resultados ya que las poblaciones se mostraron homogéneas y por lo tanto no mostraron diferencias estadísticas significativas.

Tabla 6. Características clínicas de los participantes.

PARÁMETRO	CONTROL (n=501)	SM (n=423)	DT2 (512)
Género (F/M)	126/375	144/279	364/146
Edad (años)	43.61 ± 6.63	44.99 ± 7.09	53.45 ± 7.52
IMC (Kg/m ²)	27.54 ± 3.47	30.53 ± 4.16	29.23 ± 4.75
TA sistólica (mmHg)	116.42 ± 9.87	126.6 ± 12.5	118.52 ± 13.9
TA diastólica (mmHg)	73.83 ± 7.37	78.21 ± 8.68	76.21 ± 8.12
HOMA2 %B	117.62 ± 41.7	121.59 ± 54.6	55.43 ± 54.04
HOMA2-IR	1.21 ± 0.6	1.65 ± 0.8	2.36 ± 3.7
Insulina (µUI/ml)	9.43 ± 4.96	12.76 ± 7.92	14.05 ± 10.06
Glucosa (mg/dL)	86.64 ± 8.05	95.55 ± 11.76	183.58 ± 78.91
Colesterol T (mg/dL)	200.14 ± 38.9	205.51 ± 39.95	221.35 ± 64.01
Triglicéridos (mg/dL)	168.31 ± 94.03	259.73 ± 150.26	235.28 ± 168.19
C-HDL (mg/dL)	44.41 ± 11.41	37.75 ± 9.7	48.69 ± 15.01
C-LDL (mg/dL)	127.7 ± 34.5	125.9 ± 34.91	137.65 ± 38.17

Datos en medias±DS, F=femenino, M=masculino, UI=unidades internacionales

Fueron estudiados 1443 individuos que integraron los 3 grupos de estudio constituidos por 501 sanos sin antecedentes familiares de DT2 (grupo control), 425 con SM (diagnosticados con base a los criterios establecidos por la AHA en el 2005) y 514 individuos con DT2 (diagnosticados con los criterios de la IDF).

Genotipificación: Se evaluaron los rs7754840, rs9465871 y rs10946398 del gen *CDKALI* para tres diferentes grupos de estudio, por ensayos TaqMan para discriminación alélica (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes. La genotipificación fue realizada con éxito en un porcentaje > 98% y las muestras que se realizaron por duplicado, aproximadamente 8% de cada grupo y no mostraron ninguna diferencia, obteniéndose las frecuencias genotípicas y alélicas reportadas en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Frecuencias genotípicas, alélicas y equilibrio de Hardy-Weinberg de los tres SNPs ubicados en el intrón 5 del gen CDKAL1 en cromosoma 6p22.3.

rs	GENOTIPO	CONTROL (%)	SM (%)	DT2 (%)
rs7754840	GG	242 (48.3)	220 (51.8)	244 (47.7)
	GC	217 (43.3)	173 (40.7)	210 (41.1)
	CC	42 (8.4)	32 (7.5)	56 (11.1)
Alelica	G	69.96	72.12	68.3
	C	30.03	27.08	31.7
P		0.49	0.80	0.25
rs9465871	TT	282 (56.3)	254 (60.1)	279 (54.7)
	TC	189 (37.7)	150 (35.4)	196 (38.5)
	CC	30 (6.0)	19 (4.5)	34 (6.8)
Alelica	T	75.15	77.8	74.07
	C	24.85	22.2	25.93
P		0.82	0.06	0.96
rs10946398	AA	243 (48.5)	218 (51.5)	245 (47.7)
	AC	216 (43.1)	171 (40.4)	213 (41.4)
	CC	42 (8.4)	34 (8.1)	56 (10.9)
Alelica	A	70.05	71.75	68.38
	C	29.95	28.5	31.62
P		0.53	0.95	0.31

Resultados reportados en frecuencias y porcentajes. Valores de $P < 0.05$ no se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg.

La n estimada para cada una de las poblaciones fue la misma respectivamente pero por la poca eficiencia en la extracción de DNA de algunas muestras (por lisis o por un volumen bajo de sangre periférica) y por el uso de las mismas para otros protocolos de estudios de la unidad de investigación, no fue suficiente para genotipificar las poblaciones completas, esto no siendo mayor al 1% de la población por grupo de estudio.

La prueba estadística del equilibrio de Hardy-Weinberg se realizó por el método de Sasiani en un programa que se encuentra disponible en la red. Para las frecuencias genotípicas obtenidas de los SNPs; rs7754840, rs9465871, rs10946398 del gen CDKAL1 en cada uno de los tres grupos de estudio, cumplieron con este parámetro estadístico ya que se obtuvieron $P > 0.05$ para cada SNPs en los diferentes grupos de estudio (**Tabla 7**).

Mediante una prueba de asociación con un intervalo de confianza del 95% en el programa en la red ya mencionado se realizó el análisis de asociación de las frecuencias genóticas de los polimorfismos de los rs7754840, rs9465871 y rs10946398 en las diferentes poblaciones estudiadas y se encontró que:

- Para los SNPs rs7754840, rs9465871 y rs10946398 no mostraron asociación con SM ni DT2 (**Tabla 8**), obteniéndose $P > 0.05$ para cada SNP.

Tabla 8. Tabla de asociación de las frecuencias obtenidas de los grupos de estudio para los 3 SNPs con un intervalo de confianza (IC) del 95%.

rs	Genotipo	CONTROL	SM	χ^2	P	DT2	χ^2	P
rs7754840	GG	242 (48.3)	220 (51.8)	0.63	0.42	244 (47.7)	1.06	0.30
	GC	217 (43.3)	173 (40.7)			210 (41.1)		
	CC	42 (8.4)	32 (7.5)			56 (11.1)		
rs9465871	TT	282 (56.3)	254 (60.1)	1.78	0.18	279 (54.7)	0.40	0.52
	TC	189 (37.7)	150 (35.4)			196 (38.5)		
	CC	30 (6.0)	19 (4.5)			34 (6.8)		
rs10946398	AA	243 (48.5)	218 (51.5)	0.64	0.42	245 (47.7)	0.75	0.38
	AC	216 (43.1)	171 (40.4)			213 (41.4)		
	CC	42 (8.4)	34 (8.1)			56 (10.9)		

Se toman como significativos cualquier valor $p < 0.05$.

El análisis de asociación por alelo fue realizado con el programa EPI INFO16 por tablas de contingencia y con la prueba de χ^2 se estimaron razones de momios (“Odds Ratio”) y sus intervalos de confianza al 95 % (CI 95 %), tomándose como significativo cualquier valor de $p < 0.05$, asociando el grupo control (sano) con los grupos de pacientes (SM y DT2).

Dado que no existe ningún estudio relacionado con este gen y SM pero si este padecimiento con DT2 se esperaba que se presentara alguna asociación con alguno de los SNPs pero en el análisis del grupo control con el grupo de SM no mostró asociación con ninguno de los alelos de los 3 SNPs dando una $P=0.33$ para el rs7754840, $P=0.20$ para el

rs9465871 y una $P=0.45$ para el rs10946398 (**Tabla 9**) y de igual manera en la asociación con DT2.

Tabla 9. Tabla de asociación de alelos de los SNPs del gen CDKAL1 estudiados comparando sanos con SM y DT2.

rs	ALELO	CONTROL	SM	OR	IC	χ^2	P
rs7754840	G	69.97	72.12	0.95	95%	0.97	0.33
	C	30.03	27.88	(0.87-1.04)			
rs9465871	T	75.15	77.8	0.94	95%	1.61	0.20
	C	24.85	22.2	(0.85-1.03)			
Rs10946398	A	70.05	71.75	0.96	95%	0.55	0.45
	C	29.95	28.25	(0.88-1.05)			

rs	ALELO	CONTROL	DT2	OR	IC	χ^2	P
rs7754840	G	69.97	68.3	1.04	95%	0.57	0.45
	C	30.03	31.7	(0.94-1.15)			
rs9465871	T	75.15	74.07	1.03	95%	0.25	0.61
	C	24.85	25.93	(0.92-1.14)			
rs10946398	A	70.05	68.38	1.04	95%	0.59	0.44
	C	29.95	31.62	(0.94-1.14)			

Se toman como significativos cualquier valor $p < 0.05$.

En el análisis de asociación de los genotipos de los 3 SNPs y las características antropométricas y clínicas de los grupos de estudio nos dieron resultados interesantes, en donde observamos una asociación discreta del rs10946398 en el grupo con SM con la edad ($P=0.028$), insulina ($P=0.048$), HOMA2-%B ($P=0.032$) y HOMA-IR ($P=0.020$). En el grupo con DT2 se asocia con el género e IMC ($P=0.010$ y $P=0.021$, respectivamente) y con el grupo control tenemos solo la asociación con TG ($P=0.030$), todos asociados con el alelo de riesgo “C”, este SNP fue el más asociado en nuestro estudio y especialmente con SM. Ninguno de los otros 2 SNPs (rs775484 y rs9465871) mostró asociación con ninguna de las características clínicas y antropométricas del grupo control. Dado que estos resultados nos arrojaron datos significativos con respecto al género separamos a nuestra población y sólo encontramos que la asociación persistía para el grupo con DT2 en mujeres con respecto al IMC ($P = 0.028$), en hombres no se observó ningún dato significativo.

Se realizó el análisis estadístico completo para cada grupo por separado con cada uno de los 3 SNPs de estudio no reportándose las tablas completas por considerar que son innecesarias por no presentar datos significativos.

El rs7754840 mostró asociación con el género ($P = 0.029$) e IMC ($P = 0.034$) en el grupo de DT2. Dado este resultado estratificamos por género y se encontró asociación en el grupo mujeres con SM e IMC ($P = 0.045$).

El rs9465871 no mostró ninguna asociación con ninguno de los grupos sino después de que se realizó el análisis ajustando por género. Este rs mostró asociación en hombres en el grupo con DT2 con TAD con una $P = 0.042$.

Tabla 10. Análisis estadístico de los parámetros bioquímicos del grupo control (sanos). Con un intervalo de confianza del 95%.

PARAMETRO	rs7754840				rs9465871				rs10946398			
	GG	GC	CC	P	GG	GC	CC	P	GG	GC	CC	P
GLUCOSA (mg/dL)	85.7±8.2	87.4±8.2	86.5±7.4	0.08	86.5±9.02	86.3±6.8	87.8±7.3	0.64	87.1±8.1	87.4±8.4	86.4±7.1	0.06
INSULINA (mUI/mL)	9.33±4.7	9.7±5.4	8.6±5.1	0.41	9.5±5.4	9.4±4.5	8.7±5.1	0.71	9.3±4.6	9.6±5.4	8.9±5.6	0.66
HOMA-IR (mg/dL)	1.48±1.07	2.12±1.26	1.87±1.21	0.29	2.04±1.2	2.02±1.03	1.92±1.25	0.85	1.98±1.06	2.1±1.25	1.93±1.28	0.45
C-TOTAL (mg/dL)	196.3±39.8	204.9±40.4	196.5±33.1	0.05	197.1±41.2	202.9±38.3	209.5±31.4	0.11	196.2±39.7	204.6±40.1	198.7±35.7	0.07
C-LDL (mg/dL)	123.6±33.3	129.4±37.8	127±31.7	0.21	123.9±35.5	128.6±35.4	134.8±29.1	0.14	123.4±33.3	129.1±37.5	128.8±33.6	0.20
C-HDL (mg/dL)	43.4±11.4	44.8±11.6	45.5±11.5	0.33	43.2±11.03	45.2±11.9	46.9±11.9	0.07	43.6±11.5	44.6±11.4	45.9±11.9	0.41
TG (mg/dL)	166.4±83.4	175.8±111	142.1±57.6	0.09	167.03±87.1	173.8±109	148.5±65.7	0.37	166.2±84.04	177.4±111	135.8±50.6	0.03

Se toman como significativos cualquier valor $p < 0.05$.

Tabla 11. Asociación de las características clínicas con los genotipos de los 3 SNPs de estudio con SM. Con un intervalo de confianza del 95%.

PARAMETRO	rs7754840				rs9465871				rs10946398			
	GG	GC	CC	P	TT	TC	CC	P	AA	AC	CC	P
GENERO (F/M)	64/144	58/112	13/17	0.43	80/160	46/101	8/11	0.56	65/142	56/112	14/18	0.41
EDAD (años)	44.7±6.6	44.9±7.5	47.3±7.9	0.17	44.7±6.72	45.26±7.42	46.0±9.20	0.58	44.8±6.6	44.6±7.4	48.06±7.8	0.028
IMC (kg/m ²)	30.5±3.9	30.7±4.4	29.2±2.9	0.19	30.5±4.1	30.3±4.2	30.5±4.1	0.88	30.4±3.9	30.7±4.4	29.2±2.9	0.14
TAS (mmHg)	127.2±12.8	125.7±12.5	126.7±11.4	0.52	126.9±13.0	125.8±12.3	128.2±9.5	0.64	127.3±13.3	125.4±11.9	127.8±11.4	0.26
TAD (mmHg)	76.7±6.8	77.2±108	77.6±6.8	0.94	77.2±10.9	76.6±11.6	78.5±7.6	0.74	76.8±11.7	77.4±10.9	76.8±7.1	0.85
GLUCOSA mg/dL	95.5±11.7	95.5±11.7	96.7±12.9	0.84	95.8±11.8	95.5±11.6	93.3±13.5	0.67	95.6±11.9	95.6±11.5	95.8±12.9	0.99
INSULINA(mUI/ml)	12.8±8.4	13.1±7.6	10.1±5.3	0.14	12.8±8.3	12.5±7.4	12.3±6.8	0.87	12.5±7.9	13.2±7.6	9.7±4.8	0.048
HOMA2 %B	120.42±48	126.1±62.9	104.8±39.7	0.11	120.33±40.3	122.2±61.4	126±57.6	0.88	120.17±49.1	127.1±62.1	99.9±39.8	0.032
HOMA2-IR	1.62±0.6	1.73±0.94	1.39±0.65	0.08	1.64±0.76	1.65±0.91	1.56±0.85	0.91	1.61±0.73	1.75±0.93	1.32±0.59	0.020
C-TOTAL mg/dL	205.1±41.9	207.8±35.9	202.1±47	0.68	207.6±39.4	202.9±40.2	205.6±45.8	0.52	205.1±142.6	208.5±34.9	200.6±46	0.49
C-LDL mg/dL	123.1±37.3	129.2±31.5	126.7±30.4	0.21	125.3±35.6	126.4±33.3	127±32.4	0.94	123.5±37.8	129±31.1	126.3±29.6	0.29
C-HDL mg/dL	37.6±10.6	38.1±8.6	37.2±11.3	0.80	38.5±10.3	36.7±8.8	36.811.6	0.17	37.7±10.4	38.01±8.6	36.9±11.1	0.81
TG mg/dL	267.9±163	253.6±133	255.9±147	0.63	266.7±165	257.7±131	220.1±77.2	0.40	266.5±163.8	257.9±134	248±144.9	0.73

Se toman como significativos cualquier valor $p < 0.05$.

Tabla 12. Análisis estadístico de los parámetros antropométricos del grupo con DT2. Con un intervalo de confianza del 95%.

PARAMETRO	rs7754840				rs9465871				rs10946398			
	GG	GC	CC	P	TT	TC	CC	P	AA	AC	CC	P
GÉNERO F/M	174/70	158/52	34/24	0.029	197/82	146/50	20/14	0.16	170/75	164/49	32/24	0.010
EDAD (años)	53.6±7.4	53.5±7.6	53.3±6.9	0.96	53.5±7.6	53.4±7.1	53.8±7.1	0.94	53.5±7.4	53.3±7.6	53.1±6.7	0.92
IMC (kg/m ²)	29.7±5.2	28.5±4.2	29.6±5.0	0.034	29.4±4.8	28.8±4.7	29.7±4.07	0.34	29.6±5.2	28.5±4.04	29.9±5.2	0.021
TAS (mmHg)	117.4±13.3	119.8±14.7	118.0±12.9	0.17	118.2±13.1	118.8±14.7	119.5±15.2	0.79	117.6±13.4	119.3±14.7	118.8±12.4	0.43
TAD (mmHg)	74.9±9.9	75.6±11.02	75.8±7.7	0.74	75.6±9.2	75.1±10.6	76.9±9.4	0.58	75.2±9.9	75.2±10.9	76.2±7.8	0.81

Se toman como significativos cualquier valor $p < 0.05$.

Tabla 13. Asociación de parámetros antropométricos en mujeres en el grupo con SM.

PARAMETRO	rs7754840				rs9465871				rs10946398			
	GG	GC	CC	P	TT	TC	CC	P	AA	AC	CC	P
EDAD (años)	45±6.4	44.8±7.6	48.7±7.9	0.15	45.3±7.03	44.9±6.4	47.5±11.9	0.63	44.7±6.3	44.7±7.5	44.3±7.9	0.06
IMC (kg/m ²)	30.5±4.4	32.2±4.9	29.7±2.6	0.045	30.8±4.8	31.8±4.1	31.1±5.1	0.46	30.6±4.4	32.2±5.1	29.82±2.5	0.07
TAS (mmHg)	124.9±14.3	122.9±11.8	128.6±12.6	0.32	124.2±12.9	124.5±14.3	128.1±8.7	0.72	124.7±14.1	122.5±11.8	129.4±12.2	0.18
TAD (mmHg)	74.7±11.7	78.2±7.8	75.4±7.9	0.12	76.4±10.6	75.9±9.4	77.4±7.02	0.92	74.8±11.7	78.2±7.9	75.4±7.7	0.14

Se toman como significativos cualquier valor $p < 0.05$.

Tabla 14. Asociación de parámetros antropométricos en mujeres en el grupo con DT2.

PARAMETRO	rs7754840			P	rs9465871			P	rs10946398			P
	GG	GC	CC		TT	TC	CC		AA	AC	CC	
EDAD (años)	53.7±7.4	53.6±7.5	53.8±7.2	0.98	53.7±7.6	53.5±7.1	55.1±7.7	0.68	53.7±7.4	53.5±7.5	53.6±6.9	0.96
IMC (kg/m ²)	29.9±5.2	28.7±4.4	29.9±5.7	0.05	29.7±4.9	29.01±5.04	29.5±4.3	0.39	29.8±5.2	28.7±4.2	30.7±5.8	0.028
TAS (mmHg)	117.2±13.4	119.2±15.8	118.6±14.7	0.42	118.4±13.1	118.2±15.9	117±16.8	0.91	117.3±13.4	118.8±15.8	119.8±3.7	0.52
TAD (mmHg)	74.5±10.4	74.5±11.9	75.4±7.6	0.91	75.6±9.8	73.9±11.2	75±9.6	0.34	74.8±10.5	74.3±11.7	76.06±7.9	0.69

Se toman como significativos cualquier valor $p < 0.05$. Mostrando solo asociación con el IMC en este grupo y no así en hombres.

Tabla 15. Asociación de parámetros antropométricos en hombres en el grupo con DT2.

PARAMETRO	rs7754840			P	rs9465871			P	rs10946398			P
	GG	GC	CC		TT	TC	CC		AA	AC	CC	
EDAD (años)	53.1±7.3	53.2±8	52.5±6.4	0.92	53.2±7.7	53.1±7.07	52.1±6.2	0.87	53.11±7.4	52.9±8.1	52.5±6.4	0.94
IMC (kg/m ²)	29.02±5.01	28.2±3.6	29.02±4.1	0.52	28.7±4.7	28.3±3.9	29.9±3.9	0.46	29.1±5	27.9±3.3	29.02±4.1	0.33
TAS (mmHg)	117.9±13.3	121.5±10.7	117.3±10.6	0.18	117.6±12.9	120.7±10.1	123.1±12.1	0.16	118.4±13.2	121.2±10.5	117.3±10.1	0.31
TAD (mmHg)	75.9±8.6	78.5±6.9	76.3±8.04	0.20	75.6±7.6	78±7.9	79.8±8.7	0.042	76.2±8.6	78.3±6.8	76.3±8.04	0.31

Se toman como significativos cualquier valor $p < 0.05$. Este dato es representativo de este grupo ya que en ningún análisis observamos esta asociación sino hasta separar a nuestros grupos de estudio por género.

9. DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se determinó la frecuencia de tres SNPs asociados con la susceptibilidad a padecer DT2 los cuales han sido previamente reportados en trabajos de investigación en otras poblaciones, y también se asoció con el SM por la estrecha relación que existe entre estas dos enfermedades multifactoriales, aunque previamente no se haya reportado nada en relación con este último padecimiento.

Para nuestro conocimiento este es el primer estudio del gen *CDKAL1* relacionado con DT2 y SM en nuestra población; en especial con SM ya que no se tiene ningún reporte de la asociación de este gen con tal padecimiento.

Las variantes en los rs7754840, rs9465871 y rs10946398 del gen *CDKAL1* de riesgo para padecer DT2 no mostraron ninguna asociación con este padecimiento ni con SM como se ha reportado en otras poblaciones. La población japonesa mostró asociación con DT2 obteniendo frecuencias genotípicas del rs7754840 en su estudio de casos y controles grupo control de GG446/GC881/CC534 y de su grupo de casos con DT2 de GG262/GC781/CC538 con $P = 3.2 \times 10^{-7}$ (Horikawa *et al.*, 2008), en un estudio realizado en población caucásica se obtuvieron resultados de asociación discreta a DT2 (las frecuencias alélicas para el alelo “C” de riesgo fueron de 0.37 para el grupo control y de 0.41 para el grupo de DT2 con $P = 0.047$) (Stancáková *et al.*, 2008), también observaron asociación con el HOMA IR por genotipo del rs7754840 (GG vs. GC vs. CC: 1.85 ± 1.29 vs. 1.70 ± 1.13 vs. 1.69 ± 1.17 ; $P = 0.010$). Otro análisis de asociación realizado en una población de Korea con genes candidatos que predisponen a padecer DT2 encontraron asociación con el rs7754840, en donde sus frecuencias genotípicas fueron GG171/GC389/CC303 para el grupo con DT2 y GG178/GC319/CC133 para el grupo control ($P = 4.17 \times 10^{-9}$), este análisis también detectó la asociación de este SNP con el HOMA-IR ($P = 0.049$) (Cho *et al.*, 2008).

Aunque las variantes del gen *CDKAL1* no se asociaron directamente con estos padecimientos, mostraron asociaciones interesantes con diversos parámetros que se utilizan para diagnosticar estas dos enfermedades multifactoriales.

La asociación más clara la produjo la variante con el rs10946398 (cambio de A/C) con más de un parámetro que se utiliza para diagnosticar SM de acuerdo a lo establecido por la AHA. Las asociaciones se presentaron con respecto a: Edad ($P = 0.028$), Insulina ($P = 0.048$), HOMA2 %B ($P = 0.032$) y HOMA2-IR ($P = 0.020$), siendo estos parámetros

unos de los más importantes a nivel clínico que nos ayudan a entender la patogénesis de esta enfermedad. A nivel molecular la influencia de la variante de este gen está relacionada con la función de las células beta pancreáticas, ya que se tiene la hipótesis de que estas variantes pueden llevar a la degeneración de células β por la modulación de la actividad de CDK5/p35 (Ubeda *et al.*, 2006, Wei *et al.*, 2005).

A pesar de que no existe ningún estudio que asocie las características clínicas del SM con los SNPs en estudio, si existen reportes de asociación de estos con el HOMA2 %B reportado en un análisis realizado en población china (Ying *et al.*, 2008) donde la asociación fue mayor para el rs10946398 (P = 0.00009) y para los otros dos rs7754840 y rs9465871 fue de P=0.0011 P= 0.0065 respectivamente. Estos dos últimos no presentaron asociación en nuestra población de estudio. Ellos en su análisis reportan que estos SNPs por separado contribuyen al riesgo a padecer DT2 no siendo este el caso en nuestro análisis ya que aquí solo se muestra asociación con el riesgo a padecer SM siendo este padecimiento un antecedente de riesgo para desarrollar DT2 y por lo tanto un marcador de predisposición a padecerla. Los resultados obtenidos en nuestro análisis para el rs10946398 son respaldados por los obtenidos por Nicholette (Nicholette *et al.*, 2008) en poblaciones de Afroamericanos e Hispanos (p= 0.0046), ellos reportaron también la asociación del rs7754840 con HOMA2 %B. En nuestra población con SM no presentó asociación.

Otro análisis realizado en población caucásica reportaron asociado al HOMA2 IR asocian con la variante del rs10946398 en su población con DT2 (P=9.86X10⁻⁵) (Pascoe *et al.*, 2007), esta asociación es mayor con respecto al valor obtenido en nuestro análisis para SM (P = 0.020). Estos valores respaldan los reportados en la población Finlandesa (Steinthorsdottir *et al.*, 2007) y en la nuestra en cuanto a la reducción de la acción de la insulina.

Los únicos reportes congruentes a nuestros resultados con respecto a la no asociación de nuestros SNPs con DT2 son los reportados para la población Marroquí (Stephane *et al.*, 2008) y los de la población norteamericana (Allan *et al.*, 2008). Ya que no lo hacen en otras poblaciones como Británicos (The Wellcome Trust Case Control Consortium 2007), Indus (Dharambir *et al.*, 2008), Koreanos y Chinos (Ying *et al.*, 2008, Maggie *et al.*, 2008, Lui *et al.*, 2008), Alemanes (Kirchhoff *et al.*, 2008), Afroamericanos e Hispanos (Nicholette *et al.*, 2008) y Japoneses (Yukio *et al.*, 2008).

El rs7754840 es el más reportado en los estudios de asociación con DT2 en todo el mundo pero no en nuestra población, lo cual se explica por las diferencias étnicas presentes

en cada población de estudio y por la gran diversidad genética que existe entre poblaciones e incluso etnias.

Los resultados de asociación obtenidos con los parámetros clínicos de nuestras poblaciones con los SNPs de estudio nos indican que los parámetros evaluados son determinantes en el desarrollo, expresión o complicación de estos padecimientos. La asociación con el IMC, TG y TAD va de la mano con estas alteraciones ya que la obesidad predispone a presentar resistencia a la insulina y es un factor determinante en el desarrollo de la DT2.

El enfoque tomado en cuenta con respecto a este trabajo es solamente el principio de un gran proyecto ya que se debe de tomar en cuenta el origen étnico de nuestras poblaciones de estudio, pues se sabe que dependiendo del origen existe mayor riesgo genético de padecer o desarrollar alguno de estos padecimientos; por lo tanto un objetivo independiente de este estudio sería tomar marcadores informativos de ancestría para evaluar la estratificación poblacional y tener resultados mas confiables al reducir la posibilidad de tener falsos negativos o positivos.

10. CONCLUSIONES

Dada la relevancia de estos padecimientos en la salud de la comunidad se requiere encontrar estrategias científicas que acorten los tiempos en la generación de conocimientos y que permitan diseñar modelos de prevención y tratamiento. La meta se alcanzará cuando estos modelos sean operables a través de programas asistenciales y se logre disminuir la frecuencia de estas entidades.

Los resultados obtenidos no mostraron asociación directa entre las variantes del gen *CDKALI* con DT2 ni con SM posiblemente por la falta de marcadores de ancestría para poder estratificar nuestras poblaciones. Ya que es de gran importancia realizar estratificación de los grupos de estudio con base en su descendencia étnica por posibles falsos negativos o positivos ya que como lo hemos mencionado existen diferencias genéticas entre poblaciones y en nuestro país se cuenta con una diversidad genética muy amplia.

A pesar de los resultados negativos en nuestra asociación se cumplieron los objetivos particulares:

Se formó un banco de DNA de los individuos participantes en el estudio.

Se determinó la existencia de la relación entre los datos bioquímicos, antropométricos y genéticos entre los grupos de estudio dando como resultado la asociación genotípica con; TG en el grupo control, HOMA2-IR, HOMA2 %B, insulina, IMC en el grupo con SM, TAD en hombres con DT2 e IMC en el grupo en general de DT2.

Aún faltan análisis por realizarse como la estratificación de nuestros grupos de estudio, la secuenciación de nuestros fragmentos de amplificación para verificar si no existen variantes cercanas a las que estamos estudiando y puedan estas ser las que estén dando las asociaciones reportadas en nuestro estudio, y se espera tener un poco más claro el panorama epidemiológico que enfrenta actualmente nuestra sociedad con respecto al creciente número de nuevos casos de personas que padecen alguna de estas enfermedades multifactoriales.

11. BIBLIOGRAFÍA

Allan F. Moore, Kathleen A. Jablonski, Jarred B. McAteer, Richa Saxena, Toni I. Pollin, Paul W. Franks, Robert L. Hanson, Alan R. Shuldiner, William C. Knowler, David Altshuler and Jose C. Florez. 2008. Group for the Diabetes Prevention Program Research. Results in the diabetes prevention program. *Diabetes*, 57:2503-2510.

American Diabetes Association. 2007. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 30; S42-S47.

Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. 1998. *Diabet Med*. 15: 539-53.

Amy K. Y. Fu, Wing-Yu Fu, Alberto K. Y. Ng, Winnie W. Y. Chien, Yu-Pong Ng, Jerry H. Wang, and Nancy Y. Ip. 2004. Cyclin-dependent kinase 5 phosphorylates signal transducer and activator of transcription 3 and regulates its transcriptional activity. *PNAS*, 101: 6728-6733.

Anderson PJ, Critchley JAJH, Chan JCN et al. 2001. Factor analysis of the metabolic syndrome: obesity vs insulin resistance as the central abnormality. *Int J Obesit*, 25: 1782-1788.

Arredondo A, Zúñiga A, I Parada. 2005. Health care costs and financial consequences of epidemiological changes in chronic diseases in Latin America: evidence from Mexico. *Public Health*, 119: 711-720.

Arredondo A, Zúñiga A. 2004. Economic consequences of epidemiological changes in diabetes in middle income countries. *Diabetes Care*, 27: 104-109.

Balkau B, Charles MA. 1999. Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *Diabetes Med*, 16: 442-443.

Barcelo A, Aedo C, Rajpathak S, Robles S. 2003. The cost of diabetes in latin America and the Caribbean. *Bull World Health Org*, 81: 19-27.

Barker, D. J. P. 1995. Fetal origins of coronary heart disease. *Brit Med J*, 311: 171-174.
Barquera Simón, Tovar-Guzmán Víctor, Campos-Nonato Ismael, González-Villalpando Clicerio and Rivera-Dommarco Juan. 2003. Geography of Diabetes Mellitus Mortality in Mexico: An Epidemiologic Transition Análisis. *Arch Med Res*, 34: 407-414.

Carey VJ, Walters EE, Colditz GA et al. 1997. Body fat distribution and risk of noninsulin-dependent diabetes in women: the Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol*, 145: 614-619.
Carrillo Esper Raúl, Sánchez Zúñiga Martín De Jesús, Elizondo Argueta Sandra. 2006. Síndrome metabólico. *Rev Fac Med UNAM*, 49: 98-104.

Cherif H, Reusens B, Dahri S y Remacle C. A 2001. Protein-Restricted Diet during Pregnancy Alters in Vitro Insulin Secretion from Islets of Fetal Wistar Rats. *J Nutr*, 131; 1555–1559.

Claire M. Steppan, Shannon t. Bailey, Savitha Bhat, Elizabeth J. Brown, Ronadip R. Banerjee, Christopher M. Wright, Hiralben R. Patel, Rexford S. Ahima & Mitchell A. Lazar. 2001. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*, 409: 307-312.

Córdova Villalobos José Ángel, Barriguete Meléndez José Armando, Lara Esqueda Agustín, Barquera Simón, Rosas Peralta Martín, Hernández Ávila Mauricio, De León May María Eugenia, Aguilar Salinas Carlos A. 2008. Las enfermedades crónicas no transmisibles en México: sinopsis epidemiológica y prevención integral. *Sal Pub Méx*, 50: 419-427.

Cruz López Miguel, García Mena Jaime, López Orduña Eduardo, Valladares Salgado Adán, Sánchez Reina, Wachter Rodarte Niels, Aguilar Gaytán de Jesús Kumate. 2005. Genes candidatos como posibles marcadores de susceptibilidad a diabetes tipo 2. *REB*, 40: 81-86.

Cruz López Miguel, Montoya Carlos, Gutiérrez Margarita, Wachter Rodarte Niels, Aguilar Gaytán de Jesús Kumate. 2002. Polimorfismos de genes relacionados con diabetes tipo 2. *Rev Med IMSS*, 40: 113-125.

Dharambir K Sanghera, Lyda Ortega, Shizhong Han, Jairup Singh, Sarju K Ralhan, Gurpreet S Wander, Narinder K Mehra, John J Mulvihill, Robert E Ferrell, Swapan K Nath and Mohammed I Kamboh. 2008. Impact of nine common type 2 diabetes risk polymorphisms in Asian Indian Sikhs: *PPARG2 (Pro12Ala)*, *IGF2BP2*, *TCF7L2* and *FTO* variants confer a significant risk. *BMC Med Gen*, 9: 1-9.

Davidsson P, Hulthe J, Fagerberg B, Olsson BM, Hallberg C, Dahllof B, Camejo G. 2005. Unique distribution of apolipoproteins on small, dense LDL in patients with the metabolic syndrome and type 2 diabetes: a proteomic study. *J Lipid Res*, 46: 1999-2006.

Diabetes Genetics Initiative of Broad Institute of Harvard and MIT, Lund University, and Novartis Institutes for BioMedical Research. 2007. Genome-Wide Association Analysis Identifies Loci for Type 2 Diabetes and Triglyceride Levels. *Science*, 316:1331-1336.

Díaz Hernández Diana Patricia, Luis Carlos Burgos Herrera. 2002. ¿Cómo se transporta la glucosa a través de la membrana celular? *IATREIA*, 15: 179-189.

Drake A J y Walker B R. 2004. The intergenerational effects of fetal programming: non-genomic mechanisms for the inheritance of low birth weight and cardiovascular risk. *J Endocrinol*. Vol. 180; 1–16.

Ehm MG, Karnoub MC, Sakul H, Gottschalk K, Holt DC, Weber JL, Vaske D, Briley D, Briley L, Kopf J, McMillen P, Nguyen Q, Reisman M, Lai EH, Joslyn G, Shepherd NS, Wagner MJ, Burns DK . 2000. Genomewide search for type 2 diabetes susceptibility genes in four American populations. *Am J Hum Genet*. Vol. 66:1871-1881.

Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas: Epidemiología SSA 1993.

Escobedo de la Peña J, Escamilla Cejudo JA, Santos Burgos C. 1994. Colesterol sérico y diabetes mellitus: Principales factores de riesgo independientes en la mortalidad por cardiopatía isquémica en México. *Arch Inst Cardiol Mex*; 64: 189-195.

Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). 2001. *JAMA*, 285: 2486- 97.

Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*. 2001, 16: 2486-2497.

Fan-Yan Wei, Kazuaki Nagashima, Toshio Ohshima, Yasunori Saheki, Yun-Fei Lu, Masayuki Matsushita, Yuichiro Yamada, Katsuhiko Mikoshiba, Yutaka Seino, Hideki Matsui, Katsuhito Tomizawa. 2005. Cdk5-dependent regulation of glucose-stimulated insulin secretion. *Nat Med*, 11: 1104-1108.

Feike R. 1998. The secrets of fragment análisis. Amersham Pharmacia Biotech GmbH. Vienna, 152-156.

Flordellis CS, Ilias I, Papavassiliou AG. 2005. New therapeutic options for the metabolic syndrome: what's next? *Trends Endocrinol Metab*, 16: 254-60.

Flores J. C. 2008. Newly identified loci highlight beta cell dysfunction as a key cause of type 2 diabetes: Where are the insulin resistance genes? *Diabetologia*, 51: 1100–1110.

Ford ES, Giles WH, Diez WH. 2002. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults. Findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA*, 287: 356-359.

Frayling T.M. & McCarthy M.I. 2007. Genetic Studies of diabetes following the advent of the genome wide association study: where do we go from here? *Diabetologia*, 50: 2229-2233.

García-García E, de la Llata-Romero M, Kaufer-Horwitz M y cols. 2008. La obesidad y el síndrome metabólico como problema de salud pública. Una reflexión. *Acta Pediatr Mex*, 29: 227-46.

Giaccari A, Morviducci L, Pastore L, Zorretta D, Sbraccia P, Maroccia E. 1998. Relative contribution of glycogenolysis and gluconeogenesis to hepatic glucose production in control and diabetic rats. A re-examination in the presence of euglycaemia. *Diabetologia*, 41: 307-314.

Ginsberg HN. 2000. Insulin resistance and cardiovascular disease. *J Clin Invest*. 106: 453-458.

González C. A. 2002. Consenso Mexicano sobre el Tratamiento Integral del Síndrome metabólico. *Rev Mex Cardiol*, 13: 4-30.

González Sarmiento Enrique, Isaac Pascual Calleja, Martín Laclaustra Gimeno y José A. Casanovas Lenguas. 2005. Síndrome metabólico y diabetes mellitus. Rev. Esp. Cardiol. Supl, 5: 30-37.

Grundey SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, et al. 2005. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. Circulation, 112: 2735-52.

Gustavo F. Gonzales Rengifo, Cynthia Gonzales Castañeda, Diego Espinosa Guerinoni, Cristina Rojas Tubeh. 2007. Sobreexpresión de genes de las enzimas de la vía glicolítica en células cancerígenas. Acta Med Per. Vol. 24; 194-195.

Hales, C. N. y Barker, D.J.P. Hales C. N; Barker, D.J.P. 1992. Type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. Diabetologia, 35: 595-601.
Han TS, Sattar N, Williams K, Gonzalez Villalpando C, Lean MEJ, Haffner SM. 2002. Prospective study of C-reactive protein in relation to the development of diabetes and metabolic syndrome in the Mexico City Diabetes Study. Diabetes Care, 25: 2016-2021.

Hervey lodish, Arnold Berk, S. Lawrence Zipursky, Paul Matsudaria, David Baltimore, James Darnell. 2000. Biología Celular y Molecular. 4ª ed. Ed Medica Panamericana, 497-499.

Horikawa Yukio, Miyake Kazuaki, Yasuda Kazuki, Enya Mayumi, Hirota Yushi, Yamagata Kazuya, Hinokio Yoshinori, Oka Yoshitomo, Iwasaki Naoko, Iwamoto Yasuhiko, Yamada Yuichiro, Seino Yutaka, Maegawa Hiroshi, Kashiwagi Atsunori, Yamamoto Ken, Tokunaga Katsushi, Takeda Jun, Kasuga Masato. 2008. Replication of genome-wide association studies of type 2 diabetes susceptibility in Japan. J Clin Endocrin Metab, 93: 3136-3141.

Iniesta Raquel, Elisabet Guinó, Víctor Moreno. 2005. Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. Gac Sanit, 19: 333-341.

International Diabetes Federation. 2003. Diabetes Atlas. 2ª ed. Bruselas, Bélgica. International Diabetes Federation.

International Diabetes Federation. The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome.

Jaquet D, Gaboriau A, Czernichow P, Levy-Marchal C. 2001. Relatively low serum leptin levels in adults born with intrauterine growth retardation. Int J Obes Relat Metab Disord, 25: 491-495.

Jonathan van Tilburg, Timon W van Haeften, peter pearson, Cisca Wijmenga. 2001. Defining the genetic contribution of type 2 diabetes mellitus. J Med Genet, 38: 569-578.

King H, Aubert RE, Herman WH. 1998. Global burden of diabetes, 1995-2025: Prevalence, numerical estimates and projections. Diabetes Care, 21:1414-1431.

Knowler WC, Pettitt DJ, Saad MF, et al. 1991. Obesity in the Pima Indians: its magnitude and relationship with diabetes. *Am J Clin Nutr*, 53 (suppl); 1543–1551.

Kohsuke Kitani, Shigeo Oguma, Tei-ichi Nishiki, Iori Ohmori, Hervé Galons, Hideki Matsui, Laurent Meijer, and Kazuhito Tomizawa. 2007. A Cdk5 Inhibitor Enhances the Induction of Insulin Secretion by Exendin-4 Both in Vitro and in Vivo. *The Journal of Physiological Sciences*, 57: 235-239.

Laclaustra Gimeno Martín, Bergua Martínez Clara, Pascual Calleja Isaac y Casasnovas Lenguas José A. 2005. Síndrome metabólico. Concepto y Fisiopatología. *Rev Esp Cardiol Supl*, 5: 3-10.

Lerman Garber Israel, Carlos A Aguilar-Salinas, Francisco J Gómez-Pérez, Alfredo Reza Albarrán, Sergio Hernández Jiménez, Cuauhtémoc Vázquez Chávez, Juan A Rull. 2004. El síndrome metabólico. Características del síndrome metabólico en México. *Rev Endoc Nut*, 12: 109-122.

Lilja Lena, Shao Nian Yang, Dominic Luc Webb, Lisa Juntti Berggren, Per Olof Berggren and Christina Bark. 2001. Cyclin-dependent Kinase 5 Promotes Insulin Exocytosis. *J Bio Chem*, 276: 34199-34205.

Lombo Bernardo, Claudia Satizábal, César Villalobos, Claudia Tique, William Kattah · Bogotá, D.C. 2007. Prevalence of the metabolic syndrome in diabetic Patients. *Acta Médica Colombiana*, 32: 9-15.

Maggie C.Y. Ng, Kyong Soo Park, Bermseok Oh, Claudia H.T. Tam, Young Min Cho, Hyoung Doo Shin, Vincent K.L. Lam, Ronald C.W. Ma, Wing Yee So, Yoon Shin Cho, Hyung-Lae Kim, Hong Kyu Lee, Juliana C.N. Chan, and Nam H. Cho. 2008. Implication of Genetic Variants near *TCF7L2*, *SLC30A8*, *HHEX*, *CDKAL1*, *CDKN2A/B*, *IGF2BP2* and *FTO* in Type 2 Diabetes and Obesity in 6719 Asians. *Diabetes*, 2226-2233.

Marc Maillet, María Pilar Fernández Mateos, Biología Celular. Ed. Masson. España. 2002. pp.35.

Martin, JF, Carol S. Johnston CS, Chung-Ting Han y Benyshek DC. 2000. Nutritional Origins of Insulin Resistance: A Rat Model for Diabetes-Prone Human Populations *J. Nutr*, 30: 741–744.

Matthews D, Rudenski A, Naulyor B, Treacher D, Turner R. 1985. Homeostasis model assessment: Insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, 28: 412-419.

Minihane AM, Khan S, Talmud PJ, Williams DL, Wright JW, Murphy MC, Griffin BA, Williams CM. 2000. Lack of association between lipaemia and central adiposity in subjects with an atherogenic lipoprotein phenotype (ALP). *Int J Obes Relat Metab Disord*, 24: 1097-106.

Moebus Susanne, Jens Ulrich Hanisch, Pamela Aidelsburger, Peter Bramlage, Jürgen Wasem and Karl-Heinz Jöckel. 2007. Impact of 4 different definitions used for the assessment of the prevalence of the Metabolic Syndrome in primary healthcare: The

German Metabolic and Cardiovascular Risk Project (GEMCAS). *Cardiovascular Diabetology*, 6: 1-10.

Neel J.V. 1963. Diabetes mellitus: A thrifty genotype rendered detrimental by “progress”? *Am. J. Hum. Gen.*, 353–362.

Nesher R, Gross DJ, Donath MY, Cerasi E, Kaiser N. 1999. Interaction between genetic and dietary factors determines b cell function in *Psammomys obesus*, an animal model of type 2 diabetes. *Diabetes*, 48: 731-737.

Olaiz Fernandez G, Rivera Dommarco J, Shamah Levy T, Rojas R, Villalpando Hernández S, Hernández Avila M, Sepúlveda Amor J. 2006. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006. Cuernavaca México; Instituto Nacional de Salud Pública, 21: 77-88.

Pascoe Laura, Andrea Tura, Sheila K. et al., 2007. Common Variants of the Novel Type 2 Diabetes Genes *CDKALI* and *HHEX/IDE* Are Associated With Decreased Pancreatic B-Cell Function. *Diabetes*, 56:30.

Paul Zimmet, K. George M.M. Alberti y Manuel Serrano Ríos. 2005. Una nueva definición mundial del síndrome metabólico propuesta por la Federación Internacional de Diabetes: fundamento y resultados. *Rev Esp Cardiol*, 58: 1371-1376.

Peter Bennett. Nuevos datos, perspectivas renovadas: *Diabetes Atlas*, 3^a ed. 2007. *Diabetes Voice*, 52: 46-48.

Pineda Carlos Andrés, MD. 2008. Síndrome metabólico: definición, historia, criterios. *Colombia Médica*, 39: 96-106.

Ravelli AC, van der Meulen JH, Osmond C, Barker DJ, Bleker OP. 1999. Obesity at the age of 50 years in men and women exposed to famine prenatally. *Am J Clin Nutr*, 70: 811-816.

Ravelli GP, Stein ZA, Susser. 1976. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *N Engl J Med*, 295: 349-353.

Reaven GM. 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, 37: 1595-1607. Report of The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2007; Suppl. 1;542-547.

Reyes Armua Maria Cristina, Noelia Melina Benítez Giuggia Dra. Silvia G. de Lapertosa. 2008. Frecuencia del síndrome metabólico en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 en un servicio de diabetes de corrientes. *Revista de Posgrado de la VIa Cátedra de Medicina*, 185; 5-8.

Romero Carlos E. 2006. El síndrome metabólico. *Rev Med Urug*, 22: 108-121.

Rull JA, Aguilar Salinas CA, Rojar R, Ríos Torres JM, Gómez Perez FJ, Olaiz G. 2005. Epidemiology of type 2 diabetes in Mexico. *Arch Med Res*. Vol. 36; 188-196.

Saltiel A. 2001. New Perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 Diabetes. *Cell*, 104: 517-519.

Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA. 1989. pp.B2.

Scott Laura J., Karen L. Monlke, Lori L. Bonnycastle, Cristen J. Willer, Yun Li. *et al.*. 2007. A Genome-Wide Association Study of Type 2 Variants Diabetes in Finns Detects Multiple Susceptibility. *Science*, 316:1341-1345.

Secretaría de Salud. 2000. Proyecto de modificación a la norma oficial mexicana NOM-015-SSA2-1994 para la prevención, tratamiento y control de la diabetes. *Rev Med IMSS*, 38: 477-495.

Okada Shuichi, Eijiro Yamada, Tsugumichi Saito, Kihachi Ohshima, Koshi Hashimoto, Masanobu Yamada, Yutaka Uehara, Takafumi Tsuchiya, Hiroyuki Shimizu, Kasuaki Tatei, Takashi Izumi, Keishi Yamauchi, Shinichi Hisanaga, Jeffrey E. Pessin and Masatomo Mori. 2008. CDK5-dependent phosphorylation of the Rho family GTPase Tc10 regulates insulin-stimulated GLUT4 traslocation Running title: CDK5 and GLUT4. *J Biol Chem*, 1264-1268.

Sierra Ariza ID. 2007. Análisis crítico de los criterios de definición y prevalencia del Síndrome Metabólico. *JAMA*. 201-210.

Stančáková Alena, Pihlajamäki Jussi, Kuusisto Johanna, Stefan Norbert, Fritsche Andreas, Häring Hans, Andreozzi Francesco, Succurro Elena, Sesti Giorgio, Welløw Boesgaard Trine, Hansen Torben, Pedersen Oluf, Jansson Per Anders, Hammarstedt Ann, Smith Ulf, Laakso Markku. 2008. Single-nucleotide polymorphism rs7754840 of *CDKAL1* is associated with impaired insulin secretion in nondiabetic offspring of type 2 diabetic subjects and in a large sample of men with normal glucose tolerance. *J Clin Endocrinol Metab*, 93: 1924-1930.

Steinthorsdottir Valgerdur, Gudmar Thorleifsson, Inga Reynisdottir, Rafn Benediktsson, Thorbjorg Jonsdottir, G Bragi Walters, Unnur Styrkarsdottir, Solveig Gretarsdottir, Valur Emilsson, Shyamali Ghosh, Adam Baker, Steinunn Snorraddottir, Hjordis Bjarnason, Maggie C Y Ng, Torben Hansen, Yu Bagger, Robert L Wilensky, Muredach P Reilly, et al. 2007. A variant in *CDKAL1* influences insulin response and risk of type 2 diabetes. *Nat Genet*, 39: 770-775.

The Wellcome Trust Case Control Consortium. 2007. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*, 447: 661-678.

Tilburg J., Haeflén T., Pearson P., Wijmenga C. 2001. Defining the genetic contribution of type 2 diabetes mellitus. *J Med Genet*, 38: 569-578.

Trejo Gutierrez Jorge F. 2004. Epidemiología de Síndrome Metabólico y Diabetes Tipo 2: ¿El diluvio que viene? *Archivos de Cardiología en México*, 74: 267-270.

Tusié Luna María Teresa. 2005. Genes and Type 2 Diabetes Mellitus. *Arch Med Res*, 36: 210-222.

- Ubeda Mariano, Kemp D.M., and Habener J.F. 2004. *Endocrinol*, 145: 3023-3031.
- Ubeda Mariano, Rukstalis Michael and Habener Joel F. 2006. Inhibition of cyclin-dependent kinase 5 activity protects pancreatic beta cells from glucotoxicity. *J Biol Chem*, 281: 28858-28864.
- Velásquez Monroy O, Rosas Peralta M, Laraesqueda A, Pastelón Hernández G, Grupo ENSA 2000, Attie F, Tapia Conyer R. 2002. *Hipertensión Arterial en México: Resultados de la Encuesta Nacional de Salud (ENSA) 2000*. *Arch Cardiol Mex*, 72: 71-84.
- Voronko O. E. Bodoev N. V. Archakov A. I. 2008. The Use of SNP Markers for Estimation of Individual Genetic Predisposition to Diabetes Mellitus Type 1 and 2. *Biochemistry. Supplement Series B: Biomed Chem*, 2: 126–132.
- Rodríguez Enriquez Yanik. 2002. Interpretaciones recientes sobre el metabolismo Lipídico en la resistencia a la insulina. *Revista Cubana Aliment Nutr*, 16: 54-62.
- Ying Wu, Huaixing Li, Ruth J.F. Loos, Zhijie Yu, Xingwang Ye, Lihua Chen, An Pan, Frank B. Hu, and Xu Lin. 2008. Common Variants in *CDKAL1*, *CDKN2A/B*, *IGF2BP2*, *SLC30A8*, and *HHEX/IDE* Genes Are Associated With Type 2 Diabetes and Impaired Fasting Glucose in a Chinese Han Population. *Diabetes*, 57: 2834-2842.
- Yura S, Itoh H, Sagawa N, Yamamoto H, Masuzaki H, Nakao K, Kawamura M, Takemura M, Kakui K, Ogawa Y, Fujii S. 2005. Role of premature leptin surge in obesity resulting from intrauterine undernutrition. *Cell Metab*, 1: 371-378.
- Zeggini E, Weedon MN, Lindgren CM, et al. 2007. Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. *Science*, 316: 1336–1341.
- Zimmet Paul, K. G. M. M. Albeerti, Jonathan Shaw. 2001. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*, 414: 782-787.
- Zimmet Paul. 2000. Globalization, coca-colonization and the chronic disease epidemic: can the doomsday scenario be averted? *J. Intern. Med*, 247: 104-109.

12. Sitios electrónicos

- 2008-10-08 www.idf.org
- http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/faq/snps.shtml#snps.
- 2009-04-03 http://string.embl.de/newstring.cgi/show_network_section.pl
- 2009-06-17 <http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>.
- 2008-12-13 <http://translate.google.com.mx/translate?hl=es&sl=en&u=http://www.dtu.ox.ac.uk/homa/index.php&ei=-R-fSbqED5DWMcLrcoL&sa=X&oi=translate&resnum=3&ct=result&prev=/search%3Fq%3Dhoma%26hl%3Des>.
- 2009-01-22 http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/faq/snps.shtml#snps.
- 2008-09-02 <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M806531200>.

ANEXOS

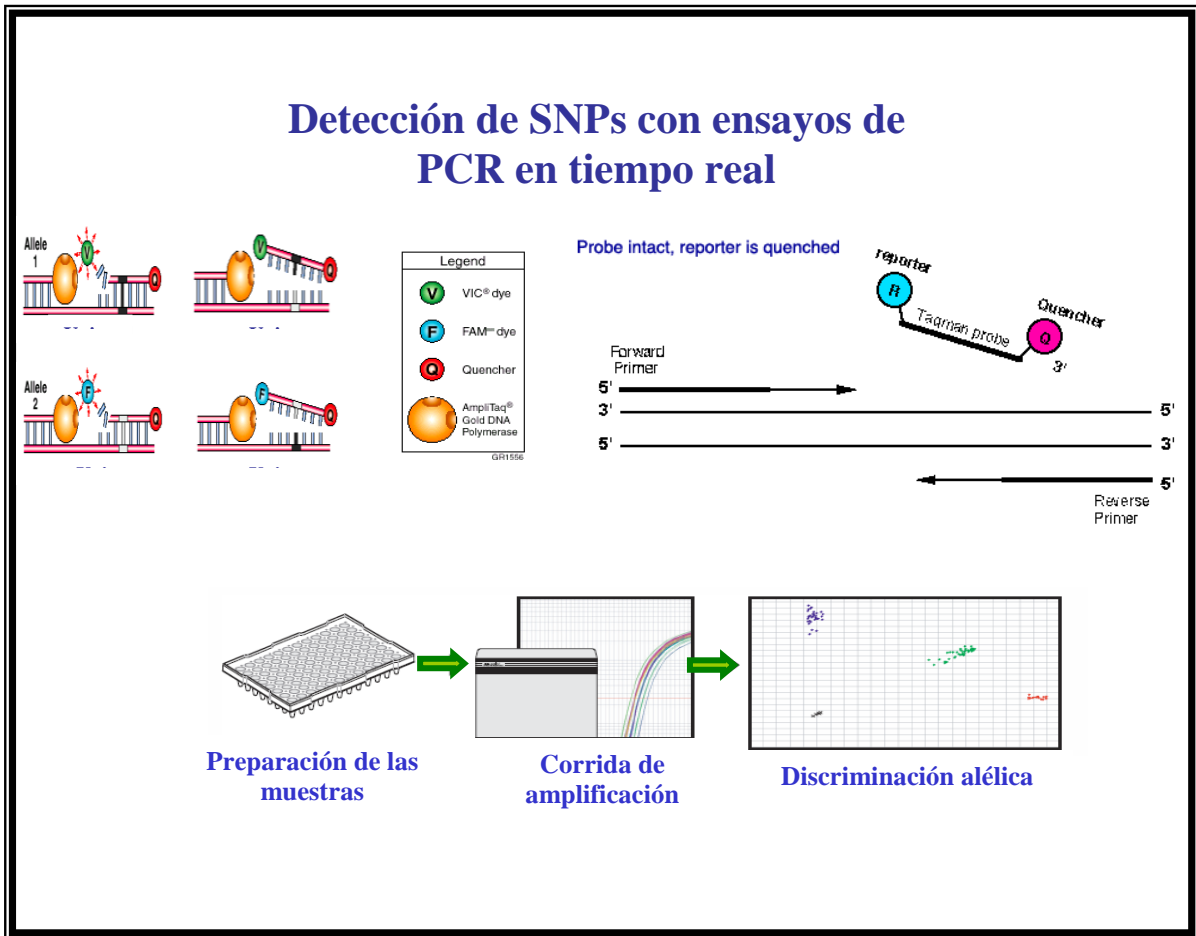
13.1 Fundamento de las sondas TaqMan.

Una sonda TaqMan es un oligonucleótido cuya secuencia es complementaria a la región central del amplicón. Tiene una secuencia de 13 a 18 nucleótidos que presenta en el extremo 5' una marca fluorescente (reportero) y en el extremo 3' un “quencher” o apagador que anteriormente era TAMRA (actualmente se utilizan apagadores no fluorescentes) de tal forma que cuando estas dos moléculas se encuentran unidas por la sonda, toda la fluorescencia emitida por el reportero, es absorbida por el apagador, por lo que la fluorescencia global observada es igual a cero, a este fenómeno se le conoce como FRET de Förster (o Fluorescent) Transferencia de energía resonante (Resonant Energy Transfer). Las sondas TaqMan, que tienen una T_m mayor que los primers, por lo que durante la etapa de alineación, la primera en unirse a su secuencia específica es la sonda, y posteriormente los primers, de tal forma que cuando la DNA polimerasa se une al extremo 3' del primer e inicia la elongación en su paso se encuentra con la sonda y la degrada dada su actividad exonucleasa 5' \rightarrow 3'. Al ser degradada, libera al reportero del apagador lo que suprime el fenómeno FRET y la fluorescencia emitida por el sistema de detección del ABI Prism HT7900 (Applied Biosystems, USA). Dado que la fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de sonda degradada, y esta a su vez es proporcional a la cantidad de templado generado, este sistema permite visualizar el incremento de amplicon a lo largo de la reacción de PCR.

La utilización de sondas TaqMan presenta muchas ventajas en comparación con SYBR Green, ya que la incorporación de un tercer oligonucleótido a la reacción de PCR, incrementa su especificidad, de esta forma la fluorescencia registrada corresponde únicamente a la generada por el producto de amplificación, el cual es altamente específico. Otra ventaja es que no hay que hacer estandarización alguna pues los sistemas TaqMan se entregan ya optimizados y utilizan protocolos universales de amplificación y permiten analizar simultáneamente un gran número de genes.

Sabemos que el paciente diabético desarrolla complicaciones durante la evolución de la enfermedad. Con este enfoque de genes-evolución-complicaciones se podría llegar a conocer que efecto tienen los SNPs ya sea como protectores o marcadores de riesgo.

Esquema general de PCR en tiempo real y lectura de discriminación alélica.



La secuenciación del genoma humano representa un gran logro que puede tener profundas consecuencias para la práctica médica. Gracias a esta pueden ser identificados nuevos genes de diversas enfermedades y la información obtenida podrá algún día ser usada para predecir el riesgo de una persona de desarrollar una enfermedad específica o su respuesta a un medicamento en particular (Voronko *et al.*, 2008).

13.2 Obtención de material biológico.

Se obtuvo sangre venosa de los participantes, en ayuno, en tubos Vacutainer sin anticoagulante y tubos preparados con EDTA, de la misma forma que en rutina para cualquier examen de laboratorio; se centrifugó las muestras sanguíneas a 2000 rpm durante 10 minutos a 20 °C, se separó el suero para ser utilizado para estudios bioquímicos y de la muestra anticoagulada se obtuvieron células mononucleares, mediante centrifugación por gradiente de densidad.

Extracción de DNA.

Para la extracción se utilizó un estuche comercial QIAamp DNA Blood Midi/ Kit Handbook (Qiagen) y se procesaron las muestras según el siguiente procedimiento:

El paquete celular se resuspendió con 2 mL de PBS 1x y se agitó vigorosamente en vortex, se adicionó 200 µL de proteasa Quiagen, y 2.4 mL de regulador (AL), se volvió a mezclar en vortex, se incubó a 70 °C durante 4 horas en agitación constante (se mezcló en vortex cada dos horas por períodos de 15 segundos). Posteriormente se adicionaron 2 mL de etanol grado reactivo y se mezcló en vortex durante 15 segundos. Se dejó la mezcla durante 10 minutos a temperatura ambiente y se agitó en vortex, 15 segundos. Se transfirieron 4 mL de la mezcla anterior a una columna QIAamp Midi y se colocaron en un tubo de centrifuga de 15 mL, se centrifugaron a 3000 rpm durante 4 minutos a temperatura ambiente. Al terminar se descartó el filtrado, y adicionó el volumen restante de la mezcla, se centrifugó a 3000 rpm durante 4 minutos a temperatura ambiente. Se removió la columna, se descartó el filtrado, y la columna se colocó otra vez en el tubo de 15 mL, se adicionó 2 ml de regulador de lavado (AW1) y centrifugó a 4100 rpm durante 3 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron 2 mL del segundo regulador de lavado (AW2) y centrifugó a 4,100 rpm, 20 minutos, a temperatura ambiente, después se quito la columna del tubo e incubó a 70 °C, durante 10 minutos y al enfriarse se colocó la columna en un tubo de centrifugación nuevo de 15 mL, se adicionaron 300 µL del regulador de eluido (AE) (previamente calentado a 40 °C) al centro de la membrana. Se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos y se centrifugó a 4100 rpm durante 6 minutos a temperatura ambiente, se agregó de nuevo 300 µL de AE, se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó a 4100 rpm durante 6 minutos a temperatura ambiente.

13.3 Cuantificación y determinación de integridad del DNA (Feike 1998).

Se homogeneizó el DNA a cuantificar y se realizó una dilución de cada muestra 1:10. Se tomaron las lecturas correspondientes a 260 y 280 nm para cada muestra y se calculó la concentración en el equipo Victor, Perkin Elmers. Se tomaron como adecuadas para estudios posteriores aquellas muestras que tenían por lo menos 50 µg / mL de DNA.

Se calculó el cociente de las lecturas obtenidas a 260 nm y 280 nm con el fin de determinar la pureza. El cociente debe de estar entre 1.8 y 2.0.

Una vez que se realizó la extracción, cuantificación y determinación de la pureza del DNA, se procedió a realizar la prueba de integridad con objeto de observar la presencia ó ausencia de degradación, con la siguiente técnica (Sambrook 1989):

Se preparó un gel de agarosa al 0.9 % en TBE (Tris-Borato-EDTA 0.5M pH= 8.0), y se adicionó 0.6 µL de bromuro de etidio (0.5 mg/mL), además se colocaron en el pozo del gel 2 µL de DNA y se adicionaron 2 µL de amortiguador de carga (azul de bromofenol y xilencianol en glicerol). Se cargó el gel colocando 4 µL de la mezcla y se realizó la electroforesis a 80 voltios, 1 hr. Después se observó el gel en el analizador de geles equipado con una fuente UV (BIO-RAD modelo ET9970623-54, USA).

13.4 Amplificación por PCR tiempo real del fragmento de los 3 SNPs del gen *CDKAL1* de estudio.

Las sondas para los 3 SNPs, se adquirieron con base en el catálogo de de Applaied Biosystems, estas sondas están marcadas con fluoróforos, en este caso VIC para el alelo “X” y FAM para el alelo “Y” de acuerdo a la siguientes secuencias (alelo X y Y se refieren a su ubicación espacial en las gráficas que da como resultados el equipo).

Información general de las sondas de estudio.

Código	Secuencia del fragmento del gen a analizar	rs
C__29598297_10	CAGCTGTGTAAGTGTGCTGAGAAA[C/T]TGAGTTAGATGAAGACTGAAGATTG	rs9465871
C__31635230_10	TTTGGGAAAAGGGTTTAGTATCGTT[A/C]TGCTGTCATTGCATCAAGTCATCGT	rs10946398
C__29246232_10	GGGGAAGAAGTAGTAATGTTGGAAA[C/G]GTTGACTTGATAGAGGATTTGTAA	rs7754840

* Código de Catalogo Applaied Biosystem.

Como se observa en las secuencias de la tabla de arriba siempre la primera base nitrogenada que se encuentra dentro del corchete va marcada con el fluoróforo VIC y la siguiente con el fluoróforo FAM.

Técnica TaqMan para SNPs en el software S.D.S. versión 2.2.2 para el equipo 7900HT de Applied Biosystems.

Una vez que se obtuvo DNA integro y con la pureza adecuada, se prepararon diluciones de cada muestra de DNA a una concentración de 20 ng/ µL. Es importante que las muestras

tengan concentración uniforme para que se agrupen en los tres genotipos posibles: homocigotos 1, heterocigotos, homocigotos 2.

1. Posteriormente, se hace una mezcla de reacción con los reactivos de Applied Biosystems,
 - a. 3µl de Master Mix.
 - b. 0.25µl de sonda al 20X.
 - c. DNA 1µl (20 ng/ µL), el rango va de 5-30 ng/ µL.
 - d. Agua inyectable: ajustar a 6 µL.

Nota: La Master Mix contiene el buffer, los dNTPs y la Taq Polimerasa.

2. Se coloca los 5 µL de la mezcla y 1 µL de DNA en cada pozo (uno por muestra) y se sella con la “cover”. Se corre con las siguientes condiciones de PCR.

Inicial (Hold)	2 min	50 grados C
“Steps” (Hold)	10 min	95 grados C
“Meeting”	15 seg	95 grados C
Alineación /extensión	1 min	60 grados
Número de ciclos:	40	
“Thermal Cycler Protocol” Standar		

Nota: El número de ciclos va de 40 a 50, dependiendo del tamaño del amplicon.

Programación para discriminación alélica en el software S.D.S. versión 2.2.2 para el equipo 7900HT de Applied Biosystems.

3. Se encendió la computadora, posteriormente el equipo de PCR en Tiempo Real HT7900. Ya que el equipo se estabilizó y solo si tiene luz verde se accedió al programa S.D.S 2.2.2.
4. Se accedió a una plantilla nueva en donde apareció una ventana con varias opciones (cuantificación absoluta, discriminación alélica) y de calibración como: Background (se realizó cada mes ó cada semana dependiendo de el uso de el equipo) y Pure Spectra (calibración) se realizó cada 6 meses, entre otras. La primera plantilla que se abrió fue la de cuantificación absoluta (Absolute Quantification), en donde se seleccionó toda la placa.
5. Se adicionó el detector, y también los NTC (No Template Control) y se colocó como referencia pasiva a Rox, posteriormente se abrió la pestaña de “instrument” en donde se verificó las condiciones de PCR ya mencionadas. Una vez ya terminada esta

plantilla se guardó en un archivo para llevar su registro y su control, además de que nos sirvió para poder verificar nuestros resultados en posteriores ocasiones.

6. Ya que se terminó la cuantificación absoluta, abrimos una plantilla nueva y seleccionamos la opción de Discriminación alélica en donde seleccionamos un marcador, NTC y referencia pasiva (ROX). Se guardó en un archivo para poder verificar nuestros resultados en posteriores ocasiones.
7. Una vez que se termino se abrió nuevamente la plantilla de Cuantificación Absoluta, en donde en la opción de “instrument”, se dio un “click” en “open/close”, introduciendo la placa previamente cargada con la mezcla y DNA, se dió nuevamente “open/close”, ya que se cerro se dió “Start” y se espero alrededor de 1:45 hrs. Para que el equipo termine la reacción de PCR-Tiempo Real.
8. Ya que la reacción de PCR concluyó se abrió la plantilla de Discriminación Alélica en donde en la pestaña de “instrument” se dió la orden de “Post Read”.
9. Una vez que se realizó la reacción de PCR en Tiempo Real y Discriminación alélica se realizó una revisión de resultados de ambas corridas.
10. Se determinó cuales muestras son homocigotos para alguno de los dos alelos y cuales son heterocigotos.

13.5 Esquema de trabajo y valores de referencia para las pruebas bioquímicas.

	Glucosa	Creatinina	Colesterol	LDL	HDL	Triglicéridos
Técnica usada	Enzimática de punto final	Jaffé modificado	Enzimático de Punto final	Punto final	Punto final	Punto final
Longitud de onda	340 nm	520 nm	520 nm	560 nm	520 nm	520 nm
Rango analítico	5-700 mg/dL	0.3-25 mg/dL	5-750 mg/dL	6.6-992 mg/dL	5-90 mg/dL	10-1000 mg/dL
Valores de referencia en suero	70-105 mg/dL	0.6-1.3 mg/dL	Bajo riesgo<200 Incierto 201-239 Alto>240 mg/dL	Aceptable< 130 Medio 130-159 Alto ≥160 mg/dL	Mujeres >50 mg/dL Hombres >40 mg/dL.	35-160 mg/dL
Volumen de muestra por ensayo	3µL	20µL	3µL	3µL	5µL	3µL
Volumen de reactivo por ensayo	300µL	219µL	300µL	300µL	300µL	300µL

