



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA

“Estudio de la variación genética de la región hipervariable I  
del ADNmt en pacientes con *Diabetes Mellitus tipo 2*”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIOLOGA

P R E S E N T A

YURITZY ITZEL RAMÍREZ GONZÁLEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. MARÍA DE LOURDES MUÑOZ MORENO  
Departamento de Genética y Biología Celular, CINVESTAV

ASESOR INTERNO:

M en C. JOSÉ MISAEL VICENTE HERNÁNDEZ VÁZQUEZ  
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM



MÉXICO D.F. 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
PRESENTE.

Comunico a usted que la alumna **RAMÍREZ GONZÁLEZ YURITZY ITZEL**, con número de cuenta **306244685**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **30 de agosto de 2016** a las **15:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

**PRESIDENTE** M. en C. CATALINA MACHUCA RODRÍGUEZ

**VOCAL** Dra. MARÍA DE LOURDES MUÑOZ MORENO\*

**SECRETARIO** M. en C. JOSÉ MISAEL VICENTE HERNÁNDEZ VÁZQUEZ

**SUPLENTE** Dr. JUAN JOSÉ RODRÍGUEZ MERCADO

**SUPLENTE** Dr. HUGO LÓPEZ MUÑOZ

El título de la tesis que presenta es: **Estudio de la variación genética de la región hipervariable I del ADN mitocondrial en pacientes con Diabetes Mellitus Tipo 2.**

Opción de titulación: Tesis.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

**ATENTAMENTE**  
**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU” DE ESTUDIOS**  
 Ciudad de México, a 27 de julio de 2016

**DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ**  
DIRECTOR



RECIBÍ  
OFICINA DE EXÁMENES  
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.  
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL  
JEFE DE CARRERA



El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio No.1 del Departamento de Genética y Biología Molecular, del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV IPN). Bajo la dirección de la Dra. María de Lourdes Muñoz Moreno y asesorado por el M en C. José Misael Vicente Hernández Vázquez de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la Universidad Nacional Autónoma de México (FESZ-UNAM) y fue apoyado por la Beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología SNI nivel III-3871 (CONACyt-México)

**“En biología nada tiene sentido,  
si no es a la luz de la evolución”**

**Theodosius Dobzhansky.**

## **AGRADECIMIENTOS**

**Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada a través del Sistema Nacional de Investigadores Nivel III de la Dra. María de Lourdes Muñoz Moreno, que sirvió como apoyo durante el desarrollo de mi tesis de Licenciatura en el Laboratorio 1, del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Zacatenco).**

**Agosto 30, 2016**

## **AGRADECIMIENTOS**

### **UNAM**

A la UNAM, por haberme acogido en sus aulas, brindándome la oportunidad de crecer y desarrollarme académicamente, abriéndome a un mundo de posibilidades.

A la Fes Zaragoza, por otorgarme conocimiento y experiencias durante toda mi carrera, a través de innumerables maestros quienes compartieron su sabiduría y pasión por la Biología y la ciencia, recuerdo con estima, agradeciendo por lo aportado a Enrique Gil, Carlos Castillejos, Sonia Cruz, Luis Sánchez, José Misael Vicente, Arturo Cano, Rosalva Rangel, Teresa Corona, Edelmiro Santiago, Ma. Del Carmen García.

A la maestra Carmen Olmos Fuertes por haberme contagiado su interés y pasión por la biología, por su apoyo y empoderación el cual me encamino a elegir esta carrera.

## **AGRADECIMIENTOS**

### **CINVESTAV-IPN**

*A “Un maestro es aquella persona que dedica parte de su tiempo y conocimiento, para forjar el éxito de sus alumnos”*

Dra. María de Lourdes Muñoz Moreno.

Requiero agradecerle por haberme otorgado la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo en su laboratorio, confiando en mí durante todo este tiempo, así como por su gran disposición en asesorarme en este proyecto de tesis y en atenderme cada vez que lo requerí, por hacerme cuestionar el trabajo, a mí misma, dándome así la oportunidad de crecer, por haber confiado en que terminaría el trabajo, por todo el apoyo que me brindó con tal de verme titulada.

A la Dra. Angélica Saldaña Martínez.

Qué decirte... de ti fue de quién recibí grandes lecciones en todos los aspectos, gracias por involucrarte en este trabajo y conmigo, por todos los conocimientos que me brindaste, a todo nivel, algo que siempre recordaré será tu entusiasmo, buen humor y tu risa contagiosa que casi no se escuchaba en toda situación o lugar, por ser paciente cuando de explicar se trataba, en resumidas cuentas gracias por ser mi maestra, mis mejores deseos en todo aspecto para ti, tienes un futuro brillante.

Al Dr. Gerardo Pérez Ramírez.

Mi estimado Doc, gracias por compartir todo su conocimiento conmigo, por el compromiso y entusiasmo que otorgó a la presente tesis, por atenderme en todo momento de duda, despejándolas o haciéndolas más grandes, por sus puntos de vista, comentarios para enriquecer la tesis, por el ánimo aportado en los momentos de estrés, por las largas charlas compartiendo puntos de vista respecto a la pasión en común: la Biología y la ciencia.

**Les dedico con cariño está frase a dos:**

*“Dime y lo olvido, enséñame y lo recuerdo, involúcrame y lo aprendo”*

Futuro Dr. Gracias por tu amistad, por fomentar en mí la ñoñez, literatura, puntos de vista, la ciencia y la pasión por la Biología, por el apoyo en mis momentos de duda, sobre todo en la parte estadística, el mayor éxito en todo aspecto Doc.

Dr. Eduardo Domínguez de la Cruz.

A todos los integrantes del laboratorio No.1: Miguel (Don Mike), Rosy, Hebert, Miri, Asha (gordis), Mirna, César, Armando; gracias por todo este tiempo de sana y divertida convivencia, por aportarme cada uno una parte de sí en todo aspecto, por todo el apoyo brindado en todo aspecto, desde académico al personal, por su ánimo y entusiasmo para que terminara este trabajo, mis mejores deseos para todos ustedes.

M en C. María Guadalupe Aguilar González, responsable de la Unidad de Ácidos Nucleicos, por el apoyo técnico indispensable en la parte de la secuenciación, nunca escuché un “no” por respuesta aún con todo su trabajo, al contrario siempre obtuve una cálida sonrisa, recomendaciones y uno que otro dulce.

Dr. Otoniel Maya, por su apoyo brindado en la parte de los alineamientos de las secuencias.

A Gabriela Mora Macías, por su amable atención, disposición, ya que me facilito todo el papeleo que requerí en su momento, con eficiencia.

Al Dr. Jonathan García, gracias por que fue debido a ti que supe de la existencia del CINVESTAV, te respeto y admiro por tus logros, gracias por tu escucha, consejos y recomendaciones cuando estaba en una etapa crítica para elegir, ahora lo veo, fue de las mejores elecciones de mi vida, ya que aunque no sabía lo que me deparaba, esa corazonada se cumplió, brindándome un escalón clave en mi vida. Mis mejores deseos Doc!!!

## **AGRADECIMIENTOS**

### ***A mis grandes amigas de la preparatoria:***

Mónica, Aline y Lupita, gracias por acompañarme durante todo este tiempo, requiero decirles lo importante y especiales que son para mí, gracias por todo cuanto me han brindado, compartido, aun cuando nos distanciamos por un tiempo o no nos frecuentemos seguido, sepan que en mí tendrán a una amiga con la cual contar siempre, me considero afortunada de tenerlas en mi vida, me emociona ver cuánto han crecido, cada una en su camino personal, las amo y admiro chicas, soy su fan!!!

Zuleyma, gracias por tu amistad y ejemplo, hoy me sorprendo de tus logros, de cómo has crecido como individuo, ver todo lo que has creado me tiene orgullosa, me sirve de impulso y anima a seguir adelante, viendo que yo también puedo llegar muy lejos, enfrentando mis miedos, siendo auténtica.

### ***A mis súper amigos de la universidad:***

Vero, Isa y Daniela, mis niñas, pareciera ayer cuando las conocí y no me dieron “mala espina” como a todos los demás, jajaja; muchas gracias por brindarme su amistad todo este tiempo, por todo cuanto hemos compartido de corazón, por las experiencias que hemos vivido juntas e individual durante nuestra etapa universitaria, me considero dichosa de tenerlas en mi vida, lo que escribo aquí no podría plasmar lo que pasa por mi cabeza al escribir lo que siento por ustedes, pero requiero sepan que aunque cada una ya camina su propia senda, nos tendremos siempre, a una llamada, whats, inbox, etc. Deseo que nunca perdamos lo construido, al contrario, sigamos creciendo, fortaleciendo los lazos que nos unen.

Anita, Viri, Mau, por siempre equipo UMIEZ, pues que decirles... saben todas las aventuras que disfrutamos juntos, las tengo presentes, me alegra saber y ver que cada uno brilla, que están justo dónde se lo merecen y van por más, gracias por ser ejemplo e impulso, por muy lejos que estemos algunos (literal), en mi corazón están presentes, les deseo lo mejor a cada uno, hagamos que nuestra amistad dure toda la vida, yo haré lo que me corresponda a ello.

A Ivonne, gracias por ser toda esa ternura e inocencia, eres una gran amiga, gracias por la confianza y escucha, confié en que tú también pronto lograras concluir tu sueño, todo el éxito del mundo amiga!!!

A Diego, Giovanni, Flor, Oscar, Sarita, Rubí, por ser grandes compañeros, de quienes aprendí diversas cosas, gracias por hacer divertida la estancia en la carrera en sus diversas etapas, mis mejores deseos a ustedes en su camino.

A Miguel, Ricardo y Leo, gracias por su amistad y confianza todo este tiempo, por todo cuanto me han brindado, en verdad, los apreció mucho, saben que cuentan conmigo chicos!!!

## **DEDICATORIAS**

### ***A mi madre:***

*María del Carmen González, tú eres una mujer libre, honesta y amorosa!!!*

Agradezco al universo el haberme dado el privilegio y honor de ser tu hija, gracias por todo el amor, entrega, fuerza, ternura, y valor que están en ti, qué me has brindado y enseñado, por haberme dado la vida y apoyado para regresar a ella, aunque no lo exprese estoy eternamente agradecida contigo por ello; todo lo que aquí escribo no abarca lo que siento por ti; gracias por todo el apoyo para concluir esta etapa en mi vida, por el empuje a realizar mis sueños, ten en cuenta que te admiro muchísimo, eres enorme para mí mamá, gracias por ser todo lo que requiero a cada momento, hoy sé que me has brindado lo mejor que tenías en cada momento, pueda que no me alcance la vida para retribuirte todo lo que has hecho por mí, pero hagamos que el tiempo que vivamos sea creador y en amor. Te amo mamá, soy tu fan!!! Te dedico con amor mi esfuerzo y este trabajo.

### ***A mi padre:***

*Dionicio Ramírez Guzmán, tú eres un hombre amoroso, honesto y sensible!!!*

Gracias por ser todo ese esfuerzo y ejemplo en mi vida, por ser estricto y duro conmigo, por tus llamadas de atención cuando lo he requerido, hoy sé que lo que buscabas era prepararme para la vida, darme ese empujón para darme cuenta de mi realidad y moverme de posición, también por ser ese amor y alegría en mi vida desde que era pequeña, porque con tu carácter también has contribuido a forjar el mío, a ser exigente conmigo misma y ver cómo puedo dar lo mejor aún con mis errores, a analizar, a actuar, a usar lo que tengo para crear mis sueños y futuro, por siempre ver en mi luz e animarme cada que lo requiero para ver quién soy y qué puedo lograr. Gracias por todo pá, admiro de ti tu constancia, tu espíritu emprendedor, el nunca rendirte y siempre seguir adelante, aun cuando el panorama no sea el mejor, gracias también por regresarme a la vida, te amo pá!!! Te dedico con amor mi esfuerzo y este trabajo.

### ***A mi hermano:***

*Oscar Tonatiuh Ramírez González.*

Requiero que sepas que te amo; puede que no esté de acuerdo con muchas cosas respecto a ti, pero eso no es impedimento para estar contigo, apoyarte cuando busques crecer y ser ese gran hombre que eres, aunque no lo creas te admiro y respeto por todo cuanto has elegido vivir, te agradezco enormemente apoyarme para redescubrirme, gracias por todo tu amor, ternura, fuerza, valor, decisión que

eres y me has compartido, te deseo lo mejor para ti, que donde sea que estés o hagas seas pleno, que estés orgulloso de todo cuanto has logrado. Te dedico con amor este trabajo.

***A mi abuelita:***

*Dolores Ramírez Perales.*

Gracias por ser ese ser de luz y amor puro que he conocido en mi vida, por siempre haberme estrechado en tus brazos, dándome ánimos y protección, por tu hermoso carisma y esa sonrisa inigualable, por ese espíritu inquebrantable que te caracterizó, aún que ya no estés en este plano, siempre te recordare con inmenso amor, porque vives en mí, gracias al universo por haberme dado el privilegio y honor de conocerte, te dedico con amor este trabajo a ti, será que en algún momento volvamos a encontrarnos cuando mi momento aquí haya concluido.

***A mi tía:***

*Irma González Ramírez*

Gracias por quererme como a una hija, tú fuiste como una madre para mí, gracias por tus cuidados, amor e impulso, porque siempre estuviste detrás de mí de alguna manera, confío en que descansas, gracias por mostrarme tu coraje, que la constancia y el trabajo duro pueden darme grandes satisfacciones si las pongo al servicio de los demás. Te amo, ojalá podamos encontrarnos en algún momento.

***A mis abuelitos:***

*Catalina Guzmán y Cirenio Ramírez.*

Gracias por ser ejemplo de constancia, trabajo duro, respeto, amor a la tierra, fuerza, integridad, pasión, valores que se han estado perdiendo en este mundo, por ser esa fuente de amor, a su particular forma de ser, por hacerme sentir orgullosa de venir de un gran linaje indígena, por todos los momentos compartidos, que loas atesoro, gracias por ser mi ejemplo e inspiración para continuar mi camino, a mi manera, los amo inmensamente!!!

***A mi familia:***

*Tíos y tías, primos y primas (Ramírez y González)*

A cada uno, gracias por darme su amor, compañía, alegría, apoyo e impulso en todo momento, cuando lo he requerido, hoy me siento afortunada de contar con ustedes, ustedes también cuentan conmigo, los amo!!!

### ***Al universo:***

Por ser tan grande, porque siempre me ha sabido acomodar en cada sitio-tiempo para aprender lo que he requerido, para crecer como ser humano, por todas las experiencias que me ha brindado, porque de todas he aprendido algo, por todos los maestros que me ha puesto a lo largo de mi camino, reflejo mío en algún aspecto, por todas sus enseñanzas, porque aprendía a aprender y desaprender, a regresar a mí, saber quién soy, saber que aún hay mucho por recorrer, qué apenas voy vislumbrando el camino, pero aún con miedos e incertidumbre estoy dispuesta a seguir caminando hasta llegar al final, porque se en el fondo que soy capaz de lograr lo que esta deparado para mí, porque lo tengo todo, por las intensas experiencias que he experimentado desde hace relativamente poco tiempo, que las llevo en mí y no me hacen más que agradecerle por existir.

### ***A los grandes amigos que he encontrado en este cortó tiempo:***

Heriberto, Tere, Fausto, Diana, Guillermo, Mar, Carlos, Sergio, Emmanuel, Julieta, José, José Luis, Alma, María, Octavio, Roberto, Mundo, Adriana, Eduardo. Infinitas gracias por haberme acompañado en este camino de locos, por todo cuanto me brindaron, porque lo vivido a su lado fue simplemente mágico, no encuentro palabras para describirlo, siento tantas emociones encontradas al recordar todo lo que compartimos, aprendimos y crecimos en todo este tiempo, por ser grandes maestros de vida, por poner en el espacio todo lo que requerí, por haber creído en mí cuando yo no lo hacía, por su poder, su enorme ser y contraparte, por nunca soltarme e ir por mí de la manera en que cada uno de ustedes sabe hacerlo, por ser también esas patadas duras en el momento adecuado, gracias por la creación, los abrazos, su luz, la contención, los errores, los aciertos, por haber creído en el proyecto en común, por darse la oportunidad de descubrirse a sí mismos empleándome para ello, pondré todo de mí en que esto que creamos siga en pie, en movimiento, nos lo merecemos, que sigamos juntos, caminando cada quién su vida y elecciones, de la manera que cada quien sabes hacerlo, LOS AMO!!!!!!.

### ***A mis amigos:***

Camilo, Gaby, Iván, Israel, César, Phoebz, Paty, Gallur, Mony, Isis, Fabricio, Yana, Jorge, Edgar, Edd, Nancy, Raúl. Ustedes, a quienes encontré en este peculiar andar, agradezco todas sus enseñanzas, por ser grandes maestros, porque a su lado aprendí que las lecciones no terminan nunca, que siempre se puede volver a empezar, que tengo mucho por aportar, por considerarme parte especial de sus

vidas, porque han estado ahí cuando lo he requerido de la forma en que cada quien sabe hacerlo, por eso los considero más que amigos, IN LAK´ ECH a cada uno.

Mitzy, Mar, Nadua, Iván, Carlos, Álvaro, Lucero, Katia, Lupis, Paola: por ser esa luz, impulso, por sus certeras palabras, su ejemplo, su coraje para seguir adelante, me siento plenamente orgullosas de los caminos que han elegido en sus vidas, por atreverse a continuar, en mi tienen a una amiga en la cual confiar y apoyarse, muchas gracias por todo.

## ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL	3
ÍNDICE DE TABLAS	5
ÍNDICE DE FIGURAS	6
ABREVIATURAS	7
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUCCIÓN	10
1.1. La mitocondria	10
1.1.1. Origen	10
1.1.2. Función y estructura	12
1.2. ADN mitocondrial	12
1.2.1. Características principales del ADN mitocondrial	12
1.2.2. Estructura y organización del ADN mitocondrial	14
1.2.3. Polimorfismos de un solo nucleótido	16
1.3. Haplogrupos mitocondriales	16
1.3.1. Ancestría mitocondrial en México	18
1.4. Diabetes mellitus	19
1.4.1. Diabetes en el mundo	20
1.4.2. Diabetes en México	21
1.4.3. Tipos de diabetes mellitus	22
1.4.4. Síntomas y criterios para su diagnóstico	24
1.4.5. Patogénesis de la Diabetes mellitus	25
1.4.6. Genética de la Diabetes mellitus	27
1.4.7. Haplogrupos y variantes del ADNmt asociadas a Diabetes mellitus	27
2. JUSTIFICACIÓN	31
3. HIPÓTESIS	32
4. Objetivo general	33
5. Objetivos particulares	33
6. Estrategia experimental	34
7. MATERIALES Y MÉTODOS	35
7.1.1. Obtención de las muestras	35
7.1.2. Extracción de ADN a partir de sangre periférica	35
7.1.3. Cuantificación de ADN	36
7.1.4. Amplificación de la Región Hipervariable I del ADNmt de las muestras por PCR punto final	36
7.1.5. Electroforesis en gel de agarosa de los amplicones obtenidos	37
7.1.6. Purificación de productos de PCR	37
7.1.7. Secuenciación	38
7.1.8. Purificación de productos de secuenciación	38
7.1.9. Determinación de haplogrupos mitocondriales	39
7.1.10. Obtención de las frecuencias de haplogrupos	39
7.1.11. Construcción de redes haplotípicas	39
7.1.12. Análisis estadístico	40
8. RESULTADOS	41

8.1. Parámetros clínicos y antropométricos	41
8.2. Amplificación de ADNmt en pacientes con diabetes mellitus tipo 2	42
8.3. Frecuencia de haplogrupos del ADNmt de individuos con diabetes mellitus tipo 2 y controles normoglucémicos	42
8.4. Polimorfismos de las secuencias de individuos de las muestras de individuos con DMT2 y controles normoglucémicos	47
8.5. Redes haplotípicas del ADNmt de individuos con diabetes mellitus tipo 2 y controles normoglucémicos	50
8.5.1. Haplotipos de A en el grupo diabético y control	50
8.5.1. Haplotipos de B en el grupo diabético y control	52
8.5.2. Haplotipos de C en el grupo diabético y control	54
8.5.3. Haplotipos de D en el grupo diabético y control	56
8.6. Asociación de haplogrupos mitocondriales con DMT2	58
9. DISCUSIÓN	59
10. CONCLUSIONES	65
11. PERSPECTIVAS	66
12. BIBLIOGRAFÍA	67
13. ANEXO	79

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.-</b> Estudios de tipificación del ADNmt en población mestiza mexicana	19
<b>Tabla 2.-</b> Clasificación etiológica de la Diabetes Mellitus	23
<b>Tabla 3.-</b> Criterios para el diagnóstico de la Diabetes Mellitus	25
<b>Tabla 4.-</b> Haplogrupos mitocondriales y su relación con la Diabetes Mellitus	28
<b>Tabla 5.-</b> Características de los oligonucleótidos empleados en PCR para la amplificación de la región hipervariable I en el ADNmt	36
<b>Tabla 6.-</b> Condiciones para una reacción de PCR para la amplificación de región hipervariable I en el ADNmt	37
<b>Tabla 7.-</b> Condiciones para la reacción de secuenciación para la amplificación de la región hipervariable I del ADNmt	38
<b>Tabla 8.-</b> Principales haplogrupos para América	39
<b>Tabla 9.-</b> Parámetros clínicos y antropométricos estándares considerados para la categorización de las muestras del presente trabajo	41
<b>Tabla 10.-</b> Análisis de asociación de haplogrupos mitocondriales amerindios con el desarrollo de DMT2	58

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.-</b> Estructura de una mitocondria	11
<b>Figura 2.-</b> Principales funciones y componentes de la mitocondria	12
<b>Figura 3.-</b> Estructura detallada del ADNmt y la D-loop	15
<b>Figura 4.-</b> Mapa de las migraciones humanas basadas en estudios del ADNmt	18
<b>Figura 5.-</b> Mapa del crecimiento estimado para la Diabetes Mellitus en el mundo	21
<b>Figura 6.-</b> Mapa de la prevalencia de la Diabetes Mellitus en México	22
<b>Figura 7.-</b> Mutaciones asociadas a DMT2 en el genoma mitocondrial	30
<b>Figura 8.-</b> Amplicones obtenidos de los individuos en estudio	42
<b>Figura 9.-</b> Frecuencias de haplogrupos presentes en el grupo de diabéticos y controles	44
<b>Figura 10.-</b> Frecuencia total de todos los subhaplogrupos presentes en el grupo de diabéticos y controles	45
<b>Figura 11.-</b> Frecuencia total de todos los haplogrupos y subhaplogrupos de origen europeo y africano presentes en el grupo de diabéticos y controles	46
<b>Figura 12.-</b> Red de haplotipos que incluyen muestras del grupo diabético y control en conjunto con secuencias de GenBank pertenecientes a subhaplogrupos de A	52
<b>Figura 13.-</b> Red de haplotipos que incluyen muestras del grupo diabético y control en conjunto con secuencias de GenBank pertenecientes a subhaplogrupos de B	54
<b>Figura 14.-</b> Red de haplotipos que incluyen muestras del grupo diabético y control en conjunto con secuencias de GenBank pertenecientes a subhaplogrupos de C	56
<b>Figura 15.-</b> Red de haplotipos que incluyen muestras del grupo diabético y control en conjunto con secuencias de GenBank pertenecientes a subhaplogrupos de D	57

## **ABREVIATURAS**

**ADA** Asociación Americana de Diabetes  
**AIF** Factor de iniciación de la apoptosis  
**ATP** Adenosina trifosfato  
**ARNr** Ácido ribonucleico ribosomal  
**ARNt** Ácido ribonucleico de transferencia  
**ADA** Asociación americana de diabetes  
**ADP** Adenosina difosfato  
**CBS** Bloque de secuencia conservada  
**DM** Diabetes mellitus  
**DMT2** Diabetes mellitus tipo 2  
**ERO** Especies reactivas de oxígeno  
**ENSANUT** Encuesta Nacional de Salud y Nutrición  
**FADH<sub>2</sub>** Flavín adenín dinucleótido  
**H<sup>+</sup>** Ion hidrógeno  
**HLA** Antígenos leucocitarios humanos  
**HVR-1** Región hipervariable 1  
**HVR-2** Región hipervariable 2  
**IDF** Federación Internacional de Diabetes  
**INEGI** Instituto Nacional de Geografía y Estadística  
**ADNmt** Ácido desoxirribonucleico mitocondrial  
**mtPTP** Poro de transición de permeabilidad  
**NADH** Dinucleótido de nicotinamida y adenina  
**NIDDK** Instituto Nacional de Diabetes y Enfermedades digestivas y Renales, USA.  
**OH** Origen de replicación de la cadena pesada  
**OL** Origen de replicación de la cadena ligera  
**PH** Promotor de transcripción de la hebra pesada  
**PL** Promotor de transcripción de la hebra ligera  
**RI** Resistencia a la insulina  
**RC** Región control no codificante del ADNmt  
**SNPs** Polimorfismos de un sólo nucleótido  
**TAS** Secuencia de terminación asociada

## RESUMEN

La Diabetes Mellitus tipo 2 (DMT2) es una enfermedad con una alta morbilidad y mortalidad en el presente y se calcula que se incrementará su frecuencia en el futuro, de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud y a la Federación Internacional de Diabetes. Los últimos datos de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición, reportan que se ha convertido en un grave problema de salud en México. Se sabe que dentro de los factores asociados a la patogénesis de la DMT2, el factor genético juega un papel muy importante, ya que existe evidencia de que puede estar asociada con polimorfismos y/o haplogrupos del genoma mitocondrial. Por ello, entender el origen genético de esta enfermedad representa una excelente estrategia para el manejo y su prevención en el futuro. Así, en el presente trabajo se estudió una población de 54 individuos mestizos mexicanos diagnosticados con DMT2 y un grupo de 97 individuos sanos, encontrando que: 1) La mayoría de las muestras en ambos grupos tipifican dentro de los 4 haplogrupos amerindios reportados, siendo el haplogrupo A el de mayor frecuencia en diabéticos (52%) como en individuos sanos (47%), seguido por el haplogrupo C (18%) para ambos grupos, mientras que el haplogrupo B se encontró en una frecuencia del 13% y 10% respectivamente, finalmente para el haplogrupo D se obtuvo una frecuencia del 11% y 9% en diabéticos e individuos sanos respectivamente. 2) En cuanto a la diversidad del haplogrupo A en la población estudiada, se observaron un total de 18 haplotipos, en el haplogrupo B 7, en el haplogrupo C 6 haplotipos, y 5 en el haplogrupo D. De acuerdo con el análisis estadístico de "Odds" ratio no se encontró evidencia de que el haplogrupo mitocondrial sea un factor genético de riesgo. Por otra parte, existe la teoría de que la carga genética indígena mitocondrial podría generar susceptibilidad a la enfermedad, por ello se realizó un análisis de redes haplotípicas. 3) Se observa que 1 secuencia de un individuo con diabetes Mellitus tipo 2 con haplogrupo B2 comparte el haplotipo 7 con una secuencia de un individuo de origen Nahuatl y otra secuencia de otro paciente con haplogrupo B2 comparte el haplotipo 8 con una secuencia de un individuo de origen Mixteco. El polimorfismo T16189C correspondiente al haplogrupo B, y que se ha asociado a DMT2 en población asiática se observó en una de las muestras con diabetes Mellitus tipo 2. Este tipo de análisis es importante realizarlo en un mayor número de muestras para determinar si algún polimorfismo del ADN mitocondrial (ADNmt) está asociado a la susceptibilidad a diabetes en la población mexicana.

## ABSTRACT

Diabetes Mellitus type 2 (T2DM) is a disease with a high morbidity and mortality and the estimated frequency is expected to increase in the near future, according to the World Health Organization and the International Diabetes Federation. The latest data from the National Health and Nutrition Survey report has shown that this disease is a serious health problem in Mexico. It is known that the genetic factor play a very important role in the pathogenesis of this disease, since there is evidence that polymorphisms and/or mitochondrial haplogroups are associated to the disease. Therefore, understanding the genetic origin of the T2DM represents an excellent strategy for its management and prevention in the future. Thus, in this study the sequence of mitochondrial DNA (mtDNA) hypervariable region in a population of 54 Mexican mestizos diagnosed with T2DM and a group of 97 healthy individuals were studied. The results showed that most of the samples in both groups typify within the 4 Amerindian haplogroups reported. Haplogroup A had the highest frequency in both groups the diabetics (52%) and healthy (47%) individuals, followed by haplogroup C with 18% in both groups, while haplogroup B was found at a frequency of 13% and 10% respectively, and haplogroup D had a frequency of 11% and 9% respectively. In addition, haplogroup A displayed a total of 18 haplotypes, haplogroup B, 6, and haplogroup C and D 5 haplotypes. The statistical analysis of Odds ratio showed no evidence of mitochondrial haplogroup as a risk factor for this disease in our Mexican population. Furthermore to determine the haplotype of this population and its associations with other populations, the analysis of haplotype networks was developed. One of the sequences of an individual with T2DM with haplogroup B2 shared haplotype 7 with a sequence of a Nahua individual and another sequence of a patient with T2DM containing haplogroup B2 shared haplotype 8 with a sequence of a Mixe. The T16189C polymorphism corresponding to haplogroup B, which has been associated with type 2 diabetes mellitus in Asian population, was observed in one sample of a patient with diabetes mellitus. It is very important to do this analysis in a larger number of samples to determine if any mtDNA polymorphism is associated with the susceptibility to diabetes type 2 in the Mexican population.

## 1. INTRODUCCIÓN.

### 1.1. La mitocondria

Es uno de los orgánulos más importantes de la célula, presente en todos los organismos eucariotas. Su función principal radica en la producción de la energía necesaria para la célula así como llevar a cabo la respiración aeróbica (Friedman y Nunnari, 2014).

#### 1.1.1. Origen

La mitocondria es el resultado de la endosimbiosis, que probablemente ocurrió hace unos 1.5 millones de años, cuando las células eucariotas primitivas se fusionaron con  $\alpha$ -protopobacterias, estableciéndose permanentemente en su nuevo entorno (Andersson *et al.*, 1998; DiMauro, 2007). De acuerdo a la teoría endosimbiótica, se sabe que las células eucarióticas comenzaron como organismos anaerobios sin mitocondria, que posteriormente establecieron una relación simbiótica estable con una bacteria cuyo sistema de fosforilación oxidativa fue modificado para su propio uso (Friedman y Nunnari, 2014).

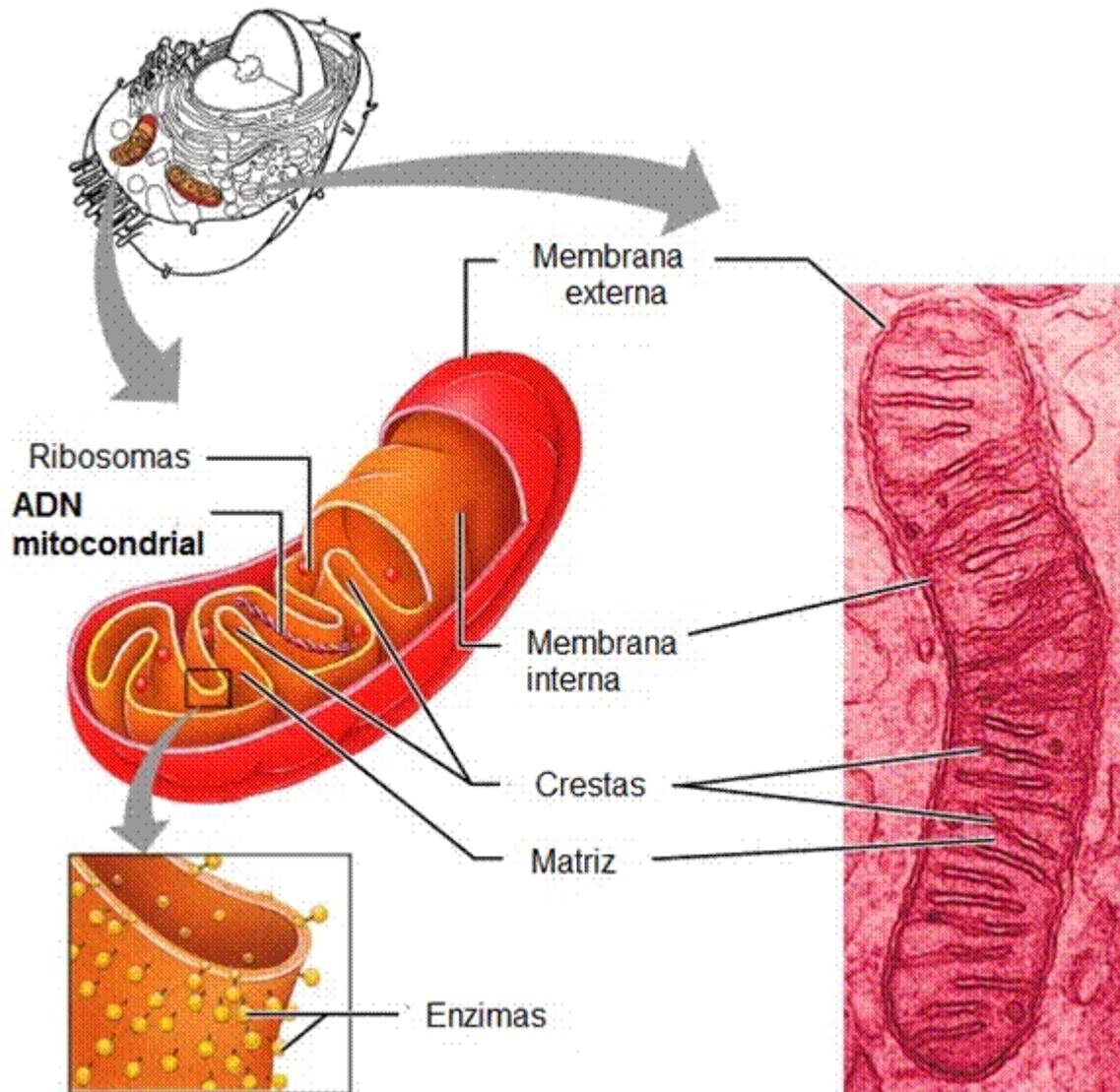
#### 1.1.2. Función y Estructura

Las mitocondrias desempeñan funciones importantes, incluyendo la señalización celular de la muerte por apoptosis (DiMauro, 2007; Friedman y Nunnari, 2014). Cada célula posee un gran número de mitocondrias, de acuerdo a sus propios requerimientos energéticos (Kowald y Kirkwood, 2011); por lo tanto, las neuronas, el músculo cardíaco y esquelético tienen una alta densidad de mitocondrias (DiMauro, 2007).

Actualmente se sabe que las mitocondrias no existen como entidades distintas de manera permanente, sino que pueden formar redes complejas y ramificarse en base a su capacidad para moverse, fusionarse, y dividirse (DiMauro, 2007; Kowald y Kirkwood, 2011; Friedman y Nunnari, 2014). Pueden intercambiar constantemente proteínas, ADN mitocondrial y lípidos por procesos de fisión y fusión (Kowald y Kirkwood, 2011). A menudo se localizan asociadas con microtúbulos, que pueden determinar la orientación y distribución de las mismas en diferentes tipos de células.

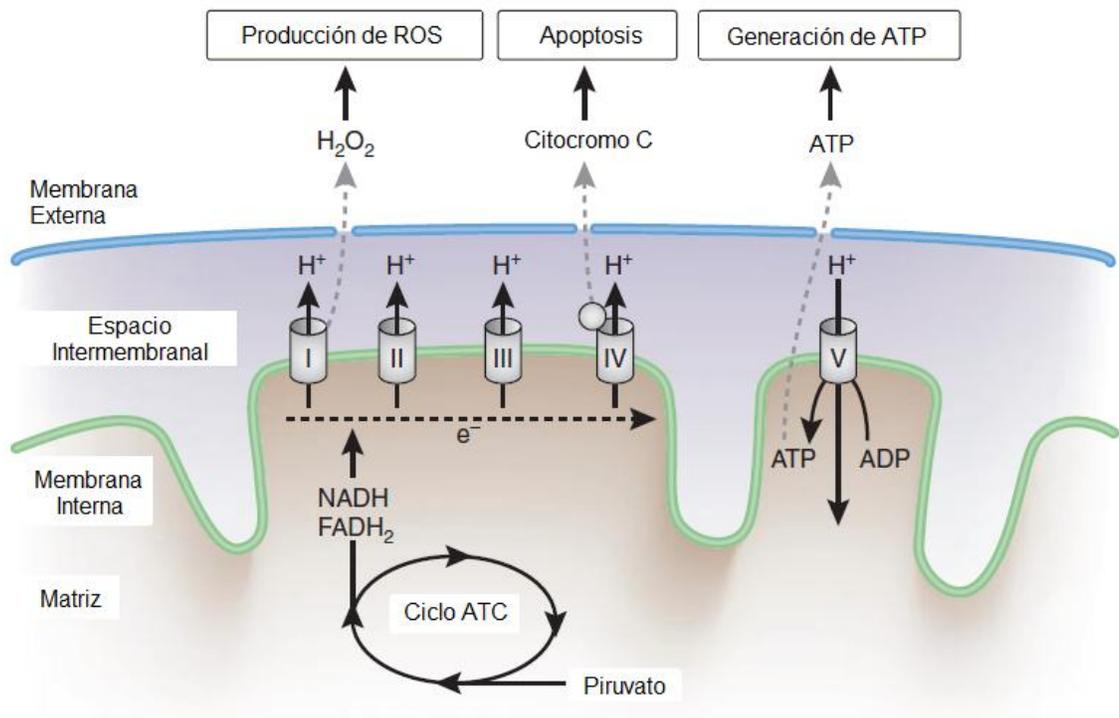
Las mitocondrias contienen dos membranas, cada una con diferente función, juntas, crean 2 compartimientos separados: la matriz interna y el espacio intermembranal (Figura 1). La matriz contiene miles de enzimas, dentro de éstas se encuentran las que se requieren para la oxidación del piruvato, los ácidos

grasos y el ciclo del ácido cítrico; también contiene copias del ADN mitocondrial, ribosomas, ARN de transferencia, así como diversas enzimas que se requieren para la expresión genes mitocondriales (Friedman y Nunnari, 2014).



**Figura 1.** Estructura de una mitocondria. Compuesta por la membrana externa e interna, matriz, ribosomas, crestas y su propio ADN mitocondrial. Modificado de [www.apsubiology.org](http://www.apsubiology.org)

Además las mitocondrias son también los reguladores principales de la apoptosis, en caso de estrés celular, se abre el poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mtPTP). Esta apertura del mtPTP permite la liberación de proteínas mitocondriales, tales como el citocromo c, y el factor de iniciación de apoptosis (AIF), para inducir este proceso (Figura 2). Un exceso de calorías o la inactividad física puede perjudicar la transferencia de electrones a través de la cadena de transporte, dando lugar a una mayor producción de ERO y por consiguiente la apoptosis en diversas células y tejidos (Kwak *et al.*, 2010)



**Figura 2.** Principales funciones y componentes de la mitocondria. Modificado de Kwank *et al.*, 2010.

## 1.2. ADN mitocondrial.

### 1.2.1. Características principales del ADN mitocondrial.

Este genoma presenta varias características importantes, una de ellas es que se hereda única y exclusivamente por vía materna y no presenta recombinación alguna (Jobling y Gill, 2004; Richards y Macaulay, 2001). Además el ADNmt acumula mutaciones en mayor número de veces y en mayor velocidad comparado con el ADN nuclear (Eshleman *et al.*, 2003). La tasa de mutación estimada para la D-loop del ADNmt es de 12.3 por base, por año  $\times 10^{-8}$  (Soares *et al.*, 2009;

Kivisild, 2015); mientras que para la HVR-1 es de 16.4 por base, por año  $\times 10^{-8}$  (Soares *et al.*, 2009; Kivisild, 2015). Por último presenta un alto número de copias o poliploidía, como se ha mencionado anteriormente; las aproximadamente 10 moléculas de ADNmt dentro de una célula humana típica son idénticas entre sí generalmente (Cann *et al.*, 1987). En cuanto al número existente de ADN mitocondrial, se sabe, que un óvulo maduro puede llegar a contener entre 100000 y 200000 copias de este genoma (Marchington *et al.*, 1997), un espermatozoide sólo contiene 50 (Ankelsimons y Cummings, 1996). A su vez se tiene conocimiento de que la masa mitocondrial, así como el número de copias de ADNmt puede alterarse durante la diferenciación celular, tratamientos hormonales y ejercicio (Lee y Wei, 2005).

Existe un fenómeno de cuello de botella que interviene en la población de moléculas de ADNmt dentro de cada oocito (Cann *et al.*, 1987; Taylor y Turnbull, 2007). Este proceso en específico se lleva a cabo durante la producción de ovocitos primarios, donde un número selecto de moléculas de ADNmt son transferidas a cada oocito, la maduración de estas células está asociada con una rápida replicación de este genoma. Existe también, un fenómeno de restricción-amplificación, que conlleva a cambios al azar en cuanto a la carga del ADNmt entre generaciones, siendo responsable del nivel de variación de este ADN. (Bendall y Sykes, 1995; Taylor y Turnbull, 2007).

En el genoma mitocondrial pueden existir 2 diferentes tipos de ADNmt, por un lado lo que se conoce como homoplasmia, es decir, cuando todas las copias del genoma son idénticas, y la heteroplasmia, que es cuando existe una mezcla de 2 o más genotipos mitocondriales. La proporción de moléculas de ADNmt mutantes determina tanto la penetrancia y la gravedad de la expresión de algunas enfermedades (Ye *et al.*, 2014).

Se sabe que la mayoría de los mamíferos son homoplásmicos, lo cual indica que las mutaciones que surgen en una molécula pueden llegar a dispersarse y fijarse dentro de un individuo. Debido a este fenómeno se ha propuesto la hipótesis denominada cuello de botella anteriormente mencionada, en la cual, en algún momento de la oogénesis o embriogénesis un pequeño número de moléculas de ADNmt determinaran el genotipo de la siguiente generación, entonces, si una mutación surge en una sola molécula, puede llegar a fijarse como un linaje dentro de un pequeño número de generaciones (Bendall y Sykes, 1995).

La heteroplasmia existe en individuos sanos, sin embargo por lo general los individuos que la presentan tienen alguna patología; un estudio reciente en diversas poblaciones humanas demostró que existe una prevalencia de heteroplasmia del 90% y que esta es universal en individuos sanos, sin embargo

la baja frecuencia permite que su salud no se vea afectada. El cómo cambia la frecuencia de la heteroplasmia a lo largo de la vida de un individuo es desconocido (Ye *et al.*, 2014).

La relación existente entre diferentes tipos de ADNmt en una población heteroplásmica puede resultar variable y en general solo un tipo es frecuente, por ejemplo, en las células donde heteroplasmia está presente, cada célula hija puede recibir diferentes proporciones de las mitocondrias que llevan ADNmt normal y mutante, entonces el tipo alterno está presente en baja proporción. Debido a lo anterior, el fenotipo del organismo se encuentra determinado por la variante predominante de ADNmt (Kmiec *et al.*, 2006; Ye *et al.*, 2014).

### 1.2.2. Estructura y organización del ADN mitocondrial.

Se ha planteado que las mitocondrias se encuentran en asociación con proteínas formando unos complejos dinámicos conocidos como nucleoides (aproximadamente 475) que contienen entre 2.6 a 10 moléculas de ADNmt y numerosas proteínas claves para su mantenimiento (Iborra *et al.*, 2004; Taylor y Turnbull, 2005).

El ADN mitocondrial (Figura 3), es una molécula circular de doble cadena, de 16,569 pb, con una región o bucle de desplazamiento –D-loop–, dentro de éste existe una región control no codificante (RC) de 1.1 kb aproximadamente, ubicada entre la posición 16024 y 576. Los genes están organizados en 2 cadenas, la cadena exterior denominada cadena pesada (OH), rica en guanina y una cadena interior denominada cadena ligera (OL), rica en citocina (Yasukawa *et al.*, 2006). La región D-Loop que tiene una alta diversidad se ha dividido en 2 regiones la 1 y la 2 (Figura 3). La región hipervariable I (HVR-1), ubicada entre la posición 16024 y 16365, y la región hipervariable II (HVR-2), ubicada entre la posición 73 y 340 (Greenberg *et al.*, 1983). La región D-loop se genera durante la replicación de la cadena pesada por la síntesis de un segmento corto de esta misma hebra, denominada ADN 7S, la cual permanece unido al ADN molde desplazando la cadena pesada para formar una triple hélice (Nicholls y Minczuk, 2014).

La región control (RC) contiene elementos reguladores como el origen de la replicación de la cadena pesada (OH), los promotores de la transcripción -hebras H y L- (PL, PH), y los elementos reguladores de la expresión del ADNmt (Montoya, 2005), así como tres bloques de secuencias conservadas (CSB I, II, III), y las secuencias de terminación asociadas (TAS) (Nicholls y Minczuk, 2014). Mutaciones en la RC del ADNmt tienen potencial de ser funcionalmente importantes, por ejemplo, se sabe que un polimorfismo en la región TAS en la posición 16189 se correlaciona con un aumento del riesgo para la diabetes tipo II



**Figura 3.** Estructura detallada del ADNmt y la D-loop. Modificado de Nicholls y Minczuk, 2014.

### 1.2.3. Polimorfismos de un solo nucleótido

Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs por sus siglas en inglés) representan a los marcadores genéticos más ampliamente distribuidos en el genoma humano. Hoy en día se han descrito más de 10 millones de SNPs, se ha estimado que existen aproximadamente 20 millones de variantes estructurales en el genoma completo (Feero y Gutmacher, 2010; The 1000 Genomes Project Consortium, 2010).

Se sabe que SNPs funcionales han sido implicados en las enfermedades humanas o en la susceptibilidad a éstas, donde se incluyen SNPs localizados en promotores, intrones, sitios de empalme y regiones intergénicas, los cuales podrían tener efectos funcionales a través de mecanismos desconocidos, esto contribuye a la importancia de conocer los efectos de los polimorfismos en relación con la enfermedad humana (Crawford y Nickerson, 2005).

En el ADNmt se estima que aproximadamente el 90% de los SNPs son transiciones (Cavalli-Sforza, 2007). La mayoría de los SNPs en el ADNmt, son homoplásmicos, algunos de estos polimorfismos se han localizado en regiones codificantes (Brownlee, 2001; Lu *et al.*, 2010; Wong, 2007).

Actualmente existen estudios de asociación para detectar variantes mitocondriales en la secuencia que se les responsabiliza de la variación en el riesgo de enfermedad (Saxena *et al.*, 2006), donde incluso se discute que posee una importancia igual de poderosa que su contraparte nuclear (McRae *et al.*, 2008).

El estudio de la diversidad humana abarca no sólo dominios culturales, fenotípicos, geográficos y lingüísticos. La diversidad genética y/o alélica ha demostrado ser un excelente recurso para estudiar esta diversidad humana, de igual manera es muy informativa para el estudio de la predisposición genética humana a diversas enfermedades (Guha *et al.*, 2013).

### 1.3. Haplogrupos mitocondriales

Todos los cambios existentes en la secuencia del ADNmt son los resultados de mutaciones acumuladas heredadas de madre a hija (Eshleman *et al.*, 2003). Por lo tanto todos los descendientes de una misma madre tendrán la misma secuencia de ADNmt, y por lo tanto el mismo linaje materno. Así, las hijas de las hijas seguirán manteniendo la misma secuencia y por lo tanto el mismo linaje materno. Aunado a su naturaleza haploide, estas ventajas llegan a ser importantes, ya que

se emplean para estudiar los linajes a través del tiempo, buscando la ascendencia materna dentro de una población determinada (Pakendorf y Stoneking, 2005).

La utilización del ADNmt para trazar patrones evolutivos y eventos migratorios está basada en el hecho de que ciertos haplotipos han sido observados en individuos de regiones geográficas específicas del mundo, además de que se observa la acumulación de mutaciones en poblaciones diferentes pero con linajes maternos relacionados, probablemente debido a que los individuos migraron y empezaron a poblar nuevas regiones (Witas y Zawicki, 2004).

Los haplogrupos representan grupos relacionados de secuencias que se definen por mutaciones compartidas y que tienden a mostrar especificidad dentro de ciertas regiones (Pakendorf y Stoneking, 2005).

Los haplogrupos, por ejemplo, han servido para reflejar la ascendencia del ADNmt en el centro de Asia, ya que se dio a conocer la estimación de la proporción de mezcla en las poblaciones que habitan en esas diversas áreas geográficas así como rutas migratorias. También en base a las frecuencias de los haplogrupos, así como de mutaciones tanto específicas como en a las existentes en las poblaciones asiáticas, se emplearon para establecer la teoría del cuello de botella que se produjo durante la colonización de América (Pakendorf y Stoneking, 2005).

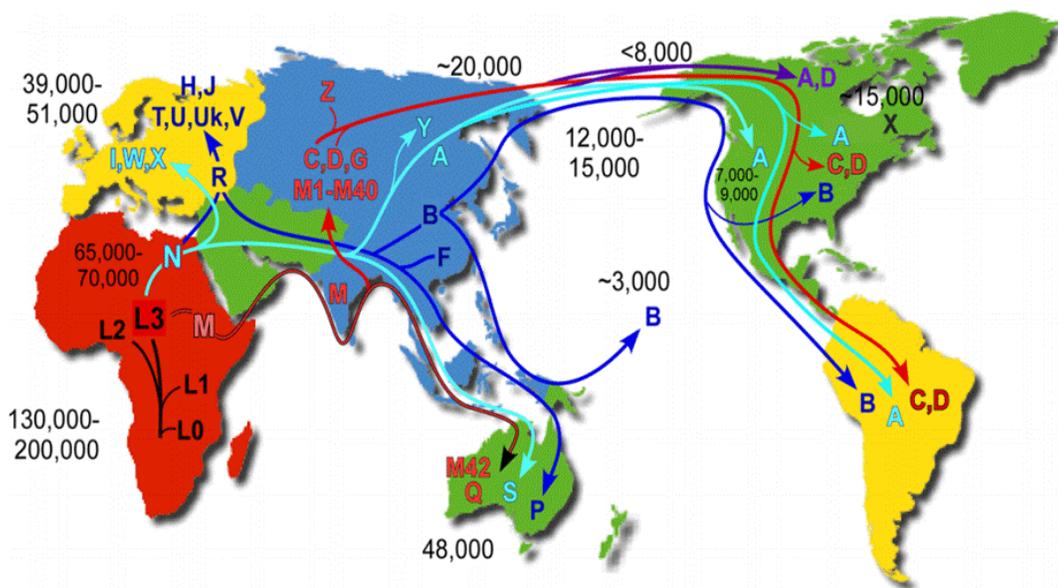
La hipótesis “Fuera de África” propone un esquema de como los *Homo sapiens* comenzaron a poblar el mundo fuera de África hace cerca de 100,000 años aproximadamente (Figura 4), proponiendo una ruta de cómo se fueron dispersando a nivel global y como reemplazaron a otras especies de *Homo*, con los que se encontraron durante su expansión (Guha *et al.*, 2013; Oppenheimer, 2012).

En base a secuencias de ADNmt se plantearon 2 grandes rutas migratorias de África, la ruta sur representó la expansión del haplogrupo M, desde Etiopía, la península arábiga, India y Asia, de hecho se sabe que existe una gran diversidad del haplogrupo M en la India. La ruta norte se dividió en 3 grandes grupos: el primer grupo que consta de los haplogrupos W, I y N1b, mismos que se encuentran en Europa, el oriente medio, el Cáucaso, Egipto y en la península arábiga. El siguiente grupo se dividió dando origen a los haplogrupos X y A, ambos presentes en Europa y Asia, respectivamente. El tercer grupo se subdivide en 4 linajes, de los cuales el primero dio lugar al haplogrupo B, presente en Japón, Asia oriental y el Archipiélago del Pacífico, el segundo fue conformado por los haplogrupos J y T, a su vez el tercer grupo pertenecen los haplogrupos H y V, y sus linajes derivados se encuentran en Europa, el Norte de África y Asia central. El

cuarto linaje es U, localizado en India, el Norte de África y Europa (Quintana-Murci *et al.*, 1999; Mishmar *et al.*, 2003; Pakendorf y Stoneking, 2005; Fendt *et al.*, 2012; Brotherton *et al.*, 2013; Guha *et al.*, 2013).

Sólo cinco de los linajes del sur de Asia (A, B, C, D, y G) llegaron a predominar en el norte de Siberia. De estos sólo cuatro de ellos (A, B, C, y D) cruzaron el puente de tierra de Bering para poblar el continente americano. (Coskun *et al.*, 2003). La más reciente evidencia genética molecular sugiere que los fundadores iniciales de América surgieron de una población ancestral de menos de 5,000 personas que se desarrollaron de manera aislada, probablemente en Beringia (Derenko *et al.*, 2012).

El posible período de aislamiento y posterior diferenciación genética en los primeros seres humanos que se asentaron en Beringia fue de aproximadamente unos 8,000 años. Se estima que llegaron al continente hace, como máximo, unos 23,000 años, conformando una única ola migratoria. Ya dentro de América, el acervo genético de estos pobladores se diversificó en dos ramas basales hace aproximadamente unos 13,000 años, coincidiendo con el deshielo de los glaciares y la apertura de rutas en el interior de América del Norte. Estas dos ramas conforman las diversas poblaciones nativas actuales en el continente (Raghavan *et al.*, 2015).



**Figura 4.** Mapa de las migraciones humanas basadas en estudios del ADN mitocondrial (Tomado y modificado de MITOMAP, 2014).

### 1.3.1. Ancestría mitocondrial en México.

México es un país con una gran riqueza cultural producto de su historia. Su población, mestiza en su mayoría, resulta de la mezcla post colombino de genomas de poblaciones indígenas ancestrales, españolas y, en menor proporción, africanas que llegaron a México durante el periodo colonial, por lo que el actual conjunto poblacional es sumamente complejo (INMEGEN 2010; Martínez-Cortés *et al.*, 2013).

Según los censos más recientes basados principalmente en el número de habitantes que hablan alguna lengua indígena, alrededor de 10% de la población mexicana pertenece a algún grupo indígena. La mayoría de los mexicanos (aproximadamente  $\geq 90\%$ ) son identificados como mestizos (INEGI, 2010)

Las frecuencias de la ancestría materna de los mestizos mexicanos se presenta en general con los siguientes valores: Nativo Americano (85-93.3%), Europea (5.26-7%) y Africana (0.7-5%) (Green *et al.*, 2000; Guardado-Estrada *et al.*, 2009; Martínez-Cortés *et al.*, 2013; Merriwerther *et al.*, 1997).

Hasta el momento son pocos los estudios donde se involucró la ancestría materna (con especial énfasis en los haplogrupos y haplotipos en alguno de éstos) en la población mestiza mexicana, en la tabla 1 se observan los estudios existentes al respecto.

**Tabla 1.** Estudios de tipificación del ADNmt materno en población mestiza mexicana.

Haplogrupo	Green <i>et al.</i> , 2000	Peñaloza <i>et al.</i> , 2007	Sandoval <i>et al.</i> , 2009	Kemp <i>et al.</i> , 2010*	Guardado <i>et al.</i> , 2010	Moran <i>et al.</i> , 2011	Martínez- Cortés <i>et al.</i> , 2013
<b>A</b>	33.6	51.2	50.5	49.0	51.1	42.7	47
<b>B</b>	26.5	28.8	17.6	28.0	17.8	23.6	23.7
<b>C</b>	23.3	11.1	28.5	17.1	18.5	20.4	15.9
<b>D</b>	5.8	5.3	2.7	5.6	5.9	4.5	6.2
<b>Africano</b>	4.5	0.6	-	0.2	0.7	-	5.3
<b>Europeo</b>	5.4	-	-	0.1	6.0	-	1.9
<b>Desconocido</b>	0.9	-	0.6	-	-	8.8	-
<b>N ind./n pob</b>	223/2	513/11	477/11	597/11*	270/17	110/2	742/10

N ind. =número de individuos en número de poblaciones. \* Solo se tomó en cuenta a las poblaciones mexicanas. Las cantidades mostradas están en porcentaje, a excepción de las N ind. y n pob.

#### 1.4. Diabetes mellitus.

La *Diabetes mellitus* (DM) es una enfermedad determinada genéticamente en la que el sujeto que la padece sufre alteraciones del metabolismo de los

carbohidratos, las grasas y las proteínas, junto con una deficiencia relativa o absoluta en la secreción de insulina. Es un trastorno considerablemente heterogéneo que implica varias anormalidades; esta heterogeneidad radica en la existencia de diferencias congénitas, inmunológicas y ambientales entre grupos de pacientes en cuanto a etiología y patogenia, así como en la evolución y en la respuesta al tratamiento; considerando así como un síndrome integral (Islas-Andrade y Revilla-Monsalve, 2004). Con el tiempo, la enfermedad puede causar daños, disfunción e insuficiencia de diversos órganos (OMS, 2015).

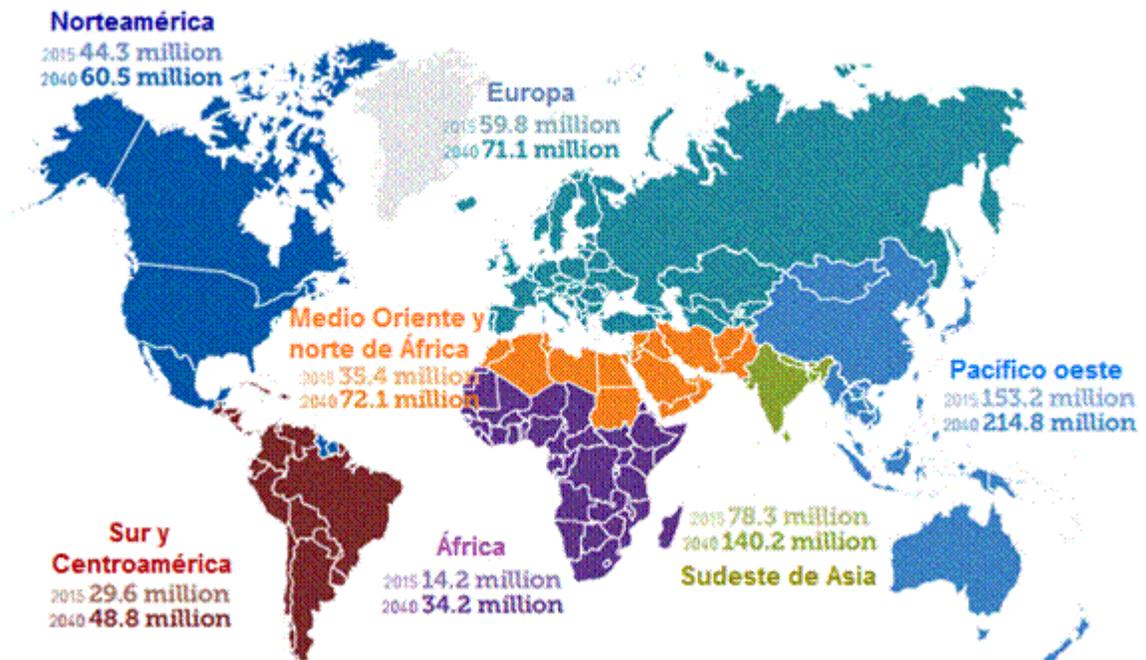
Un concepto interesante es el de la prediabetes, la cual es un estado donde la cantidad de glucosa en la sangre está por encima de las medidas estándar, pero no se considera al individuo propiamente como diabético. Las probabilidades de contraer diabetes tipo 2, enfermedades del corazón y derrame cerebral aumentan. Con medidas preventivas (actividad física moderada acompañada de pérdida de peso) se puede regresar a los niveles normales de glucosa, (NIDDK, 2015).

#### 1.4.1. Diabetes en el mundo.

Las principales complicaciones de la DM se clasifican en microvasculares (ojos, los riñones, y las neuronas) y macrovasculares (enfermedad coronaria y accidentes cerebrovasculares).

Estimaciones sugieren que 387 millones de personas en el mundo tienen DM (esto en 2014), esta cifra aumentará a 205 millones en 2035, de acuerdo al atlas de la Federación Internacional de la Diabetes (IDF, por sus siglas en inglés) en 2014, y se estima que un 46.3% de los individuos no se encuentran diagnosticados. Esta enfermedad es la causa principal de la enfermedad renal en etapa terminal, la amputación no traumática de la pierna y ceguera. Se le atribuye un total de 4.6 millones de muertes lo que representa el 8.2% de mortalidad global. A su vez, también se reporta que el 77% de las personas con DM viven en países de ingresos medianos y bajos (IDF, 2014).

Particularmente para el continente americano y el caribe, los datos arrojan que 44.3 millones de personas tienen diabetes (2015), y se pronostica que esta cifra alcanzará los 60.5 millones en 2040 (Figura 5). Esta enfermedad cuenta con la prevalencia más alta a nivel mundial, ya que, 1 de cada 9 adultos tiene DM, una cifra alarmante muestra que el 27% de ellos no están diagnosticados, teniendo por ende un mayor riesgo de desarrollar complicaciones. Se estima que el gasto en tratamiento alcanzará los 310,000 millones de dólares y que el 41% de las muertes ocurrirá en menores de 60 años (IDF, 2014).

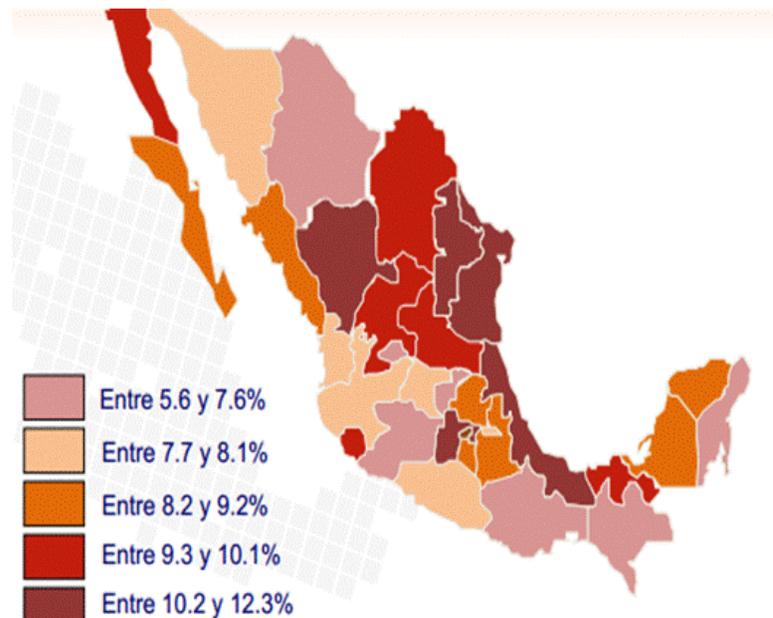


**Figura 5.** Mapa del crecimiento estimado para la diabetes en el mundo. Tomado del Atlas de la IDF, 2015.

#### 1.4.2. Diabetes en México

México es el segundo país del continente americano con el mayor número de personas con DM (en un rango de 20 a 79 años) con 9,019 millones (IDF, 2014). Se reportan un total de 9,018,062 de casos de diabetes en adultos mexicanos, los casos no diagnosticados corresponden a 2,254,065, las muertes relacionadas con esta patología ascienden a 5 millones (IDF, 2014). La prevalencia nacional estimada en el 2012 fue de un 9.2% aproximadamente, se estima que esta cifra está subestimada ya que el total de las personas adultas con diabetes podría ser incluso el doble por los individuos que no se han diagnosticado. Se determinó en 2012 que 11 millones de mexicanos padecían esta enfermedad (ENSANUT, 2012).

En México la incidencia de DMT2 se incrementa con la edad, siendo la población de 60 a 64 años la más vulnerable, aunque el número de casos se está incrementando en la población infantil; además del total de casos con diabetes, el 28.1% presentan alguna complicación, siendo las más frecuentes las afecciones oftalmológicas y a largo plazo las de tipo renal (como se ha mencionado anteriormente), disminuyendo la esperanza de vida e incrementando los costos en la atención y el tratamiento, esto según datos reportados por la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT, 2012) y del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI, 2013).



**Figura 6.** Mapa de la prevalencia de la diabetes en México, Tomado de ENSANUT, 2012.

#### 1.4.3. Tipos de *Diabetes mellitus*

Ya que existe una variedad considerable de manifestaciones fenotípicas, signos y síntomas de la DM, ésta se debe considerar como un síndrome metabólico (Islas-Andrade y Revilla-Monsalve, 2004).

El Instituto Nacional de Diabetes y Enfermedades Digestivas y Renales (NIDDK, por sus siglas en inglés) en Estados Unidos admite más de dos categorías de la DM, dentro de las cuales las más empleadas, y conocidas, son las establecidas como *tipo 1* -o dependiente de insulina- y *tipo 2* -o no dependiente de insulina- ( NIDDK, 2015).

- A) La diabetes mellitus tipo 1 es la variante en la cual el paciente presenta autoinmunidad. Esto se debe a que los antígenos leucocitarios humanos (HLA, por sus siglas en inglés) desconocen y atacan a las células responsables de la producción de insulina, las células en el páncreas; al grado de impedir o reducir la secreción de esta hormona. La población afectada por este tipo de DM son los niños aunque también puede desarrollarse en personas adultas, sobre todo en mujeres.
- B) La DM tipo 2 (DMT2) es una variante en la que el paciente produce insulina pero el cuerpo es incapaz de utilizarla eficazmente. Esto último se atribuye

a defectos genéticos al nivel de los receptores de insulina, tanto en número como en afinidad. La DM2 es la variante más común entre los pacientes diabéticos puesto que abarca entre el 90 y 95% de los casos, los cuales están integrados por personas en edad avanzada y personas con problemas de sobrepeso u obesidad, no obstante, en años recientes esta enfermedad es cada vez más diagnosticada en niños y adolescentes, especialmente entre los afroamericanos, mexico-americanos, y los habitantes de las islas del Pacífico (Islas-Andrade y Revilla-Monsalve, 2004).

No obstante, existen diversas causas que originan a la DM. De acuerdo a una reunión del Comité internacional de Expertos de la Asociación Estadounidense de Diabetes en 1997 (actualmente vigente) se proporciona la siguiente clasificación etiológica (Tabla 2):

**Tabla 2.** Clasificación etiológica de la *Diabetes mellitus*.

<b>Tipos de DM</b>
<b>I. Diabetes tipo 1 (destrucción de células que conducen a una deficiencia absoluta de insulina):</b>
<b>A. Mediada por mecanismos inmunológicos</b>
<b>B. Idiopática</b>
<b>II. Diabetes tipo 2 (con variaciones: desde la resistencia a la insulina predominante con la deficiencia relativa de insulina, o al defecto en la secreción predominante con resistencia a la insulina)</b>
<b>III. Otros tipos específicos</b>
<b>C. Defectos genéticos de la función de las células p en:</b>
1. Cromosoma 12, HNF-1 $\alpha$ (MODY 3)
2. Cromosoma 7, glucocinasa (MODY 2)
3. Cromosoma 20, HNF-4 $\alpha$ (MODY 1)
4. ÁDNmt
5. Otras
<b>D. Defectos genéticos en la acción de la insulina:</b>
1. Resistencia a la insulina tipo A
2. Lepracaunismo
3. Síndrome de Rabson-Mendenhall
4. Diabetes lipoatrófica
5. Otras
<b>E. Enfermedades del páncreas exocrino</b>
1. Pancreatitis
2. Traumatismo/pancreatectomía
3. Neoplasia
4. Fibrosis quística
5. Hemocromatosis
6. Pancreatopatía fibrocalculosa
7. Otras
<b>F. Endocrinopatías</b>
1. Acromegalia
2. Síndrome de Cushing

- 
3. Glucagonoma
  4. Feocromocitoma
  5. Hipertiroidismo
  6. Somatostatinoma
  7. Aldosteronoma
  8. Otras
- G. Sustancias químicas o fármacos capaces de inducir diabetes
1. Pentamicina
  2. Ácido nicotínico
  3. Glucocorticoides
  4. Hormona tiroidea
  5. Diazóxido
  6. Agonistas adrenérgicos p
  7. Tiacinas
  8. Difenilhidantoína
  9. Interferón a
  10. Otras.
- H. Infecciones
1. Rubéola congénita
  2. Citomegalovirus
  3. Otras
- I. Formas poco comunes de diabetes mediada inmunológicamente
1. “Síndrome del hombro rígido”
  2. Anticuerpos contra el receptor de insulina
  3. Otras
- J. Otras síndromes que algunas veces se acompañan de diabetes
1. Síndrome de Down
  2. Síndrome de Klinefelter
  3. Síndrome de Turner
  4. Síndrome de Wolfram
  5. Ataxia de Friedreich
  6. Corea de Huntington
  7. Síndrome de Lawrence-Moon-Beidel
  8. Distrofia miotónica
  9. Porfiria
  10. Síndrome de Prader-Willi
  11. Otras

#### IV. Otros tipos específicos

---

##### 1.4.4. Síntomas de *Diabetes mellitus* y criterios para su diagnóstico.

Independientemente del tipo de DM que padezca un paciente, en términos generales los síntomas que distinguen a este trastorno son: producción excesiva de orina (poliuria), sed excesiva (polidipsia), hambre constante (polifagia), pérdida de peso, alteraciones visuales y fatiga. (NIDDK, 2015; OMS, 2015). Los síntomas de la diabetes tipo 2 se desarrollan gradualmente. Su aparición no es tan repentina y notoria como en la diabetes tipo 1. En consecuencia, la enfermedad puede diagnosticarse sólo cuando ya tiene varios años de evolución y han aparecido complicaciones que pueden llevar a la muerte. Hasta hace poco, este tipo de diabetes solo se observaba en adultos, pero en la actualidad también se está manifestando en niños como se mencionó anteriormente (OMS, 2015).

De acuerdo al más reciente suplemento de la Asociación Americana de Diabetes -2015- (ADA, por sus siglas en inglés), los criterios diagnósticos para la DM son (Tabla 3):

**Tabla 3.** Criterios para el diagnóstico de la diabetes.

<b>Parámetros de diagnóstico</b>	
<b>A1C <math>\geq</math> 6.5%</b>	La prueba debe realizarse de acuerdo al protocolo certificado NGSP y estandarizado para el ensayo DCCT.
<b>FPG <math>\geq</math> 126 mg/dL (7.0 mmol/l)</b>	El ayuno es definido como la no ingesta calórica durante al menos 8 h. *
<b>2-h PG <math>\geq</math> 200 mg/dL (11.1 mmol/l)</b>	Durante una PTOG. La prueba debe realizarse con el uso de una carga de glucosa que contiene el equivalente de 75 g de glucosa anhidra disuelta en agua.*
<b>Glucosa plasmática al azar <math>\geq</math> 200 mg/dl (11.1 mmol/l)</b>	En un paciente con síntomas clásicos de hiperglucemia o una crisis de hiperglucemia.

\*En ausencia de hiperglucemia, se requiere repetir pruebas para así confirmar los resultados. A1C = Hemoglobina glucosilada. FPG = Glucosa plasmática en ayunas. PG = Glucosa plasmática tomada después de 2 horas después de ingesta de azúcar. NGSP = Programa de normalización nacional de la hemoglobina glucosilada. DCCT = Programa de control y complicaciones de la diabetes. PTOG = Tolerancia oral a la glucosa.

#### 1.4.5. Patogénesis de la diabetes mellitus.

Un mal funcionamiento temprano de algunos órganos esenciales desempeña un papel importante en su patogénesis, es decir, son los mecanismos fisiopatológicos principales en esta enfermedad. Los órganos participes en una interacción para el mantenimiento de los niveles normales de glucosa en sangre son el músculo esquelético, el hígado y las células  $\beta$  pancreáticas. Defectos en el músculo esquelético son los responsables de la resistencia a la insulina, de la misma manera, fallos en el hígado y en células  $\beta$  pancreáticas conllevan a la progresión de hiperglucemia (Lowell y Shulman, 2005; Tusié Luna, 2008).

Se ha planteado que estas características particulares de la DMT2 son causadas por disfunción mitocondrial (Lowell y Shulman, 2005). Se ha documentado en individuos adultos que hay una correlación entre la disminución en la actividad oxidativa mitocondrial y en la síntesis de adenosin trifosfato (ATP), con la presencia de una fuerte resistencia a la insulina en músculo, así como niveles altos de triglicéridos en este tejido y en el hígado (Petersen *et al.*, 2004). Dado el papel central de las mitocondrias en la detección de glucosa, es posible que la disminución de la función mitocondrial en las células  $\beta$ , podría predisponer a los individuos a desarrollar disfunción en estas células y por lo tanto al desarrollo de la DMT2 (Lowell y Shulman, 2005).

El mecanismo por el que ocurre la secreción de insulina requiere del metabolismo oxidativo mitocondrial, ello conduce a la generación de ATP

(adenosín trifosfato), la detección de glucosa incrementa la relación de ATP a adenosín difosfato (ADP) en la célula  $\beta$  con lo cual se desencadena el proceso de secreción de insulina; primeramente se genera la inhibición por parte de la célula del canal de potasio regulador de ATP/ADP, seguido de una despolarización de la membrana, la apertura del canal de voltaje de calcio, el flujo de éste y por último la secreción de insulina (Lowell y Shulman, 2005).

El metabolismo oxidativo de la glucosa involucra la transferencia de energía guardada dentro de los lazos de carbono de la glucosa al tercer enlace fosfato de ATP. Esta reacción comienza cuando los electrones (dentro de los lazos de carbono) se transfieren a los transportadores de electrones de dinucleótido de nicotinamida y adenina, flavín adenín dinucleótido, NADH y FADH<sub>2</sub> respectivamente. Éstos a su vez donan electrones a la cadena de transporte (la cual es una unidad multiproteica que agrupa 4 complejos -I a IV-, todos ubicados dentro de la membrana interna mitocondrial). Los electrones son conducidos a la parte final del proceso, que es la reducción de oxígeno a agua. Los complejos I, III IV son reductores, la oxidación impulsada por bombas de protones, que emplean la energía transportada por los electrones para bombear protones fuera de la matriz, creando un gradiente de potencial electroquímico a través de la membrana interna mitocondrial. Estos protones vuelven a entrar en la matriz mitocondrial a través de la ATP sintasa con la energía almacenada en el gradiente electroquímico para así lograr impulsar la síntesis de ATP a partir de ADP (Figura 2) (Lowell y Shulman, 2005).

La resistencia a la insulina (RI) puede estar mediada por diversos mecanismos celulares por ejemplo, lo que corresponde al tejido graso, este secreta citocinas que pueden modular la respuesta a la insulina en hígado y músculo (Lazar, 2005). Los ácidos grasos provocan RI por la inhibición directa de la actividad de transporte de glucosa estimulada por la insulina, esto pudiera deberse a la acumulación de acetil CoA intracelular y de diacilglicerol, lo que activaría las vías de transducción de señales críticas que conducen a la supresión de la señalización de insulina. Un incremento de ácidos grasos podría conducir a un incremento en los niveles intracelulares de acetil CoA y citrato, lo cual a su vez inhibiría a dos enzimas que intervienen en la utilización de la glucosa. La inhibición de la vía glucolítica en estos pasos podría aumentar las concentraciones de glucosa y de la glucosa-6-fosfato, lo que resulta en la reducción de la absorción de la glucosa estimulada por insulina (Randle *et al.*, 1963).

También en pacientes con DMT2 se ha visto una reducción significativa en el contenido de ADNmt (Zarouk *et al.*, 2012), asociada al almacenamiento de triglicéridos, la homeostasis de la glucosa, la sensibilidad a la insulina y la secreción de esta misma en sangre periférica (Lee *et al.*, 1998; Park *et al.*, 2001,

Song *et al.*, 2001; Weng *et al.*, 2009). Inclusive, este estado cuantitativo del ADNmt, se ha sugerido como un marcador genético (temprano) de la DMT2 y también para el síndrome de RI (Song *et al.*, 2001).

En síntesis, se podría predecir que cualquier perturbación metabólica que promueve la acumulación de ácidos grasos en hígado o músculo o cualquier defecto en la capacidad de estos órganos para metabolizar ácidos grasos podrían resultar en RI (Lowell y Shulman, 2005).

#### 1.4.6. Genética de la *Diabetes mellitus*.

“Los principales factores de riesgo” para esta patología son la carga genética y el estilo de vida. Se ha observado que la ocurrencia de DM se incrementa si los padres padecen la enfermedad. Específicamente en la población mexicana se sabe que la prevalencia de DM es de 5.9% si ninguno de los progenitores la padece, de 10.2% si uno de ellos está enfermo y por último de 19.5% si ambos padres son o fueron diabéticos (Islas-Andrade y Revilla-Monsalve, 2004).

Particularmente en relación al factor genético, se ha visto que participan diversos genes de susceptibilidad cuya expresión es modulada por factores ambientales (Tusié Luna, 2008). Existe evidencia que señala que la RI se desarrolla 1 o 2 décadas antes de la aparición de la enfermedad. También se ha visto que en hijos de padres con DMT2, la RI es un predictor para su posterior desarrollo (Kwak y Park, 2013; Lowell y Shulman, 2005).

#### 1.4.7. Haplogrupos y variantes del ADNmt asociadas a *Diabetes mellitus*.

Dado que las mitocondrias son responsables de suministrar la mayor parte de las necesidades de energía celular, y se relacionan con la movilidad de glucosa en sangre y en el acumulamiento de ácidos grasos, se ha planteado que las mitocondrias podrían desempeñar un papel importante en la susceptibilidad a la DMT2, generando así la hipótesis de el "genotipo ahorrador" (Poulton, 1998).

La hipótesis del “genotipo ahorrador”, sugiere que personas con RI pudieran conllevar una ventaja selectiva en la historia evolutiva (Wang *et al.*, 2009), es decir, los genes responsables de la RI protegen a los individuos durante períodos prolongados de ayuno, almacenando la energía en forma de grasa en lugar de glucógeno en músculo de una forma más eficiente. Este tipo particular de metabolismo “ahorrativo” permitió sobrevivir a los pobladores migrantes de la última glaciación para utilizar al máximo el tipo de alimentación disponible (Carrillo y Panduro, 2001).

Sus descendientes en la sociedad occidental actual en donde el escenario de factores sociales y culturales favorecen la abundancia de comidas con alto contenido energético y un estilo de vida sedentario, hace que estos genes que anteriormente fueron de “protección” se conviertan en genes de “susceptibilidad”, sugiriendo que los individuos no están equipados con la maquinaria metabólica para la ingesta abundante (Neel, 1962).

Estudios en el ADNmt han relacionado haplogrupos mitocondriales con la susceptibilidad a la enfermedad, como puede observarse en la tabla 4, la mayoría de estos estudios se han hecho en poblaciones asiáticas, específicamente en Corea, Japón, Taiwán, así como en poblaciones europeas. Dentro de los haplogrupos que confieren resistencia o son considerados de “protección” están N9a y D4. Por otra parte un haplogrupo sobrerrepresentado en población diabética judía de medio oriente es JI, los haplogrupos catalogados como de “riesgo o de susceptibilidad a la enfermedad” son F, D5, B4, B4a1a y E2b1. Cabe destacar un estudio para América, específicamente en población brasileña caucásica donde se concluye que la combinación del haplogrupo J y T se encuentran mayormente representadas en individuos con DMT2. Se resalta en negritas el estudio donde el haplogrupo B4 se le asocia con susceptibilidad a la enfermedad.

**Tabla 4.** Haplogrupos mitocondriales y su relación con la diabetes mellitus

Haplogrupo	Tipo de Asociación	Población	Referencia
B4a1a	Susceptibilidad	Taiwán	Loo et al., 2014
E2b1	Susceptibilidad	Taiwán	Loo et al., 2014
D4	Resistencia	Taiwán	Loo et al., 2014
D4	Resistencia	Taiwán	Liou et al., 2012
<b>B4</b>	<b>Susceptibilidad</b>	<b>Taiwán</b>	<b>Liou et al., 2012</b>
JI	Sobrerrepresentados en individuos con DMT2	Judíos de medio oriente	Feder et al., 2009
D5	Susceptibilidad	Japón/Corea	Fuku et al., 2007
F	Susceptibilidad	Japón/Corea	Fuku et al., 2007
N9a	Resistencia	Japón/Corea	Fuku et al., 2007
J/T	Sobrerrepresentados en individuos con DMT2	Brasil	Crispim et al., 2006

También existen reportes que relacionan varias mutaciones puntuales o deleciones con la DMT2 y con la denominada diabetes de herencia mitocondrial (MIDD, por sus siglas en inglés), por ejemplo, esta última enfermedad está caracterizada por presentar la mutación A3243G, la cual es común, también en el síndrome de encefalomiopatía mitocondrial, con acidosis láctica y episodios cerebrovasculares (MELAS, por sus siglas en inglés), esta mutación se ubica en el gen del ARN de transferencia de leucina, su presencia reduce la estabilidad de las proteínas que codifica el ADNmt y la unión de la leucina a este ARNt. También ha sido asociada con la reducción de masa de los islotes pancreáticos, que involucra tanto a las células  $\beta$  y a las células  $\alpha$ , que producen glucagón (Maechler y Wollheim, 2001).

Se ha propuesto que las variantes identificadas en el ADNmt ejercen un efecto pequeño pero aditivo en el desarrollo de la DMT2, sin embargo explicaría al menos un 10% de los casos de susceptibilidad a la DMT2.

Un cambio que se ha encontrado asociado a DMT2 es la transición T16189C que se ubica en la región control (en región hipervariable I), también conocida como variante OriB (esto por su posición en el origen de la replicación OriB). Existe fuerte evidencia de riesgo a la enfermedad, sobre todo en poblaciones asiáticas (Liao, 2008; Liou *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2008; Poulton *et al.*, 2002; Poulton, 1998; Weng *et al.*, 2005; Ye *et al.*, 2013), sin embargo, en un meta análisis donde estudian varias enfermedades asociadas con esta variante en poblaciones europeas, sugiere que está modestamente asociada con el riesgo de padecer DMT2 en estas poblaciones (Ye *et al.*; 2013).

Como podemos observar la hipótesis “enfermedad común, variante común” y de “enfermedad común-variante rara”, entran dentro del contexto en el cual la DMT2 se presenta, ya que se sabe que esta enfermedad es causada por un gran número de variantes comunes de baja penetración o de múltiples variantes raras con alta penetración (Kwak y Park, 2013).

Otra variante de riesgo que también ha sido asociada a DMT2 es la transición, T16519C de igual manera se ubica en región hipervariable I, en población asiática e italiana (Liao, 2008; Navaglia *et al.*, 2006). Como se aprecia en la figura 7, los polimorfismos antes mencionados así como diversas mutaciones presentes en el genoma mitocondrial se han relacionado con DMT2.



## **2. JUSTIFICACIÓN.**

La DMT2 es una enfermedad multifactorial y se sabe que esta patología posee un fondo genético. Existen estudios que sugieren una posible influencia del ADN mitocondrial en la susceptibilidad a padecer DMT2 en algunas poblaciones como las asiáticas, pero en particular para la población mexicana se desconoce la influencia de este fondo genético en la patología de la enfermedad. Por ello es importante estudiar e identificar la influencia genética mitocondrial en la población mexicana que sugiera un posible riesgo o protección a padecer DMT2.

### **3. HIPÓTESIS.**

Sí se ha demostrado que polimorfismos mitocondriales están asociados a la Diabetes Mellitus tipo 2, en otras poblaciones (asiática, europea, africana); entonces es posible que las poblaciones mexicanas con DMT2 contengan polimorfismos de riesgo o protectores del ADNmt que se asocien a la enfermedad.

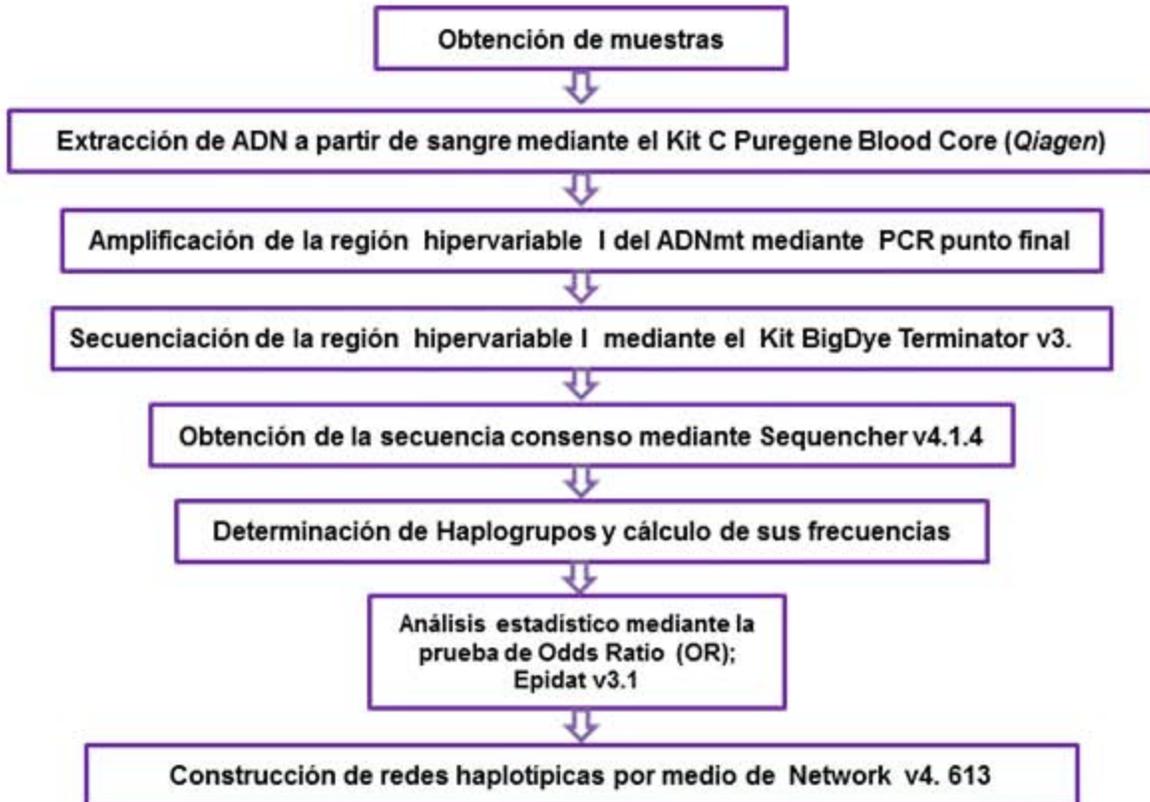
#### **4. OBJETIVO GENERAL.**

Identificar los haplogrupos y haplotipos mitocondriales en una población mexicana mestiza y determinar si el haplogrupo y/o el haplotipo presentan algún tipo de asociación ya sea de riesgo o de protección con la diabetes mellitus tipo 2.

#### **5. OBJETIVOS PARTICULARES.**

1. Determinar los haplogrupos mitocondriales de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 y controles normo glucémicos mediante la secuenciación de la región hipervariable I del ADNmt.
2. Determinar las frecuencias de los haplogrupos en las muestras estudiadas.
3. Determinar si existe diferencia estadísticamente significativa entre los haplogrupos, tanto de diabéticos como de controles normoglucémico
4. Determinar los haplotipos de pacientes con DMT2 y controles normo glucémicos mediante una red haplotípica.

## 6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.



## **7. MATERIAL Y MÉTODOS.**

### **7.1.1. Obtención de las Muestras.**

Las muestras de sangre de pacientes diagnosticados con DMT2 fueron proporcionadas por Dra. María Cristina Revilla Monsalve, adscrita en la Unidad de Investigación Médica de Enfermedades Metabólicas del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

Se obtuvieron un total de 54 muestras de pacientes con DMT2 no relacionados entre sí y 97 muestras de personas normoglucémicas que fueron utilizados como controles negativos. Estas muestras, pertenecen al banco de muestras del Laboratorio No.1 del departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, a cargo de la Dra. María de Lourdes Muñoz Moreno.

### **7.1.2. Extracción de ADN a partir de sangre periférica.**

La extracción del ADN a partir de las muestras de sangre se realizó por medio del kit comercial Puregene Blood Core Kit C (QIAGEN, USA), de acuerdo al protocolo proporcionado por el proveedor: 1) En un tubo estéril para centrifuga de 50 ml (CORNING, USA) se adicionó 3 ml de sangre más 10 ml de solución de lisis RBC, y se homogenizó por inversión. Se incubó por 5 min a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugo por 5 min a 4,000 rpm. 2) Terminada la centrifugación se descartó cuidadosamente el sobrenadante y se agregaron 3 ml de solución de lisis celular a la muestra, se mezcló con vortex (THERMOLYNE, USA) y se mantuvo a 37° C por 2 horas en incubadora (STRATAGENE, USA), 3) Terminado el periodo de incubación se adicionaron 2 ml de solución de precipitación de proteínas, agitándose por vortex por 20 s posteriormente se centrifugó por 10 minutos a 2,500 rpm, concluido esto, se recuperó el sobrenadante y se puso en un tubo nuevo (sin remover la pastilla de proteínas que se forma en el fondo) y se adicionaron cuidadosamente 15 ml de isopropanol, se mezcló por inversión, y se volvió a centrifugar, por 3 minutos a 10,000 rpm para obtener el ADN en el botón del fondo.

Se decantó el sobrenadante y se dejó secar la muestra en un papel absorbente, una vez seco, se agregaron 10 ml de etanol al 70% y se lavó el botón por inversión, se centrifugó a 10,000 rpm por 5 min, se descartó el sobrenadante, se procedió a secar el ADN de las muestras colocándolas en papel absorbente de 5 a 10 minutos. Finalmente, se resuspendió el ADN, adicionando 500 µl de solución

de hidratación, homogenizando la pastilla de ADN con un vortex, la suspensión se transfirió a un tubo cónico de 1.5 ml para incubarla por 1 hora a 65° C para disolver totalmente el ADN, o se incubó a temperatura ambiente toda la noche y se alícuotó en volúmenes de 50 y 10 µl en microtubos de 0.6 ml (EPPENDORF, USA), almacenándose a -70° C para su preservación.

### 7.1.3. Cuantificación de ADN.

El ADN obtenido de las muestras se cuantificó mediante el equipo Nanodrop (Thermo Scientific, USA). Utilizando 2 µl de cada muestra, se utilizó solución de hidratación como blanco, y se lavó el brazo mecánico con agua destilada. Como criterio de la calidad del material genético se tomaron en cuenta las absorbancias resultantes de la concentración de ácido nucleicos (ng/µl) y la relación 260/280 (esta última para corroborar la pureza), valores entre 1.5 a 1.8 son indicadores de ADN altamente puro, cabe destacar que los valores de absorbancia de estas muestras se entraron dentro de este rango.

### 7.1.4. Amplificación de la Región Hipervariable I del ADNmt de las muestras por PCR punto final.

Se amplificó un fragmento de 769 pb correspondiente a la región hipervariable I del ADNmt, utilizando un juego de primers reportados por Rieder *et al*, 1998 escalando las cantidades para un volumen final de 12.5 µl (Tablas 5 y 6)

**Tabla 5.** Características de los oligonucleótidos empleados en PCR para la amplificación de región hipervariable I en el ADNmt.

PRIMERS	SECUENCIA	POSICIÓN	TM (°C)	TAMAÑO DEL AMPLICON (PB)
23 F	5- TCATTGGACAAGTAGCATCC-3´	15811	58	769
23 R	5- GAGTGGTTAATAGGGTGATAG-3´	11	58	

Por otra parte el control negativo consistió en una mezcla con los mismos reactivos anteriores a excepción del ADN. Toda la manipulación de reactivos y muestras se realizó en hielo y en condiciones de esterilidad.

**Tabla 6.** Condiciones para una reacción de PCR para la amplificación de región hipervariable I en el ADNmt.

REACTIVO	VOLUMEN ( $\mu$ l)
<b>BUFFER PHUSION® HF 5X</b> (FINNZYMES, SUECIA)	<b>2.5</b>
<b>DNTP'S (10 mM)</b>	<b>0.3</b>
<b>PRIMER 23 F: (12.5 pmoles/<math>\mu</math>l)</b> (SIGMA ALDRICH, USA)	<b>0.4</b>
<b>PRIMER 23 R: (12.5 pmoles/<math>\mu</math>l)</b> (SIGMA ALDRICH, USA)	<b>0.4</b>
<b>MUESTRA ADN (3.5 ng/<math>\mu</math>l)</b>	<b>5</b>
<b>ADN POLIMERASA PHUSION® HOT</b> <b>START (2 u/<math>\mu</math>l)</b> (FINNZYMES, SUECIA)	<b>0.125</b>
<b>AGUA BIDESTILADA ESTÉRIL</b>	<b>La necesaria para completar 12.5 <math>\mu</math>l</b>

Las mezclas se colocaron en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (APPLIED BIOSYSTEMS, USA) usando el siguiente protocolo de termociclado: 98° C por 3 min, (inicio caliente); 98° C por 10 s de desnaturalización, 60° C por 5 s de alineamiento, 72° C por 55 s de elongación repetido por 35 ciclos; finalmente 72° C por 3 min; de extensión final y 4° C al infinito para su almacenaje.

Las muestras fueron retiradas del termociclador y almacenadas a -20° C o preparadas para electroforesis en gel de agarosa.

#### **7.1.5. Electroforesis en gel de agarosa de los amplificados obtenidos.**

Los amplificados se observaron mediante electroforesis en un minigel de agarosa al 1% en TAE 1X (ver ANEXO), para lo cual se mezcló el total de la reacción de amplificación con 2 $\mu$ l de buffer de carga (ver ANEXO), colocándose esta mezcla en cada uno de los pozos del gel y corriendo a 90 volts por 40 minutos, usando siempre marcador de 1 Kb (FERMENTAS, USA) como indicador de tamaño molecular, terminado el tiempo el gel se tiñó por inmersión en solución con bromuro de etidio 0.5 mg/ml por 10 min. Finalmente se visualizaron los productos de amplificación por radiación UV en un fotodocumentador UVP EpiChemi II Darkroom (UVP, USA).

#### **7.1.6. Purificación de productos de PCR por ExoSAP-IT®**

Los productos de amplificación se purificaron por el kit Exo SAP-IT (USB-AFFYMETRIX, USA), para lo cual se mezclaron 10  $\mu$ l del producto de reacción de PCR con 3.5  $\mu$ l de Exo SAP-IT se incubaron a 37 °C por 15 minutos para remover los primers no incorporados y desfosforilar los dNTP sobrantes. Finalmente, la mezcla se incubó

a 80 °C por 15 minutos para desactivar la enzima Exo SAP-IT. El producto de PCR queda listo para utilizarse en la reacción de secuenciación del ADN. Las enzimas que conforman este kit son la exonucleasa I recombinante y la fosfatasa alcalina de camarón, las cuales son hidrolíticas. La exonucleasa degrada los residuos de los primers o de cualquier tipo de ADN producido en la reacción de PCR mientras que la fosfatasa se encarga de hidrolizar los DNTP's sobrantes de la mezcla de PCR.

#### 7.1.7. Secuenciación.

Para obtener la secuencia de la región hipervariable I del ADN mitocondrial de las muestras problema, se utilizó el kit de secuenciación BigDye Terminator v3®. (Applied Biosystems, USA), la mezcla de reacción se muestra en la tabla 7.

**Tabla 7.** Condiciones para una reacción de secuenciación de región hipervariable I en el ADNmt.

Reactivo	Volumen (µl)
BigDye	1.5
Primer F o R (12.5 pmoles/µl)	0.8
Amplificado de PCR	5
Agua bidestilada estéril	La necesaria para completar 20 µl

Una vez preparados los tubos, se colocaron en el termociclador con el protocolo preestablecido para secuenciación: una desnaturalización inicial de 96° C por un minuto y 25 ciclos de 96°C por 10 s, 50° C por 5 s, 60° C por 4 min. Pasado el tiempo las muestras fueron retiradas y preparadas para su purificación.

#### 7.1.8. Purificación de productos de secuenciación.

Para purificar los productos de secuenciación al volumen total de la reacción se agregó 60 µl de isopropanol y 20 µl de agua bidestilada estéril y se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente, posteriormente, se centrifugó a 13,500 rpm por 20 min. Terminada la centrifugación se decantó el sobrenadante, se adicionaron 250 µl de isopropanol al 70 %, se mezcló brevemente y se volvió a centrifugar por 5 minutos a 13,500 rpm. Por último se aspiró el sobrenadante y se dejó secar las muestras en un termobloq a 60°C el tiempo necesario. Terminado el secado se llevó al laboratorio de ácidos nucleicos del departamento de Genética y Biología Molecular, donde se procesaron mediante el secuenciador de electroforesis capilar ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA).

### 7.1.9. Determinación de Haplogrupos mitocondriales.

Obtenida la secuencia se tipificaron los haplogrupos mitocondriales de las muestras mediante la detección de los polimorfismos específicos para cada uno, (de acuerdo a la publicación de Anderson *et al.*, 1981; Quintana-Murci *et al.*, 1999; Achilli *et al.*, 2008; Perego *et al.*, 2008; Fendt *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2011; Bandelt *et al.*, 2012) (Tabla 8). Los polimorfismos se corroboraron mediante el programa bioinformático MITOMASTER (Brandon *et al.*, 2009).

**Tabla 8.** Principales haplogrupos mitocondriales para América. (Anderson *et al.*, 1981).

	16111	16189	16217	16223	16290	16298	16319	16325	16327	16362
<b>rCRS</b>	C	T	T	C	C	T	G	T	C	T
<b>Haplogrupo A</b>	T			T	T		A			C
<b>Haplogrupo B</b>		C	C							
<b>Haplogrupo C</b>				T		C			T	
<b>Haplogrupo D</b>				T				C		C

Las secuencias obtenidas fueron alineadas con la versión revisada de la secuencia de referencia de Cambridge (rCRS) (Andrews *et al.*, 1999) mediante el software Sequencher versión 4.1.2, este mismo programa sirvió para generar la secuencia correcta, la cual se empleó para una determinación preliminar de haplogrupo mediante la página online MITOMASTER. Los alineamientos de las secuencias se realizaron con el software Bioedit versión 7.0.5.3. (Hall, 1999) así como para determinar los cambios de nucleótidos.

### 7.1.10. Obtención de las frecuencias de haplogrupos.

Se obtuvo la frecuencia en porcentaje de cada haplogrupo encontrado tanto del grupo de enfermos como de los controles y se representaron en gráficas de pastel (Figura 9-11).

### 7.1.11. Construcción de redes haplotípicas.

Las redes haplotípicas fueron construidas usando el programa Network versión 4.6.0.0. (Bandelt *et al.*, 1999) la obtención de los archivos en formato Roel se hizo utilizando el programa DnaSP versión 5.10 (Librado y Rozas, 2009). Los

parámetros seleccionados que utilizó Network para crear las redes haplotípicas son: Median-Joining y máxima parsimonia.

#### 7.1.12. Análisis estadístico.

En este trabajo se hizo un análisis de tipo caso-control, entendiéndose este último como un estudio cuyo objetivo es brindar una estimación válida y precisa, de la fuerza de asociación de una relación hipotética de causa-efecto (Lazcano-Ponce *et al.*, 2001).

Con apoyo del software Epidat 3.1 se determinó la asociación que confieren los haplogrupos obtenidos con el riesgo de desarrollar la DM mediante el cálculo de Odds (ventaja) ratio con intervalos de confianza de 95% y significancia de  $p < 0.05$ . En el caso de una enfermedad el Odds ratio hace referencia a la determinación de la presencia o ausencia de un suceso (la enfermedad, en este caso) en 2 grupos diferentes (caso-control), es una forma de representar un riesgo, por medio del cociente entre el número de veces que ocurre el suceso frente a cuántas veces no sucede, el cociente de los odds de los dos grupos es el odds ratio, los resultados se muestran en una tabla de contingencia de 2X2. (Molinero, 2001; Lewis, 2002); la fórmula para calcular el OR es la siguiente:

$$OR = \frac{a \times d}{b \times c}$$

a	b
c	d

Dónde:

- a) individuos que desarrollan el evento y estaban expuestos
- b) individuos que desarrollan el evento y no estaban expuestos
- c) individuos que no desarrollan el evento y estaban expuestos
- d) individuos que no desarrollan el evento y no estaban expuestos

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Parámetros clínicos y antropométricos.

Se analizaron un total de 54 muestras de sangre de individuos con DMT2, las cuales fueron obtenidas de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Metabólicas del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS; y 97 individuos controles normoglucémicos.

Los parámetros clínicos y antropométricos estándar por medio de los cuales se caracterizaron las muestras de los individuos para considerarlos como diabéticos: fueron género, edad, índice de masa corporal (IMC), peso, índice de cintura, cadera, hemoglobina glucosilada (Hb1Ac), glucosa, insulina, colesterol y triglicéridos.

De acuerdo a los parámetros de la ADA (Asociación americana de diabetes), como se aprecia en la tabla 9, se encontró que la población estudiada se divide en 2 grupos: pre-diabético y diabético, de acuerdo a su más reciente suplemento se define al primer grupo como: “grupo de personas cuyos niveles de glucosa no cumplen con los criterios para la diabetes, pero son demasiado altos para ser considerado normales”. De un total de 44 diabéticos (de los que se cuentan con datos clínicos), 13 entran dentro de la categoría de pre diabéticos y 30 dentro del grupo diabéticos. Encontrándose un mayor número de mujeres dentro de la categoría de diabetes con un total de 21, de acuerdo a los parámetros anteriormente mencionados solo 8 mujeres entran en la categoría de pre-diabéticas y 21 en diabéticas; 9 individuos masculinos se consideraron diabéticos, mientras que para el grupo de pre-diabetes resultaron solo 5 individuos.

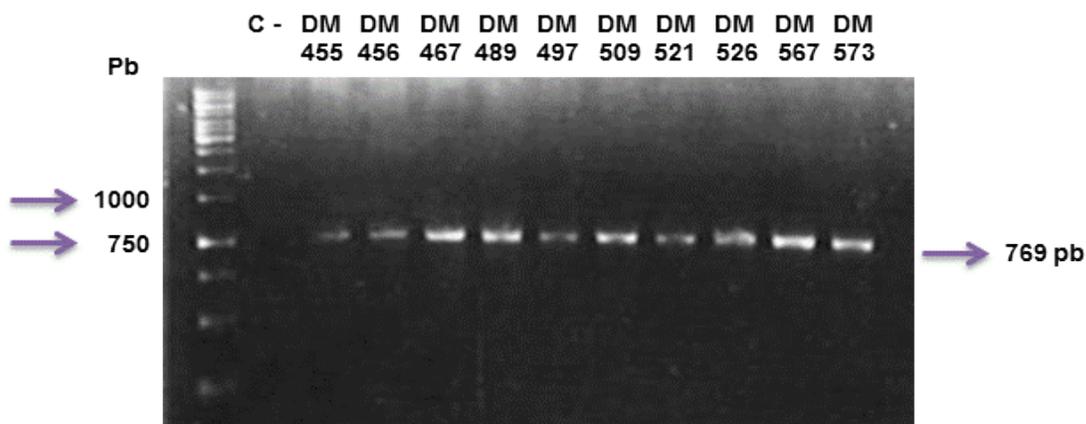
**Tabla 9.** Parámetros clínicos y antropométricos estándares considerados para la categorización de diabético y pre diabético de las muestras del presente trabajo.

<b>Parámetros Pacientes DMT2 n= 44</b>	<b>Valores para pre-diabetes</b>	<b>Valores para diabéticos</b>	<b>Valores normales</b>
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	25-30	≥ 31	18.5-24
Índice de cintura (cm)	80-88/94-102	≥88/≥102	<80
Hb1Ac (%)	5.7-6.4	≥6.5	<4
Glucosa (mg/dL)	100-125	≥200	70-100
HDL (mg/dL)	50-60	≥60	<40
Triglicéridos (mg/dL)	150-200	>200	<150

HDL= lipoproteína de alta densidad. Hb1Ac= hemoglobina glucosilada.

## 8.2. Amplificación de ADNmt de pacientes con DMT2.

En la figura 8 se muestra el resultado obtenido de la amplificación de la HVR-1 de las muestras problema DMT2 423 a DMT2 573 (enumeradas arbitrariamente), se realizaron 54 reacciones de PCR obteniendo productos, los cuales se purificaron y se obtuvieron 54 secuencias, solo en caso de que en una secuencia solo resultase visible con uno de los 2 oligonucleótidos, se repitió el proceso de secuenciación con el oligonucleótido contrario (ya sea el sentido o el contrasentido).



**Figura 8. Amplicones obtenidos de los individuos en estudio.** En el panel se muestran los amplicones en el tamaño esperado (769 pb) de muestras de los individuos en estudio. Estos amplicones se obtuvieron con la pareja de primers 23F y 23R (posición 15811 y 11 respectivamente). El marcador de peso molecular se localiza en el primer carril, seguido del control negativo (C -), consecutivamente las muestras.

## 8.3. Frecuencias de haplogrupos del ADNmt de individuos con Diabetes mellitus tipo 2 y controles.

Para la determinación de los haplogrupos mitocondriales, se alinearon y compararon las secuencias del presente trabajo con la secuencia de referencia de Cambridge. Se trabajaron un total de 151 individuos (54 diabéticos y 97 controles). Se aprecia que el haplogrupo A representa el 52% de la población total, seguido del haplogrupo C (18 %), haplogrupo B (13%), haplogrupo D (11%) y, el 6% corresponde a haplogrupos no amerindios (H, K, L, R, T, U, V), (Figura 9). En las muestras del presente trabajo existe una mayor frecuencia del haplogrupo A en diabéticos (52%) con respecto del grupo control (47%). Los subhaplogrupos de A en el grupo de diabéticos, encontró una mayor frecuencia del subhaplogrupo A2 (29%), seguido del subhaplogrupo A4 (22%), A2g (18%), A2b (7%), las frecuencias de los subhaplogrupos restantes son menores al 7% (A2a, A2d, 2i,

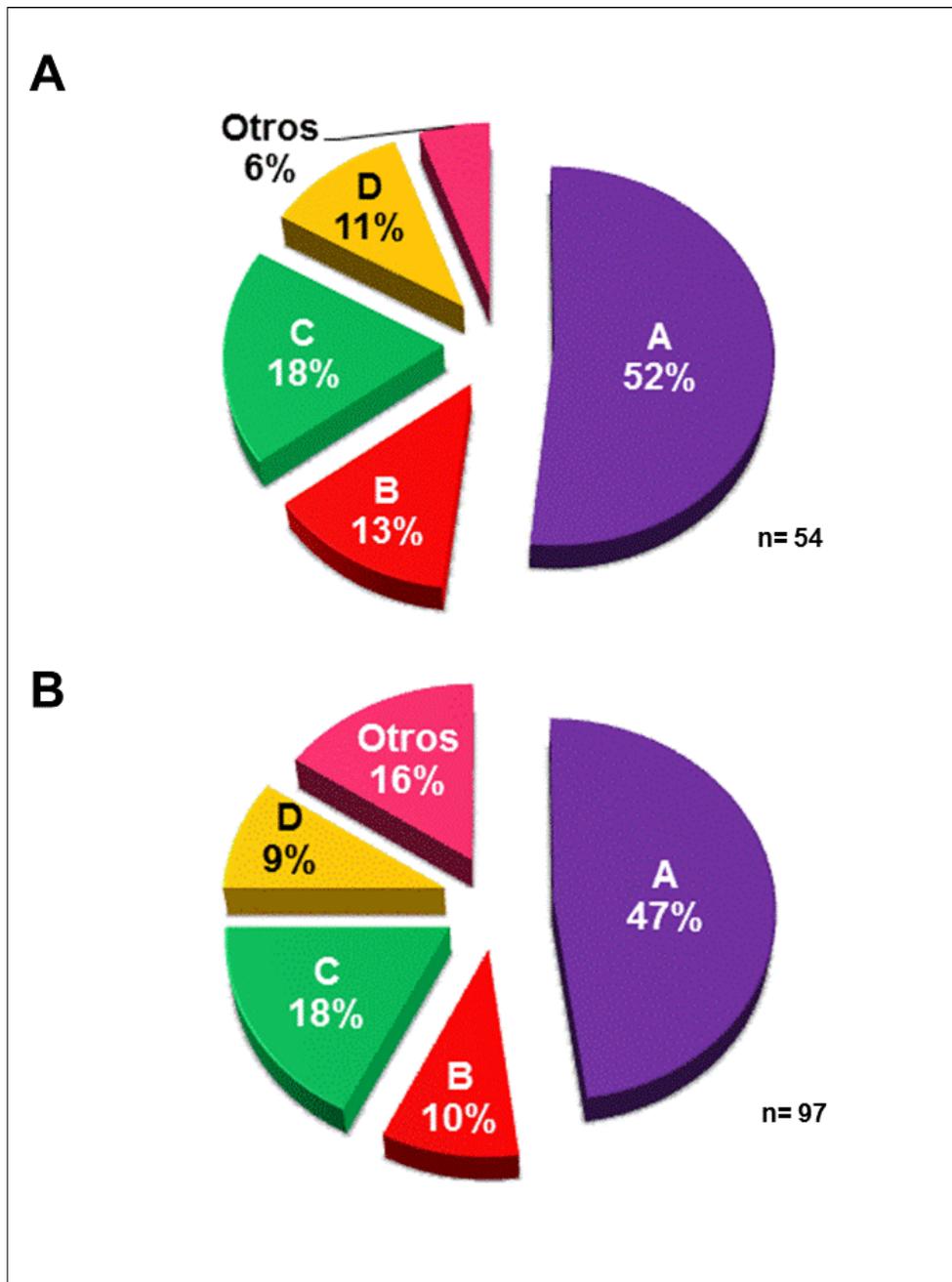
A2n, A2u, y A2w) de forma similar en el grupo control se encontraron los subhaplogrupos A2 (39%), seguido de A y A2v (11%), A2d1 (9%), los subhaplogrupos restantes tienen frecuencias menores al 7% (A2a, A2b, A2e, A2f, A2f2, A2f5, A2h, A2n7, A2q y A2u) (Figura 10).

Para el haplogrupo B observamos que en las muestras de los enfermos de DMT2 existe una mayor frecuencia del subhaplogrupo B2c (57%), seguido por el subhaplogrupo B2 (43%). Para el grupo control el subhaplogrupo fue el de mayor frecuencia B2c (45%), seguido por el subhaplogrupo B2 (33%) y B (22%) (Figura 10).

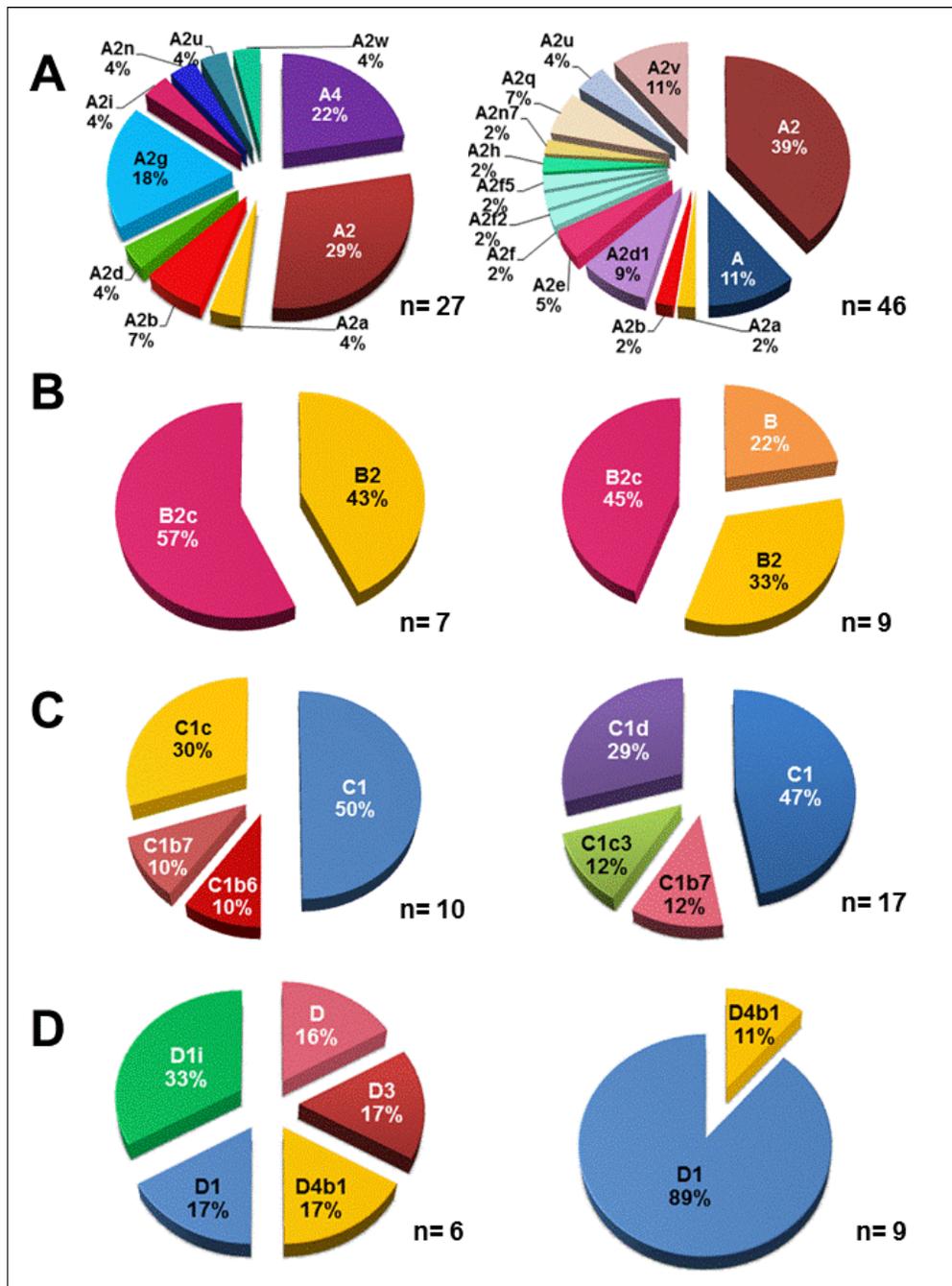
En el caso del haplogrupo C en el grupo diabéticos se observó en mayor proporción el subhaplogrupo C1 (50%), seguido de C1c (30%), y C1b6 y C1b7 con una frecuencia del 10% cada uno. En las muestras control el haplogrupo con la mayor frecuencia fue C1 (41%), seguido de C1d (29%), C1c3 (12%) y C1b7 (12%) (Figura 10).

Para el haplogrupo D se observó que el subhaplogrupo D1i (33%) presentó la mayor frecuencia, seguido de D4b1, D3 y D1 con una frecuencia de 17% para cada uno, por último el haplogrupo D con 16%; en las muestras control sólo se identificaron el subhaplogrupo D1 con una frecuencia del 89% y el D4b1 con una frecuencia del 11% (Figura 10).

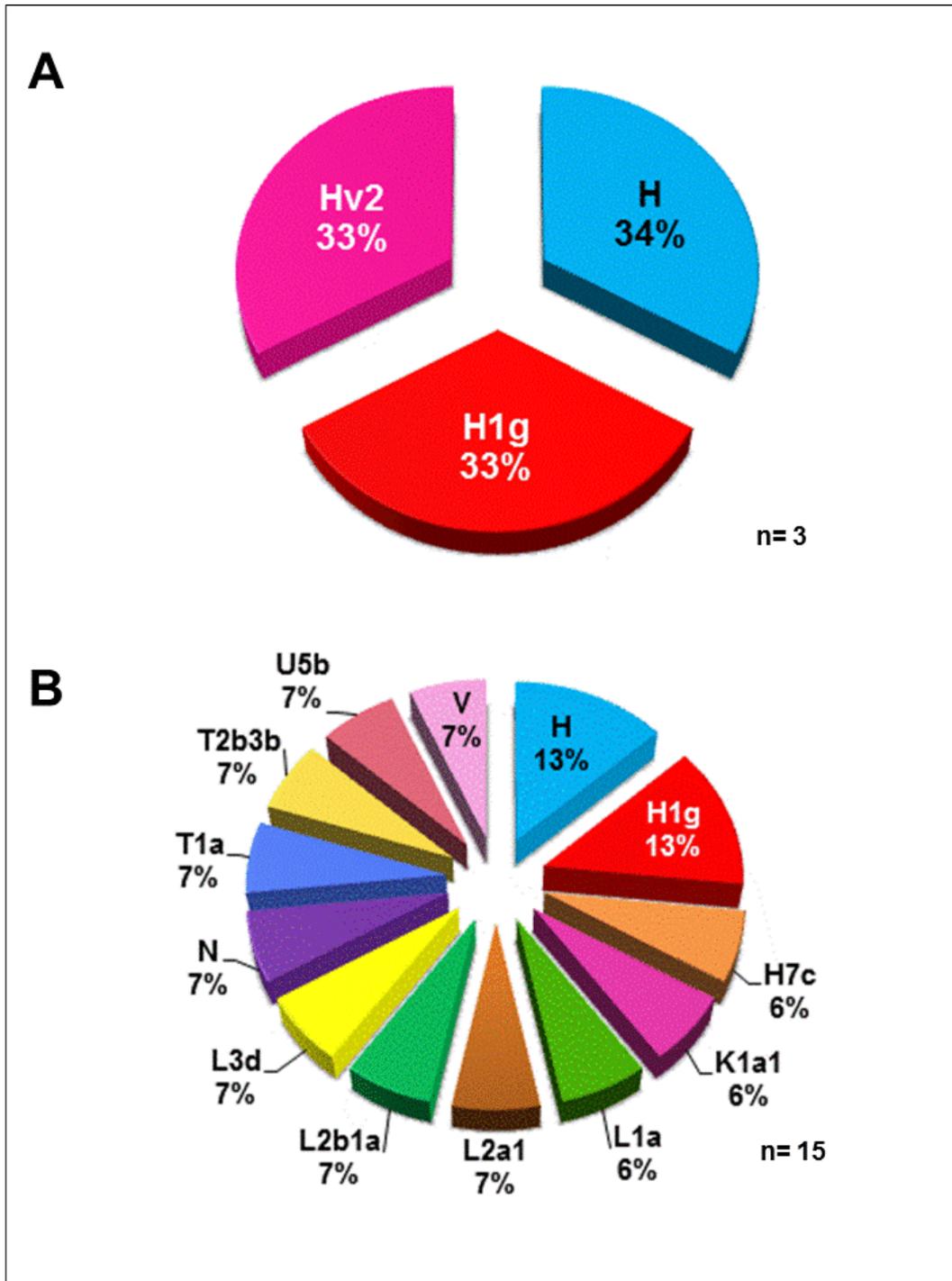
En ambos grupos se encontraron haplogrupos europeos, en el grupo de pacientes con DMT2 se observaron los subhaplogrupos: H, H1g, Hv2, todos con una frecuencia del 33% cada uno; y para los controles se encontraron los haplogrupos H, H1g con un 13% cada uno, los subhaplogrupos H7c, K1a1 con una frecuencia del 7%, y los subhaplogrupos L1a, L2a1, L2b1a, L3d, N, T1a, T2b3b, U5v y V con una frecuencia del 6% cada uno (Figura 11)



**Figura 9. Frecuencia de haplogrupos presentes en el grupo de Diabéticos y Controles.** **A)** El 94% de la población del grupo de diabéticos estudiada resulto estar dentro de los haplogrupos mitocondriales amerindios (A, B, C y D) el 6% restante resulto pertenecer a haplogrupos mitocondriales europeos; **B)** En los controles el 84% de la población presenta haplogrupos mitocondriales amerindios (A, B, C y D) mientras que un 16 % son haplogrupos de origen europeo y africano. En ambos grupos se observa que el haplogrupo A es predominante, con mayor frecuencia en el grupo de diabéticos (52%) que en el grupo de controles (47%), es de llamar la atención que el haplogrupo C presenta la misma frecuencia en ambos grupos de muestras con el 18%.



**Figura 10. Frecuencia total de los subhaplogrupos presentes en el grupo de Diabéticos y Controles.** En esta figura se muestra la frecuencia en porcentaje de los subhaplogrupos en el grupo de diabéticos y controles indicados dentro de los gráficos así como el número de individuos que componen cada grupo. Se puede observar que los subhaplogrupos exclusivos dentro de cada grupo fueron para el haplogrupo A (**A**), en el grupo de diabéticos A4 (22%), A2g (18%), A2w, A2n, A2i, y A2d; y en el grupo control A, A2v, A2d1, A2q, A2e, A2f, A2f2, A2f5, A2h, A2n7. Para el haplogrupo B (**B**), en el grupo control, fueron B. Para el haplogrupo C (**C**) en el grupo de diabéticos fueron C1c y C1b6, y en el grupo control C1d y C1c3. Finalmente para el haplogrupo D (**D**) fueron D1i, D3, y D.



**Figura 11. Frecuencia de haplogrupos y subhaplogrupos de origen europeo y africano presentes en el grupo de pacientes con DMT2 y Controles sanos.** Se muestran las frecuencias de los haplogrupos mitocondriales Europeos y Africanos en la muestras de pacientes con DMT2 **(A)**, y para los individuos control sanos **(B)** conforme corresponde en cada caso.

#### **8.4. Polimorfismos de las secuencias de las muestras de ADNmt de individuos con Diabetes mellitus tipo 2 y controles normoglucémicos.**

Para las muestras del grupo de pacientes con DMT2 se utilizó la nomenclatura “DM” y el número correspondiente a cada muestra. Las muestras de pacientes con DMT2 que se tipificaron como pertenecientes al haplogrupo A se encontró que los polimorfismos de la RHVI asociados al haplogrupo A4 son: C16290T, G16319A y T16362C. Se determinó que un total de seis muestras son haplogrupo A4.

Resultaron ser haplogrupo A2 un total de 8 muestras, en este caso, las secuencias tienen los polimorfismos que tiene el haplogrupo A4 y adicionalmente el polimorfismo C16111T que es determinante para el haplogrupo A2.

Solo se determinó una muestra con subhaplogrupo A2a, (muestra DM573) la cual presenta el polimorfismo C por T en la posición 16192. Las muestras DM480 y DM491 presentan el cambio: A16265G, el cual es característico para el haplogrupo A2b. La muestra DM423, se clasificó como subhaplogrupo A2d ya que presentó el polimorfismo G16153A característico.

Cinco muestras (DM424, DM469, DM471, DM475 y DM521) fueron identificadas como pertenecientes al subhaplogrupo A2g por presentar los polimorfismos G16391A y C16192T. La muestra DM425 se identificó como perteneciente al subhaplogrupo A2i, pues presentó el polimorfismo característico T16325C determinante para este haplotipo. La muestra perteneciente al subhaplogrupo A2n5 fue DM573 con el polimorfismo característico C16270T y la ausencia del polimorfismo T16111C. La muestra DM429 presentó el polimorfismo T16136C por lo que pertenece al subhaplogrupo A2u. Finalmente el subhaplogrupo A2w lo mostró la muestra DM448 ya que presentó el polimorfismo C16187T.

Las muestras del grupo control se empleó la nomenclatura “C”, y el número correspondiente a cada muestra. En el grupo de muestras control o normoglucémicas tipificadas como pertenecientes al haplogrupo A fueron C1007, C1340, C1368, C972 y C1860 ya que presentaron los cambios C16290T y G16319A. Dieciocho de las muestras controles mostraron el subhaplogrupo A2, ya que presentó los mismos cambios que para el haplogrupo A y el cambio C16111T. La muestra C517 presentó el polimorfismo C16192T por lo que pertenece al subhaplogrupo A2a. En la muestra C13657 se determinó el polimorfismo A16265G característico del subhaplogrupo A2b. Las muestras clasificadas como del subhaplogrupo A2d1, fueron las que presentaron el cambio G16274A. Las muestras C1331 Y C152 presentaron el cambio C16187T característico del subhaplogrupo A2e (Figura 10, panel A). La muestra C152

presento el cambio C16264T por lo que se determinó como perteneciente al subhaplogrupo A2f; mientras que la muestra C1297 presento el cambio T16172C lo que la hace haplogrupo A2f5. La muestra C1872 se determinó como perteneciente al subhaplogrupo A2h por el cambio A16335G y la muestra C1841 se determinó como perteneciente al subhaplogrupo A2n7 por presentar el cambio T16357C. Las muestras C1158, C1891 y C99 se clasificaron como pertenecientes al subhaplogrupo A2q por presentar el cambio T16209C. El subhaplogrupo A2u se observó en las muestras C1846 y C983, ya que presentaron el cambio T16136C. El subhaplogrupo A2v se identificó en 5 muestras (C85, C86, C486, C1322 y C975) por presentar el cambio C16239T.

En el grupo de pacientes con DMT2 con haplogrupo B presentaron el cambio en la posición A16183C característico del haplogrupo B. Dos muestras resultaron ser haplogrupo B2 (DM436 y DM457), con la presencia de los polimorfismos característicos T16189C y T16217C. Las muestras DM489, DM497, DM455 y DM452 se determinaron como pertenecientes al subhaplogrupo B2c, por contener el polimorfismo determinante A16182C.

En el grupo control observamos los haplogrupos B (C366 y C1359) con el polimorfismo específico en el nucleótido T16189C, B2 (C998, C531, C1316, C1359, C531) con el polimorfismo específico en la posición T16189C y T16217C, y B2c (C1306, C887, C981) con los mismos polimorfismos más el polimorfismo en la posición A16182C.

Con respecto al haplogrupo C se tipificaron 8 haplotipos diferentes en las muestras de diabéticos, todas las muestras presentaron los polimorfismos característicos del haplogrupo C (T16298C, T16325C y C16327T); la DM438 fue subhaplogrupo C1b7 por presentar el cambio T16311C; la muestra DM482 fue clasificada como subhaplogrupo C1c por presentar los cambios C16354T y G16526A.

El grupo de muestras control mostró 10 haplotipos diferentes, el subhaplogrupo C1 incluyó las muestras C1318, C1878, C275, C278, C512, C1325, C1365, C275 y C1157. El subhaplogrupo C1b7 incluyó las muestras C475 y C1315, ya que ambas presentaron el cambio T16311C. Las muestras C539, C993, C472, C988, C995, mostraron el subhaplogrupo C1d, debido a la presencia del polimorfismo A16051G.

Las muestras tanto del grupo de diabéticos como del grupo control presentaron 6 haplotipos dentro del haplogrupo D con los cambios específicos en T16362C y T16368C. También se observó el haplogrupo D4b1 en las muestras DM146 y

DM581, ya que presentaron el polimorfismo G16319A. El haplogrupo D1 se observó solo en la muestra DM456 con el cambio en el nucleótido 16325.

Para los controles un total de 8 muestras se integran en el subhaplogrupo D1: C1248, C894, C912, C927, C652, C656, C1289 y C1290, quienes en conjunto representan la mayor diversidad de polimorfismos para el haplogrupo D, sólo el control C1311 resulto ser D4b1 presentando el cambio G16319A.

Las muestras de pacientes con DMT2 que se tipificaron como correspondientes a subhaplogrupos europeos, 3 muestras (DM442, DM559 y DM501) mostraron los haplogrupos H, H1g y Hv2 respectivamente.

Dentro de los controles las muestras C1314 y CAB mostraron haplogrupo H. Dos controles mostraron el subhaplogrupo H1g, ya que presentó el cambio T por C en la posición 16189, la muestra C53 mostro el haplogrupo H7c que se determinó por la presencia del cambio A por G en la posición 16265, la muestra C1851 mostro el subhaplogrupo K1a1 ya que presento los polimorfismos T por C en las posiciones 16093, 16224 y 16311.

El segundo grupo con mayor representación fue el que mostró haplogrupo L, con los subhaplogrupos L1a, L2a1, L2b1a y L3d, a excepción de L1a, todas las muestras presentaron el cambio T por C en la posición 16223. El grupo de controles 291, 296, 513 y 139 compartieron los cambios C por T en las posiciones 16278, 16148, el subhaplogrupo L2a1 que presentó los cambios T por C en la posición 16086, A por G en 16212 y 16294, fue representado por la muestra C291. De la misma manera, L1a está representada por C1296, con los cambios A por C en 16298, C por T en 16279. La muestra C513 fue tipificada como subhaplogrupo L2b1a, con los polimorfismos C16114A, G16213A, G16129A, C16148T y C16355T.

Sólo se determinó una muestra con, la muestra C569 muestra tipificada como perteneciente al macrohaplogrupo N mostró el polimorfismo característico C16223T. La muestra C1307 correspondió al subhaplogrupo T1a, mostrando los polimorfismos característicos A16163G, C16186T, T16189C; C16294T y C16296T tipificadas como T2b3 fueron C16294T, C1307.

El subhaplogrupo U5b estuvo representado por la muestra: C545, ya que presentó el cambio C por T en la posición 16270, el cual lo define. La muestra C545, presentó el subhaplogrupo V, ya que presentó el polimorfismo T16298C característico de éste.

#### **8.5. Redes haplotípicas del ADNmt de individuos con diabetes mellitus tipo 2 y controles normoglucémicos**

Una vez clasificadas las secuencias en uno de los haplogrupos mitocondriales por las variantes características de la región control. Se procedió a construir la red haplotípica correspondiente a cada haplogrupo y grupo de estudio con la finalidad de estudiar la distribución y diversidad de los haplotipos. Como anteriormente se mencionó se incluyeron una gama de secuencias obtenidas de una base de datos pública (NCBI), que a su vez provenían de diversos artículos relacionados con el presente trabajo.

Las redes del presente trabajo se realizaron agrupando las secuencias tanto de diabéticos como del grupo control, para averiguar si existía alguna otra característica o diferencia específica que no hubiese sido percibida con los resultados anteriormente descritos.

#### **8.5.1. Haplotipos presentados por el haplogrupo A en el grupo diabético y control.**

El fragmento para A consta de 332 pb, de la posición 16030 a 16361. El algoritmo empleado fue el de máxima parsimonia. En número total de muestras incluidas en la presente red fue de: 18 del grupo diabético y 39 del grupo control. La diversidad haplotípica para esta red fue de 0.9599.

La topología tipo estrella con un nodo interno que conecta a los haplotipos sugiere una expansión demográfica. El hecho de que existan en los nodos una amplia gama de secuencias de etnicidad diferente nos indica que existe migración de otros sitios hacia la ciudad de México, estos criterios se aplica a todas las redes del presente trabajo.

En la figura 12 es posible observar claramente 2 grupos bien definidos, con un solo cambio interno que los conecta, es la transición T16111C, ésta última es característica para el haplogrupo A2. De lado derecho, se observa el haplotipo 2, este haplotipo principal comprende secuencias provenientes de Asia (Siberia, China y Corea), de subhaplogrupos (A y A4c), en este nodo junto con las secuencias mencionadas anteriormente, se agruparon los controles C1007 y C1340, tipificadas como haplogrupo A. De éste haplotipo a su vez irradian un total de 12 haplotipos, en este grupo el haplogrupo y subhaplogrupo predominante es A4, dentro de éste grupo coexisten secuencias de origen ya descrito, otros haplogrupos y subhaplogrupos observados incluyen A, A4a y A4c; cabe destacar que es en este grupo donde se hallaron 2 muestras del grupo diabético (DM446 y 487), ambas tipificadas como A4, a diferencia de los controles, no se agruparon con otras secuencias, se encontraron a un paso mutacional del haplotipo 2 con un cambio en la posición C16223T y T16195C respectivamente.

De este grupo diverge el siguiente nodo relevante, el cual conjunta secuencias con haplogrupo A2 como predominante, en este nodo se aprecia la mayor diversidad haplotípica (68 haplotipos); el haplotipo 1, el haplogrupo predominante para todo este haplotipo fue A2, en él se conjuntaron 8 secuencias del grupo control (C1001, C1310, C1883, C307, C37, C474, C496, C918) todas ellas caracterizadas como A2, 5 secuencias del grupo de diabéticos (DM458, 476, 478, 479, 498), también de A2, otras secuencias presentes en este mismo nodo corresponden a secuencias tipificadas como A2a y A2, provenientes de diferentes regiones (Siberia, Norteamérica, México).

De manera individual el haplotipo 32 a un paso mutacional de distancia (16104) está separado del nodo principal.

Con al menos 2 cambios mutacionales (16325 y 16344) y un haplotipo de por medio (H43) se identificó al haplotipo 29, a su vez con los pasos 16311 y 16136 son los necesarios para dar origen al nodo 30, el cual está compuesto por una secuencia de un diabético.

Los nodos 13 y 10 en la red del haplogrupo A se integraron cada uno por 1 secuencia del grupo de diabéticos y 1 del grupo control, presentaron los sitios mutacionales 16265 y 16311, así como un “median vector” (entendiéndose como secuencias ancestrales extintas o secuencias sin muestrear posiblemente existentes); de manera similar, pero con secuencias de diferentes orígenes se encontró en conjunto con secuencias de diabéticos formando los nodos 23 (con secuencias pertenecientes a A2, A2a, A2g) y 28 (secuencias tipificadas como A2d y A2). El haplotipo 13, lo conformo el control C152 y una secuencia del grupo diabético DM448; otros subhaplogrupos presentes en la red fueron A2b, A2g, A2n7, A2q, A2v, A2w entre otros.

# HAPLOGRUPO A

Median-Joining Network  
16030-16361; 332 pb

No. de Haplotipos: 76

HD: 0.9599

Muestras: 58

- Controles
- Diabéticos
- Chukchi
- Eskimo
- Dogrib
- Mexicanoamericano
- Nahua
- Mixe
- Buryat
- Altaia-Kizhi
- Han
- Coreano
- Mixteco
- Huichol
- Zuni
- Papago
- Zapoteco
- Cora
- Tarahumara
- Japonés
- Apache
- Oroqen
- Mongol
- Ewenki

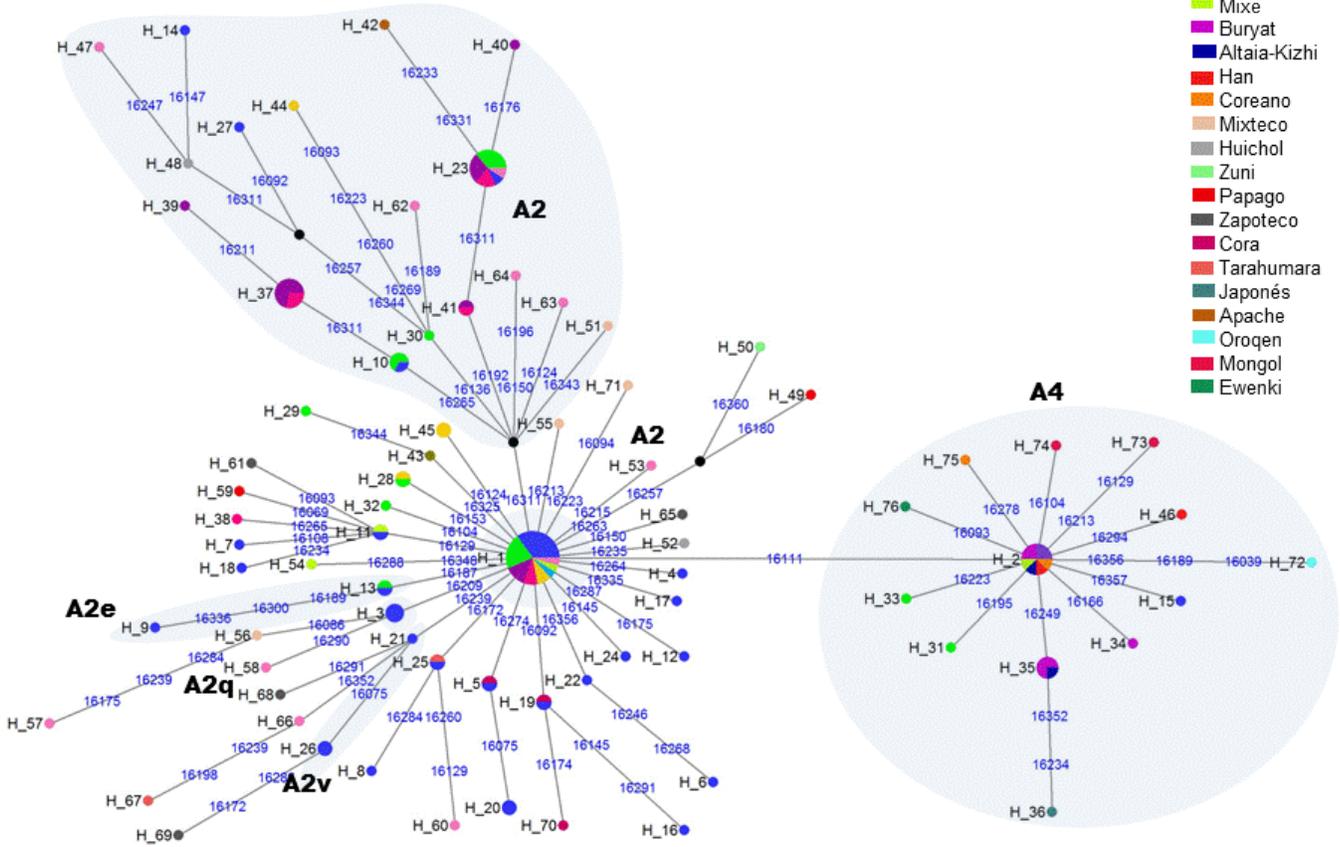


Figura 12. Red de haplotipos que incluyen muestras del grupo diabético y control en conjunto con secuencias de GenBank pertenecientes a subhaplogrupos de A. El método de inferencia del árbol se realizó con Median-Joining. Se muestra en azul las posiciones de mutación de cada secuencia. El número de haplotipos en total y el número de muestras empleadas del presente estudio.

## 8.5.2. Red haplotípica para el haplogrupo B en el grupo diabéticos y control.

El fragmento para B consta de 328 pb, de la posición 16030 a 16361. El algoritmo empleado fue el de máxima parsimonia. La diversidad haplotípica para esta red fue de 0.9837.

La red cuenta con un total de 50 haplotipos (Figura 13), la mayor diversidad en cuanto a subhaplogrupos se encontró en el grupo del lado izquierdo con 26 haplotipos en total. En número total de muestras incluidas en la presente red fue de: 5 del grupo diabético y 5 del grupo control.

La red haplotípica de los grupos de diabéticos y control, en lo que respecta al haplogrupo predominante es B2, con excepción de secuencias identificadas como B3, B2a, B2a1, B2c, B2d, también presentes pero en menor frecuencia. Esta red las secuencias de los individuos con diabetes, con los haplotipos 9, 10 y 11, todas fueron tipificadas como B2c, con un máximo de 2 pasos mutacionales separadas del haplotipo 2, en el caso del haplotipo 11, debido a la presencia de 2 SNP: 16186 y 16189 este nodo diverge del haplotipo principal, el segundo SNP es determinante del subhaplogrupo B2c.

Los haplotipos 7 y 8 (secuencias de individuos con diabetes), en ambos casos, forman un nodo con secuencias de origen Nahua y Mixe (México) respectivamente.

Respecto a las secuencias de los controles, estos se conjuntaron en el nodo 3 (el control C981 forma parte de él) junto con secuencias de individuos Coras (México). Similarmente en el nodo 2 se agruparon los controles C1306 y 887, ambos caracterizados como subhaplogrupo B2c, junto con otras secuencias, en su mayoría de etnias mexicanas (zapotecos, huichol).

El haplotipo 1 incluyó secuencias de Sudamérica y el control C1879, tipificado como subhaplogrupo B2. La muestra control C998 perteneciente al mismo haplogrupo, presentó el haplotipo 4.

Tanto el haplotipo 1 como 2 se encuentran separados por un solo cambio en la base 16182, que es característico para el subhaplogrupo B2c. De igual manera como en la red anterior el hecho de que existan en los nodos una amplia gama de secuencias de etnicidad diferente nos sugiere la migración de otros sitios hacia la ciudad de México.

# HAPLOGRUPO B

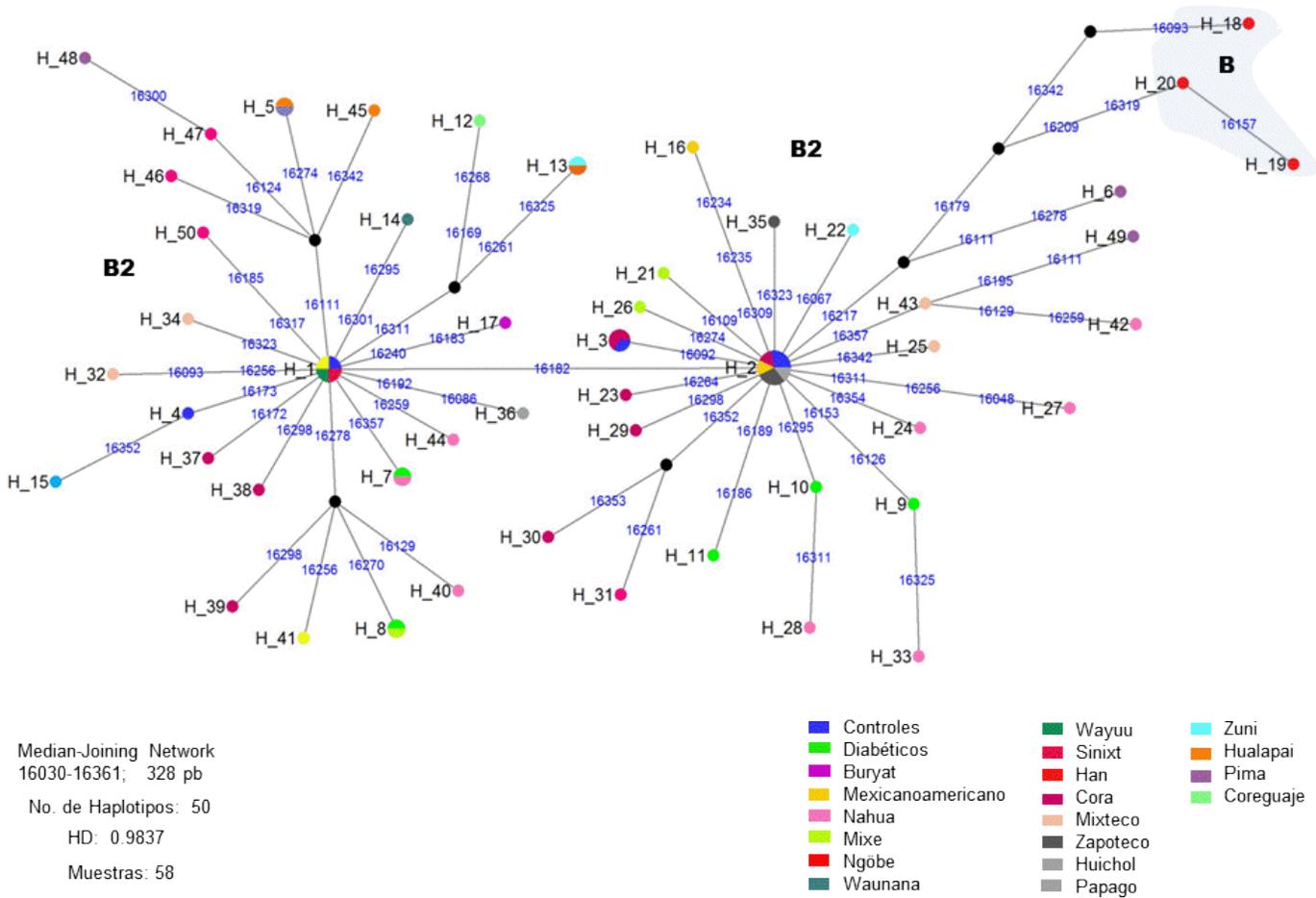


Figura 13. Red de haplotipos que incluyen muestras del grupo diabético y control en conjunto con secuencias de GenBank pertenecientes a subhaplogrupos de B. El método de inferencia del árbol se realizó con Median-Joining. Se muestra en azul las posiciones de mutación de cada secuencia. El número de haplotipos en total y el número de muestras empleadas del presente estudio.

## 8.5.3. Haplotipos de C en el grupo diabético y control.

Por otra parte, la red de secuencias del haplogrupo C (Figura 14), abarca el mayor número de haplotipos (88) de todas las redes, su diversidad haplotípica fue de 0.9770. El fragmento analizado consto de 332 pb, desde la posición 16030 a 16361. El algoritmo empleado fue el de máxima parsimonia. En número total de muestras incluidas en la presente red fue de: 10 del grupo diabético y 14 del grupo control.

Dentro de toda la red pueden distinguirse 4 conjuntos de haplotipos principales, el haplogrupo predominante para la mayoría de los haplotipos es C1, otros subhaplogrupos presentes fueron C, C4, C4a, C4b, C4c, C1, C1b, C1b7, C1c, C1c3, C1d, C1d1, y C1d2a.

Tanto el nodo 2, 4, 15, 20 se diversificaron en ramas que generaron diferentes subhaplogrupos dando una imagen de estrella lo que nos indica dispersión poblacional.

Se puede observar que en el haplotipo 2, se agruparon las secuencias de las muestras DM483, DM485, DM496, C1318, C1878, C278, C512 tipificadas como C1. Este haplotipo engloba una amplia gama de secuencias de diversos orígenes del Norte, centro y Sudamérica. En la Figura 14 podemos distinguir las secuencias de las muestras de los pacientes con diabetes y los controles con un color diferente.

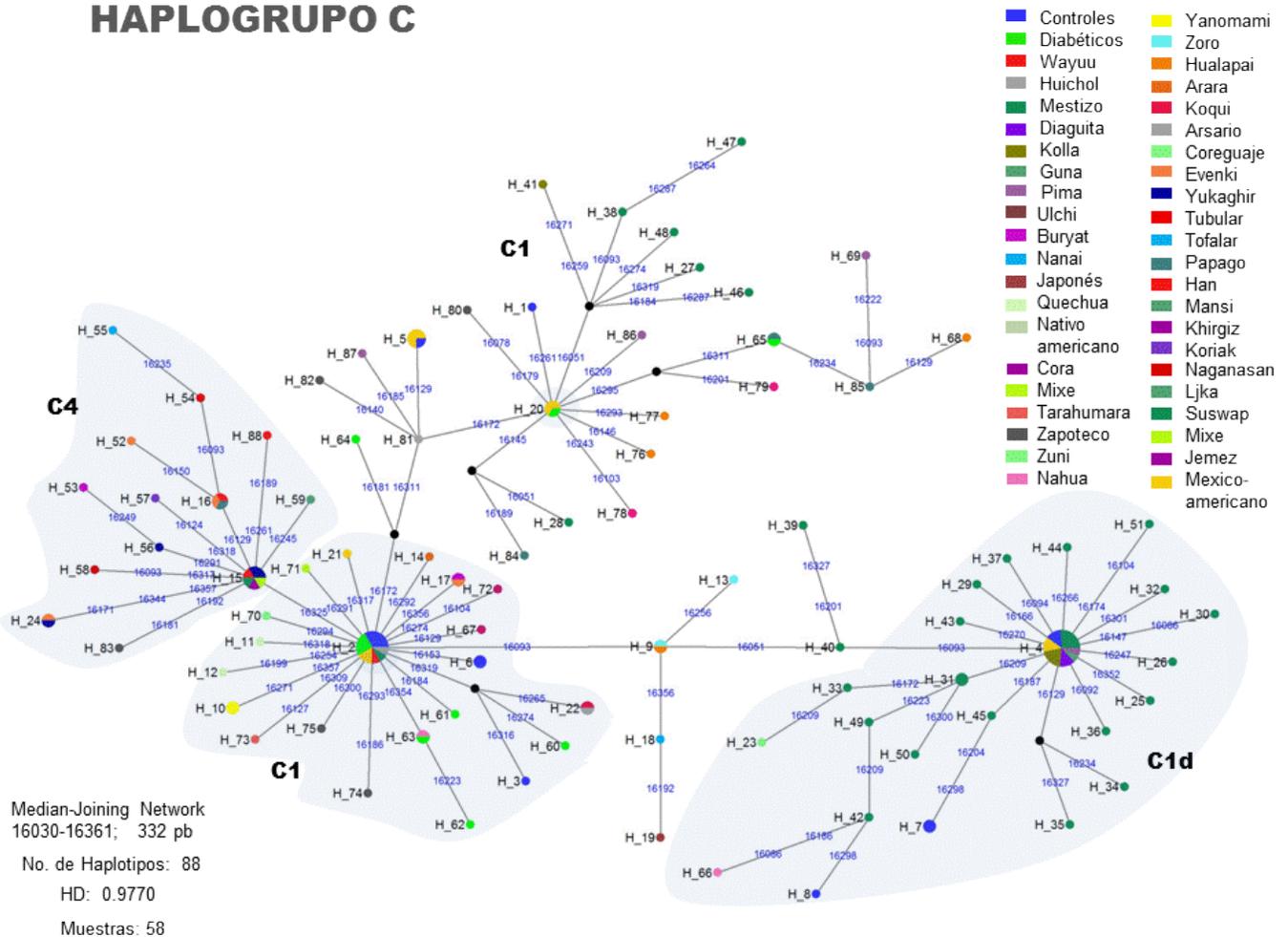
También es importante notar que el paciente diabético DM482, caracterizada como subhaplogrupo C1c, presento el mismo haplotipo que una muestra de origen Nahua, con haplogrupo C1. Otras secuencias de pacientes, presentaron los haplotipo 60, 61 y 62; el haplotipo vecino del nodo 60, tipificado como C1, corresponde al control 275, presenta el sitio mutacional 16316. En la misma dirección, el siguiente nodo corresponde al haplotipo 6 que está compuesto de los controles 477 y 491, ambos caracterizados como C1c3.

Por otro lado, se forma otro grupo de haplotipos del lado derecho, en general este nodo contiene secuencias de diversos sitios (Norte, centro y Sudamérica), con una amplia diversidad que incluyen C, C1, C1b, C1d, C1d1, C1d1b. Es de este nodo del cual se derivan los controles 539, 993 (tipificados como C1d) y 988 con haplogrupo C1.

El haplotipo 8 engloba secuencias de individuos mestizos del Centro y Sudamérica. El haplotipo 4 contiene a los controles 472 y 995, identificados como C1d y C1b respectivamente, otras secuencias que integran este mismo nodo son de Norte, centro y Sudamérica. El haplotipo 7 incluyó los controles: C539 y 993, (ambos identificados como C1d). El haplotipo 5 incluyó secuencias de Norteamérica y el control C475, el cuál fue tipificado como C1b7.

El haplotipo 20 integrado por secuencias procedentes de Norteamérica, incluyó la muestra del grupo diabético DM438, caracterizada como C1b7, y el haplotipo 65 incluyó la secuencia perteneciente a DM567 con subhaplogrupo C1b6 y una secuencia de Norteamérica. A su vez, del haplotipo 20 incluyó el control C1315, cuyo subhaplogrupo es C1b7.

## HAPLOGRUPO C



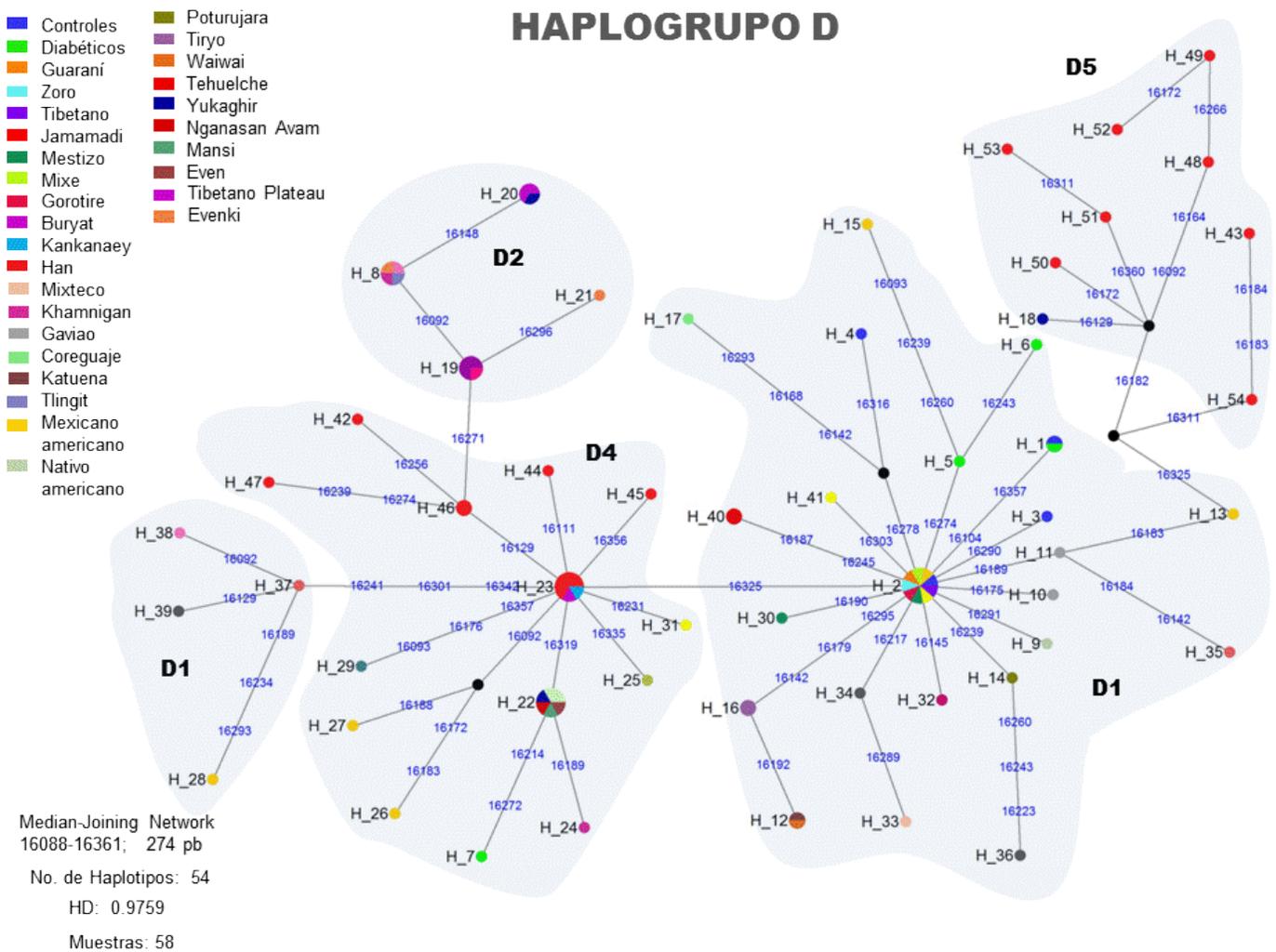
**Figura 14.** Red de haplotipos que incluyen muestras del grupo diabético y control en conjunto con secuencias de GenBank pertenecientes a subhaplogrupos de C. El método de inferencia del árbol se realizó con Median-Joining. Se muestra en azul las posiciones de mutación de cada secuencia. El número de haplotipos en total y el número de muestras empleadas del presente estudio.

### 8.5.4. Haplotipos de D en el grupo diabético y control.

La diversidad haplotípica para esta red de secuencias fue de 0.9759, la longitud del fragmento analizado fue de 274 pb, abarcando desde la posición 16088 a 16361. El algoritmo empleado fue el de máxima parsimonia. En número total de muestras incluidas en la presente red fue de: 4 del grupo diabético y 4 del grupo control.

Como se aprecia en la red de haplotipos de D, presenta también 2 grandes nodos, del cual a su vez divergen numerosos haplotipos. Del haplotipo 23, se

ramificaran un total de 22 haplotipos, de los cuales, el nodo 22 abarco un mayor número de secuencias de todo ese grupo, las secuencias provenientes del Tíbet y Siberia lo conformaron. Es a partir de este nodo y con 2 pasos mutacionales que se ramifican para dar lugar al haplotipo 7, cuya secuencia corresponde a DM581, caracterizada como D4b1. Es importante mencionar que todos los controles presentes en la red fueron tipificados como D1. Existe un solo SNP que une a los 2 mayores nodos de toda la red, con el cambio en la base 16325, característico del haplogrupo D1.



**Figura 15.** Red de haplotipos que incluyen muestras del grupo diabético y control en conjunto con secuencias de GenBank pertenecientes a subhaplogrupos de D. El método de inferencia del árbol se realizó con Median-Joining. Se muestra en azul las posiciones de mutación de cada secuencia. El número de haplotipos en total y el número de muestras empleadas del presente estudio.

El siguiente nodo (H2) comprendió secuencias provenientes del Tíbet, centro y Sudamérica. Una secuencia derivada de este nodo corresponde al control C894. EL nodo 3 estuvo representado por el control C912 el cual mostro un solo cambio en la base 16290.

En referencia a las secuencias del grupo diabético, la muestra DM456 se agrupo en el haplotipo 1, al igual que en las redes de los haplogrupos A y C, junto con esta secuencia se congregó una secuencia del control C1248 que fueron tipificadas como haplogrupo D1, para la ramificación de este nodo fueron requeridos 2 cambios nucleotídicos en las posiciones 16104 y 16357. En la misma dirección, con solo un cambio en la posición 16274, se observa que el haplotipo 5 engloba la muestra DM441 caracterizada como D1i. A partir de este nodo, más cambio nucleotidico en la posición 16243 se encontró la secuencia DM545 que representa el haplotipo 6. Otros haplogrupos presentes en esta red fueron D2, D3, D4, D5 y D6.

### 8.6. Análisis de asociación de haplogrupos del ADNmt con diabetes mellitus tipo 2.

En el análisis de asociación entre haplogrupos mitocondriales y la DMT2, en la cual se incluyeron todos los haplogrupos amerindios y no amerindios, se observó que las diferencias en las frecuencias de haplogrupos entre casos y controles, estadísticamente no son significativas, calculada mediante Odds Ratio (OR) con intervalos de confianza de 95% y significancia de  $p < 0.05$ ; en base al análisis, se determinó que no existe asociación entre los haplogrupos mitocondriales y el desarrollo de la diabetes en la población estudiada ya que los valores de P no son significativos.

**Tabla 10.** Análisis de asociación de haplogrupos mitocondriales amerindios con el desarrollo de DMT2.

Haplogrupo	DMT2	Controles	Odds Ratio	IC (95%)	Valor P
A	28	46	1.1939	0.6133-2.3243	0.7248
B	7	10	1.2957	0.4630-3.6257	0.8213
C	10	17	1.0695	0.4510-2.5360	0.9450
D	6	9	1.2222	0.4104-3.6396	0.9386
Otros	3	15	0.3215	0.0887-1.1657	0.1238

DMT2= Diabetes mellitus tipo 2; IC= Intervalos de confianza

## 9. DISCUSIÓN.

La DMT2 es una enfermedad multifactorial, considerada como una epidemia por la OMS, con un fuerte impacto en la actualidad, previendo a futuro un crecimiento en el número de casos sin precedentes. Se estima que al menos 336 millones de personas tendrán DM para el 2030 (WHO). Ya que es una enfermedad multifactorial, donde el estilo de vida y el componente genético desempeñan un papel importante, es trascendental estudiar esta enfermedad desde un punto de vista integral para una mejor comprensión de la misma.

Dentro del aspecto clínico, este estudio contó con variables antropométricas y clínicas como lo fueron la hemoglobina glucosilada, colesterol total, triglicéridos; asimismo género, edad e índice de masa corporal (Tabla 9). Tales resultados arrojan que la población estudiada está dividida en 2 categorías: prediabética y diabética. Se observó que la mayoría de los individuos de este estudio son mujeres, lo que concuerda con el porcentaje estipulado para la población mexicana, de acuerdo a la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT 2012) y al boletín de diabetes mellitus más reciente de la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud (2014).

Si bien, estadísticamente no hay diferencia en cuanto a las variables clínicas, es interesante observar esta división, cabe destacar que aunque no se le dé importancia a la prediabetes en México, se ha considerado qué debería tratarse como una enfermedad, ya que de acuerdo a la literatura, posee una elevada prevalencia, y se relaciona con un incremento de morbilidad, mortalidad y presencia de complicaciones (Coronado-Malagón *et al*, 2009).

Otro punto interesante, son los valores del IMC, los cuales tanto en mujeres como en varones, de acuerdo a la NOM-174-SSA1-1998, para el manejo integral de la obesidad caen en las categorías de sobrepeso y obesidad, de manera similar se encontraron los valores de triglicéridos, colesterol, y Hb1ac altos; lo que confirma el fenotipo diabético del grupo estudiado.

Hasta el momento existen algunos estudios sobre asociación de la DMT2 con diferentes haplogrupos en poblaciones asiáticas y europeas (Crispim *et al.*, 2006; Fuku *et al.*, 2007; Chinnery *et al.*, 2007; Feder *et al.*, 2009; Liou *et al.*, 2012; Loo *et al.*, 2014). El objetivo de relacionar los haplogrupos mitocondriales con el riesgo a desarrollar DMT2 (Crispim *et al.*, 2006; Fuku *et al.*, 2007; Chinnery *et al.*, 2007; Feder *et al.*, 2009; Takasaki, 2009; Liou *et al.*, 2012; Loo *et al.*, 2014). De igual manera se estudió la relación de los polimorfismos de un solo nucleótido con especial énfasis en T16189C y T16519C con la susceptibilidad a desarrollar DMT2 (Poulton *et al.*, 1998; Poulton *et al.*, 2002; Weng *et al.*, 2005; Liou *et al.*, 2007; Liao

*et al.*, 2008; Park *et al.*, 2008; Ye *et al.*, 2013; Hsouna *et al.*, 2015). Por lo que en este estudio se determinaron los polimorfismos y haplogrupos de la región hipervariable del ADNmt en una población mexicana de mestizos con DMT2 comparado con un grupo control de individuos sanos.

En nuestro grupo de trabajo se está evaluando si existe algún tipo de asociación de los haplogrupos, haplotipos y SNPs mitocondriales en el riesgo o susceptibilidad a la DMT2. En base a esto, el grupo de investigación de nuestro laboratorio ha demostrado la presencia de haplogrupos mitocondriales amerindios, en población mestiza mexicana, de la Ciudad de México (Saldaña Martínez, 2012; Domínguez de la Cruz, 2014).

Estudios previos de variación del ADNmt en México se han centrado en las poblaciones nativas americanas geográfica y culturalmente aisladas. Este enfoque no proporciona información con respecto a la ascendencia de la población cosmopolita en general (mezcla reciente relativa de los pueblos indígenas con los pueblos de diversos orígenes geográficos).

Como parte de la línea de investigación antes mencionada, en la presente tesis, se analizaron las secuencias del ADNmt en individuos con diabetes mellitus y controles normoglucémicos, y se demuestra que la gran mayoría de las muestras se agrupan en uno de los cuatro linajes nativo americanos predominando la ascendencia nativo americana, seguido de ascendencia europea y africana lo cual está de acuerdo con previas publicaciones, (Merriwether *et al.*, 1997; Green *et al.*, 2000; Guardado-Estrada *et al.*, 2010; Martínez-Cortés *et al.*, 2013).

Encontramos que la población total estudiada contiene en mayor frecuencia el haplogrupo A (52%), seguido, por el haplogrupo C (18%), haplogrupo B (13%), el haplogrupo D (11%) y finalmente los haplogrupos de origen no amerindio H, K, L, N, T, U y (6%) (V) (Figura 9). En comparación con el trabajo reportado por Saldaña Martínez, 2012, donde observó que el 50% corresponden a haplogrupo A, 24% al haplogrupo B, 15% es haplogrupo C, 7% haplogrupo D y finalmente 4% para otros haplogrupos; Domínguez de la Cruz (2014), encontró que el haplogrupo A está presente en un 56%, 26% haplogrupo B, 18% el haplogrupo C 6% haplogrupo D y 1% de otros haplogrupos.

Por otra parte, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en las proporciones de haplogrupos amerindios entre casos y controles que pueda sugerir una asociación con la enfermedad (Tabla 10). Hasta el momento no existen reportes de haplogrupos mitocondriales amerindios asociados a diabetes.

Al efectuar el análisis estadístico, se observó que a pesar de las diferencias observadas en las frecuencias de los haplogrupos entre casos y controles, estas

no son significativas, con lo cual se puede afirmar que no se puede asociar el desarrollo de la DMT2 en la población estudiada con el haplogrupo. Al no encontrar una diferencia significativa a nivel de haplogrupo se procedió a analizar la variación a nivel del subhaplogrupo.

Tocante a la variación en cada subhaplogrupo, claramente se aprecia una diversificación interna para cada haplogrupo, sobre todo para el haplogrupo A y C, ya que en el caso de B y D estuvo confinado a la existencia de pocos subhaplogrupos, en el caso de B, solo se encontró la existencia de B4 y B2c, D estuvo confinado a solo 3 subhaplogrupos D4b1, D1i y D1 (Figuras 12-15). Aun cuando solo se haya realizado este estudio a nivel de la región hipervariable I, fue posible encontrar esta variación a nivel de subhaplogrupo, específicamente para el haplogrupo A se ha postulado que lo que permitió tal variación fueron las expansiones secundarias del haplogrupo A2 desde Beringia a América, después del final de la última glaciación (LGM) (Achilli *et al.*, 2008), lo cual es consistente con los resultados aquí expuestos. Mientras que en el caso de C, este es uno de los haplogrupos mayormente distribuidos con diversas ramas en el continente americano (Perego *et al.*, 2010), en este trabajo también se halló variación a nivel de subhaplogrupo respecto a este haplogrupo, no tan extensa como en el caso del haplogrupo A pero si importante.

En cuanto a los haplogrupos no-amerindios del presente trabajo, se identificaron 7 diferentes haplogrupos: H, K, L, N, T, U, V. De estos se ha reportado que el haplogrupo HV está asociado con retinopatía en pacientes con DMT2. Así mismo, se sabe que el haplogrupo V es uno de los más comunes entre pacientes con diabetes de herencia materna, en población finlandesa (Soini *et al.*, 2012), incrementando también el riesgo de fallo renal en pacientes con DMT2 (Achilli *et al.*, 2011).

Se debe esperar la presencia de haplotipos europeos de ADNmt en la población mexicana, debido al contexto histórico, ya que durante la invasión española, hubo un incremento en de los linajes genéticos europeos (Green *et al.*, 2000).

La mayoría de los haplotipos de ADNmt de origen europeo son miembros de uno de los siete haplogrupos europeos (H, I, J, K, T, V y W), o los haplogrupos que comparten los europeos con los africanos (T) o con algunos pobladores nativos del Pacífico (X).

Mientras que la mayoría de los haplogrupos africanos que se han reportado son L o L3 (Green *et al.*, 2000).

Los linajes de origen africano también se encuentran en baja frecuencia, dependiendo del área geográfica de la que se hable, que puede ser explicado

porque existió una mayor proporción de varones esclavos africanos y de colonizadores europeos que mujeres de estas poblaciones (Green *et al.*, 2000) También se ha reportado que en la ciudad de México se concentra una parte importante de haplogrupos de origen europeo, lo cual es consistente con el hecho histórico de que mujeres europeas se establecieron principalmente en la Ciudad de México y en las ciudades coloniales más grandes (Guardado-Estrada *et al.*, 2009).

Las frecuencias en que se distribuyen los 4 subhaplogrupos muestran diversos grados de variabilidad dentro de los linajes mitocondriales. Esto puede deberse a diversos factores. Los principales procesos que influyen en la distribución de los haplogrupos en las poblaciones humanas son el efecto fundador, el flujo génico y la deriva genética (Torroni *et al.*, 1993; Malhi *et al.*, 2002). De los 4 factores de la evolución, la mutación es responsable del origen de los polimorfismos y la selección natural del cambio de sus frecuencias en respuesta al medio ambiente (Cavalli-Sforza, 2007). Se ha considerado que los patrones de diversidad del ADNmt en los mexicanos se atribuyen principalmente a la deriva genética (Sandoval *et al.*, 2009). Lo anterior mencionado podría explicar la alta frecuencia y diversidad de los haplogrupos encontrados en este trabajo donde observamos que la población estudiada mestiza ha mantenido su fondo genético materno de los pobladores amerindios. Es importante mencionar que estas muestras fueron colectadas por el Centro Medico de la Ciudad de México de pacientes que podrían ser también de otras partes de la República mexicana, lo que nos permitiría sugerir que es una muestra representativa de México.

La distribución de haplogrupos en una población permite distinguir no solo la presencia de una población en un área geográfica determinada, sino que además el flujo migratorio que esta puede tener de un sitio y otro. El análisis de haplogrupos representa sólo un acercamiento al fenómeno estudiado.

Como se aprecia en todas las redes, sin excepción alguna, existe un patrón tipo estrella, el cual se ha visto que en estudios de haplogrupos implica eventos de expansión de la población (Achilli *et al.*, 2008).

En las redes haplotípicas (Figuras 12-15) se aprecia claramente los polimorfismos que dividen a los diferentes grupos dentro de cada red, específicamente para la red del haplogrupo A, la transición C16111T separa al grupo de secuencias de A4 A2, esta transición se ha visto en el Este de Siberia, en la población Chukchi, y se ha considerado que es un marcador que pudo haberse originado en Beringia (Bonatto y Salzano, 1997). A su vez los Chukchi también muestran la transición C16192T (muy común en secuencias de A2), la cual comparten con individuos Na-Dené y esquimales, todo ello sugiere un ancestro común para ambas poblaciones,

de hecho se cree que los Chukchi fueron producto de una población con remanentes asiáticos, que se separó de otros grupos asiáticos antes de que surgiese la transición C16111T en Beringia (característica del haplogrupo A2), en conjunto a los Na-Dené y esquimales experimentaron una re-expansión durante la cual emergió la transición C16192T (Foster *et al.*, 1996), este polimorfismo no se ve a menudo en otros haplogrupos (Tanaka *et al.*, 2004; Mabuchi *et al.*, 2007), y se encuentra presente en mayor frecuencia en la CDMX que en la zona central de México (Guardado-Estrada *et al.*, 2009). Otro cambio importante es la transición C16325T (característico del haplogrupo C), ya que es la que separa a los haplogrupos C4 y C1. Este cambio se encuentra muy extendido en amerindios, esquimales y Na-Dené, y no se ha observado fuera del este de Siberia (Bonatto y Salzano, 1997). Para la red de haplogrupo B, el cambio que separa el grupo B4 de B2 es la transición A16182C que se ha observado en secuencias de poblaciones mexicanas, específicamente de los estados de Chiapas y Aguascalientes (Martínez-Cortés *et al.*, 2013). En otro estudio este cambio aparece estrechamente relacionado con haplogrupos europeos, ya que el haplogrupo B deriva del haplogrupo H y este a su vez del R, de hecho, el polimorfismo 16189 es altamente conservado y pertenece al haplogrupo R (Guardado-Estrada *et al.*, 2009). En este mismo estudio reportaron que la frecuencia del haplogrupo B es mayor en la CDMX, resultado que es contrario a lo que encontramos en nuestros estudios. Este haplogrupo se ha observado en alta frecuencia en población Náhuatl (27-40%) y Mixe (33%) (Peñaloza-Espinosa *et al.*, 2007; Torroni *et al.*, 1993; Torroni *et al.*, 1994). Del haplogrupo C se ha observado que tiene una frecuencia del 21% en la ciudad de México, cifra cercana a la encontrada en este trabajo. Aunque también se ha reportado que el haplogrupo C se está en baja frecuencia en el valle de México (Peñaloza-Espinosa *et al.*, 2007), sin embargo en otras poblaciones indígenas más cerradas ocurre lo contrario (Peñaloza-Espinosa *et al.*, 2007; Torroni *et al.*, 1993; Torroni *et al.*, 1994;). Concerniente al haplogrupo D1, este se encuentra en muy baja proporción comparado con todos los demás haplogrupos amerindios (Guardado-Estrada *et al.*, 2009).

Los nahuas son el grupo indígena mayormente representado en todo el territorio nacional, es decir, no son un grupo étnico cerrado, al contrario, predominan en el estado de Puebla, Veracruz, Hidalgo, San Luis Potosí y Guerrero, en menor proporción en el Estado de México, ciudad de México, Tlaxcala, Morelos, Oaxaca, Tabasco, Tamaulipas, Michoacán, Jalisco, Durango y Nayarit (CDI, 2016). Por lo que por probabilidad se explica que las secuencias de diabéticos hayan compartido el mismo haplotipo con secuencias de origen Nahua

Se sabe que una población Nahua muestra una uniformidad cultural, al menos en la ciudad de México (Buentello-Malo *et al.*, 2008). En un estudio, se reporta que la ancestría de este grupo indígena es 98.6% de origen nativo americano (Peñaloza *et al.*, 2007).

Respecto al grupo mixe, este se encuentra confinado a la parte norte del estado de Oaxaca (UNESCO, 2016), se encuentran relacionados lingüísticamente con los mayas. El hecho de que secuencias de origen indígena (Nahuatl, Mixe) se hayan agrupado con secuencias del grupo diabético podría sugerir que exista un ancestro común entre el origen indígena y los individuos con DMT2 con los que compartieron el haplotipo.

Este trabajo de investigación representa una parte de un mega proyecto que contempla en el estudio un mayor número de muestras, por lo que nuestros resultados definitivamente contribuirán al análisis completo que incluirá un mayor número de secuencias de la población con DMT2 al igual que de controles sanos.

## 10. CONCLUSIONES.

Los resultados muestran que:

1. La mayor parte de las secuencias del ADNmt de los individuos mexicanos incluidos en este estudio presentaron uno de los cuatro haplogrupos nativo americano A2, B2, C1, D1.
2. Asimismo, se observaron la contribución genética de origen africano y europeo en las secuencias de ADNmt, lo que refleja la presencia de europeos y africanos debido a la invasión española.
3. El haplogrupo predominante fue el A en la población de mexicanos con y sin DMT2 con una frecuencia de 52 y 47 % respectivamente, seguido del haplogrupo C con 18%, mientras que el haplogrupo B se encontró en una frecuencia del 13% y 10%, finalmente para el haplogrupo D se observó una frecuencia del 11% y 9% respectivamente.
4. El Haplogrupo mitocondrial no mostro que sea un factor de riesgo o protección para el desarrollo de DMT2 en la población mestiza mexicana, ya que las diferencias observadas por la prueba de Odds ratio no fueron estadísticamente significativas. Aunque será necesario incrementar el número de muestra para este tipo de análisis.
5. La población estudiada, mostro un total de 18 haplotipos en el haplogrupo A, 7 para el haplogrupo B, 6 para el haplogrupo C y 5 para el haplogrupo D.
6. Uno de los individuos con haplogrupo B2, mostro el polimorfismo T16189C que se ha asociado a DMT2 en una población asiática.

## **11. PERSPECTIVAS.**

1. Incrementar el número de muestras para incrementar la significancia estadística.
2. Secuenciar el genoma mitocondrial completo para abarcar una mayor área de estudiar la asociación de polimorfismos con la susceptibilidad a DMT2.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

Aedo SM, Pavlov SD, Clavero FC. 2010. Riesgo relativo y *Odds ratio* ¿Qué son y cómo se interpretan? Revista Obstetricia Ginecología. 5 (1): 51-54.

Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJH, Staden R, Young IG. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature. 290 (5806): 457-465.

Andersson SG, Zomorodipour A, Andersson JO, Sicheritz-Pontén T, Alsmark UC, Podowski RM, Näslund AK, Eriksson AS, Winkler HH, Kurland CG. 1998. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. Nature. 396(6707): 133-143.

Ankel-Simons F, Cummins JM. Misconceptions about mitochondria and mammalian fertilization: Implications for theories on human evolution. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 93(94): 13859-13863.

Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. 1999. Reanalysis and revision of the Cambridge reference for human mitochondrial DNA. Nature Genetics. 23 (2): 147

A human mitochondrial genome database (MITOMAP). (Consultado diciembre 2014). Disponible en la página:  
<http://www.mitomap.org/bin/view.pl/MITOMAP/WebHome>

Achilli A, Perego UA, Bravi CM, Coble MD, Kong Q-P, Woodward SR, Salas A, Torroni A, Bandelt H-J. 2008. The phylogeny of the Four Pan-American MtDNA Haplogroups: Implications for Evolutionary and Disease Studies. PLoS ONE. 3(3): e1764.

Bandelt HJ, Forster P, Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Molecular Biology and Evolution. 16 (1): 37-48. Network

Bandelt HJ, Forster P, Sykes BC, Richards MB. 1995. Mitochondrial Portraits of Human Populations Using Median Networks. Genetics. 141 (2): 743-753.

Bandelt HJ, Herrnstadt C, Yao YG, Kong QP, Kivisild T, Rengo C, Scozzari R, Richards M, Villems R, Macaulay V, Howell N, Torroni A, Zhang YP. 2003. Identification of Native American founder mtDNAs through the analysis of complete mtDNA sequences: some caveats. Annals of Human Genetics. 67(Pt 6): 512-524.

Bendall KE, Sykes BC. 1995. Length Heteroplasmy in the First Hypervariable Segment of the Human mtDNA Control Region. *American Journal of Human Genetics*. 57 (2): 248-256.

Boletín Diabetes Tipo 2 2014. Dirección General de Epidemiología (DGE). Secretaría de Salud (SSA) (consultado diciembre 2015). Disponible en la página: [http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/dgae/infoepid/bol\\_diabetes.html](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/dgae/infoepid/bol_diabetes.html)

Boletín Epidemiológico. Dirección General de Epidemiología (DGE). Secretaría de Salud (SSA) (consultado febrero 2016). Disponible en la página: [http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/dgae/boletin/intd\\_boletin.html](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/dgae/boletin/intd_boletin.html)

Bonato SL, Salzano FM. 1997. A single and early migration for the peopling of the Americas supported by mitochondrial DNA sequence data. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 94(5): 1866-1871.

Bonato SL, Salzano FM. 1997. Diversity and Age of the Four Major mtDNA Haplogroups, and Their Implications for the Peopling of the New World. *American Journal of Human Genetics*. 61 (6): 1413-1423.

Buentello-Malo L, Peñaloza-Espinosa R, Loeza F, Salamanca-Gomez F, Cerda-Flores RM. 2003. Genetic Structure of Seven Mexican Indigenous Populations Based on Five Polymarker Loci. *American Journal of Human Biology*. 15 (1): 23-28.

Brandon MC, Ruiz-Pesini E, Mishmar D, Procaccio V, Lott MT, Nguyen KC, Spolim S, Patil U, Baldi P, Wallace DC. 2009. MITOMASTER: a bioinformatics tool for the analysis of mitochondrial DNA sequences. *Human Mutation*. 30 (1): 1-6.

Brothertorn P, Haak W, Templeton J, Brandt G, Soubrier J, Jane Adler C, Richards SM, Sarkissian CD, Gansimeier R, Friederich S, Dresely V, van Oven M, Kenyon R, Van der Hoek MB, Korlach J, Luong K, Hoy SY, Quintana-Murci L, Behar DM, Meller H, Alt KW, Cooper A, Genographic Consortium, Adhikarla S, Ganesh Prasad AK, Pitchappan R, Varatharajan Santhakumari A, Balanovska O, Bertranpetit J, Comas D, Martínez-Cruz B, Melé M, Clarke AC, Matisoo-Smith EA, Dulik MC, Gaieski JB, Owings AC, Schurr TG, Vilar MG, Hobbs A, Soodyall H, Javed A, Parida L, Platt DE, Royyuru AK, Jin L, Li S, Kaplan ME, Merchant NC, John Mitchell R, Renfrew C, Lacerda DR, Santos FR, Soria Hernanz DF, Spencer Wells R, Swamikrishnan P, Tyler-Smith C, Paulo Vieira P, Ziegler JS. 2013. Neolithic mitochondrial haplogroup H Genomes and the Genetic origins of Europeans. *Nature Communications* 4: 1764.

Cann RL, Stoneking M, Wilson AC. 1987. Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature*. 325 (6099): 31-36.

Cavalli-Sforza LL. 2007. Human Evolution and Its Relevance for Genetic Epidemiology. . *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. 8: 1-15.

Comisión Nacional para el desarrollo de los Pueblos Indígenas (CDI). (consultado diciembre 2015). Disponible en la página:

<http://www.gob.mx/cdi>

Coronado-Malagón M, Gómez-Vargas JI, Espinosa-Peralta D, Arce-Salinas A. 2009. Progresión de prediabetes a diabetes mellitus tipo 2 en mexicanos. Evaluación en una cohorte. *Gaceta Médica de México* 145 (4): 269-272.

Coskun PE, Ruiz-Pesini E, Wallace DC. 2003. Control región mtDNA variants: Longevity, climatic adaptation, and a forensic conundrum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100(5): 2174-2176.  
Chinnery PF, Mowbray C, Patel SK, Elson JL, Sampson M, Hitman GA, McCarthy MI, Hateersley AT, Walker M. 2007. Mitochondrial DNA haplogroups and type 2 diabetes: a study of 897 cases and 1010 controls. *Journal of Medical Genetics*. 44 (66): e80.

Crispim D, Canani LH, Gross JL, Tschiedel B, Souto KE, Roisenberg I. 2006. The European-specific mitochondrial cluster J/T could confer an increased risk of insulin-resistance and type 2 diabetes: an analysis of the m.4216T>C and m.4917A>G variants. *Annals of Human Genetics*. 70 (Pt 4): 488-495.

Derenko M, Malyarchuk B, Denisova G, Perkova M, Rogalia U, Grzybowski T, Khusnutdinova E, Dambueva I, Zakharov I. 2012. Complete mitochondrial DNA analysis of Eastern Eurasian haplogroups rarely found in populations of northern Asia and Eastern Europe. *PLoS One*. 7(2): e32179.

DiMauro S, Mancuso M. 2007. Mitochondrial Diseases: Therapeutic Approaches. *Biosci Rep* 27(1-3): 125-137.

DiMauro S, Schon EA. 2003. Mitochondrial respiratory-chain Diseases. *The NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE*. 348(26): 2656-68.

Domínguez de la Cruz Eduardo. 2014. Asociación de variantes en los genes TCF7L2, WFS1 y el haplogrupo mitocondrial con el desarrollo de diabetes tipo 2 en una población mexicana. Tesis de maestría. CINVESTAV. México, CDMX.

Eshleman JA, Malhi RS, Glenn Smith D. 2003. Mitochondrial DNA Studies of Native Americans: Conceptions and Misconceptions of the Population Prehistory of the Americas. *Evolutionary Anthropology* 12 (1): 7-18.

Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) (Consultado julio 2014)  
Disponible en la página:

<http://ensanut.insp.mx/>

Feero GW, Guttmacher A. Genomic Medicine – An Updated Primer. *The NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE*. 362 (21): 2001-11.

Feder J, Ovadia O, Blech I, Cohen J, Wainstein j, Harman-Boehm I, Glaser B, Mishmar D. 2009. Parental diabetes status reveals association of mitochondrial DNA haplogroup J1 with type 2 diabetes. *BMC Medical Genetics*. 10: 60.

Federación internacional de Diabetes (IDF), *IDF DIABETES ATLAS –Sixth edition–* (consultado septiembre 2015). Disponible en la página:  
<http://www.idf.org/diabetesatlas>

Fendt L, Röck A, Zimmermann B, Bodner M, Thye T, Tschentscher F, Owusu-Dabo E, Göbel TM, Schneider PM, Parson W. 2011. MtDNA diversity of Ghana: a forensic and phylogeographic view. *Forensic Science International: Genetics*. 6 (2): 244-249.

Foster P, Harding R, Torroni A, Bandelt HJ. 1996. Origin and Evolution of Native American mtDNA Variation: A Reappraisal. *American Journal of Human Genetics*. 59 (4): 935-945.

Fuku N, Park KS, Yamada Y, Nishigaki Y, Cho YM, Matsuo H, Segawa T, Watanabe S, Kato K, Yokoi K, Nozawa Y, Lee HK, Tanaka M. 2007. Mitochondrial haplogroup N9a confers resistance against type 2 diabetes in Asians. *The American Journal of Human Genetics*. 80 (3): 407-415.

Friedman JR Nunnari J. 2014. Mitochondrial form and function. *Nature*. 505 (483): 335-343.

Genetic Admixture of Eight Mexican Indigenous Populations: Base don Five Polymarker, HLA-DQA1, ABO and RH Loci. *American Journal of Human Biology*. 20 (6): 647-650.

Guardado-Estrada M, Juarez-Torres E, Medina-Martínez I, Wegier A, Macías A, Gomez G, Cruz-Talonia F, Roman-Bassaure E, Piñero D, Kofman-Alfaro S, Berumen J. 2009. A great diversity of Amerindian mitochondrial DNA ancestry is present in the Mexican mestizo population. *Journal of Human Genetics*. 54 (12): 695-705.

Guha P, Srivastava SK, Bhattacharjee S, Chaudhuri TK. 2013. Human migration, diversity and disease association: a convergent role of established and emerging DNA markers. *Frontiers in GENETICS*. 4 155: 1-8.

Green LD, Derr JN, Knight A. 2000. MtDNA affinities of the peoples of North-Central Mexico. *The American Journal of Human Genetics*. 66 (3): 989-998.

Greenberg Barry D. Newbold JE, Sugino A. 1983. Intraspecific nucleotide sequence variability surrounding the origin of replication in human mitochondrial DNA. *Gene*. 21 (1-2): 33-49.

Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Series* 41: 95-98.

Hsouna S, Ben Halim N, Lasram K, Arfa I, Jamoussi H, Bahri S, Ammar SB, Miladi N, Abid A, Abdelhak S, Kefi R. 2015. Association study of mitochondrial DNA polymorphisms with type 2 diabetes in Tunisian population. *26 (3)*: 367-372.

Iborra FL, Kimura H, Cook PR. 2004. The functional organization of mitochondrial genomes in human cells. *BMC Biology*. 2: 9 1-14.

INMEGEN. 2010. Mapa del Genoma de Poblaciones Mexicanas. Libro de divulgación del Proyecto de Diversidad Genómica de la Población Mexicana. 2 Edición. México. INMEGEN. Pp. 4-26.

Islas Andrade SA, Revilla-Monsalve MC. *Diabetes Mellitus* 3 Edición. México. McGraw Hill. 2005. Pp 6, 7, 9, 100.

Jobling MA, Gill P. 2004. ENCODED EVIDENCE: DNA IN FORENSIC ANALYSIS. *Nature Reviews Genetics* 5, 739–751.

Kemp BM, González-Oliver A, Malhi RS, Monroe C, Schroeder KB, McDonough, Rhett G, Resendéz A, Peñaloza-Espinosa RI, Buentello-Malo L, Gorodesky C, Glenn Smith D. 2010. Evaluating the Farming/Language Dispersal Hypothesis with Genetic variation exhibited by populations in the Southwest and Mesoamerica. *PNAS*. 107 (15): 6759-6764.

Kivisild T. 2015. Maternal ancestry and population history from whole mitochondrial genomes. *Investigative Genetics*. 6: 3.

Kong Q-P, Bandelt HJ, Sun C, Yao YG, Salas A, Achilli A, Wang CY, Zhong L, Zhu CL, Wu SF, Torroni A, Zhang YP. 2006. Updating the East Asian mtDNA phylogeny: a prerequisite for the identification of pathogenic mutations. *Human Molecular Genetics*. 15 (13): 2076-2086.

Kowald A, Kirkwood T. 2011. Evolution of the mitochondrial fusion-fission cycle and its role in aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 108(39): 16481-16481.

Kumar S, Bellis C, Zlojutro M, Melton PE, Blangero J, Curran JE. 2011. Large scale mitochondrial sequencing in Mexican Americans suggest a reappraisal of Native American origins. *BMC Evolutionary Biology*. 11: 293.

Kmiec B, Woloszynska M, Janska H. 2006. Heteroplasmy as a common state of mitochondrial genetic information in plants and animals. *Curr Genet*. 50: 149-159.

Kwak SH, Park KS. 2013. Genetics of type 2 diabetes and potential clinical implications. *Archives of Pharmacal Research*. 36 (2): 167-177.

Kwank SH, Park KY, Lee KU, Lee HK. 2010. Mitochondrial metabolism and diabetes. *Journal of Diabetes Investigation*. 1(5): 161-9.

Lazar MA. 2005. How obesity causes diabetes: not a tall tale. *Science*. 307 (5708): 373-375.

Lee HK, Song JH, Shin CS, Park DJ, Park KS, Lee KU, Koh CS. 1998. Decreased mitochondrial DNA content in peripheral Blood precedes the development of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 42 (3): 161-167.

Lee HC, Wei YH. 2005. Increase of mitochondria and mitochondria DNA in response to oxidative stress in human cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* J 348 (Part 2): 425–432

Lee HK, Song JH, Shin CS, Park DJ, Park KS, Lee KU, Koh CS. 1998. Decreased mitochondrial DNA content in peripheral Blood precedes the development of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 42 (3): 161-167.

Lewis CM. 2002. Genetic association studies: design, analysis and interpretation. *BRIEFINGS IN BIOINFORMATICS*. 3 (2): 146-153.

Liao W-Q, Pang Y, Yu Ch-A, Wen J-Y, Zhang Y-G, Li XH. 2008. Novel Mutations of Mitochondrial DNA Associated with Type 2 Diabetes in Chinese Han Population. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*. 215 (4): 317-384.

Liou CW, Lin TK, Weng HH, Lee CF, Chen T-L, Wei Y-H, Chen S-D, Chuang Y-C, Weng SW, Wang P-W. 2007. A common Mitochondrial DNA Variant and Increased Body Mass Index as Associated Factors for Development of Type 2 Diabetes: Additive Effects of Genetic and Environmental Factors. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 92 (1): 235-239.

Liou CW, Chen JB, Tiao MM, Weng SW, Huang TL, Chuang JH, Chen SD, Chuang YC, Lee WC, Lin TK, Wang PW. 2012. Mitochondrial DNA coding and control región variants as Genetic risk factors for type 2 diabetes. 61 (10): 2642-2651.

Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioninformatics*. 25 (11): 1451-1452.

Lazcano-Ponce E, Salazar-Martínez E, Hernández-Avila M. 2001. Estudios epidemiológicos de casos y controles. Fundamento teórico, variantes y aplicaciones. *Salud Pública de México*. 43 (2): 135-150.

Loo JH, Trejaut JA, Yen JC, Chen ZS, Ng WM, Huang CY, Hsu KN, Hung KH, Hsiao Y, Wei YH, Lin M. 2014. Mitochondrial DNA association study of type 2 diabetes with or without ischemic stroke in Taiwan. *BMC Research Notes*. 7: 223.

Lorenz JG, Smith DG. 1997. Distribution of Sequence Variation in the mtDNA Control Region of Native North Americans. *Human Biology*. 69 (6): 749-776.

Lowell BB, Shulman GI. 2005. Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science*. 307 (5708): 384-387.

Maechler P, Wollheim CB. Mitochondrial functions in normal and diabetic beta-cells. 2001. *Nature*. 414 (6865): 807-812.

Mabuchi T, Susukida R, Kido A, Oya M. 2007. Typing the 1.1 kb control region of human mitochondrial DNA in Japanese individuals. *Journal of Forensic Sciences*. 52 (2): 355-363.

Malhi RS, Eshleman JA, Greenberg JA, Weiss DA, Schultz Shook BA, Kaestle FA, Lorenz JG, Kemp BM, Johnson JR, Glenn Smith D. 2002. The structure of Diversity within New World Mitochondrial DNA Haplogroups: Implications for the Prehistory of North America. *American Journal of Human Genetics*. 70 (4): 905-919.

Malhi RS, Mortensen HM, Eshleman JA, Kemp BM, Lorenz JG, Kaestle FA, Johnson JR, Gorodezky C, Glenn Smith D. 2003. Native American mtDNA Prehistory in the American Southwest. *American Journal of Physical Anthropology*. 120 (2): 108-124.

Marchington DR, Harshorne GM, Barlow D, Poulton J. 1997. Homopolymeric Tract Heteroplasmy in mtDNA from Tissues and Single Oocytes: Support for a Genetic Bottleneck. *The American Journal of Human Genetics*. 60(2): 408-416.

Martínez-Cortés G, Salazar-Flores J, Haro-Herrero J, Rubi-Castellanos R, Velarde-Félix JS, Muñoz-Valle JF, López-Casamiichana M, Carrillo-Tapia E, Canseco-Avila LM, Bravi CM, López-Armenta M, Rangel-Villalobos H. 2013. Maternal Admixture and Population Structure in Mexican-Mestizos based on mtDNA haplogroups. *American Journal of Physical Anthropology*. 151 (4): 526-537.

Merriwether AD, Huston S, Iyengar S, Hamman R, Norris JM, Shetterly SM, Kamboh IM, Ferrell RE. 1997. Mitochondrial Versus Nuclear Admixture Estimates Demonstrate a Past History of Directional Mating. *American Journal of Physical Anthropology*. 102 (2): 153-159.

Mishmar D, Ruiz-Pesini E, Golik P, Macaulay V, Clark AG, Hosseini S, Brandon M, Easley K, Chen E, Brown MD, Sukernik RI, Olckers A, Wallace DC. 2003. Nature selection shaped regional mtDNA variation in humans. 100 (1): 171-176.

Montoya J. 2005. Biogénesis y Patología Mitocondrial. Rev. Real Academia de Ciencias. Zaragoza. 60: 7-28.

Moran-Barroso VF, Sánchez-Boiso A, Peñaloza-Espinosa RI, Castro Sierra E, Cerda-Flores RM, Buentello-Malo L, Sánchez-Urbina R, Ortiz-de-Luna RI, Rodríguez-Espino BA, Salamanca-Gómez FA, Flores-Ayón MP, Salamanca-Vargas T, Aguirre-Hernández JA, Cerón-Vázquez E, López-Castillejos J. 2011. Genetic structure of three Native Mexican communities based on mtDNA haplogroups, and ABO and Rh Blood group systems. Revista de Investigación Clínica. 63 (6): 614-620.

McRae AF, Byrne EM, Zhao ZZ, Montgomery GW, Visscher PM. 2008. Power and SNP tagging in whole mitochondrial genome association studies. Genome Research. 18: 911-917.

National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK), *Your Guide to Diabetes: Type 1 and Type 2* (consultado septiembre 2015). Disponible en la página:

<http://www.niddk.nih.gov/health-information/health-topics/Diabetes/your-guide/diabetes/Pages/index>.

Navaglia F, Basso D, Fogar P, Sperti C, Greco E, Zambon C-F, Stranges A, Falda A, Pizzi S, Parenti A, Pedrazzoli S, Plebani M. 2006. Somatic Mutations Are Epiphenomena While the Germline 16519T Variant Worsens Metabolism and Outcome. Am J Clin Pathol. 126: 593-601.

Neel JV. 1962. Diabetes Meliitus: A "Thrifty" Genotype Rendered Detrimental by "Progress"? The American Journal of Human Genetics. 14. 353-362.

Nicholls TJ, Minczuk M. 2014. In D-loop: 40 years of mitochondrial 7S DNA. Experimental Gerontology. 56: 175-181.

Norma Oficial Mexicana NOM-174-SSA1-1998, Para el manejo integral de la obesidad. (consultado diciembre 2015). Disponible en la página:

<http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/174ssa18.html>

Oppenheimer S. 2012. Out-of-Africa, the peopling of continents and Islands: tracing uniparental gene trees across the map. PHILOSOPHICAL TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY. 367 (1590): 770-784.

Organización de las Naciones Unidas para la educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO) (consultado noviembre 2015)

<http://www.unesco.org/uy/phi/aguaycultura/pt/paises/mexico/pueblo-mixes.html>

Organización Mundial de la Salud (OMS), *Diabetes* (consultado septiembre 2015) Disponible en la página:

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/>

Park KS, Chan JC, Chuang LM, Suzuki S, Araki E, Nanjo K, Ji L, Ng M, Nishi M, Furuta H, Shirota T, Ahn BY, Chung SS, Min H-K, Lee SW, Kim JH, Cho YM, Lee KH. 2008. A mitochondrial DNA variant at position 16189 is associated with type 2 diabetes mellitus in Asians. *Diabetología* 51: 602-608.

Park CB, Larsson N-G. 2011. Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *The Journal of Cell Biology*. 193 5: 809-818.

Park KS, Lee KU, Song JH, Choi CS, Shin CS, Park DJ, Kim SK, Koh JJ, Lee HK. 2001. Peripheral Blood mitochondrial DNA content is inversely correlated with insulin secretion during hyperglycemic clamp studies in healthy Young men. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 52 (2): 97-102.

Pakendorf B, Stoneking M. 2005. MITOCHONDRIAL DNA AND HUMAN EVOLUTION. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. 6: 165-83.

Peñaloza-Espinosa RI, Arenas-Aranda D, Cerda-Flores RM, Buentello-Malo L, González-Valencia G, Torres J, Álvarez B, Mendoza I, Flores M, Sandoval L, Loeza F, Ramos I, Muñoz L, Salamanca F. 2007. Characterization of mtDNA Haplogroups in 14 Mexican Indigenous Populations. *Human Biology*. 79 (3): 313-320.

Perego UA, Angerhofer N, Pala M, Olivieri A, Lancioni H, Kashani BH, Carossa V, Ekins JE, Gómez-Carballa A, Huber G, Zimmermann B, Corach D, Babudri N, Panara F, Myres NM, Parson W, Semino O, Salas A, Woodward SR, Achilli A, Torroni A. 2010. The initial peopling of the Americas: A growing number of founding mitochondrial Genomes from Beringia. *Genome Research*. 20: 1174-1179.

Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Garcia R, Shulman GI. 2004. Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE*. 350 (7): 664-671.

Poulton J, Luan J, Macaulay V, Hennings S, Mitchell J, Wareham. 2002. Type 2 diabetes is associated with a common mitochondrial variant: evidence from a population-based case-control study. *Human Molecular Genetics*. 11 13: 1581-1583.

Poulton J, Marchington DR, Scott-Brown M, Phillips DI, Hagelberg E. 1998. Does a common mitochondrial DNA polymorphism underlie susceptibility to diabetes and the thrifty genotype? *Trends in Genetics*. 14 (10): 387-389.

Pravenec M, Hyakukoku M, Houstek J, Zidek V, Lnada V, Mlejnek P, Mlejnek P, Miksik I, Dudová-Mothejzíkova K, Pecina P, Vrbacky M, Drahotka Z, Vojtiskova A, Mracek T, Kazdova L, Oliyarnyk O, Wang J, Ho C, Qi N, Sugimoto K, Kurtz T. 2007. Direct linkage of mitochondrial genome variation to risk factors for type 2 diabetes in conplastic strains. *Genome Research*. 17(9): 1319-26.

Quintana-Murci L, Chaix R, Wells RS, Behar DM, Sayar H, Scozzari R, Rengo C, Al-Zahery N, Semino O, Santachiara-Benerecetti AS, Coppa A, Ayub Q, Mohyuddin A, Tyler-Smith C, Qasim Mehdi S, Torroni A, McElreavey K. 2004. Where west meets east: the complex mtDNA landscape of southwest and Central Asian corridor. *The American Journal of Human Genetics*. 74 (5): 827-845.

Raghavan M, Steinrücken M, Harris K, Schiffels S, Rasmussen S, DeGiorgio M, Albrechtsen A, Valdiosera C, Ávila-Arcos MC, Malaspinas AS, Eriksson A, Moltke I, Metspalu M, Homburger JR, Wall J, Cornejo OE, Moreno-Mayar JV, Korneliussen TS, Pierre T, Rasmussen M, Campos PF, Damgaard P de B, Allentoft ME, Lindo J, Metspalu E, Rodríguez-Varela R, Mansilla J, Henrickson C, Segín-Orlando A, Malmström H, Stafford T Jr, Shringarpure SS, Moreno-Estrada A, Karmin M, Tambets K, Bergström A, Xue Y, Warmuth V, Friend AD, Singarayer J, Valdes P, Balloux F, LeBoreiro I, Vera JL, Rangel-Villalobos H, Pettener D, Luiselli D, Davis LG, Heyer E, Zollikofer CP, Ponce de León MS, Smith CI, Grimes V, Pike KA, Deal M, Fuller BT, Arriaza B, Standen V, Luz MF, Ricaut F, Guidon N, Osipova L, Voevoda MI, Posukh OL, Balanovsky O, Lavryashina M, Bogunov Y, Khusnutdinova E, Gubina M, Balanovska E, Fedorova S, Litvinov S, Malyarchuk B, Derenko M, Mosher MJ, Archer D, Cybulski J, Petzelt B, Mitchell J, Worl R, Norman PJ, Parham P, Kemp BM, Kivisild T, Tyler-Smith C, Sandhu MS, Crawford M, Villems R, Smith DG, Waters MR, Goebel T, Johnson JR, Malhi RS, Jakobsson M, Meltzer DJ, Manica A, Durbin R, Bustamante CD, Song YS, Nielsen R, Willerslev E. 2015. POPULATION GENETICS. Genomic evidence for the Pleistocene and recent population history of Native Americans. *Science*. 349(6250): aab3884.

Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme 1963. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *The Lancet*. 1(1785): 785-789.

Richards M, Macaulay V. The Mitochondrial Gene Tree Comes of Age. 2001. *The American Journal of Human Genetics*. 68: 1315-1320.

Rubicz RC, Melton PE, Crawford MH. 2007. Molecular markers in anthropological Genetic studies. En: Crawford, M. H. (ed.). *Anthropological Genetics*. Chapter 6. Cambridge University Press, Cambridge. Pp. 141-186.

Saldaña Martínez Angélica. 2012. Determinación de la mutación A3243G en el DNA mitocondrial de pacientes con Diabetes tipo 2. Tesis de maestría. CINVESTAV. México, CDMX.

Sandoval K, Buentello-Malo L, Peñaloza-Espinosa R, Avelino H, Salas A, Calafell F, Comas D. 2009. Linguistic and maternal Genetic diversity are not correlated in Native Mexicans. *Human Genetics*. 126 (4): 521-531.

Saxena R, de Bakker PIW, Singer K, Mootha V, Burt N, Hirschhorn JN, Gaudet D, Isomaa B, Daly MJ, Groop L, Ardlie KG, Altshuler D. 2006. Comprehensive Association Testing of Common Mitochondrial DNA Variation in Metabolic Disease. *The American Journal of Human Genetics*. 79: 54-61.

Soares P, Ermini L, Thomson N, Mormina M, Rito T, Röhl A, Salas A, Oppenheimer S, Macaulay V, Richards M. 2009. Correcting for purifying selection: An improved human mitochondrial molecular clock. *American Journal of Human Genetics*. 84 (6): 740-759.

Solano A, Playán A, López P MJ, Montoya J. "Genetic diseases of the mitochondrial DNA". *Salud Pública*. 2001; 43(2):151-161.

Song J, Oh JY, Sung YA, Pak YK, Park KS, Lee HK. 2001. Peripheral Blood mitochondrial DNA content is related to insulin sensitivity in offspring of type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 24 (5): 865-869.

Takasaki S. 2009. Mitochondrial haplogroups associated with Japanese centenarians, Alzheimer's patients, Parkinson's patients, type 2 diabetic patients and healthy non-obese Young males. *Journal of Genetics and Genomics*. 36 (7): 425-434.

Tamm E, Kivisild T, Reidla M, Metspalu M, Smith DG, Mulligan CJ, Bravi CM, Rickards O, Martinez-Labarga C, Khusnutdinova EK, Fedorova SA, Golubenko MV, Stepanov VA, Gubina MA, Zhadanov SI, Ossipova LP, Damba L, Voevoda MI, Dipierri JE, Villems R, Malhi RS. 2007. Beringian Standstill and Spread of Native American Founders. *PLoS ONE*. 9: e829.

Tanaka M, Cabrera VM, González AM, Larruga JM, Takeyasu T, Fuku N, Guo LJ, Hirose R, Fujita Y, Kurata M, Shinoda K, Umetsu K, Yamada YT, Oshida Y, Sato Y, Hattori N, Mizuno Y, Arai Y, Hirose N, Ohta S, Ogawa O, Tanaka Y, Kawamori R, Shamoto-Nagi M, Maruyama W, Shimokata H, Suzuki R, Shimodaira H. 2004. Mitochondrial genome variation in Eastern Asia and the peopling of Japan. *Genome Research*. 14 (10<sup>a</sup>): 1832-1850.

Taylor RW, Turnbull DM. MITOCHONDRIAL DNA MUTATIONS IN HUMAN DISEASE. 2005. *Nat Rev Genet*. 6(5): 389-402.

Torrioni A, Schurr TG, Cabell MF, Brown MD, Neel JV, Larsen M, Smith DG, Vullo CM, Wallace DC. 1993. Asian Affinities and Continental Radiation of the Four Founding Native American mtDNAs. *American Journal of Human Genetics*. 53 (3): 563-590.

Torrioni A, Chen YS, Semino O, Santachiara-Beneceretti AS, Scott CR, Lott MT, Winter M, Wallace DC. 1994. mtDNA and Y-chromosome polymorphisms in four native American populations from southern Mexico. *American Journal of Human Genetics*. 54 (2): 303-318.

Torrioni A, Schurr TG, Cabell, MF, Brown MD, Neel JV, Larsen M, Smith DG, Vullo CM, Wallace DC. 1993. Asian affinities and continental radiation of the four founding native American mtDNAs. *American Journal of Human Genetics*. 53 (3) 563–590.

Tusié Luna MT. 2008. EL COMPONENTE GENÉTICO DE LA DIABETES TIPO 2. *Mensaje Bioquímico*. UNAM. XXXII. Pp. 59-64.

The 1000 Genomes Project Consortium. A map of human genome variation from population-scale sequencing. 2010. *Nature*. 467 (7319): 1061-1073.

Wang PW, Lin TK, Weng SW, Liou CW. 2009. Mitochondrial DNA Variants in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes –Relevance of Asian Population Studies–. *The Review of Diabetic Studies*. 6 (4): 237-246.

Weng SW, TK, Liou CW, Chen SD, Wei YH, Lee HC, Chen IY, Hsieh CJ, Wang PW. 2009. Peripheral Blood mitochondrial DNA content and dysregulation of glucose metabolism. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 83 (1): 94-99.

Weng S-W, Liou C-W, Lin T-K, Wei Y-H, Lee C-F, Eng H-L, Chen S-D, Liu RT, Chen J-F, Chen I-Y, Chen M-H, Wang P-W. 2005. Association of Mitochondrial Deoxyribonucleic Acid 16189 Variant (TC Transition) with Metabolic Syndrome in Chinese Adults. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 90 (9): 5037-5040.

Witas HW, Zawicki P. 2004. Mitochondrial DNA and human evolution: A review. *Anthropological Review* 67: 97-110.

Yasukawa T, Reyes A, Cluett TJ, Yang M-Y, Bowmaker M, Jacobs HT, Holt IJ. 2006. Replication of vertebrate mitochondrial DNA entails transient ribonucleotide incorporation throughout the lagging strand. *European Molecular Biology Organization*. 25 22: 5358-5371.

Ye Zheng, Gillson C, Sims M, Khaw K-T, Plotka M, Poulton J, Langenberg C, Wareham NJ. 2013. The association of the mitochondrial DNA OriB variant (16184-16193 polycytosine tract) with type 2 diabetes in European populations. *Diabetologia*. 56: 1907-1913.

Ye K, Lu J, Ma F, Keinan A, Gu Z. 2014. Extensive pathogenicity of mitochondrial heteroplasmy in healthy human individuals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 111 (29): 10654-10659.

Zarouk WA, Rasian HM, Moguib O, Abdelneam AI, Abd El Razeek AF, Mahmoud MM, Zekrie, ME. 2012. Association of Peripheral Blood Mitochondrial DNA Content with Type 2 Diabetic Patients. *Journal of Applied Sciences Research*. 8 (10): 4958-4963.

## 13. ANEXO.

### *Información técnica*

#### **Buffer de electroforesis TAE**

Solución stock 50x:

242g de Tris base

57.1 ml de ácido acético glacial

37.2 g  $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$

$\text{H}_2\text{O}$  para 1 litro

40 mM de Tris-acetato

2 mM de  $\text{NaEDTA}_2\text{H}_2\text{O}$

pH: 8.5

#### **Buffer de corrida 10x**

20% de Ficoll 400

0.1 M  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , pH: 8

1.0 % de dodecil sulfato de sodio

0.25 % de azul de bromofenol

0.25 % de cianol de xileno

#### **Solución Bromuro de Etidio**

Solución stock 100x:

50 mg de bromuro de etidio

100 ml de  $\text{H}_2\text{O}$

Solución de trabajo: 0.5 mg/ml

Stock diluido 1:1000 para geles o solución de teñido