



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

## FACULTAD DE QUÍMICA

ANÁLISIS DE LA FRECUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS rs9282541  
y rs10991437 DEL GEN *ABCA1* Y rs1800961 DEL GEN *HNF4A* EN  
GRUPOS INDÍGENAS CORA, HUICHOL, TEPEHUANO Y MEXICANERO  
DEL ESTADO DE NAYARIT

## TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

## PRESENTA

MARISOL RAMÍREZ YAUTENTZI

## DIRECTOR DE TESIS

DRA. MARTA ALICIA MENJÍVAR IRAHETA

Ciudad Universitaria, Cd. Mx. 2016





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE: PROFESOR: FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA**

**VOCAL: PROFESOR: MARTA ALICIA MENJÍVAR IRAHETA**

**SECRETARIO: PROFESOR: NURIA VICTORIA SÁNCHEZ PUIG**

**1er SUPLENTE: PROFESOR: MARIA BENITA LEONOR FERNÁNDEZ SALGADO**

**2º SUPLENTE: PROFESOR: TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA**

**EL SIGUIENTE TRABAJO FUE DESARROLLADO EN EL LABORATORIO 202,  
EDIFICIO F DE LA FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.**

**ASESOR DEL TEMA:**

---

**Dra. Marta Alicia Menjívar Iraheta**

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

---

**DRA. KATY ALEJANDRA SÁNCHEZ POZOS**

**SUSTENTANTE:**

---

**MARISOL RAMÍREZ YAUTENTZI**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme una educación de calidad y con buenos principios, por permitirme ser parte de la máxima casa de estudios y de la comunidad universitaria más prestigiada del país, siempre será un orgullo haber sido integrante de ella.

A la Facultad de Química, por los conocimientos aprendidos y las lecciones de vida que me brindó día a día a través de los profesores, compañeros y trabajadores de la Institución. Mi agradecimiento y admiración a cada miembro de la Facultad.

A la Dra. Marta Menjívar Iraheta, por permitirme ser parte de su grupo de investigación y aportar un granito de arena a su admirable proyecto, por su apoyo durante mi estancia en el laboratorio en el servicio social, estancia estudiantil y tesis.

A la Dra. Katy Sánchez Pozos, quien se convirtió en un gran apoyo y ejemplo, por la paciencia, la dedicación y el tiempo invertido en este trabajo. Gracias por los consejos, la confianza y las enseñanzas, con mucho cariño y admiración.

A la Dra. Ángeles Granados Silvestre, por estar siempre disponible para resolver dudas y enseñarme la importancia de hacer las cosas de la mejor manera, muchas gracias.

A los miembros del jurado por sus valiosas aportaciones y recomendaciones.

Al PAPIIT-DGAPA IN208507 por el financiamiento de este proyecto.

# Contenido

<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>1</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>3</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>5</b>
<b>ÍNDICE DE GRÁFICOS</b> .....	<b>5</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>6</b>
<b>I. ANTECEDENTES</b> .....	<b>7</b>
1. VARIABILIDAD GENÉTICA .....	7
1.1 <i>Tipos de variaciones genéticas</i> .....	8
1.1.1 Variantes de un solo nucleótido .....	8
1.1.2 Variaciones estructurales .....	9
2. POLIMORFISMOS Y ENFERMEDADES COMPLEJAS.....	11
2.1 Estudios de asociación .....	13
3. POLIMORFISMOS Y DIABETES TIPO 2 (DT2) .....	16
3.1 <i>Gen ABCA1</i> .....	20
3.1.1 rs9282541 .....	24
3.1.2 rs10991437 .....	25
3.2 <i>Gen HNF4A</i> .....	26
3.1.2 rs1800961 .....	29
4. POBLACIÓN EN ESTUDIO.....	30
4.1 <i>Cora</i> .....	32
4.2 <i>Huichol</i> .....	32
4.3 <i>Tepehuano</i> .....	33
4.4 <i>Mexicanero</i> .....	34
<b>II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>36</b>
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>37</b>
<b>IV. HIPÓTESIS</b> .....	<b>38</b>
<b>V. OBJETIVOS</b> .....	<b>39</b>
OBJETIVO GENERAL .....	39
OBJETIVOS PARTICULARES .....	39
<b>VI. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>40</b>
POBLACIÓN DE ESTUDIO .....	40
DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS ANTROPOMÉTRICOS .....	40
DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS .....	40
EXTRACCIÓN DE ADN .....	41
GENOTIPIFICACIÓN .....	41
ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	41
<b>VII. RESULTADOS</b> .....	<b>42</b>
DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA POBLACIÓN EN ESTUDIO .....	42

RESULTADOS ANTROPOMÉTRICOS Y BIOQUÍMICOS .....	43
RESULTADOS GENÉTICOS.....	47
CORRELACIÓN ENTRE LOS POLIMORFISMOS ESTUDIADOS Y EL PERFIL BIOQUÍMICO .....	50
<b>VIII. DISCUSIÓN .....</b>	<b>62</b>
<b>IX. CONCLUSIONES.....</b>	<b>69</b>
<b>X. REFERENCIAS .....</b>	<b>70</b>
<b>XI. ANEXOS .....</b>	<b>73</b>
ANEXO I .....	73
ANEXO II .....	80
ANEXO III .....	85
ANEXO IV.....	87
ANEXO V .....	91

## **ABREVIATURAS**

**ABCA1:** transportador dependiente de la unión de ATP

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**AFR:** Africana

**ALT:** alanina aminotransferasa

**AMR:** América

**ASN:** Asiática Occidental

**AST:** aspartato aminotransferasa

**ATP:** adenosin trifosfato

**CDI:** Comisión Nacional para el Desarrollo de los Pueblos Indígenas

**cm:** centímetros

**cSNP:** polimorfismo de un solo nucleótido codificante

**DBL:** dominio de unión a ligando

**dNTP:** desoxinucleótidos trifosfatados

**DT1:** Diabetes Tipo 1

**DT2:** Diabetes Tipo 2

**EDTA:** ácido etilendiaminoacético

**EUR:** Europea

**FID:** Federación Internacional de Diabetes

**GAD:** glutamato descarboxilasa

**gSNP:** polimorfismo de un solo nucleótido intergénico

**HDL:** lipoproteína de alta densidad

**HNF1:** Factor nuclear de hepatocito

**ICC:** índice cintura-cadera

**IMC:** índice de masa corporal

**IMSS:** Instituto Mexicano del Seguro Social

**INEGI:** Instituto Nacional de Estadística y Geografía

**IPF-1:** factor promotor de insulina

**iSNP:** polimorfismo de un solo nucleótido intrónico

**K<sub>ATP</sub>**: canal de potasio dependiente de ATP  
**Kg**: kilogramos  
**LDL**: lipoproteína de baja densidad  
**mARN**: ácido ribonucleico mensajero  
**mg/dl**: miligramos sobre decilitro  
**Mg<sup>2+</sup>**: ion magnesio  
**mmHg**: milímetros de mercurio  
**MODY**: diabetes de aparición en la madurez joven  
**MYA**: maya  
**NBD**: dominio de unión a nucleótido  
**ng/μl**: nanogramos sobre microlitro  
**NR**: receptor nuclear  
**NR2A1**: receptores nucleares de hormonas esteroideas/tiroideas  
**nsSNP**: polimorfismo de un solo nucleótido "sinónimo"  
**OD**: densidad óptica  
**P1/P2**: promotor ½  
**pb**: pares de base  
**PAS**: presión arterial sistólica  
**PAD**: presión arterial diastólica  
**PCR**: reacción en cadena de la polimerasa  
**rSNP**: polimorfismo de un solo nucleótido regulador  
**SDS**: dodecil sulfato de sodio  
**SNP**: polimorfismo de un solo nucleótido  
**SRT**: repeticiones cortas en tándem  
**sSNP**: polimorfismo de un solo nucleótido "no sinónimo"  
**UTR**: región no traducida  
**UV**: ultravioleta-visible  
**VLDL**: lipoproteína de muy baja densidad  
**VNTR**: número variable de repeticiones en tándem

## Índice de tablas

Tabla 1. Ejemplo de polimorfismos asociados a enfermedades complejas .....	15
Tabla 2. Ejemplo de polimorfismos asociados a enfermedades metabólicas...	17
Tabla 3. Descripción de los principales polimorfismos asociados a DT2 .....	19
Tabla 4. Frecuencia alélica del rs9282541 en poblaciones del mundo .....	25
Tabla 5. Frecuencia alélica del rs10991437 en poblaciones del mundo.....	25
Tabla 6. Frecuencia alélica del rs1800961 en poblaciones del mundo .....	29
Tabla 7. Número de hablantes indígenas en el estado de Nayarit de acuerdo al grupo al que pertenecen.....	30
Tabla 8. Distribución geográfica de los grupos indígenas en estudio .....	42
Tabla 9. Características generales de la población en estudio. ....	44
Tabla 10. Comparación de parámetros antropométricos y bioquímicos de todos los grupos indígenas .....	46
Tabla 11. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo rs9282541 en población de estudio .....	47
Tabla 12. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo rs10991437 en la población estudiada .....	48
Tabla 13. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo rs1800961 en la población estudiada .....	49
Tabla 14. Frecuencia alélica de las variantes rs9282541, rs10991437 y rs1800961 de los grupos indígenas del Estado de Nayarit, población maya, mestizo-mexicano y la base de datos 1000 Genomas.....	50
Tabla 15. Relación de las concentraciones séricas de glucosa, colesterol, triglicéridos y HDL-C con la variante rs9282541 en el grupo Huichol, de acuerdo a los modelos de herencia .....	51
Tabla 16. Relación de las concentraciones séricas de glucosa, colesterol, triglicéridos y HDL-C con la variante rs9282541 en grupo Cora, de acuerdo a los modelos de herencia .....	52
Tabla 17. Relación de las concentraciones séricas de glucosa, colesterol, triglicéridos y HDL-C con la variante rs9282541 en grupo Tepehuano, de acuerdo a los modelos de herencia .....	53
Tabla 18. Relación de las concentraciones séricas de glucosa, colesterol, triglicéridos y HDL-C con la variante rs9282541 en grupo Mexicanero, de acuerdo a los modelos de herencia .....	54

Tabla 19. Relación de las concentraciones séricas de glucosa, colesterol, triglicéridos y HDL-C con la variante rs10991437 en grupo Huichol, de acuerdo a los modelos de herencia. ....	55
Tabla 20. Relación de las concentraciones séricas de glucosa, colesterol, triglicéridos y HDL-C con la variante rs10991437 en grupo Cora, de acuerdo a los modelos de herencia. ....	56
Tabla 21. Relación de las concentraciones séricas de glucosa, colesterol, triglicéridos y HDL-C con la variante rs10991437 en grupo Tepehuano, de acuerdo a los modelos de herencia. ....	57
Tabla 22. Relación de las concentraciones séricas de glucosa, colesterol, triglicéridos y HDL-C con la variante rs10991437 en grupo Mexicanero, de acuerdo a los modelos de herencia. ....	58
Tabla 23. Relación de las concentraciones séricas de glucosa, colesterol, triglicéridos y HDL-C con la variante rs1800961 en el grupo Huichol, de acuerdo a los modelos de herencia. ....	59
Tabla 24. Relación de las concentraciones séricas de glucosa, colesterol, triglicéridos y HDL-C con la variante rs1800961 en el grupo Cora, de acuerdo a los modelos de herencia. ....	59
Tabla 25. Relación de las concentraciones séricas de glucosa, colesterol, triglicéridos y HDL-C con la variante rs1800961 en el grupo Tepehuano, de acuerdo a los modelos de herencia. ....	60
Tabla 26. Relación de las concentraciones séricas de glucosa, colesterol, triglicéridos y HDL-C con la variante rs1800961 en el grupo Mexicanero, de acuerdo a los modelos de herencia. ....	61

## Índice de figuras

Figura 1. Sustitución de un solo nucleótido, tipo transversión y transición. ....	8
Figura 2. Alelos comunes con diferente número de repetidos en tándem tipo SRT .....	10
Figura 3. Clasificación de los SNP funcionales.....	12
Figura 4. Influencia de factores genéticos y ambientales en las enfermedades complejas.....	13
Figura 5. Proteínas tejido-específicas codificadas por el gen <b>ABCA1</b> . ....	20
Figura 6. Estructura de la proteína ABCA1 .....	21
Figura 7. Mecanismo de interacción de apoA-I con ABCA1 .....	23
Figura 8. Estructura del gen <b>HNF4A</b> .. .....	26
Figura 9. Función de la proteína HNF4a.. .....	28
Figura 10. Localización geográfica de las comunidades estudiadas: Huichol, Cora, Tepehuano y Mexicanero. ....	31
Figura 11. Gel de agarosa al 1.5% para verificación de la integridad de ADN	90
Figura 12. Fundamento de q-PCR por el método específico de hibridación con sondas Taqman.....	93

## Índice de gráficos

Gráfico 1. Distribución general de la población .....	42
---	----



## RESUMEN

México es considerado uno de los países con mayor diversidad cultural, lleno de tradiciones y lenguas únicas que reflejan la riqueza natural. Cuenta con 10,253,627 indígenas distribuidos en 68 etnias, entre las cuales destacan los grupos Cora, Huichol, Tepehuano y Mexicanero presentes en el estado de Nayarit, los cuales se encuentran entre los grupos más conservados genéticamente, pues debido a su ubicación geográfica se ha propiciado su aislamiento.

La presencia de factores de riesgo genéticos, como los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), aportan cierta susceptibilidad a padecer enfermedades metabólicas como la diabetes tipo 2 (DT2). Algunas de las variantes que han sido asociadas a dicha enfermedad son: rs9282541 del gen **ABCA1** y la variante rs1800961 del gen **HNF4A**. El polimorfismo rs10991437 en el gen **ABCA1**, se ha relacionado con índice cintura-cadera, factor de riesgo para DT2, pero su asociación con la enfermedad aún no se tiene claro. Debido al número de afectados, a la vulnerabilidad de los grupos indígenas y al factor de riesgo genético asociado a padecer DT2, el objetivo del presente trabajo fue determinar la frecuencia de los polimorfismos rs9282541 y rs10991437 del gen **ABCA1** y el rs1800961 del gen **HNF4A** en los grupos étnicos Cora, Huichol, Tepehuano y Mexicanero del estado de Nayarit, y su relación con parámetros bioquímicos alterados como factores de riesgo para desarrollar DT2. A través de datos antropométricos y bioquímicos se caracterizaron a 228 individuos indígenas, se extrajo el ADN a partir de sangre total y se genotipificaron mediante PCR en tiempo real y sondas TaqMan®. Los parámetros antropométricos indicaron la presencia de sobrepeso y obesidad central en los grupos nayaritas. Respecto a los parámetros bioquímicos, los grupos mostraron altas concentraciones de triglicéridos y bajas concentraciones de HDL-C. Las frecuencias alélicas encontradas mostraron diferencias respecto a la población mestizo mexicana, así como a la reportada en el proyecto de 1000 Genomas. Además, se identificó la presencia de posibles factores de riesgo genéticos para padecer enfermedades metabólicas, como la DT2, de acuerdo a su relación con parámetros bioquímicos. Los estudios descriptivos en los grupos indígenas son el primer paso para identificar factores genéticos propios de la población, que permitirán continuar con la búsqueda de marcadores genéticos de riesgo a padecer DT2, que nos ayuden a tomar medidas preventivas y de control de progresión de la enfermedad.



# I. ANTECEDENTES

## 1. Variabilidad genética

El genoma nuclear humano se ha definido como una estructura compleja, contiene  $3.2 \times 10^9$  nucleótidos, compuestos por cuatro unidades repetidas, organizadas en el interior del núcleo en forma de un largo polímero de dos metros, cubierto por unidades octaméricas de histonas. El complejo sistema permite el acceso de varias proteínas a la doble cadena de ADN, regulando así la síntesis de éste y la expresión de genes en respuesta a la estimulación interna y externa ejercida sobre la célula <sup>[1]</sup>. El ADN contiene la información genética que permite a la mayoría de los organismos vivientes realizar sus funciones, crecer y reproducirse.

Los estudios genéticos se enfocan principalmente en las variantes de secuencia del ADN entre individuos y que se heredan a través de generaciones, las cuales contribuyen a la susceptibilidad de una enfermedad, un resultado clínico o a la respuesta a un tratamiento<sup>[1]</sup>.

Las variantes genéticas ocurren por cambios en la secuencia de bases que pueden ser clasificados en dos categorías:

- a) Cambios en la secuencia de ADN que no afectan el fenotipo, por ejemplo, el reemplazo de un solo nucleótido por otro nucleótido diferente o translocaciones e inversiones de varios nucleótidos, que no producen una ganancia o pérdida neta en la secuencia, y por tanto, no tienen ningún efecto sobre el fenotipo.



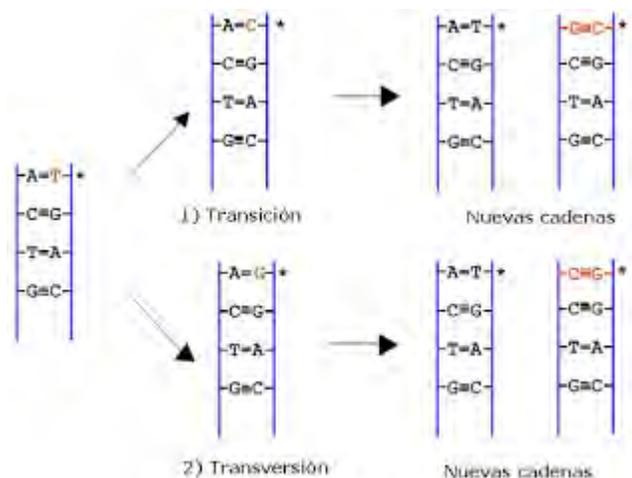
b) Cambios en la secuencia de ADN que provocan una pérdida o ganancia neta, por ejemplo, cambio en el número de copias de la secuencia de ADN que puede provocar desde una deleción o inserción de un sólo nucleótido hasta una segregación anormal de cromosomas.

Por lo general, los cambios más comunes de ADN son a pequeña escala e involucran un solo nucleótido, por lo que son llamadas **variantes de un solo nucleótido**, y a menudo no presentan ningún efecto sobre el fenotipo [2].

## 1.1 Tipos de variaciones genéticas

### 1.1.1 Variantes de un solo nucleótido

La sustitución de un solo nucleótido es el tipo de cambio más común, en el cual el cambio de nucleótido puede suceder entre bases del mismo tipo, por ejemplo de una purina a otra (adenina a guanina), que es llamada transición; o de una purina a pirimidina (guanina a citosina), que es llamada transversión (Figura 1) [2].



**Figura 1. Sustitución de un solo nucleótido, tipo transversión y transición.**



Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) son un caso específico de sustitución de un sólo nucleótido, que se presentan de manera común en la población. De esta manera, un SNP es definido como una variación en la secuencia que se presenta con una frecuencia de al menos 1% en la población. Se estima que existen de 3 a 10 millones de variantes tipo SNP en el genoma humano con una frecuencia mayor al 1% [3].

### **1.1.2 Variaciones estructurales**

#### 1.1.2.1 Inserción y duplicación

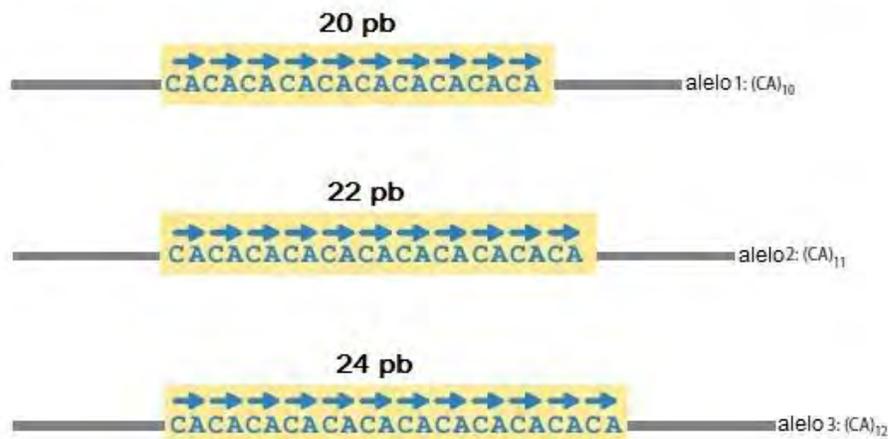
Otra forma común de variación genética incluye las inserciones, deleciones e inversiones de una o más bases. Las estimaciones sugieren que del 5-10% del genoma es duplicado una o varias veces. Estas regiones incluyen segmentos relativamente largos de ADN de 10 a 400 Kb que están duplicadas varias veces en todo el genoma, así como segmentos cortos (1-5 pb), dispersos y repetidos en tándem. Estos últimos muestran una alta tasa de inserciones y deleciones y comúnmente muestran variaciones polimórficas, con la diferencia de que se muestran distintos números de *repeticiones cortas en tándem* (STR) en la secuencia, como  $(A)_n$ ,  $(CA)_n$  o  $(AAG)_n$ , donde  $n$  es el número de repeticiones (Figura 2) [3].

Las repeticiones de microsatélites o STR son una fuente importante de marcadores que han servido de apoyo para mapear genes asociados a enfermedades. En general, se caracterizan por ser selectiva y funcionalmente neutrales, siendo la secuencia con mayor número de repeticiones el dinucleótido  $(CA)_n$ , el cual está presente en 50,000-100,000 sitios por genoma. Los repetidos  $(CA)_n$  se presentan cada 30-60Kb, de las cuales 8,000 han sido identificadas y reportadas en las bases de datos del genoma humano.



Algunos STR no son biológicamente neutrales debido a que se localizan en regiones funcionales importantes en el genoma y dan lugar a ciertas enfermedades. Las repeticiones de trinucleótidos de este tipo generan anormalmente grandes alelos que interfieren con la expresión o función del gen asociado. Entre ellos se pueden mencionar el trinucleótido  $(CAG)_n$ , que se localiza en regiones exónicas y se ha asociado a 14 desórdenes neurológicos; y el motivo CTG, el cual se localiza en la región **3'UTR** del gen *DMPK*, interfiriendo en su expresión y asociándose a distrofia miotónica .

Otra clase de repetidos son los minisatélites o número variable de repeticiones en tándem (VNTR), los cuales consisten en secuencias repetidas de 5-64 pb que algunas veces se extienden por varias kilobases de ADN y se presentan en más de 10,000 sitios a lo largo del genoma. En comparación con los microsatélites, los VNTR se encuentran distribuidos de forma menos regular, sin embargo, resultan ser marcadores altamente informativos [2, 3].



**Figura 2. Alelos comunes con diferente número de repetidos en tándem tipo SRT [2]**

Las pequeñas inversiones en la secuencia son comunes, la mayoría no tienen consecuencias funcionales, a menos que sucedan en el gen.

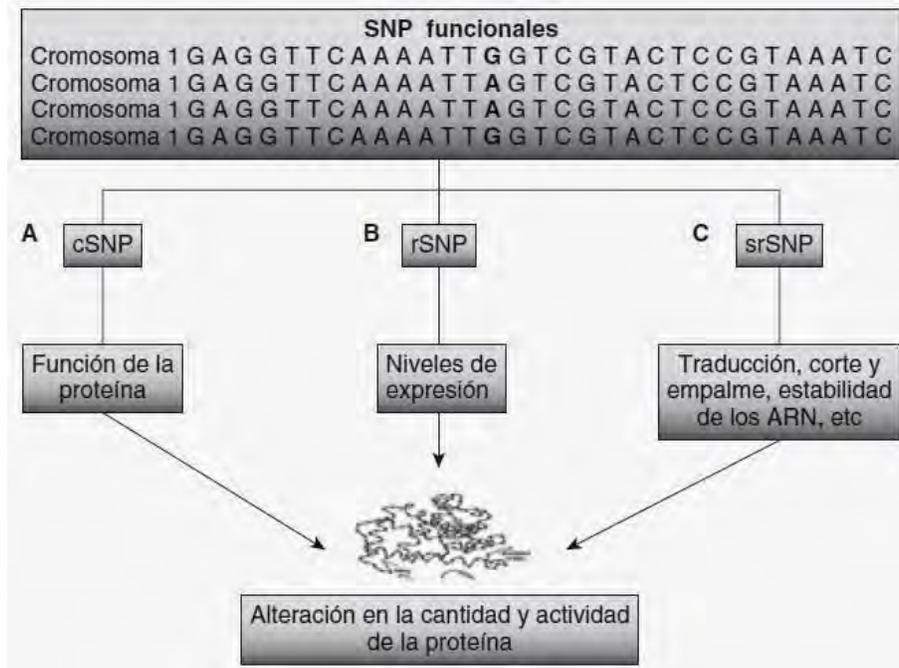


Por otro lado, la inversión de un segmento largo de cromosoma es menos común pero suele dar lugar a enfermedades. Ejemplo de ello es la hemofilia A ligada a X, la cual está asociada a la deficiencia del factor VIII C involucrado en procesos de coagulación de la sangre. Tal deficiencia se debe a la inversión en el gen asociado al factor VIII de la coagulación, F8C <sup>[3]</sup>.

## 2. Polimorfismos y enfermedades complejas

La variabilidad fenotípica de cada individuo, así como la susceptibilidad o la resistencia individual a distintas enfermedades radica principalmente en los **SNP's y en menor grado a inserciones, deleciones, secuencias repetidas y/o** rearreglos cromosómicos <sup>[4]</sup>.

Se ha estimado que en la población mundial existen más de 10 millones de polimorfismos. El efecto de éstos depende de su importancia funcional y su localización. Los SNP funcionales se han dividido en rSNP, srSNP y cSNP, afectando la cantidad y actividad de las proteínas codificadas (Figura 4) <sup>[5, 6]</sup>. Los rSNP se encuentran en los promotores de los genes que sintetizan proteínas y afectan a los niveles de expresión génica <sup>[7]</sup>. Mientras que los srSNP se encuentran tanto en los mRNA primarios como los secundarios, incluyendo **a las regiones no traducidas (5'UTR y 3'UTR), regiones intrónicas y** codificantes (sin que ocurra el cambio de aminoácido), llegando a afectar a la estructura y función de los ARN, incluyendo el corte y empalme, la regulación de la traducción de los mRNA a proteínas, la funcionalidad de las proteínas y la estabilidad de los mRNA, la poliadenilación de los mRNA, entre otros procesos biológicos de las células <sup>[5, 7, 8]</sup>. Por su parte, los cSNP se encuentran en los exones y se subdividen en sinónimos (cuando no hay cambio de aminoácido) y no sinónimos (cuando hay cambio de aminoácido), los cuales son el tipo de SNP más estudiado debido al impacto que representa cambiar un aminoácido a otro y su participación en el desarrollo de patologías multifactoriales <sup>[4, 9-11]</sup>.



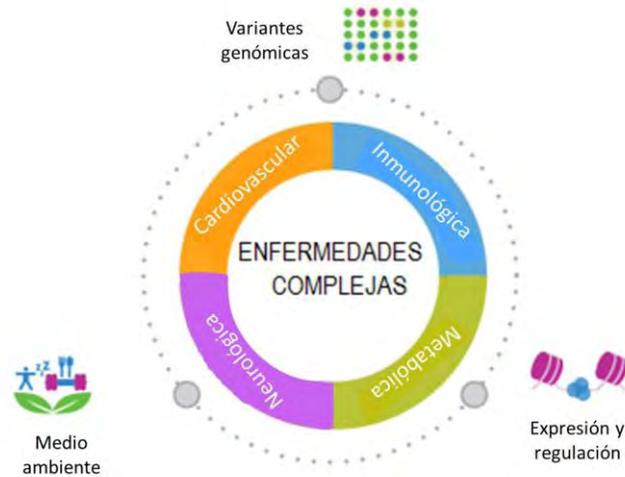
**Figura 3. Clasificación de los SNP funcionales:** a) cSNP, sinónimos y no sinónimos que se encuentran en exones; b) rSNP, que afectan a la expresión génica; y los c) srSNP, afectan a la estructura y función de los mRNA [4]

El estudio de los polimorfismos tiene aplicaciones diversas; por un lado sirven para tratar de explicar el origen de las poblaciones y así reconstruir parte de la historia evolutiva. Por otro, tienen gran aplicación en campos como la medicina forense y en el estudio de las enfermedades multigénicas [4].

Las enfermedades complejas, a diferencia de las enfermedades monogénicas mendelianas, son causadas por el efecto de varios genes, de la interacción entre ellos y con el medio ambiente (Figura 4). El tener el cambio en el gen no causa la enfermedad, sino que modifica el riesgo a padecerla. Identificar a los genes y a sus variantes alélicas responsables de la variación en rasgos complejos de importancia médica, y determinar su contribución al riesgo de padecer la enfermedad en diferentes ambientes constituye uno de los retos para la biología molecular [12].



Así, el diseño del estudio y la utilización de los métodos de análisis apropiados, son puntos críticos en la identificación de variantes genéticas. La principal estrategia utilizada para la identificación de genes y polimorfismos relacionados con enfermedades o rasgos ha sido el estudio de asociación [12].



**Figura 4. Influencia de factores genéticos y ambientales en las enfermedades complejas [13]**

## 2.1 Estudios de asociación

Los estudios de asociación permiten detectar la relación entre uno o más polimorfismos y algún rasgo, el cual puede ser una característica cuantitativa o una enfermedad. A diferencia de los estudios de ligamiento, la asociación se presenta cuando los mismos alelos son asociados con algún rasgo en toda la población, mientras que el ligamiento permite la asociación de diferentes alelos con algún rasgo en diferentes familias [14].

Los estudios de asociación son el tipo de estudio más fácil de analizar y el más poderoso, pero la dificultad recae en la identificación de los polimorfismos candidato. Una mutación en un codón que conduce a un cambio de aminoácido es una variante candidato. Sin embargo, es probable que existan variantes responsables de la heredabilidad de enfermedades complejas comunes que no



sean codificadas. Por ejemplo, algunas variantes pueden causar modificaciones en la expresión y regulación del gen. Los estudios de asociación directa sólo tienen el potencial de descubrir algunas de las variantes genéticas de la enfermedad. Pero son factibles debido a la frecuencia de los polimorfismos y a que conducen a un cambio de aminoácido <sup>[14]</sup>.

Algunas enfermedades crónicas comunes con inicio en la vida adulta muestran agregación familiar, y aunque por lo general no siguen los patrones de herencia mendelianos, se transmiten de generación en generación. Tales condiciones incluyen la enfermedad coronaria, hipertensión, diabetes, obesidad, Alzheimer, Parkinson, cáncer, entre otras. En dichas enfermedades, sólo una pequeña fracción (1-7%) de los individuos afectados debe su origen a una sola mutación en el gen por transmisión Mendeliana, además de que presentan manifestaciones graves a temprana edad. Estos casos han sido relevantes para la comprensión de las enfermedades complejas, sin embargo, el mecanismo genético del resto de los casos aún no se ha elucidado <sup>[15, 16]</sup>.

Con base en ello, se han realizado muchos estudios con el fin de relacionar los polimorfismos genéticos con diversas enfermedades, pero han sido pocos los que presentan resultados replicables válidos <sup>[15]</sup>. Algunos SNPs asociados a enfermedades complejas se presentan a continuación (Tabla 1).

**Tabla 1. Ejemplo de polimorfismos asociados a enfermedades complejas [3]**

Locus	Alelo	Característica	Efecto	Comentarios
<b>Cardiovascular</b>				
APOE	*E4	Alzheimer	Inicio temprano	Se ha observado en poblaciones de todo el mundo; puede explicar el 20% de los casos de Alzheimer
		Degeneración macular relacionada con la edad	Disminuye riesgo	Tiene efecto protector en la degeneración macular relacionada con la edad
		Enfermedad cardiovascular	Incrementa el riesgo	Se asocia a problemas de colesterol en el 10-16% de la población occidental; aumenta el riesgo de enfermedades cardiovasculares (OR 1.5)
F5	R506Q	Trombosis venosa	Aumenta el riesgo	Los portadores tienen 10% más de riesgo a padecer trombosis venosa
<b>Metabólica/nutricional</b>				
PPARG	P12A	Diabetes tipo 2	Aumenta el riesgo	Riesgo relativo 1.25
HFE	C282Y	Hemocromatosis	Riesgo de 40% para homocigotos	Alta frecuencia en caucásicos, bajo en asiáticos, sugiere que se debe a una mutación reciente
CFTR	F508	Fibrosis quística	Homocigotos afectados	Explica el 66% de fibrosis quística en caucásicos, >1000 alelos han sido encontrados
<b>Cáncer</b>				
ELAC2	S217/A541T	Cáncer de próstata	Aumenta el riesgo	OR 2.4-3.1
BRCA2	N372H	Cáncer de mama	Aumenta el riesgo	Riesgo relativo 1.31 para portadores homocigotos comparado con no portadores
<b>Infeccioso / Inflamatorio</b>				
MHC clase I	HLA.B*2702, 04, 05	Espondilitis anquilosante	Aumenta el riesgo	OR 1.79; asociado con artritis y uveítis; cerca del 2% de portadores B27-positivo desarrollan espondilitis anquilosante
MHC clase II	DQB1*0302 DRB1*0401 DQB1*0201 DRB1*03	Diabetes tipo 1	Aumenta el riesgo	Riesgo relativo 2.0 (europeos)Cerca del 10% de heterocigotos llegan a desarrollar DT1
IL12B	3'UTR alelo1	Diabetes tipo 1	Aumenta el riesgo	Interacción con HLA; incrementa la expresión de IL12B in vitro
NOD2		Enfermedad inflamatoria intestinal	Aumenta el riesgo	Poblaciones orientales, excepto japoneses, muestran 3 variantes comunes que los predisponen a la enfermedad inflamatoria intestinal.
G6PD	A (V68M/N125D)	Deficiencia de G6PD	Disminuye riesgo	
HBB	HGS (E6V)	Anemia	Disminuye riesgo	
CCR5	32-CCR5	VIH	Disminuye transmisión de VIH	De origen reciente
<b>De desarrollo</b>				
PDGFRA	Promotor H1/H2alpha, haplotipos	Defecto del tubo neural	Incrementa el riesgo	Se han reportado al menos 6 sitios polimórficos en cada haplotipo
MTHFR	A222V	Defecto del tubo neural	Incrementa el riesgo	Interacción entre genotipo y medio ambiente (dieta de folato)



### **3. Polimorfismos y diabetes tipo 2 (DT2)**

Las enfermedades metabólicas como la obesidad, diabetes y síndrome metabólico se han convertido en un problema de salud pública ya que gran parte de la población mundial las padece. Entre los síntomas que se presentan en estos padecimientos se encuentran: astenia, disnea, dificultad para dormir, artralgias, sudor excesivo, sensación constante de calor, poliuria, polifagia, pérdida de peso, cefalea frecuente, resequedad e infecciones frecuentes en la piel y depresión. Sin embargo, uno de los principales problemas de las enfermedades metabólicas es que sus etapas iniciales son silenciosas, por lo que son diagnosticadas tardíamente y causan daños irreversibles en diferentes órganos y sistemas, conduciendo a complicaciones como la ceguera, insuficiencia renal, amputaciones de miembros, infartos al miocardio y un deterioro en la calidad de vida <sup>[17]</sup>.

Actualmente, las herramientas para el análisis del genoma son altamente poderosas y necesarias para entender la complejidad de las rutas del metabolismo de carbohidratos y lípidos, así como de los procesos inflamatorios involucrados en este tipo de enfermedades <sup>(12)</sup>. Se ha documentado que el componente genético juega un papel crucial en el desarrollo de las enfermedades metabólicas. Los estudios familiares que examinan la heredabilidad han demostrado la transmisión de estas enfermedades a través de generaciones en familias. Sin embargo, las formas comunes son consideradas enfermedades complejas, en las que participan factores genéticos y ambientales <sup>[17, 18]</sup>.



Entre los factores genéticos asociados a enfermedades metabólicas se han identificado polimorfismos involucrados en el metabolismo, los cuales afectan el índice de masa corporal (IMC), los niveles de insulina, colesterol y lípidos, entre otros <sup>[17]</sup> (Tabla 2).

**Tabla 2. Ejemplo de polimorfismos asociados a enfermedades metabólicas <sup>[17]</sup>**

<b>Fenotipo</b>	<b>Gen</b>
Índice de masa corporal/Obesidad	<i>FTO, LEP, LEPR, MC4R, SEC16B, ANKRD7, BDNFOS, TMEM18, PCSK1, SH2B1, KCTD15, SOCS3, PPARGC1A, MSRA, TFAP2B</i>
Diabetes tipo 2/Secreción y resistencia a la insulina	<i>SLC16A11, TCF7L2, SLC16A13, CDKAL1, ARAP1, KCNQ1, MADD, KCNJ11, ADIPOQ, SLC30A8, CDKAL1, IGF2BP2, ITGBL1, PPARG, OLFM4</i>
Colesterol HDL	<i>ABCA1, APOB, APOC1, HERPUD1, LDLR, RPL28P4</i>
Síndrome metabólico	<i>BDNF, ZNF259, VDR, MTHFR, CYP2C19, AKT1</i>
Hipertensión	<i>ARHGAP42, ATP2B1, UMOD, LEPR, ADIPOQ</i>
Hiperglicemia	<i>ZNF259, LPL, GCKR, GCK, BTN2A1</i>

La DT2 pertenece a un grupo de alteraciones metabólicas, como se mencionó anteriormente. Se caracteriza por hiperglucemia persistente debido a la resistencia a la acción de la insulina o por la deficiencia en la producción de la misma, afectando el metabolismo de los carbohidratos, proteínas y grasas. La DT2 tiene un origen complejo y multifactorial, asociándose principalmente con obesidad, concentración elevada de triglicéridos, baja concentración de colesterol HDL-C y resistencia a la acción de la insulina <sup>[19, 20]</sup>.



Las formas menos comunes de la DT2 presentan herencia autosómica dominante (formas mendelianas). Este subtipo de diabetes, generalmente de inicio temprano se denomina MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young). Se han descrito distintos genes causales de la diabetes tipo MODY, como son el gen que codifica para la enzima glucocinasa, regulador importante de la secreción de insulina por el páncreas, y otros genes más que codifican para factores transcripcionales involucrados en la expresión del gen de la insulina, además de genes pancreáticos (*HNF4A*, *HNF1A*, *HNF1B*, *IPF-1* y *Beta2/NeuroDI*) <sup>[21]</sup>.

Las formas más comunes de la enfermedad presentan un tipo de herencia complejo, lo que implica la participación de múltiples genes (genes de susceptibilidad) y la influencia de factores ambientales en la expresión del padecimiento <sup>[22]</sup>. En la Tabla 3 se mencionan algunos de los polimorfismos más frecuentes asociados con la DT2.



**Tabla 3. Descripción de los principales polimorfismos asociados a DT2 [23]**

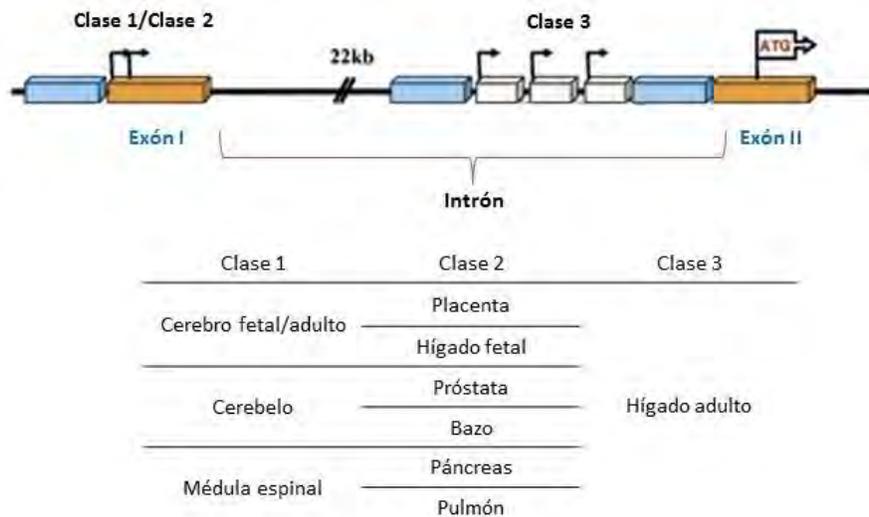
Cromosoma	Gen Símbolo	Nombre	Función	Variante	Efecto del alelo de riesgo	Población	Referencia
10q23.33	HHEX	Human Hematopoietically expressed homeobox	Factor de transcripción; desarrollo de hígado y páncreas	rs1111875	↓Función de la célula β ↓Sensibilidad a la insulina DT2	Japonesa Germana	Horikoshi y cols. (Diabetología, 2007) Schulze y cols (Diabetología, 2007)
20q13.12	HNF4A	Hepatocyte Nuclear Factor 4. Alpha	Factor de transcripción: metabolismo intermedio de glucosa, colesterol, ac. grasos	rs1800961 T130I	↓Secreción de insulina DT2	Finlandesa; Judía-Ashkenasi Amish Mexicana	Silander y cols (Diabetes 2004) Love y cols (Diabetes 2004) Damcott y cols (Brief Ge Rep, 2004) Menjívar y cols (Clín Genetic, 2008)
11p.15.1	KCNJ11	Potassium Inwardly-rectifying Channel, subfamily J member 11	Canal iónico permite la salida de potasio. Secreción de insulina	rs5219 E23K	↓Secreción de insulina; ↓función de la célula β DT2	Caucásica- Francesa Reino Unido Danesa	Hani y cols (Diabetología, 1998) Barroso y cols (Plos Biol, 2003) Schwanstecher y cols (Diabetes, 2002)
3p25	PPARc	Peroxisome Proliferator- activated Receptor c	Factor de transcripción; diferenciación de adipocitos	rs1805192 Pro12Ala	↓Sensibilidad a la insulina en tejido adiposo DT2	Escandinava Japonesa Japonesa- Americana Meta-análisis Finlandesa	Altshuler y cols (Nat. Genet, 2000) Mori y cols (Diabetes, 2001) Deep y cols (Nat. Genet, 1998) Gloyn y cols. (Diabetes, 2003) Douglas y cols. (Diabetes, 2001)
9p21	CDKN2A/2B	Cyclin dependent kinase inhibitor	Gen, supresor de tumor, inhibe a la cinasa dependiente de ciclina 4 (CDK4)	rs10811661	↓Secreción de insulina; función de la célula b	Danesa Noruega Francesa Coreana Japonesa China Mexicana	Grarup y cols. (Diabetes, 2007) Hertel y cols. (Diabetología, 2008) Duesing y cols (Diabetología, 2008) Lee y cols (J Hum Genet, 2008) Tabara y cols (Diabetes, 2009) Wu y cols (Diabetes, 2008) Gamboa y cols (Diabetes, 2012)
8q24.11	SLC30A8	Solute Carrier Family 30	Transportador de zinc en varios tejidos. En páncreas transporta Zinc al interior de las vesículas secretoras de insulina	rs13266634 R225W	↓Secreción de insulina ↓Alteración de la conversión de proinsulina a insulina	Finlandesa Sueca Árabe de Túnez Alemana	Saxena y cols (Science, 2007) Salem y cols (BMC, Endo Dis, 2014) Kirchhoff y cols (Diabetología, 2008)
10p13	CDC123/CAMK1D	Cell división cycle protein 123/calcium/calmodulin-dependent protein kinase 1D)	División del ciclo celular	rs12779790	↓Función de la célula β	Europea Este de Asia Sur de Asia Mexicana	Zeggini y cols (Nat Genet, 2008) Shu y cols (PLos genet, 2008) Kooner y cols (Nat Genet, 2011) Gamboa y cols (Diabetes, 2012)
10q25.3	TCF2	T-cell Factor 7-like 2	Regulación de la expresión del gen de proglucagon	rs7903146	↓Concentración y secreción de insulina	Islandesa Danesa Norteamericana Caucásica	Gran y cols (Nature, 2006) Sladek y cols (Nature, 2007)
9q31.1	ABCA1	ATP-binding cassette transporter A1	Transporte de colesterol y fosfolípidos a través de la membrana plasmática	rs9282541 R230C	↑Índice de masa corporal ↓HDL-C colesterol DT2	Mexicana	Villareal-Molina y cols (Diabetes, 2007) Villarreal-Molina (Diabetes, 2008)
17p13.1	SLC16A11	Solute carriers 16A11	Transportador de monocarboxilatos	rs13342692 D127G	Desconocido	Mexicana	SIGMA consortium (Nature, 2013)



En este caso nos enfocaremos en el estudio de los genes *ABCA1* y *HNF4A* debido a que la variante rs9282541 se ha caracterizado como propia de la población mestiza-mexicana y a que la variante rs1800961 en *HNF4A* se ha asociado con diabetes de aparición temprana en población mestiza-mexicana e indígena, lo cual nos sugiere que variantes en estos genes forman parte del componente genético de susceptibilidad a diabetes tipo 2 en población mexicana.

### 3.1 Gen *ABCA1*

El gen *ABCA1* comprende 147 Kb y tiene 50 exones, codifica para una proteína de membrana de 2661 aminoácidos, cuya función principal es transportar colesterol y fosfolípidos a través de la bicapa lipídica en forma dependiente de ATP. El gen produce cuatro diferentes transcritos que codifican para tres proteínas diferentes [24]. De acuerdo a la clase de transcrito, estos se pueden expresar en diferentes tejidos específicos: cerebro fetal y adulto, cerebelo, hígado fetal y adulto, bazo, páncreas, pulmón, principalmente (Figura 5).

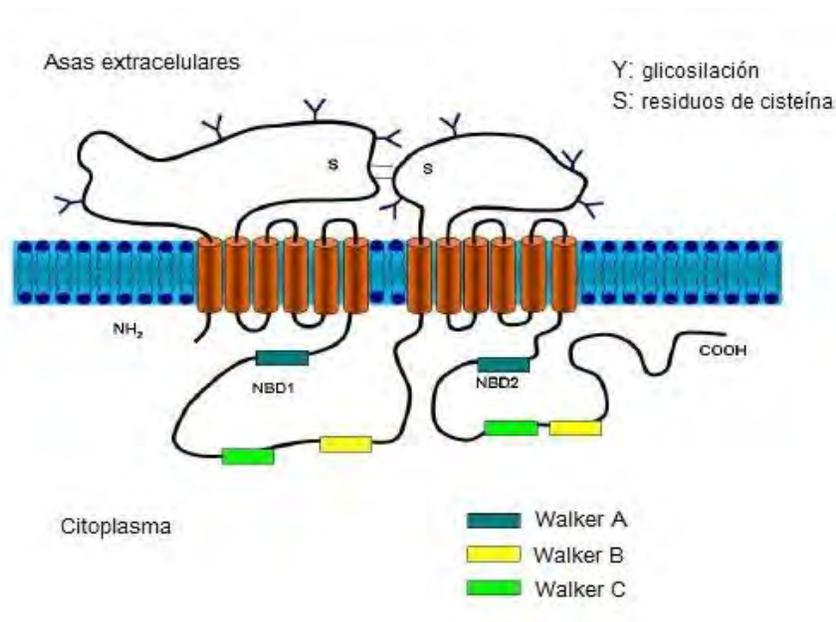


**Figura 5. Proteínas tejido-específicas codificadas por el gen *ABCA1*.** Transcritos clase1/2 tienen su sitio de inicio en el exón 1, se expresan en cerebro, médula espinal, placenta, hígado fetal, páncreas, pulmón. Transcritos clase 3 se expresan en hígado adulto y tienen su sitio de inicio en el primer intrón del gen. [25]



Pertenece a la superfamilia ABC (ATP-binding cassette), ABCA1 se expresa en hepatocitos, enterocitos, y adipocitos, en donde se encuentra involucrada en la generación de lipoproteínas de alta densidad (HDL). Mientras que en los macrófagos, es la encargada del transporte reverso del colesterol [25, 26].

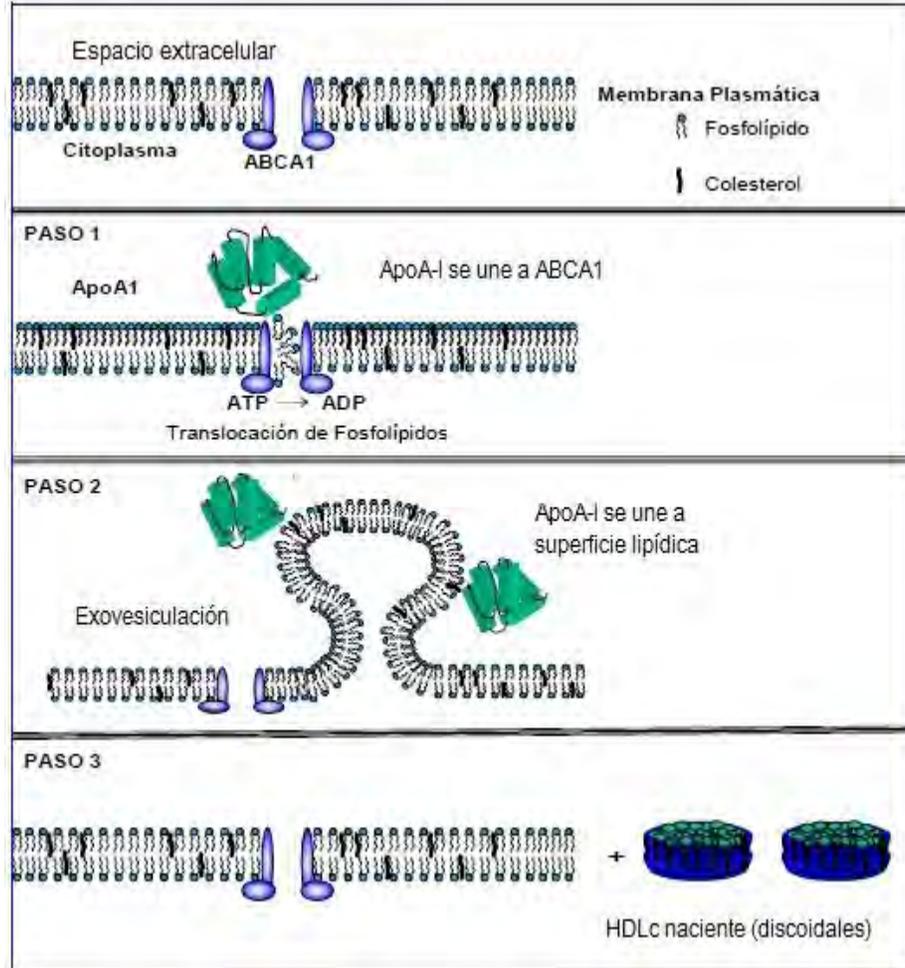
La estructura de la proteína ABCA1 consiste en dos mitades con estructura similar; cada una está compuesta por un dominio transmembranal con seis hélices y un dominio de unión a nucleótidos (NBD), que a su vez tiene dos regiones peptídicas Walker A y Walker B, además de una región Walker C propia de las proteínas ABC. Se predice que el extremo amino terminal de la proteína está orientado hacia el citosol y que existen dos asas extracelulares grandes, altamente glicosiladas, unidas entre sí por uno o más enlaces entre residuos de cisteína. (Figura 6) [27-29]. La proteína de membrana convierte la energía generada por la hidrólisis de ATP en un movimiento transmembranal que permite la importación o exportación de sustratos [30].



**Figura 6. Estructura de la proteína ABCA1.** Formada por 2 mitades con estructura similar, cada una con un dominio transmembranal compuesto por seis hélices (rojo) y un dominio de unión a nucleótidos (NBD). Cada NBD contiene dos regiones peptídicas: Walker A y Walker B y una región Walker C propia de las proteínas ABC. [29]



El mecanismo de acción de la proteína ABCA1 no ha sido elucidado completamente, sin embargo en 2007 se propuso un modelo que integraba los hallazgos experimentales de varios grupos. En el modelo se propone lo siguiente: la interacción inicial de apoA-1 con ABCA1 estabiliza a la proteína ABCA1 en la membrana plasmática. Esta estabilización activa la translocación de fosfolípidos por parte de ABCA1 hacia la capa externa de la membrana, creando una diferencia en la densidad de fosfolípidos en ambas capas de la misma. Esta diferencia de densidad crea tensión en la membrana, la cual forma dobleces y dominios lipídicos exovesiculados para relajar dicha tensión. Las exovesiculaciones crean espacios entre los grupos polares de fosfolípidos por los que pueden penetrar las hélices alfa de las apolipoproteínas, permitiendo la unión de apoA-I en los defectos formados por espacios en la superficie de la bicapa de lípidos, lo que causa desestabilización y rearrreglos en la membrana, llevando a la formación de complejos apoA-I/lípidos (HDL-nacientes), proceso conocido como “solubilización” de la membrana. Las partículas de HDL discoidales formadas pueden tener dos, tres ó cuatro moléculas de apoA-I, diferentes tipos de fosfolípidos membranales y colesterol (Figura 7) <sup>[31]</sup>.



**Figura 7. Mecanismo de interacción de apoA-I con ABCA1, formación de partículas HDL.** ApoA-I estabiliza a la proteína ABCA1 en la membrana plasmática, activando la translocación de fosfolípidos hacia la capa externa de la membrana. Esto causa una diferencia de densidad de fosfolípidos en las capas membranales (Paso 1). La tensión es relajada al formarse dominios lipídicos exovesiculados en la membrana, lo cual crea espacios entre los grupos polares de los fosfolípidos permitiendo la interacción de las  $\alpha$ -hélices de las apolipoproteínas con los dominios lipídicos (Paso 2). La acumulación de moléculas de apoA-I en la bicapa de lípidos causa desestabilización y rearrreglos en la membrana, que llevan a la formación de complejos apoA-1/lípidos (HDL-C crecientes), proceso conocido como "solubilización" de la membrana (Paso 3).<sup>[31]</sup>

Existen estudios sobre la deficiencia de HDL en humanos, ratones transgénicos y cultivos de células en donde se ha demostrado que ABCA1 es el principal exportador de colesterol celular y fosfolípidos, así como receptor de apolipoproteínas, actividad esencial para la formación de HDL<sup>[32]</sup>. En 2007 se demostró que los niveles intracelulares de colesterol pueden influir en la



función de las células  $\beta$  pancreáticas. Al inactivar selectivamente el gen **ABCA1** en ratones, se observó acumulación de colesterol celular y una reducción en la secreción de insulina *in vivo*, así como un deterioro progresivo de la tolerancia a la glucosa, sugiriendo con esto que los niveles de colesterol elevados pueden contribuir a la disfunción de las células  $\beta$  en la DT2 [33].

Se ha reportado que existen diversos SNPs en el gen **ABCA1** [34]. Entre los polimorfismos de **ABCA1** se encuentran el rs9282541 y rs10991437, los cuales se han asociado a DT2 y al índice cintura-cadera elevado respectivamente. El polimorfismo rs9282541 se ha observado en altas frecuencias en poblaciones americanas, específicamente en poblaciones mestizo-mexicanas e indígenas y se ha asociado a DT2 [35, 36]. Por lo cual, se ha reconocido como variante propia de dichas poblaciones. Por otro lado, la asociación del rs10991437 con la enfermedad aún no se tiene claro [37].

### **3.1.1 rs9282541**

El polimorfismo rs9282541, mejor conocido como R230C, se localiza en el exón 7 del gen [38]. La variante ocurre debido al cambio de una citosina por un uracilo en la posición 1001 del transcrito, pasando del codón CGC a UGC, lo que origina el cambio de aminoácido de arginina (R) por cisteína (C) en la posición 230 de la proteína.

Estudios sobre este polimorfismo han demostrado que la presencia de la variante produce una secreción anormal de insulina relacionada con la acumulación de colesterol en las células  $\beta$ . El polimorfismo R230C se ha encontrado asociado a DT2 en población mexicana, sobretodo en personas con DT2 de aparición temprana (diagnóstico antes de los 40 años) [39], así como en mestizos mexicanos con obesidad y niveles de HDL-C bajos. En general esto



sugiere que la asociación del gen **ABCA1** a DT2 está relacionada con la secreción de insulina a través de la regulación de HDL-C <sup>[39]</sup>.

El polimorfismo R230C ha sido estudiado en poblaciones japonesas, caucásicas y americanas, así como en poblaciones indígenas y mestizas, observándose una alta frecuencia de éste en poblaciones indígenas (20.4%) comparada con las demás poblaciones (Tabla 4).

**Tabla 4. Frecuencia alélica del rs9282541 en poblaciones del mundo <sup>[36]</sup>**

SNP		Frecuencias alélicas (%)				
		MYA	AMR	EUR	AFR	ASN
rs9282541	C	79.6	95.9	100	99.8	100
	T	20.4	4.1	0	0.2	0

Población: MYA, Maya; AMR, Americana; EUR, Europea; AFR, Africana; ASN, Asiática occidental.

### 3.1.2 rs10991437

El polimorfismo rs10991437 se encuentra en una región intergénica cerca de los genes **ABCA1** y **SLC44A1**. En 2015 fue identificado junto con otros 49 *loci*, y se asoció con el ICC ajustado por el IMC <sup>[37]</sup>. Esta variante no ha sido completamente estudiada, sin embargo, se ha observado una alta frecuencia en poblaciones de Asia Occidental (30%) (Tabla 5). Es importante mencionar que en población mexicana no se tienen datos de su frecuencia.

**Tabla 5. Frecuencia alélica del rs10991437 en poblaciones del mundo**

SNP		Frecuencias alélicas (%)			
		AMR	EUR	AFR	ASN
rs10991437	C	90	90	98	70
	A	10	10	2	30

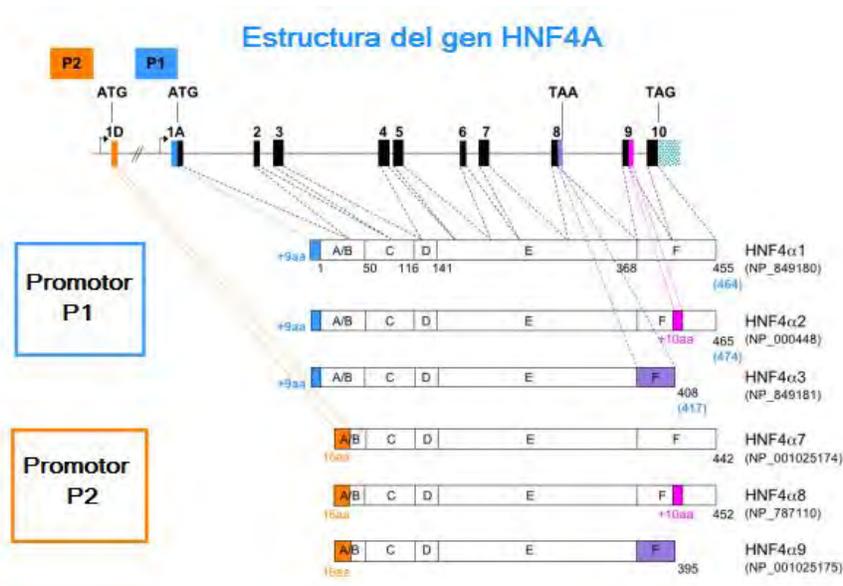
Población: AMR, Americana; EUR, Europea; AFR, Africana; ASN, Asiática occidental. Fuente: 1000 Genomes Project



### 3.2 Gen *HNF4A*

El gen *HNF4A* (factor hepatocítico nuclear 4 alpha), es un miembro de la superfamilia de receptores nucleares de hormonas esteroideas/tiroideas (NR2A1) que codifica para una proteína reguladora de vías metabólicas. Este receptor nuclear (NR) está involucrado en la regulación transcripcional de genes en las células hepáticas e islotes pancreáticos en el humano.

El gen *HNF4A* se localiza en la región 20q13.12, está constituido por 74 Kb, diez exones y dos promotores. La actividad de los promotores depende del tejido y la etapa de desarrollo <sup>[40]</sup>. Se han encontrado al menos seis isoformas de HNF4 $\alpha$ , generadas por los dos promotores y splicing alternativo, que han sido verificadas experimentalmente; aunque existen otras isoformas que siguen siendo estudiadas. Los isómeros HNF4 $\alpha$ 1 a HNF4 $\alpha$ 3 son codificados por el promotor 1 (P1), y son más abundantes en tejidos hepáticos y renales. Mientras que, los isómeros HNF4 $\alpha$ 7 a HNF4 $\alpha$ 9 son codificados por el promotor 2 (P2), los cuales se han encontrado en páncreas de adulto (Figura 8) <sup>[40, 41]</sup>.



**Figura 8. Estructura del gen *HNF4A*.** Constituido por diez exones y dos promotores (P1 y P2), los cuales conducen a la expresión de seis variantes. Las isoformas difieren en los dominios A/B y F. P1 da

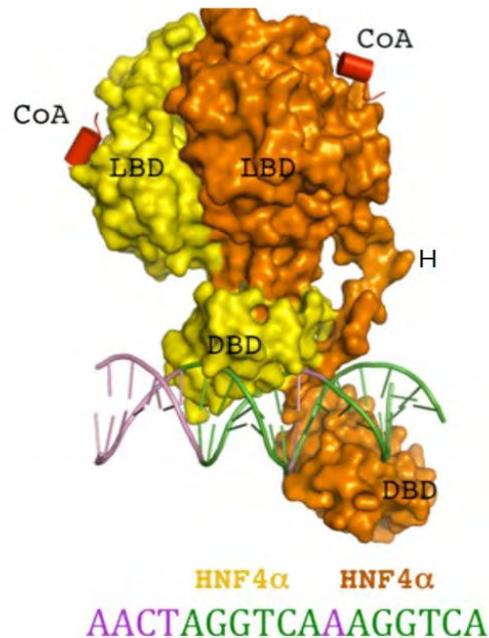


lugar a HNF4a1, HNF4a2 y HNF4a3 (hepáticos y renales). P2 genera HNF4a7, HNF4a8 Y HNF4a9 (pancreáticos) <sup>[41]</sup>.

La proteína codificada por **HNF4A** genera un factor de transcripción nuclear, de expresión constitutiva que fue descubierto en extractos proteicos de hígado de rata <sup>[42]</sup>. La transcripción del mensajero por los dos promotores (P1 y P2), a partir del splicing alternativo, da como resultado nueve transcritos que codifican nueve isoformas de la proteína con expresión tejido específica <sup>[40]</sup>.

La proteína muestra una estructura terciaria integrada por 12 hélices alfa y cuatro hojas  $\beta$ -plegadas. Los dominios funcionales del extremo N-terminal de **HNF4a** consisten en: un dominio con la función de activación, un dominio con dos dedos de Zinc C-4 (responsable de la unión al ADN), un dominio de unión al ligando (DBL) y una región C-terminal <sup>[43]</sup>.

La proteína **HNF4a** se une como homodímero al ADN, los dedos de Zinc, además de la bisagra (H) son regiones de reconocimiento para su unión al ADN, estos sitios reconocen una secuencia consenso de seis nucleótidos de repetidos directos (DR1) 5´-AGGTCA-3´o sus variaciones como DR2 con un espacio de uno o dos nucleótidos (AGGTCAaAGGTCA) de los genes que están bajo su control, para activar su posterior transcripción (Figura 9) <sup>[44]</sup>.



**Figura 9. Función de la proteína HNF4α.** El homodímero de HNF4a se une al ADN a través del multicomplejo LBD-H-DBD (dominios de unión al ligando-bisagra-dominios de unión a ADN) que reconoce y se une a los elementos de respuesta (DR1 o DR2) <sup>[45]</sup>.

Las principales funciones del gen *HNF4A* en el adulto están vinculadas a mantener la homeostasis del hígado, el intestino y las células  $\beta$ -pancreáticas. En estas últimas, el gen *HNF4A* regula la expresión del gen de la insulina y de genes que codifican proteínas involucradas en el transporte de glucosa. El gen *HNF4A* se ha relacionado con el desarrollo de DT2, cuando existe una alteración en el gen, se produce una secreción de insulina alterada <sup>[46]</sup>. Se ha observado gran variabilidad del gen entre las poblaciones, siendo altamente polimórfico. A la fecha se han identificado 3,066 SNPs localizados en regiones codificantes del mismo <sup>[47]</sup>.

Estudios realizados en los años 90´ s demostraron la existencia de mutaciones en el gen *HNF4A* responsables del tipo de diabetes MODY1. Los pacientes afectados presentan una hiperglucemia que va aumentando progresivamente, al mismo tiempo que va descendiendo la capacidad de respuesta de la célula  $\beta$



pancreática para segregar insulina, lo que da como resultado que entre un 30-40% de los afectados requieren tratamiento con insulina. Se ha podido comprobar **que existen alteraciones en la célula  $\beta$  en los sujetos no diabéticos** portadores de una mutación mucho antes de que se manifieste la hiperglucemia. La prevalencia de complicaciones micro y macrovasculares es similar a la observada en la DT1; no obstante, existe entre un 10-20% de pacientes con alguna mutación en este gen que mantienen una tolerancia normal a la glucosa <sup>[48]</sup>.

### 3.1.2 rs1800961

Entre las diferentes variantes del gen *HNF4A*, el polimorfismo rs1800961 (C>T) ha sido de los más estudiados ya que se ha asociado al desarrollo de DT2. El polimorfismo rs1800961 consiste en un cambio de aminoácido de treonina por isoleucina en la posición 130 (T130I) en el exón 4, en donde se observa el cambio de codón ACU a AUU <sup>[49]</sup>. En población mexicana hay estudios realizados en mestizos mexicanos que reportan una frecuencia alta de la variante rs1800961 en pacientes con DT2 de aparición temprana <sup>[50]</sup>.

El cambio T130I se ha usado como marcador de DT2 debido a la alta frecuencia observada en poblaciones Americanas (Tabla 6).

**Tabla 6. Frecuencia alélica del rs1800961 en poblaciones del mundo <sup>[36]</sup>**

SNP	Frecuencias alélicas (%)					
		MYA	AMR	EUR	AFR	ASN
rs1800961	C	89.7	88.5	96.6	100	99
	T	10.3	11.5	3.4	0	1

*Población: MYA, Maya; AMR, Americana; EUR, Europea; AFR, Africana; ASN, Asiática occidental.*



#### 4. Población en estudio

México es reconocido por ser una nación multicultural, conformada por 68 grupos étnicos <sup>[51]</sup>. Se ha demostrado que existe una gran variedad genética entre poblaciones debido a su historia y a las barreras geográficas del territorio del país. Actualmente, la mayor parte de la población mexicana es mestiza, sin embargo, se ha reportado que los mexicanos tienen aproximadamente un 70% de componente genético indígena, 25% de caucásico y 5% de africano <sup>[52]</sup>. Es por ello que los estudios genéticos se han enfocado en los pueblos amerindios, en búsqueda de variaciones propias de cada población y su asociación a enfermedades metabólicas.

Nayarit, se localiza al oeste de México y colinda con los estados de Zacatecas, Durango, Jalisco y Sonora. Tiene una extensión correspondiente al 1.4% del territorio nacional. Cuenta con 1,181,050 habitantes, de los cuales el 69% se localiza en zona urbana y el 31% en zona rural <sup>[53]</sup>.

Es un estado rico en diversidad cultural, en cuanto a su población el 5% es practicante de una lengua indígena. Las lenguas más habladas en el estado de Nayarit corresponden a los principales grupos indígenas (Tabla 7).

**Tabla 7. Número de hablantes indígenas en el estado de Nayarit de acuerdo al grupo al que pertenecen <sup>[51]</sup>**

Lengua indígena	Número de hablantes (2010)
Huichol	25 151
Cora	20 793
Tepehuano	1 972
Náhuatl	1 904



Las etnias del estado se ubican en la sierra de Nayarit, llamada también Sierra de Alica o Sierra de Tepic, que a su vez es continuación de la Sierra Madre de Durango. Un altiplano de 2,500 metros de altura forma parte central de la elevación, el cual está dividido de norte a sur, en su parte central, por el valle del río Cora. La importancia de este río es establecer la separación del territorio de los coras con respecto al de los huicholes<sup>[54]</sup>.

La topografía de la región se presenta llena de barrancos y precipicios, por lo que es una de las rutas más difíciles y peligrosas para los viajeros. Debido a ello, las comunidades indígenas de la región se mantuvieron intactas durante la conquista y, como consecuencia, del mestizaje.

Los indígenas de Nayarit, o nayaes, están representados por los coras, los huicholes y por algunos tepehuanos. Éstas tres tribus tienen, con pequeñas diferencias, las mismas costumbres y religión, pero se distinguen básicamente por su lengua<sup>[54]</sup>.



**Figura 10. Localización geográfica de las comunidades estudiadas: Huichol, Cora, Tepehuano y Mexicanero.**



#### **4.1 Cora**

El grupo Cora habita en la parte occidental de la sierra de Nayarit. Entre las principales actividades que realizan, se encuentra el cultivo de maíz, calabaza, frijoles, sandía y cacahuate; cultivos de caña de azúcar y de plátanos, así como de árboles frutales como el durazno y el manzano. También se dedican al cuidado de ganado y al intercambio comercial del mismo con las poblaciones vecinas.

El cora se inclina al consumo de alcohol, mismo que produce aprovechando las plantas de agave. Fabrican un fermentado parecido al mezcal, así como el pulque conocido como tachique.

La medicina entre los coras ha permanecido en estado rudimentario, se emplean algunas plantas con propiedades curativas y el ejercicio de la medicina está a cargo de los brujos. Actualmente, existen unidades médicas rurales que apoyan a las comunidades en la curación de las enfermedades; en los casos graves, se traslada a los enfermos a Tepic en avioneta. Las principales enfermedades que afectan a la población son las enfermedades de la piel y gastrointestinales <sup>[55]</sup>.

#### **4.2 Huichol**

Huichol, guachichil o huachichil, son nombres que se le da al pueblo descendiente de huitcharika, que significa agricultor. Según la leyenda, la tribu huichol fue la primera en la sierra de Nayarit en llevar a cabo el cultivo de un campo de maíz. A pesar de encontrarse entre las culturas más antiguas, ha sido poco considerada debido al carácter tímido y reservado de la población <sup>[54]</sup>.

El territorio ocupado por los huicholes incluye la parte oriental de la sierra, es decir, la zona comprendida entre el valle de río Jesús María y del río Bolaños.



En cuanto a la población, se distinguen dos tipos básicos de huicholes: uno de rasgos finos y el otro de rasgos gruesos de aspecto tosco. El grupo huichol no presenta una unidad etnográfica, se cree que es la mezcla de dos etnias distintas que se fusionaron en una época remota y se refleja en el aspecto físico de los habitantes. A pesar de haber dos tipos de etnias, no ha habido mayor mezcla con extranjeros, conservando así la pureza de su etnia <sup>[54]</sup>.

Al igual que los coras, los huicholes se dedican al cultivo del maíz, frijol, vegetales y árboles frutales. Además practican la caza de liebres, conejos, ardillas y ratas, así como venados y aves para ceremonias religiosas <sup>[54]</sup>.

En cuanto a los servicios médicos, existen unidades rurales del Seguro Social, sin embargo, son insuficientes para cubrir las enfermedades que afectan a la población como lo son: infecciones gastrointestinales, parasitosis, infecciones respiratorias, tuberculosis, infecciones de la piel, problemas dentales, partos de alto riesgo y cáncer de mama <sup>[55]</sup>.

### **4.3 Tepehuano**

Los tepehuanos o tepehuanes del sur, son uno de los cuatro grupos indígenas que habitan en la región del Gran Nayar. El vocablo tepehuán, "habitantes de la montaña", fue asignado por la región en donde habitan.

Las actividades económicas que practican son la explotación forestal, el cultivo de maíz, frijol, calabaza, chayote y chilacayote; así como la ganadería, aunque muy pocas personas tienen la capacidad económica para la manutención de los animales. También se han dedicado al comercio de artesanías, sin embargo, son actividades poco redituables <sup>[56]</sup>.

Las comunidades tepehuanas se encuentran en las regiones más apartadas de los centros urbanos, tanto en Durango como en Nayarit. Para llegar a cualquiera de las cabeceras comunales es necesario viajar cinco horas. En cuanto a servicios, la mayor parte de la región no cuenta con suministro de energía



eléctrica. Los servicios de salud que ofrece el gobierno los cubren las Unidades Médicas Rurales del IMSS y las clínicas de la Secretaría de Salud. En los últimos años, la atención médica se ha incrementado a 14 unidades en la región. Entre las causas de demanda de atención más frecuentes se encuentran: enfermedades gastrointestinales y de vías respiratorias, sarna, paludismo, y picaduras de alacrán <sup>[56]</sup>.

#### **4.4 Mexicanero**

Los mexicaneros son indígenas hablantes de nahuátl que habitan en tres comunidades de la Sierra Madre Occidental: San Pedro Jícoras y San Agustín de Buenaventura, en Durango, y Santa Cruz, en Nayarit. Es probable que el nombre de mexicaneros lo hayan adoptado como etnónimo a partir de que viajeros y exploradores los empezaron a llamar así. El etnónimo de **“mexicanero” es común entre quienes hablan la lengua mexicana, conocida como nahuátl, razón por la cual también se autodenominan “mexicanos”.**

Los mexicaneros son minoría en relación con los coras, tepehuanos y huicholes, y conviven con comunidades aledañas. La mayoría de los mexicaneros son bilingües o trilingües, razón por la cual es difícil identificarlos durante los censos de población, pues se registran como hablantes de huichol, cora o español.

La presencia de la población nahua en la Sierra Madre Occidental causó un gran interés entre los investigadores. Existen varias hipótesis sobre el origen de esta etnia. Por un lado, se consideran de origen tlaxcalteca, y por otro, se deduce que pertenecían a grupos tecuales o huicholes hablantes de nahuátl que ocuparon las comunidades mexicaneras. Sin embargo, aún no hay argumentos suficientes que confirmen el origen de los mexicaneros. Pese a ellos, la etnografía mexicana permite afirmar que se trata de una población que tiene su origen en el lugar que habita.



Las comunidades mexicaneras se encuentran muy alejadas de los servicios públicos debido a la escasa infraestructura de carreteras. En cuanto a servicios de salud, los mexicaneros son atendidos por hueseros, sobadores, parteras y el médico de la clínica de la comunidad, pero hay una gama compleja de **enfermedades consideradas “delicadas” que son** atendidas por el chamán de la comunidad, quien realiza ritos para sanar al enfermo <sup>[57]</sup>.

Es importante mencionar que, debido al difícil acceso a las comunidades descritas, aún en la actualidad, no se tiene un registro exacto de los padecimientos y de las principales causas de defunción. Como consecuencia, no se sabe exactamente el número de afectados por DT2 y otros trastornos metabólicos, lo que revela la demanda de servicios de salud en estas poblaciones.



## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México, son escasos los estudios realizados en busca de marcadores genéticos de riesgo a alteraciones metabólicas, que finalmente desencadenan obesidad y DT2. Dichos padecimientos han afectado a un gran número de personas, siendo los grupos indígenas mexicanos los más vulnerables debido a sus condiciones de aislamiento y al acceso limitado a los servicios de salud. Adicionalmente, diversos estudios han sugerido que los grupos indígenas son más susceptibles a padecer DT2 por su componente genético.

Es por ello que el estudio de las variantes rs9282541 y rs10991437 en el gen *ABCA1* y rs1800961 en el gen *HNF4A*, en poblaciones indígenas permitirá conocer su frecuencia y saber si están asociadas a alteraciones metabólicas de susceptibilidad a DT2.



### III. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades multifactoriales, como la diabetes, dependen de un factor genético, siendo las variaciones tipo SNP las más comunes. Se han identificado variantes en poblaciones caucásicas, africanas, asiáticas y americanas, sin embargo, la distribución no es homogénea debido a la variabilidad genética de cada población. Particularmente, México es un país multicultural integrado por mestizos mexicanos, quienes poseen un 70% de componente amerindio derivado de los distintos grupos indígenas. Razón por la cual su evaluación es de gran importancia, además del alto riesgo que poseen para padecer dichas enfermedades.

El estudio de las variantes rs9282541 y rs10991437 del gen **ABCA1** y el rs1800961 del gen **HNF4A**, en poblaciones indígenas permitirá conocer su frecuencia y saber si están asociadas a parámetros bioquímicos de la población. El presente trabajo se enfoca en las poblaciones indígenas del Estado de Nayarit: Cora, Huichol, Tepehuano y Mexicanero, debido a que son de los grupos indígenas más conservados genéticamente dada su localización geográfica. Esto, con el objetivo de identificar marcadores genéticos de susceptibilidad a padecer DT2 que pudieran sugerir alternativas para el control y/o prevención de la enfermedad.



## IV. HIPÓTESIS

Se encontrará una frecuencia de los polimorfismos rs9282541 y rs10991437 del gen *ABCA1* y rs1800962 del gen *HNF4A* en los grupos Cora, Huichol, Tepehuano y Mexicanero del Estado de Nayarit diferente a la reportada en mestizos mexicanos y en las poblaciones del proyecto de 1000 Genomas.



## V. OBJETIVOS

### Objetivo general

Determinar la frecuencia de las variantes rs9282541 y rs10991437 del gen *ABCA1* y el rs1800961 del gen *HNF4A* en grupos indígenas del Estado de Nayarit y su relación con factores de susceptibilidad a DT2.

### Objetivos particulares

- Evaluar los parámetros antropométricos y bioquímicos de las poblaciones indígenas: Cora, Huichol, Tepehuano y Mexicanero.
- Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos seleccionados en los grupos Cora, Huichol, Tepehuano y Mexicanero.
- Comparar estadísticamente las frecuencias obtenidas con las reportadas en mestizos mexicanos y proyecto de 1000 Genomas.
- Correlacionar el genotipo observado con los parámetros antropométricos y bioquímicos de los grupos Cora, Huichol, Tepehuano y Mexicanero.



## VI. MATERIAL Y MÉTODOS

### Población de estudio

Los requisitos que se consideraron para seleccionar a los participantes fueron los siguientes: criterio lingüístico, que mantuvieran sus costumbres y que sus familiares hayan habitado en la misma región al menos dos generaciones atrás.

El presente trabajo fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Juárez de México. Cada uno de los participantes fue informado del objetivo del estudio, para lo cual se firmó una carta de consentimiento informado y se aplicó un cuestionario de datos personales (Anexo I).

### Determinación de parámetros antropométricos

A cada uno de los participantes se le tomaron las siguientes medidas: peso (Kg), talla (cm), cintura (cm) y cadera (cm). Con dichas mediciones se calculó el Índice de Masa Corporal (IMC) y el Índice Cintura-Cadera (ICC). También se midió la presión arterial sistólica (PAS) y presión arterial diastólica (PAD) por duplicado (NOM-030 SSA2 2009).

$$\text{Cálculo de IMC: } IMC = \frac{\text{peso (kg)}}{\text{talla}^2(\text{m}^2)}$$

$$\text{Cálculo de ICC: } ICC = \frac{\text{cintura (cm)}}{\text{cadera (cm)}}$$

### Determinación de parámetros bioquímicos

A los sujetos participantes se les tomó una muestra de 5 mL de sangre periférica en un tubo sin anticoagulante y con gel separador, se obtuvo el suero de la muestra, el cual se utilizó para la determinación de glucosa, urea, creatinina, ácido úrico, colesterol, triglicéridos y transaminasas por métodos



enzimático-colorimétricos (Anexo II). Los sujetos debían estar en ayuno de 8 h, comprobado por medio de la medición de glucosa con tiras reactivas en el momento de la toma de muestra.

## **Extracción de ADN**

La obtención del ADN de cada participante se realizó a partir de una muestra de 5 mL de sangre periférica almacenada en un tubo con EDTA. Para la extracción y aislamiento de ADN, se utilizó la técnica reportada por Miller y col. <sup>[58]</sup> (Anexo III).

Posterior a la extracción, el ADN obtenido se cuantificó con la técnica de espectroscopía UV en el equipo NanoDrop 1000, el cual proporcionó también la pureza de cada muestra mediante el cociente 260/280. Así también, se verificó la integridad de las muestras por electroforesis en geles de agarosa al 1.5%, usando como revelador bromuro de etidio (Anexo IV).

## **Genotipificación**

La evaluación de los polimorfismos seleccionados se realizó por la técnica de PCR-Tiempo Real en el equipo ViiA™ 7 de Applied Biosystems®. Se utilizaron sondas TaqMan® para cada SNP: C\_\_11720861\_10 para rs9282541 de *ABCA1*, C\_\_31952442\_10 para rs10991437 de *ABCA1* y C\_\_\_7591528\_10 para rs1800961 de *HNF4A*. Se utilizó el software de discriminación alélica de Applied Biosystems® para el análisis de los datos (Anexo V).

## **Análisis estadístico**

Los estadísticos descriptivos, la comparación de parámetros antropométricos y bioquímicos, así como la determinación de frecuencias alélicas y la correlación de los polimorfismos con los parámetros antropométricos y bioquímicos se realizaron por medio del software estadístico SPSS versión 21.0 para Windows®.



## VII. RESULTADOS

### Descripción general de la población en estudio

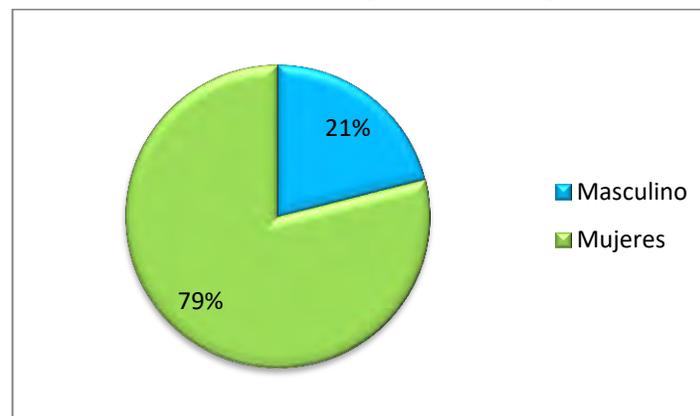
Se realizó un estudio descriptivo de tipo transversal, en el cual participaron 228 individuos no relacionados, entre 18 y 85 años, pertenecientes a cuatro diferentes grupos indígenas del estado de Nayarit (Tabla 8).

**Tabla 8. Distribución geográfica de los grupos indígenas en estudio**

Grupo indígena	Localidad	Número de participantes
Huichol	Mesa de Nueva Valey, Tepic	49
Cora	Presidio de los Reyes, Tepic	58
Tepehuano	San Andrés Milpilllas, Huajicori	92
Mexicanero	Sta. Cruz Acaponeta, Tepic	29

La proporción en cuanto a género fue de 180 mujeres y 48 hombres. (Gráfica 1).

**Gráfico 1. Distribución general de la población**





## **Resultados antropométricos y bioquímicos**

Se determinaron los parámetros antropométricos y bioquímicos de la población en estudio. En la Tabla 9 se muestra las características generales de los 228 participantes.

La muestra representativa es una población de adultos, con una mayor proporción de mujeres. En cuanto a los parámetros antropométricos, la población presenta sobrepeso, con un IMC promedio de 25.9 Kg/m<sup>2</sup>, y obesidad central en el género femenino con un ICC promedio de 0.90. En cuanto a los parámetros bioquímicos, los triglicéridos se encontraron en la zona limítrofe alta, con un valor de 159.5 mg/dl, además de que el género femenino presentó un valor bajo de HDL-C, 44.5 mg/dl. El resto de los parámetros medidos, se encontraron dentro de los valores de referencia. Aunque se debe mencionar que el 36.4% tuvo valores de glucosa alterados en ayuno, el 21.49% tuvo niveles de colesterol altos, el 56.14% triglicéridos altos y el 35.55% de mujeres y 72.91% de hombres con HDL-C bajos.



**Tabla 9. Características generales de la población en estudio.**

<b>Variable</b>	<b>N</b>	<b>Media/Mediana (percentil 25- percentil 75)</b>	<b>Valor de referencia</b>
<b>Edad (años)</b>	225	40 (29-55)	-
<b>Cintura (cm)</b>	<b>H:</b> 46	<b>H:</b> 92.4 ± 10.68	<b>H</b> <90
	<b>M:</b> 175	<b>M:</b> 92.2 ± 11.57	<b>M</b> <80
<b>Cadera (cm)</b>	<b>H:</b> 46	<b>H:</b> 100.4 ± 7.94	-
	<b>M:</b> 175	<b>M:</b> 102.1 ± 10.67	-
<b>ICC</b>	<b>H:</b> 46	<b>H:</b> 0.91 ± 0.06	<b>H:</b> 0.90-0.95
	<b>M:</b> 175	<b>M:</b> 0.90 ± 0.06	<b>M:</b> 0.80-0.85
<b>Peso (Kg)</b>	226	60.0 (54.0-75.0)	-
<b>Talla (cm)</b>	226	154.5 (149.8-160.0)	-
<b>IMC (Kg/m2)</b>	226	25.9 ± 4.89	18.5-24.9
<b>PAS (mmHg)</b>	227	118.6 ± 17.45	< 120
<b>PAD (mmHg)</b>	227	71.7 ± 11.50	< 80
<b>Glucosa (mg/dl)</b>	228	94.0 (85.3-108.0)	70-100
<b>Urea (mg/dl)</b>	228	21.0 (19.0-26.0)	4-22
<b>Creatinina (mg/dl)</b>	228	<b>H:</b> 0.90 (0.80-1.00)	<b>H:</b> 0.7-1.3
		<b>M:</b> 0.70 (0.70-0.80)	<b>M:</b> 0.6-1.1
<b>Ácido úrico (mg/dl)</b>	228	4.9 ± 1.26	3.5-7.2
<b>Triglicéridos (mg/dl)</b>	228	159.5 (104.0-236.3)	50-150
<b>Colesterol (mg/dl)</b>	228	170.4 ± 34.26	<200
<b>HDL-C (mg/dl)</b>	228	<b>H:</b> 43.4 ± 9.60	<b>H</b> >40
		<b>M:</b> 44.5 ± 10.30	<b>M</b> >50
<b>LDL-C (mg/dl)</b>	228	117.1 ± 29.36	<130
<b>AST (U/L)</b>	228	28.0 (22.0-34.0)	10-34
<b>ALT (U/L)</b>	228	22.0 (17.0-32.0)	10-40

H: Hombres, M: Mujeres

Mediante análisis de ANOVA se compararon los parámetros antropométricos y bioquímicos de los cuatro grupos indígenas. Se observaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en varios de ellos (Tabla 10). En general todas las mujeres de los grupos indígenas presentaron obesidad central, revelado por los valores de ICC, y no hubo diferencias significativas. Los grupos Cora, Tepehuano y Mexicanero, presentan sobrepeso, pero el grupo con el IMC más



alto es el Cora, el cual presenta diferencia significativa comparada con el grupo Huichol, éste último con niveles normales de IMC. Es importante mencionar que los valores de PAS y PAD estuvieron dentro de los valores normales en todos los grupos. El parámetro que presentó más diferencias significativas entre los grupos fue la concentración de triglicéridos, todos los grupos presentaron concentraciones por arriba de los valores de referencia. Las concentraciones de ácido úrico entre el grupo Mexicanero y Tepehuano también presentaron diferencias, aunque se encuentran dentro de los valores normales.



**Tabla 10. Comparación de parámetros antropométricos y bioquímicos de todos los grupos indígenas**

PARÁMETRO	HUICHOL (N=29)	CORA (N=58)	TEPEHUANO (N=92)	MEXICANERO (N=29)
<b>Edad (años)</b>	38.41 ± 13.90	43.21 ± 16.89	44.81 ± 16.74	41.93 ± 17.75
<b>Cintura (cm)</b>	<b>H:</b> 92.20 ± 11.31 <b>M:</b> 86.49 ± 12.07	<b>H:</b> 90.70 ± 14.61 <b>M:</b> 93.94 ± 10.83	<b>H:</b> 93.11 ± 9.01 <b>M:</b> 93.32 ± 11.92	<b>H:</b> 93.29 ± 9.58 <b>M:</b> 93.76 ± 8.38
<b>Cadera (cm)</b>	<b>H:</b> 99.8 ± 8.21 <b>M:</b> 96.6 ± 9.18	<b>H:</b> 100.0 ± 11.41 <b>M:</b> 104.6 ± 13.01	<b>H:</b> 100.32 ± 6.86 <b>M:</b> 102.71 ± 9.23	<b>H:</b> 102.00 ± 5.54 <b>M:</b> 103.90 ± 9.08
<b>ICC</b>	<b>H:</b> 0.92 ± 0.067 <b>M:</b> 0.89 ± 0.06	<b>H:</b> 0.91 ± 0.07 <b>M:</b> 0.90 ± 0.06	<b>H:</b> 0.93 ± 0.04 <b>M:</b> 0.91 ± 0.06	<b>H:</b> 0.91 ± 0.06 <b>M:</b> 0.90 ± 0.04
<b>Peso (Kg)</b>	57.34 ± 13.76 <sup>b,c</sup>	65.36 ± 13.60	63.33 ± 12.47	63.34 ± 9.56
<b>Talla (m)</b>	1.52 ± 0.86	1.55 ± 7.62	1.56 ± 9.92	1.57 ± 9.26
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	24.48 ± 5.06	27.09 ± 5.29 <sup>a</sup>	25.916 ± 9.92	25.77 ± 3.66
<b>PAS (mmHg)</b>	113.49 ± 14.66	115.67 ± 18.81	120.66 ± 15.02	126.72 ± 22.34 <sup>a,b</sup>
<b>PAD (mm Hg)</b>	70.67 ± 11.33	66.36 ± 11.16 <sup>c,d</sup>	74.34 ± 10.34	75.9 ± 12.18
<b>Glucosa (mg/dL)</b>	93.0 (81.0-109.5)	98.5 (87.0-112.3)	94.5 (86.3-104.0)	89.0 (78.0-109.0)
<b>Urea (mg/dL)</b>	21.0 (19.0-26.0)	21.0 (19.0-26.0)	21.0 (19.0-28.0)	21.0 (16.0-24.0)
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	<b>H:</b> 0.90 (0.8-1.0) <b>M:</b> 0.70 (0.6-0.8)	<b>H:</b> 0.95 (0.8-1.08) <b>M:</b> 0.70 (0.7-0.8)	<b>H:</b> 0.90 (0.8-1.0) <b>M:</b> 0.70 (0.7-0.8)	<b>H:</b> 0.90 (0.90-1.00) <b>M:</b> 0.70 (0.60-0.90)
<b>Ácido úrico (mg/dL)</b>	4.86 ± 1.22	5.15 ± 1.58	4.61 ± 1.02	5.35 ± 1.07 <sup>c</sup>
<b>Triglicéridos (mg/dl)</b>	175.22 ± 102.71	162.21 ± 71.45	190.36 ± 118.43	177.45 ± 40.57 <sup>a,b</sup>
<b>Colesterol (mg/dL)</b>	170.82 ± 26.75	169.02 ± 35.68	168.91 ± 35.04	239.24 ± 136.42
<b>HDL-C (mg/dL)</b>	<b>H:</b> 40.8 ± 13.8 <b>M:</b> 45.8 ± 10.8	<b>H:</b> 40.8 ± 13.8 <b>M:</b> 45.8 ± 10.8	<b>H:</b> 40.9 ± 7.9 <b>M:</b> 42.7 ± 8.3	<b>H:</b> 41.6 ± 5.8 <b>M:</b> 47.1 ± 14.6
<b>LDL-C (mg/dL)</b>	119.41 ± 24.28	115.25 ± 31.91	115.22 ± 29.63	123.09 ± 31.43
<b>AST (U/L)</b>	29.0 (23.5-37.5)	26.0 (22.0-31.25)	27.0 (22.0-31.0)	32.0 (24.0-39.0)
<b>ALT (U/L)</b>	22.0 (15.0-35.0)	22.0 (15.0-35.0)	22.0 (17.0-31.8)	26.0 (19.0-43.5)

<sup>a</sup> P<0.05 vs Huichol; <sup>b</sup> P<0.05 vs Cora; <sup>c</sup> P<0.05 vs Tepehuano; <sup>d</sup> P<0.05 vs Mexicanero



## Resultados genéticos

Con los resultados de la genotipificación de las cuatro poblaciones en estudio mediante PCR-tiempo real, se realizaron los cálculos correspondientes para obtener las frecuencias alélicas y genotípicas. Además, se determinó el equilibrio de Hardy-Weinberg por medio del cálculo de Chi-cuadrada ( $X^2$ ). A continuación se presenta el análisis por cada gen.

### **ABCA1**

Con respecto al polimorfismo rs9282541 del gen **ABCA1** (Tabla 11) se observó una alta frecuencia para el alelo de riesgo en las poblaciones: Cora, Tepehuano y Mexicanero. Las frecuencias alélicas observadas fueron de 0.30, 0.22 y 0.24, respectivamente. El grupo Huichol no presentó homocigotos para el alelo de riesgo (TT). En cuanto al equilibrio de Hardy Weinberg, el grupo mexicanero no se encontró en equilibrio con un valor de  $X^2$  de 11.269.

**Tabla 11. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo rs9282541 en población de estudio**

Grupo étnico	Gen <i>ABCA1</i> – rs9282541									
	Frecuencia observada				Frecuencia alélica		Frecuencia genotípica			$X^2$
	CC	CT	TT	TOTAL	C	T	CC	CT	TT	
Huichol	43	6	0	49	0,94	0,06	0,88	0,12	0,00	0.208
Cora	28	25	5	58	0,70	0,30	0,49	0,42	0,09	0.030
Tepehuano	55	33	4	92	0,78	0,22	0,60	0,35	0,05	0.117
Mexicaneros	20	4	5	29	0,76	0,24	0,69	0,14	0,17	11.269

$X^2 < 3.84$



En cuanto a la segunda variante del gen **ABCA1** (rs10991437), se observó una frecuencia del alelo de riesgo de 0.17 y 0.55 en los grupos Tepehuano y Mexicanero, mientras que, los grupos Huichol y Cora presentaron una frecuencia de 0.02 y 0.07 para el mismo alelo, respectivamente, siendo el grupo Huichol el que no presentó ningún homocigoto para el alelo de riesgo (AA). Las etnias Huichol, Cora y Tepehuano se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg, sin embargo, el grupo Mexicanero no se encontró en equilibrio al presentar un valor de 19.145 (Tabla 12).

**Tabla 12. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo rs10991437 en la población estudiada**

Grupo étnico	Gen <i>ABCA1</i> - rs10991437									X <sup>2</sup>
	Frecuencia observada				Frecuencia alélica		Frecuencia genotípica			
	CC	AC	AA	TOTAL	C	A	CC	CA	AA	
Huichol	47	2	0	49	0,98	0,02	0,96	0,04	0,00	0,021
Cora	51	6	1	58	0,93	0,07	0,87	0,13	0,00	2,193
Tepehuano	65	23	4	92	0,83	0,17	0,69	0,28	0,03	1,068
Mexicaneros	0	26	3	29	0,45	0,55	0,20	0,49	0,30	19,145

X<sup>2</sup> < 3.84

### ***HNF4A***

El polimorfismo rs1800961 del gen **HNF4A** (Tabla 13) presentó una frecuencia de 0.16 para el alelo de riesgo en el grupo Cora. En los grupos Huichol, Tepehuano y Mexicanero la frecuencia para el mismo alelo fue de 0.03, 0.02 y 0.02 respectivamente. Sólo en el grupo Tepehuano se encontró un homocigoto para el alelo de riesgo (TT). En cuanto al equilibrio de Hardy-Weinberg, la mayoría de los grupos presentaron valores menores a 3.84, excepto el grupo Tepehuano con un valor de 40.214 para la X<sup>2</sup>.



**Tabla 13. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo rs1800961 en la población estudiada**

Grupo étnico	Gen <i>HNF4A</i> – rs1800961									
	Frecuencia observada				Frecuencia alélica		Frecuencia genotípica			X <sup>2</sup>
	CC	CT	TT	TOTAL	C	T	CC	CT	TT	
Huichol	46	3	0	49	0,97	0,03	0,94	0,06	0,00	0.049
Cora	39	19	0	58	0,84	0,16	0,67	0,33	0,00	2.225
Tepehuano	90	1	1	92	0,98	0,02	0,98	0,01	0,01	40.214
Mexicaneros	28	1	0	29	0,98	0,02	0,97	0,03	0,00	0.009

X<sup>2</sup> <3.84

En la Tabla 14 se presentan, a manera de resumen, las frecuencias alélicas de los tres polimorfismos en estudio en todos los grupos indígenas del Estado de Nayarit, así como las frecuencias reportadas de población maya, mestizo-mexicana y la base de datos de 1000 Genomas. Se observa el porcentaje obtenido para el alelo silvestre y el alelo de riesgo de cada variante.



**Tabla 14. Frecuencia alélica de las variantes rs9282541, rs10991437 y rs1800961 de los grupos indígenas del Estado de Nayarit, población maya, mestizo-mexicano y la base de datos 1000 Genomas**

SNP Gen	Frecuencias alélicas (%)							
		Huichol	Cora	Tepehuano	Mexicanero	Maya*	Mestizo-mexicano**	AMR***
rs9282541	C	93.9	69.8	77.7	75.9	79.6	94.4	95.9
<b>ABCA1</b>	<b>T</b>	6.1	30.2 <sup>‡</sup>	22.3 <sup>‡</sup>	24.1 <sup>‡</sup>	20.4 <sup>‡</sup>	5.6	4.1
rs10991437	C	98.0	93.1	83.2	44.8			90
<b>ABCA1</b>	<b>A</b>	2.0 <sup>‡</sup>	6.9	16.8	55.2 <sup>‡</sup>	-	-	10
rs1800961	C	96.9	83.6	98.4	98.3	89.7	94.7	88.5
<b>HNF4A</b>	<b>T</b>	3.1	16.4 <sup>‡</sup>	1.6	1.7	10.3	5.3	11.5

Alelo de riesgo en negrita.

<sup>‡</sup>Test de Fisher.  $P < 0.05$  vs Mestizo-mexicano y AMR

\*Lara-Riegos et al. 2015

\*\*rs9282541, Villarreal-Molina T et al. 2008; rs1800961, Menjívar M et al. 2008

\*\*\*Proyecto 1000 Genomas

## Correlación entre los polimorfismos estudiados y el perfil bioquímico

Para evaluar el efecto de las variantes estudiadas sobre las características clínicas en toda la población, se realizó un análisis comparativo mediante el modelo lineal general univariante, de acuerdo a los modelos de herencia: dominante, recesivo y aditivo. Las variantes seleccionadas: rs922541, rs10991437 y rs1800961, se correlacionaron con los parámetros glucosa, colesterol total, triglicéridos y HDL-C, y se corrigieron de acuerdo al IMC, género y edad. A continuación se presentan los resultados del análisis realizado en cada grupo indígena, además de los estadísticos descriptivos para cada parámetro correlacionado.



## rs9282541

Al analizar el polimorfismo rs9282541 del gen *ABCA1* en el grupo Huichol (Tabla 15), se observó diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre los portadores de la variante (T) y los no portadores (C), con las concentraciones séricas de triglicéridos en el modelo dominante. Los modelos recesivo y aditivo no se aplicaron debido a la ausencia de homocigotos para el alelo de riesgo (TT).

**Tabla 15. Relación de las concentraciones séricas de glucosa, colesterol, triglicéridos y HDL-C con la variante rs9282541 en el grupo Huichol, de acuerdo a los modelos de herencia**

rs9282541 gen <i>ABCA1</i>										
Modelo de herencia	Genotipo	N	Glucosa (mg/dL)		Colesterol (mg/dL)		Triglicéridos (mg/dL)		HDL-C (mg/dL)	
			Media	p	Media	p	Media	p	Media	p
Dominante	CC	36	103.44 ± 31.05	0.544	169.47 ±28.46	0.527	173.72 ±97.55	<b>0.009*</b>	46.24 ±9.74	0.097
	CT/TT	6	97.33 ±15.27		177.00 ±19.40		246.83 ±146.90		40.75 ±6.55	

\*  $P < 0.05$

En el grupo Cora (Tabla 16), no hubo correlación entre los parámetros bioquímicos y los portadores de la variante de riesgo (T) por ninguno de los modelos de herencia estudiados.



**Tabla 16. Relación de las concentraciones séricas de glucosa, colesterol, triglicéridos y HDL-C con la variante rs9282541 en grupo Cora, de acuerdo a los modelos de herencia**

rs9282541 gen ABCA1										
Modelo de herencia	Genotipo	N	Glucosa (mg/dL)		Colesterol (mg/dL)		Triglicéridos (mg/dL)		HDL-C (mg/dL)	
			Media	p	Media	p	Media	p	Media	p
Dominante	CC	25	119.64 ± 75.50	0.795	170.32 ± 38.55	0.761	163.20 ±64.67	0.914	45.86 ±12.98	0.562
	CT/TT	26	116.50 ± 49.52		169.92 ± 35.99		168.92 ±78.88		44.87 ±11.24	
Recesivo	CT/CC	46	115.78 ± 60.30	0.417	170.23 ± 33.73	0.753	164.37 ±68.46	0.676	44.95 ±11.50	0.665
	TT	5	138.80 ± 89.78		177.00 ± 51.07		182.20 ±104.89		49.12 ±17.20	
Aditivo	CC	25	119.64 ±75.50	0.617	170.32 ±38.55	0.868	163.20 ±64.67	0.917	45.86 ±12.98	0.681
	CT	21	111.19 ±36.04		168.24 ±32.89		165.76 ±74.31		43.86 ±9.65	
	TT	5	138.80 ±89.78		177.00 ±51.07		182.20 ±104.89		49.12 ±17.20	

\* P<0.05

Asimismo, en el grupo Tepehuano (Tabla 17) tampoco se observó correlación entre los parámetros bioquímicos con los portadores de la variante de riesgo (T) por ninguno de los modelos de herencia.



**Tabla 17. Relación de las concentraciones séricas de glucosa, colesterol, triglicéridos y HDL-C con la variante rs9282541 en grupo Tepehuano, de acuerdo a los modelos de herencia**

rs9282541 gen <i>ABCA1</i>										
Modelo de herencia	Genotipo	N	Glucosa (mg/dL)		Colesterol (mg/dL)		Triglicéridos (mg/dL)		HDL-C (mg/dL)	
			Media	p	Media	p	Media	p	Media	p
Dominante	CC	48	98.92 ± 18.80	0.535	173.71 ± 34.36	0.377	187.75 ±111.44	0.283	43.01 ±7.71	0.274
	CT/TT	35	100.77 ± 41.55		165.86 ± 35.04		209.89 ±134.51		41.18 ±7.59	
Recesivo	CT/CC	79	100.47 ± 30.79	0.281	170.14 ± 34.45	0.986	197.53 ±120.76	0.996	42.07 ±7.66	0.724
	TT	4	84.50 ± 12.01		175.50 ± 43.96		188.25 ±153.84		45.63 ±7.99	
Aditivo	CC	48	98.92 ±18.80	0.359	173.71 ±34.36	0.656	187.75 ±111.44	0.539	43.01 ±7.71	0.442
	CT	31	102.87 ±43.61		164.61 ±34.41		212.68 ±134.42		40.60 ±7.47	
	TT	4	84.50 ±12.01		175.50 ±43.96		188.25 ±153.84		45.63 ±7.99	

\* P<0.05



En cuanto al grupo Mexicanero (Tabla 18), se observó correlación entre las concentraciones séricas de colesterol y los portadores de la variante de riesgo (T) por los modelos dominante y aditivo; además de las concentraciones de triglicéridos y los portadores de la variante de riesgo por el modelo dominante.

**Tabla 18. Relación de las concentraciones séricas de glucosa, colesterol, triglicéridos y HDL-C con la variante rs9282541 en grupo Mexicanero, de acuerdo a los modelos de herencia**

rs9282541 gen <i>ABCA1</i>										
Modelo de herencia	Genotipo	N	Glucosa (mg/dL)		Colesterol (mg/dL)		Triglicéridos (mg/dL)		HDL-C (mg/dL)	
			Media	p	Media	p	Media	p	Media	p
Dominante	CC	19	126.11 ± 130.55	0.432	164.79 ± 29.01	<b>0.006*</b>	228.32 ± 134.21	0.643	42.08 ± 8.40	<b>0.035*</b>
	CT/TT	9	94.56 ± 21.50		200.56 ± 52.46		251.78 ± 151.74		53.48 ± 18.57	
Recesivo	CT/CC	25	116.24 ± 114.84	0.809	170.56 ± 37.90	0.119	222.64 ± 128.76	0.489	44.93 ± 12.65	0.395
	TT	3	113.67 ± 4.73		224.00 ± 37.75		346.00 ± 191.17		52.53 ± 20.33	
Aditivo	CC	19	126.11 ± 130.55	0.717	164.79 ± 29.01	<b>0.026*</b>	228.32 ± 134.21	0.789	42.08 ± 8.40	0.106
	CT	6	85.00 ± 20.05		188.83 ± 57.78		204.67 ± 119.29		53.95 ± 10.64	
	TT	3	113.67 ± 4.73		224.00 ± 37.75		346.00 ± 191.17		52.53 ± 20.33	

\* P<0.05



## rs10991437

Respecto a la variante rs10991437 del gen *ABCA1* en el grupo Huichol (Tabla 19), se observó diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre los portadores de la variante (A) y las concentraciones de triglicéridos por el modelo dominante. No se observaron homocigotos para el alelo de riesgo (AA), por lo que se descartaron los modelos recesivo y aditivo.

**Tabla 19. Relación de las concentraciones séricas de glucosa, colesterol, triglicéridos y HDL-C con la variante rs10991437 en grupo Huichol, de acuerdo a los modelos de herencia.**

rs10991437 gen <i>ABCA1</i>										
Modelo de herencia	Genotipo	N	Glucosa (mg/dL)		Colesterol (mg/dL)		Triglicéridos (mg/dL)		HDL-C (mg/dL)	
			Media	p	Media	p	Media	p	Media	p
Dominante	CC	41	103.02 ±29.47	0.055	169.80 ±27.19	0.314	176.51 ±95.86	<b>0.002*</b>	45.61 ±9.54	0.993
	CA/AA	1	84.00		201.00		498.00		39.00	

\*  $P < 0.05$



Para el grupo Cora (Tabla 20), se observó diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre las concentraciones séricas de colesterol y los portadores de la variante de riesgo (A) por el modelo dominante. También se correlacionaron las concentraciones séricas de HDL-C con los portadores de la variante de riesgo por el modelo aditivo.

**Tabla 20. Relación de las concentraciones séricas de glucosa, colesterol, triglicéridos y HDL-C con la variante rs10991437 en grupo Cora, de acuerdo a los modelos de herencia.**

rs10991437 gen ABCA1										
Modelo de herencia	Genotipo	N	Glucosa (mg/dL)		Colesterol (mg/dL)		Triglicéridos (mg/dL)		HDL-C (mg/dL)	
			Media	p	Media	p	Media	p	Media	p
Dominante	CC	45	119.24 ± 66.20	0.829	176.53 ± 33.55	<b>0.017*</b>	171.60 ± 72.71	0.585	46.62 ± 11.54	0.051
	CA/AA	7	105.71 ± 29.75		131.29 ± 32.66		127.43 ± 45.63		36.81 ± 11.44	
Recesivo	CA/CC	51	117.96 ± 63.00	0.942	171.37 ± 36.34	0.338	167.20 ± 70.79	0.461	45.02 ± 11.85	0.240
	AA	1	90.00		123.00		87.00		59.30	
Aditivo	CC	45	119.24 ± 66.20	0.966	176.53 ± 33.55	0.060	171.60 ± 72.71	0.726	46.62 ± 11.54	<b>0.020*</b>
	CA	6	108.33 ± 31.69		132.67 ± 35.56		134.17 ± 46.01		33.07 ± 6.24	
	AA	1	90.00		123.00		87.00		59.30	

\*  $P < 0.05$



En el grupo Tepehuano (Tabla 21), no hubo correlación entre los parámetros bioquímicos y los portadores de la variante de riesgo(A) por ninguno de los modelos de herencia estudiados.

**Tabla 21. Relación de las concentraciones séricas de glucosa, colesterol, triglicéridos y HDL-C con la variante rs10991437 en grupo Tepehuano, de acuerdo a los modelos de herencia.**

rs10991437 gen <i>ABCA1</i>										
Modelo de herencia	Genotipo	N	Glucosa (mg/dL)		Colesterol (mg/dL)		Triglicéridos (mg/dL)		HDL-C (mg/dL)	
			Media	p	Media	p	Media	p	Media	p
Dominante	CC	60	98.42 ± 32.68	0.503	170.48 ±34.09	0.871	194.05 ±116.04	0.686	41.61 ±7.26	0.256
	CA/AA	23	103.04 ±23.36		170.17 ± 36.89		205.00 ±136.89		43.87 ±8.58	
Recesivo	CA/CC	80	100.25 ±30.39	0.419	170.69 ±35.08	0.819	194.13 ±121.98	0.217	42.46 ±7.56	0.193
	AA	3	85.00 ± 29.51		162.67 ± 23.01		276.00 ± 83.65		36.37 ±9.81	
Aditivo	CC	60	98.42 ±32.68	0.447	170.48 ±34.09	0.970	194.05 ±116.04	0.470	41.61 ±7.26	0.109
	CA	20	105.75 ±21.93		171.30 ±38.85		194.35 ±141.58		44.99 ±8.05	
	AA	3	85.00 ±29.51		162.67 ±23.01		276.00 ±83.65		36.37 ±9.81	

\* P<0.05



En cuanto al grupo Mexicanero (Tabla 22), se observó diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre las concentraciones séricas de glucosa y los portadores de la variante de riesgo (A) por el modelo recesivo. No se aplicaron los modelos dominante y aditivo debido a la ausencia de homocigotos para el alelo silvestre (CC).

**Tabla 22. Relación de las concentraciones séricas de glucosa, colesterol, triglicéridos y HDL-C con la variante rs10991437 en grupo Mexicanero, de acuerdo a los modelos de herencia.**

rs10991437 gen <i>ABCA1</i>										
Modelo de herencia	Genotipo	N	Glucosa (mg/dL)		Colesterol (mg/dL)		Triglicéridos (mg/dL)		HDL-C (mg/dL)	
			Media	p	Media	p	Media	p	Media	p
Recesivo	CA/CC	24	99.50 ±53.51	<b>0.039*</b>	173.79 ±43.01	0.490	238.21 ±144.03	0.885	43.90 ±12.23	0.108
	AA	4	214.75 ±261.52		191.25 ±20.12		221.75 ±105.97		56.85 ±16.39	

\*  $P < 0.05$

### rs1800961

Respecto al polimorfismo rs1800961 del gen *HNF4A*, en el grupo Huichol (Tabla 23) hubo correlación entre las concentraciones séricas de triglicéridos con los portadores de la variante por el modelo dominante. Sólo se aplicó el modelo de herencia dominante ya que no se presentaron homocigotos para el alelo de riesgo (TT).



**Tabla 23. Relación de las concentraciones séricas de glucosa, colesterol, triglicéridos y HDL-C con la variante rs1800961 en el grupo Huichol, de acuerdo a los modelos de herencia.**

rs1800961 gen <i>HNF4A</i>										
Modelo de herencia	Genotipo	N	Glucosa (mg/dL)		Colesterol (mg/dL)		Triglicéridos (mg/dL)		HDL-C (mg/dL)	
			Media	p	Media	p	Media	p	Media	p
Dominante	CC	41	102.51 ± 29.55	0.756	171.07 ± 28.38	0.166	177.85 ±104.81	<b>0.003*</b>	45.90 ±9.37	0.281
	CT/TT	2	93.50 ± 20.51		182.00 ± 2.83		301.50 ±20.51		36.75 ±0.35	

\* P<0.05

En el grupo Cora (Tabla 24), no hubo correlación entre los parámetros bioquímicos y los portadores de la variante de riesgo (T) por ninguno de los modelos de herencia.

**Tabla 24. Relación de las concentraciones séricas de glucosa, colesterol, triglicéridos y HDL-C con la variante rs1800961 en el grupo Cora, de acuerdo a los modelos de herencia.**

rs1800961 gen <i>HNF4A</i>										
Modelo de herencia	Genotipo	N	Glucosa (mg/dL)		Colesterol (mg/dL)		Triglicéridos (mg/dL)		HDL-C (mg/dL)	
			Media	p	Media	p	Media	p	Media	p
Dominante	CC	37	119.70 ± 69.14	0.550	170.03 ±32.91	0.957	167.30 ±64.15	0.592	46.85 ±13.09	0.328
	CT/TT	16	111.25 ±42.09		169.81 ± 44.70		155.88 ±88.04		42.11 ±7.53	

\* P<0.05



Se observó una situación similar para el grupo Tepehuano (Tabla 25), en donde no hubo correlación entre los parámetros bioquímicos y los portadores del alelo de riesgo (T) por ninguno de los modelos de herencia estudiados.

**Tabla 25. Relación de las concentraciones séricas de glucosa, colesterol, triglicéridos y HDL-C con la variante rs1800961 en el grupo Tepehuano, de acuerdo a los modelos de herencia.**

rs1800961 gen <i>HNF4A</i>										
Modelo de herencia	Genotipo	N	Glucosa (mg/dL)		Colesterol (mg/dL)		Triglicéridos (mg/dL)		HDL-C (mg/dL)	
			Media	p	Media	p	Media	p	Media	p
Dominante	CC	81	99.95 ± 30.65	0.425	169.99 ±34.66	0.838	193.58 ±120.59	0.194	42.34 ±7.70	0.505
	CT/TT	2	89.50 ±0.71		187.00 ± 42.43		339.00 ±63.64		38.20 ±6.22	
Recesivo	CT/CC	82	99.83 ±30.48	0.656	170.56 ±34.84	0.557	195.90 ±121.68	0.632	42.34 ±7.65	0.497
	TT	1	89.00		157.00		294.00		33.80	
Aditivo	CC	81	99.95 ±30.65	0.720	169.99 ±34.66	0.582	193.58 ±120.59	0.362	42.34 ±7.70	0.767
	CT	1	90.00		217.00		384.00		42.60	
	TT	1	89.00		157.00		294.00		33.80	

\* P<0.05



Por último, el grupo Mexicanero (Tabla 26) no presentó ninguna correlación entre los parámetros bioquímicos y los portadores del alelo de riesgo (T) en los modelos de herencia. Cabe mencionar que no se presentaron homocigotos para el alelo de riesgo (TT) en el grupo.

**Tabla 26. Relación de las concentraciones séricas de glucosa, colesterol, triglicéridos y HDL-C con la variante rs1800961 en el grupo Mexicanero, de acuerdo a los modelos de herencia.**

rs1800961 gen <i>HNF4A</i>										
Modelo de herencia	Genotipo	N	Glucosa (mg/dL)		Colesterol (mg/dL)		Triglicéridos (mg/dL)		HDL-C (mg/dL)	
			Media	p	Media	p	Media	p	Media	p
Dominante	CC	28	119.29 ± 108.63	0.695	178.11 ±41.15	0.476	241.57 ±138.33	0.365	45.65 ±13.34	0.906
	CT/TT	1	82.00		159.00		174.00		49.80	

\* P<0.05



## VIII. DISCUSIÓN

A través de la investigación desarrollada por diferentes grupos, se han identificado variantes genéticas asociadas a alteraciones metabólicas [22, 36, 59, 60]. Existe evidencia de estudios realizados en poblaciones caucásicas, asiáticas y africanas, en donde se ha observado asociación de polimorfismos en genes como *HNF4A*, *FTO*, *HHEX*, *TCF7L2* con DT2 (Tabla 3). Así como nuevas variantes relacionadas con adipogénesis, resistencia a la insulina y angiogénesis<sup>[37]</sup>. Sin embargo, la distribución de las frecuencias alélicas es diferente en todas las poblaciones, siendo los mestizos mexicanos uno de los grupos con gran variabilidad debido a la estructura genética compleja que posee. Además, se ha demostrado a través de varios estudios la mayor predisposición de los mestizos mexicanos y de los grupos hispanos a desarrollar diabetes y obesidad, lo cual se ha atribuido a su componente genético Amerindio<sup>[60, 61]</sup>.

Considerando que el 70% del componente genético de los mestizos mexicanos es de origen amerindio y, que los grupos indígenas son el sector más vulnerable para desarrollar alteraciones metabólicas y DT2<sup>[62]</sup>, se estudiaron tres polimorfismos previamente asociados a esta enfermedad en otras poblaciones, en etnias del estado de Nayarit. Una de las variantes seleccionadas es propia de la población mestizo mexicana (rs9282541), mientras que la segunda (rs10991437), corresponde a una nueva variante encontrada en población europea<sup>[37]</sup>, y la tercera (rs1800961) ha sido reportada en población europea y asiática en diferentes estudios. Se eligieron las cuatro etnias representativas del estado de Nayarit debido a que su localización geográfica las ha mantenido apartadas de la zona urbana, permitiendo la conservación de su componente genético así como de sus costumbres y tradiciones.



La muestra poblacional evaluada fue de 228 participantes de diferentes edades (18 a 85 años) organizados en los cuatro grupos indígenas: Huichol, Cora, Tepehuano y Mexicanero (Tabla 8). La distribución general de la población mostró una mayor proporción del género femenino (79%) comparado con el masculino (21%) (Gráfica 1) debido a que los hombres en estas poblaciones van a trabajar al campo desde las 4 am, por lo cual es difícil su participación en este tipo de estudios.

El presente estudio se realizó considerando dos apartados: la determinación de los parámetros antropométricos y bioquímicos, y la evaluación genética que corresponde a la frecuencia de los polimorfismos seleccionados. Las características generales (Tabla 9) muestran una población indígena con sobrepeso, indicado por el valor de IMC correspondiente a 25.9 Kg/m<sup>2</sup>; obesidad central en mujeres (ICC=0.90); concentraciones limítrofes de triglicéridos, 159.5 mg/dl, y con un valor bajo de HDL-C en el género femenino, 44.5 mg/dl. Cabe mencionar que el resto de los parámetros se encontraron dentro de los valores de referencia, incluidos los valores de PAS, PAD, glucosa y colesterol (alteraciones en estos parámetros han sido asociadas a enfermedades cardiovasculares y metabólicas). Estos datos reflejan de manera general el estado de salud de los grupos indígenas, mostrando una población con pocos casos de obesidad (18.6%), dislipidemia (21.5% con colesterol alto, 56.1% triglicéridos elevados y 35.6% de mujeres y 72.9% de hombres con HDL-C bajos) e hiperglucemia (36.4%). Dichos porcentajes reflejan una población propensa a padecer enfermedades metabólicas, lo cual podría estar asociado a su estilo de vida, sin embargo, estos grupos no ingieren dietas altas en carbohidratos o lípidos y no tienen una vida sedentaria, por lo que el componente genético que poseen podría estar involucrado de manera significativa.



Al comparar los parámetros antropométricos y bioquímicos de los cuatro grupos (Tabla 10), se observó que hubo diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en los parámetros de peso (Huichol vs Cora/Tepehuano), IMC (Huichol vs Cora), PAS (Mexicanero vs Huichol/Cora), PAD (Cora vs Tepehuano/Mexicanero), ácido úrico (Tepehuano vs Mexicanero) y triglicéridos (Mexicanero vs Huichol/Cora). El grupo Mexicanero fue el grupo que presentó mayores alteraciones antropométricas y bioquímicas: ICC en mujeres, IMC, presión arterial sistólica, concentración de triglicéridos, colesterol y HDL-C. Por su parte, el grupo Huichol, presentó menor número de alteraciones, siendo éstas el ICC en mujeres, concentración de triglicéridos y HDL-C. Estas diferencias ponen de manifiesto la existencia de factores específicos (alimentación, actividad física) en cada grupo indígena que impactan en los parámetros estudiados.

El factor genético se evaluó en el presente trabajo a través de la frecuencia de tres polimorfismos asociados al desarrollo de DT2. Dos de las variantes seleccionadas se encuentran en el gen **ABCA1**, el cual codifica para un transportador de membrana dependiente de ATP. La función de la proteína codificada es transportar colesterol y fosfolípidos a través de la membrana celular, además de estar involucrado en la formación de HDL-C. La variante rs9282541, mejor conocida como R230C, ha sido evaluada en poblaciones europeas, africanas, asiáticas y americanas, las cuales no han reportado evidencia suficiente para asociarlo con la DT2. Sin embargo, estudios realizados en individuos mexicanos han mostrado una asociación significativa entre la variante rs9282541 y la enfermedad. En el presente estudio, los grupos indígenas Cora, Tepehuano y Mexicanero del estado de Nayarit presentaron frecuencias de 30.2%, 22.3% y 24.2% para el alelo de riesgo (T) (Tabla 14). Frecuencias similares se han reportado en otros estudios, como el



de Villarreal-Molina y cols., con una frecuencia de 20.1% en población mexicana <sup>[60]</sup>, Acuña-Alonzo y cols., reporta 12% en población nativo americana <sup>[35]</sup>, y el de Lara-Riegos y cols., con un valor de 20.4% para el alelo de riesgo en población indígena maya <sup>[36]</sup>. Por el contrario, el grupo Huichol presentó una baja frecuencia de 6.1% para el alelo de riesgo, sin presencia de homocigotos para el alelo T. Este pueblo indígena se distingue por ser el menos comunicado y aislado del estado de Nayarit, lo que propicia que tenga características únicas a diferencia de los demás grupos.

La segunda variante del gen **ABCA1** que se estudió en las etnias nayaritas fue el rs10991437, el cual se localiza en una zona intergénica entre los genes **ABCA1** y **SCL44A**. Las frecuencias alélicas observadas para el alelo de riesgo fueron de 2.0%, 6.9%, 16.8% y 55.2% para cada uno de los grupos (Huichol, Cora, Tepehuano y Mexicanero, respectivamente) (Tabla 14). Dichas frecuencias son muy diferentes entre sí, con ello se podría inferir que se trata de una variante propia de ciertas poblaciones, sin embargo existen pocos estudios relacionados con este SNP, por lo que la comparación de los resultados obtenidos con otros es limitante.

El tercer polimorfismo evaluado en la población indígena de Nayarit fue el rs1800961, conocido como T130I por el cambio de aminoácido que provoca la mutación. Respecto a la frecuencias alélicas observadas para el alelo de riesgo, se obtuvieron los siguientes valores: 3.1%, 16.4%, 1.6% y 1.7% para cada uno de los grupos estudiados (Tabla 14). Pese a que los Cora no presentaron ningún de homocigotos para el alelo de riesgo (TT) (Tabla 13), presentaron una frecuencia alta de 16.4% para este mismo. Valores similares han sido reportados en otros estudios, en los cuales se ha encontrado asociación con DT2. Rodríguez-Trejo y cols., reportó una frecuencia de 13% en jóvenes mexicanos no diabéticos <sup>[63]</sup>; Granados-Silvestre y cols., 11.4% en el grupo



indígena Teenek <sup>[64]</sup>; Menjívar y cols., registró un porcentaje de 16% en un estudio de asociación en pacientes del Hospital Juárez de la Ciudad de México <sup>[50]</sup>; y Lara-Riegos y cols., reportó una frecuencia de 10.3% en población indígena maya <sup>[36]</sup>. Esta cifra contrasta con las poblaciones Europeas en donde se ha reportado 4% <sup>[65]</sup>. De acuerdo a las frecuencias reportadas en diferentes estudios, el rs1800961 ha creado controversia en cuanto a su asociación con DT2. Sin embargo, los datos observados en grupos indígenas sugieren la existencia de un fondo genético propio de los grupos autóctonos Mexicanos, que sugiere una contribución a la aparición de diabetes en población mestiza mexicana <sup>[64]</sup>.

En algunos casos, las etnias no permanecieron en equilibrio de Hardy-Weinberg, esto sucede por efecto de selección natural, mutaciones, deriva génica, migración y monogamia. De manera particular, los grupos indígenas estudiados viven situaciones de monogamia bajo la justificación de conservar la pureza de su etnia, lo cual pudo afectar tal equilibrio.

Para relacionar los polimorfismos seleccionados con algunos parámetros bioquímicos, se realizó un análisis comparativo mediante un modelo lineal general univariante. Para el rs9282541 se observaron diferencias significativas en los grupos Huichol y Mexicanero. En el primero de ellos (Tabla 15), hubo una correlación entre las concentraciones séricas de triglicéridos con los portadores de la variante de riesgo (T) por el modelo dominante, lo que indica que el ser portador del alelo T afecta el transporte de triglicéridos, esto se reflejó en la concentración elevada de triglicéridos (246.83 mg/dl) de los heterocigotos y homocigotos de la variante de riesgo. Por su parte, en el grupo Mexicanero (Tabla 18), se observó una correlación entre los parámetros colesterol y HDL-C con los portadores del alelo T por el modelo dominante, aumentando la concentración sérica de colesterol (164.79 mg/dL vs. 200.56



mg/dL) en los portadores de la variante de riesgo. Esto concuerda con estudios realizados en mestizos-mexicanos <sup>[60, 66]</sup> e indígenas <sup>[36]</sup>, en donde se reporta un aumento en las concentraciones séricas de triglicéridos y colesterol en los portadores del alelo de riesgo. En cambio, se observó el efecto contrario en la concentración de HDL-C en el grupo Mexicanero, siendo los no portadores del alelo de riesgo los que presentaron bajos niveles, lo que podría deberse a algún efecto genético (tamaño de la muestra, migración, monogamia) o factor ambiental.

En cuanto al rs10991437 del gen **ABCA1**, hubo diferencias significativas en el grupo Huichol (Tabla 19), presentando un comportamiento similar al rs9282541, ya que hubo correlación entre la concentración de triglicéridos y los portadores del alelo de riesgo (A) por el modelo dominante. En el grupo Cora (Tabla 20) hubo diferencias significativas en los parámetros de colesterol y HDL-C, se observaron concentraciones séricas mayores en los no portadores de la variante de riesgo (A). Cabe mencionar que el tamaño de muestra fue pequeño para los portadores de la variante A, por lo que se sugiere aumentar el tamaño de muestra para verificar que la correlación es correcta. Por su parte, en el grupo Mexicanero (Tabla 22) se correlacionó la concentración sérica de glucosa con los portadores homocigotos del alelo de riesgo, los cuales presentaron concentraciones altas de glucosa (99.5 vs 214.75 mg/dL). Los estudios existentes no son suficientes para comparar los resultados obtenidos, por lo que sería necesario ampliar los estudios del polimorfismo. Aunque se sugiere una función específica del rs10991437 en comparación del rs9282541, pese a pertenecer al mismo gen.

En el análisis realizado para la variante rs1800961 del gen **HNF4A** se observó diferencia significativa en el grupo Huichol (Tabla 23), en donde se correlacionó la concentración sérica de triglicéridos con los portadores de la



variante de riesgo (T) por el modelo dominante. Se observó que los portadores heterocigotos y homocigotos del alelo T tuvieron una concentración de triglicéridos mayor (177.85 vs 301.50 mg/dL) a los no portadores. Un estudio realizado por el grupo de laboratorio <sup>[50]</sup> reportó resultados similares en población mestiza-mexicana, lo que indica que existe una relación entre la concentración de triglicéridos y los portadores del alelo de riesgo. Sin embargo, se sugiere aumentar el tamaño de muestra, ya que sólo se encontró un homocigoto para la variante de riesgo en la población estudiada (Tabla 25).

El presente estudio tiene como finalidad describir genéticamente a las poblaciones indígenas del Estado de Nayarit para tener un primer acercamiento que permita realizar estudios de asociación posteriormente. Esto con el objetivo de identificar factores genéticos propios de los grupos étnicos de México asociados al desarrollo de la DT2.

Finalmente, la presencia de polimorfismos asociados a DT2 en localidades nayaritas, demuestra la presencia de variantes genéticas de susceptibilidad en estos grupos, aunque se sugiere ampliar y profundizar la investigación.



## **IX. CONCLUSIONES**

Las frecuencias alélicas de los polimorfismos rs9282541, rs10991437 y rs1800961, obtenidas de los grupos indígenas del Estado de Nayarit, se compararon con las frecuencias reportadas en mestizos mexicanos y la población americana del Proyecto 1000 Genomas, hallando diferencias significativas entre los grupos de estudio y los datos documentados.

La presencia de dichos polimorfismos, así como la relación con parámetros bioquímicos alterados, revelan la presencia de factores de riesgo genéticos específicos de cada grupo indígena para padecer enfermedades metabólicas, como la diabetes tipo 2.



## X. REFERENCIAS

1. Marian, A.J., *Molecular genetic studies of complex phenotypes*. Transl Res, 2012. **159**(2): p. 64-79.
2. Tom Strachan, J.G., Patrick Chinnery, *Principles of genetic variation*, in *Genetics and Genomics Medicine*, G. Science, Editor. 2015. p. 500.
3. Wright, A.F., *Genetic Variation: Polymorphisms and Mutations*. 2005.
4. CARATACHEA, M.A.C., *Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones*. REV INST NAL ENF RESP MEX, 2007. **20**: p. 213-221.
5. Sadee, W., et al., *Pharmacogenomics of the RNA world: structural RNA polymorphisms in drug therapy*. Clin Pharmacol Ther, 2011. **89**(3): p. 355-65.
6. Sadee, W., *Measuring cis-acting regulatory variants genome-wide: new insights into expression genetics and disease susceptibility*. Genome Med, 2009. **1**(12): p. 116.
7. Hernandez-Romano, J., J. Martinez-Barnette, and V. Valverde-Garduno, *[Polymorphisms in gene regulatory regions and their role in the physiopathology of complex disease in the post-genomic era]*. Salud Publica Mex, 2009. **51 Suppl 3**: p. S455-62.
8. Ramirez-Bello, J., et al., *[Genetic and genomic studies in the hypertension: an actualization of the genomic studies]*. Arch Cardiol Mex, 2011. **81**(3): p. 240-50.
9. Julián Ramírez-Bello, G.V.-A., Carlos Tovilla-Zárate y José Manuel Fragoso, *Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP): implicaciones funcionales de los SNP reguladores (rSNP) y de los SNP-ARN estructurales (srSNP) en enfermedades complejas*. Gaceta Médica de México, 2013. **149**: p. 220-228.
10. Hunt, R., et al., *Silent (synonymous) SNPs: should we care about them?* Methods Mol Biol, 2009. **578**: p. 23-39.
11. Yu, H., et al., *A functional NQO1 609C>T polymorphism and risk of gastrointestinal cancers: a meta-analysis*. PLoS One, 2012. **7**(1): p. e30566.
12. J.M. Soria , J.F.D., J. Martínez-González, M. Camacho, *Métodos de estudio de las enfermedades complejas: aneurismas de la aorta abdominal*. Angiología, 2010. **62**.
13. Illumina, *Methods for Investigating the Genomic Basis of Complex Diseases*. 2014.
14. Cordell, H.J. and D.G. Clayton, *Genetic association studies*. Lancet, 2005. **366**(9491): p. 1121-31.
15. G., M.A., *Genetics of complex diseases\**. J Zhejiang Univ SCIENCE B, 2006: p. 167-168.
16. Davey Smith, G., Ebrahim, S., Lewis, S., Hansell, A.L., Palmer, L.J., Burton, P.R., *Genetic epidemiology and public health: hope, hype, and future prospects*. The Lancet, 2005. **366**: p. 1484-1498.
17. Lorena Orozco, A.G.M.H., Francisco Martin Barajas Olmos, *GENÓMICA DE LAS ENFERMEDADES METABÓLICAS*. Revista Digital Universitaria, UNAM, 2014. **15**: p. 1-15.
18. McCarthy, M.I., *Genomics, type 2 diabetes, and obesity*. N Engl J Med, 2010. **363**(24): p. 2339-50.
19. American Diabetes, A., *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. Diabetes Care, 2013. **36 Suppl 1**: p. S67-74.
20. Miguel Cruz, J.G.-M., Eduardo López-Orduña, Adán Valladares, Reyna Sánchez, Niels Wachter-Rodarte, Rocío Aguilar-Gaytán y Jesús Kumate, *GENES CANDIDATOS COMO POSIBLES MARCADORES DE SUSCEPTIBILIDAD A DIABETES TIPO 2*. Revista de Educación Bioquímica, 2005. **24**: p. 81-86.
21. Fajans, S.S., et al., *Maturity onset diabetes of the young (MODY)*. Diabet Med, 1996. **13**(9 Suppl 6): p. S90-5.
22. Samuel Canizales-Quinteros, A.H.-V., Laura Riba-Ramírez, Adriana Monroy-Guzmán, Aarón Domínguez-López, Sandra Romero-Hidalgo, Carlos Aguilar-Salinas, Maribel Rodríguez-Torres, Salvador Ramírez-Jiménez, María Teresa Tusié-Luna, *Identificación de distintos loci de susceptibilidad relacionados al desarrollo de diabetes de inicio temprano y enfermedad cardiovascular en familias mexicanas*. Gaceta Médica de México, 2004. **141**: p. 115-122.
23. RIEGOS., J.C.L., *ESTUDIO DE LAS VARIANTES POLIMÓRFICAS DE LOS GENES HHEX, HNF4α, KCNJ11, PPARγ, CDKN2A/2B, SLC30A8, CDC123/CAMK1D, TCF7L2, ABCA1 Y SLC16A11, COMO POSIBLES MARCADORES GENÉTICOS DE SUSCEPTIBILIDAD AL DESARROLLO DE DIABETES TIPO 2 EN POBLACIÓN MAYA*, in *PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD 2016*, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO Ciudad de México. p. 187.
24. Gene, E. *Gene Summary Page*. [cited 2016 30 de marzo]; Available from: <http://genome.ewha.ac.kr/cgi-bin/ECquery.cgi?organism=human&query=ABCA1>.
25. Tarling, E.J., T.Q. de Aguiar Vallim, and P.A. Edwards, *Role of ABC transporters in lipid transport and human disease*. Trends Endocrinol Metab, 2013. **24**(7): p. 342-50.
26. *Genetics Home Reference*. 2012 [cited 2016 21 marzo]; Available from: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/ABCA1>.



27. Bungert, S., L.L. Molday, and R.S. Molday, *Membrane topology of the ATP binding cassette transporter ABCR and its relationship to ABC1 and related ABCA transporters: identification of N-linked glycosylation sites*. J Biol Chem, 2001. **276**(26): p. 23539-46.
28. Dean, M., Y. Hamon, and G. Chimini, *The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily*. J Lipid Res, 2001. **42**(7): p. 1007-17.
29. Fitzgerald, M.L., et al., *ATP-binding cassette transporter A1 contains an NH2-terminal signal anchor sequence that translocates the protein's first hydrophilic domain to the exoplasmic space*. J Biol Chem, 2001. **276**(18): p. 15137-45.
30. Locher, K.P., *Review. Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2009. **364**(1514): p. 239-45.
31. Vedhachalam, C., et al., *Mechanism of ATP-binding cassette transporter A1-mediated cellular lipid efflux to apolipoprotein A-I and formation of high density lipoprotein particles*. J Biol Chem, 2007. **282**(34): p. 25123-30.
32. Liu, J., et al., *IMB2026791, a xanthone, stimulates cholesterol efflux by increasing the binding of apolipoprotein A-I to ATP-binding cassette transporter A1*. Molecules, 2012. **17**(3): p. 2833-54.
33. Brunham, L.R., et al., *Beta-cell ABCA1 influences insulin secretion, glucose homeostasis and response to thiazolidinedione treatment*. Nat Med, 2007. **13**(3): p. 340-7.
34. Science, W.I.o. *Gene Cards. Data Human Base*. 2016 [cited 2016 30 d emarzo]; Available from: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ABCA1#proteins>.
35. Acuna-Alonzo, V., et al., *A functional ABCA1 gene variant is associated with low HDL-cholesterol levels and shows evidence of positive selection in Native Americans*. Hum Mol Genet, 2010. **19**(14): p. 2877-85.
36. Lara-Riegos, J.C., et al., *Diabetes susceptibility in Mayas: Evidence for the involvement of polymorphisms in HHEX, HNF4alpha, KCNJ11, PPARGgamma, CDKN2A/2B, SLC30A8, CDC123/CAMK1D, TCF7L2, ABCA1 and SLC16A11 genes*. Gene, 2015. **565**(1): p. 68-75.
37. Shungin, D., et al., *New genetic loci link adipose and insulin biology to body fat distribution*. Nature, 2015. **518**(7538): p. 187-96.
38. Center for Bioinformatics, P.U. *Human Transporter Database*. 2014 [cited 2016 08 noviembre]; Available from: [http://htd.cbi.pku.edu.cn/entry\\_info.php?GeneID=19&SNP&sort\\_by=allele\\_pop\\_diff\\_log10\\_pvalue,het,MAF,rsId,var\\_func,chr\\_pos&only\\_exonic=2](http://htd.cbi.pku.edu.cn/entry_info.php?GeneID=19&SNP&sort_by=allele_pop_diff_log10_pvalue,het,MAF,rsId,var_func,chr_pos&only_exonic=2).
39. Villarreal-Molina, M.T., et al., *Association of the ATP-binding cassette transporter A1 R230C variant with early-onset type 2 diabetes in a Mexican population*. Diabetes, 2008. **57**(2): p. 509-13.
40. Harries, L.W., et al., *The diabetic phenotype in HNF4A mutation carriers is moderated by the expression of HNF4A isoforms from the P1 promoter during fetal development*. Diabetes, 2008. **57**(6): p. 1745-52.
41. Yusuf, D., et al., *The transcription factor encyclopedia*. Genome Biol, 2012. **13**(3): p. R24.
42. Drewes, T., et al., *Human hepatocyte nuclear factor 4 isoforms are encoded by distinct and differentially expressed genes*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(3): p. 925-31.
43. Bogan, A.A., et al., *Analysis of protein dimerization and ligand binding of orphan receptor HNF4alpha*. J Mol Biol, 2000. **302**(4): p. 831-51.
44. Lu, P., et al., *Crystallization of hepatocyte nuclear factor 4 alpha (HNF4 alpha) in complex with the HNF1 alpha promoter element*. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun, 2008. **64**(Pt 4): p. 313-7.
45. Chandra, V., et al., *Multidomain integration in the structure of the HNF-4alpha nuclear receptor complex*. Nature, 2013. **495**(7441): p. 394-8.
46. Gupta, R.K., et al., *The MODY1 gene HNF-4alpha regulates selected genes involved in insulin secretion*. J Clin Invest, 2005. **115**(4): p. 1006-15.
47. Science, W.I.o. *Gene Cards. Data Human Base*. 2016 [cited 2016 30 de marzo]; Available from: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=HNF4A#proteins>.
48. Roser Casamitjana Abellà, J.O.A., Ignacio Conget Donlo, *DIABETES TIPO MODY: CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, BIOQUÍMICAS Y MOLECULARES*. EDUCACIÓN CONTINUADA EN EL LABORATORIO CLÍNICO, 2004. **7**: p. 21-27.
49. Zhu, Q., et al., *T130I mutation in HNF-4alpha gene is a loss-of-function mutation in hepatocytes and is associated with late-onset Type 2 diabetes mellitus in Japanese subjects*. Diabetologia, 2003. **46**(4): p. 567-73.
50. Menjivar, M., et al., *High frequency of T130I mutation of HNF4A gene in Mexican patients with early-onset type 2 diabetes*. Clin Genet, 2008. **73**(2): p. 185-7.
51. INEGI. *Censo de Población y Vivienda 2010*. 2010 [cited 2016 3 de marzo]; Available from: <http://www.cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/nay/poblacion/diversidad.aspx?tema=me&e=18>.
52. Silva-Zolezzi, I., et al., *Analysis of genomic diversity in Mexican Mestizo populations to develop genomic medicine in Mexico*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(21): p. 8611-6.
53. *Estado de Nayarit*. [cited 2016 3 de marzo]; Available from: <http://www.nayarit.gob.mx/>.
54. Diguet, L., *Por tierras occidentales: entre sierras y barrancas*. 2005. 497.



55. *Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana*. 2009 [cited 2016 28 marzo]; Available from: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/pueblos.php?l=2&t=huichol&mo=&demand=&orden=&v=>.
56. *Biblioteca digital de medicina tradicional mexicana*. 2009 [cited 2016 28 marzo]; Available from: [http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/pueblos.php?l=2&t=tepehuan%20del%20sur&mo=&demand a=&orden=&v=](http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/pueblos.php?l=2&t=tepehuan%20del%20sur&mo=&demand=a&orden=&v=).
57. *Biblioteca digital de medicina tradicional mexicana*. 2009 [cited 2016 28 de marzo]; Available from: [http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/pueblos.php?l=2&t=mexicane%20del%20sur&mo=&demand a=&orden=&v=](http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/pueblos.php?l=2&t=mexicane%20del%20sur&mo=&demand=a&orden=&v=).
58. Sambrook, E.F.F., and T. Maniatis, *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cell, 1990. **61**(1).
59. Villalobos-Comparan, M., et al., *The FTO gene is associated with adulthood obesity in the Mexican population*. Obesity (Silver Spring), 2008. **16**(10): p. 2296-301.
60. Villarreal-Molina, M.T., et al., *The ATP-binding cassette transporter A1 R230C variant affects HDL cholesterol levels and BMI in the Mexican population: association with obesity and obesity-related comorbidities*. Diabetes, 2007. **56**(7): p. 1881-7.
61. Zuniga, J., et al., *HLA class I and class II conserved extended haplotypes and their fragments or blocks in Mexicans: implications for the study of genetic diversity in admixed populations*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e74442.
62. Diabetes, F.I.d., *Atlas de Diabetes*, in [www.diabetes.org](http://www.diabetes.org). 2015.
63. Rodríguez-Trejo A, O.L., Menjivar M., *Evaluación del polimorfismo T130 I del gen HNF4A como factor de riesgo de Diabetes mellitus tipo 2 de aparición temprana en alumnos de la facultad de Química de la UNAM*. Medigraphic Artemisa, 2006.
64. Granados-Silvestre Ma, O.-L.g.M.M., *Evaluación de la frecuencia de la Mutacion T130I del gen HNF4A en dos Grupos indígenas mexicanos*. 2° Congreso Nacional de Química Médica, 2006: p. 1-4.
65. Genomes. *rs1800961*. 2015 [cited 2016 Agosto]; Available from: [http://browser.1000genomes.org/Homo\\_sapiens/Variation/Population?r=20:43041864-43042864;source=dbSNP;v=rs1800961;vdb=variation;vf=1230183](http://browser.1000genomes.org/Homo_sapiens/Variation/Population?r=20:43041864-43042864;source=dbSNP;v=rs1800961;vdb=variation;vf=1230183).
66. Villarreal-Molina, T., et al., *The ABCA1 gene R230C variant is associated with decreased risk of premature coronary artery disease: the genetics of atherosclerotic disease (GEA) study*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e49285.
67. Alejos Velázquez Laura Patricia, Aragón Martínez María del Consuelo, and Romero A.C. *Extracción y purificación de ADN*. [cited 2016 6 de febrero]; Available from: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/710/extraccion.pdf>.
68. Tarduchy., G.R.-. *CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS*. 2014 [cited 2016 6 de febrero]; Available from: <https://www.iib.uam.es/portal/documents/76122/76162/CUANTIFICACION+DE+%C3%81CIDOS+NUCLEICOS+V2.pdf/04333940-c6ff-4419-ad85-cfd1e04dbca8>.
69. Duina Posso Duque, T.G.H., *Uso de Marcadores Microsatélites para la Estimación de Diversidad Genética en Plantas*. 2008, Caracas, Venezuela.
70. Tamay de Dios, L.I., C. Velasquillo, C. , *Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real*. Discapacidad en investigación, 2013. **2**: p. 70-78.
71. Rodríguez, M.R.L., William *PCR en tiempo real*. 2006 [cited 2016 5 de febrero].



## XI. ANEXOS

### Anexo I

#### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO



Hospital Juárez de México  
Facultad de Química  
Universidad Nacional Autónoma de México

#### CARTA CONSENTIMIENTO INFORMADO

Titulo del Estudio:	<i>“Estudio genómico para la búsqueda del fondo diabetogénico en población indígena mexicana”</i>
Nombre del Investigador Responsable	Dra. Marta Menjivar Iraheta C Dra. Ma. Guadalupe Ortiz López
Dirección:	Laboratorio de Diabetes, Facultad de Química, UNAM, CU. y Laboratorio de Endocrinología Molecular, Hospital Juárez de México Av. IPN 5160, Colonia Magdalena de las Salinas Del. Gustavo A Madero CP 07760, México, D.F.
Teléfono de contacto	56-22-38-22 y 57-47-76-84

#### Introducción:

El documento que se expone a continuación cumple con lo dispuesto por el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación en Salud. Artículos 1o., 2o., fracción VII, 3o. fracción IX, 4o., 7o., 13 apartado "A" fracciones I, IX, X, apartado "B" fracciones I y VI, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103 y demás relativos a la Ley General de Salud.

Queremos invitarlo a formar parte del proyecto ***“Estudio genómico para la búsqueda del fondo diabetogénico en población indígena mexicana”***, que será desarrollado por investigadoras de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de



*México y el Laboratorio de Endocrinología Molecular del Hospital Juárez de México, preocupadas por el alarmante alza de personas que presentan diabetes en nuestro país, esta enfermedad se caracteriza por aumentar el azúcar en sangre y que con el tiempo daña los riñones, los ojos y el corazón entre otras cosas. La finalidad de este estudio es conocer la herencia de la diabetes de nuestras comunidades indígenas mexicanas, para lo cual mediremos sus concentraciones de azúcar (glucosa) y de grasa en sangre (colesterol, triglicéridos y “colesterol malo”) y también se buscará en su sangre cambios en sus genes (herencia) que pudieran relacionarse con la posibilidad a padecer diabetes, sus resultados serán muy valiosos porque con ellos contribuiremos a prevenir la diabetes a nuestros descendientes.*

*Este estudio tiene como objetivo principal: Profundizar en el conocimiento de factores genéticos que puedan predisponer al desarrollo de la diabetes, que es una enfermedad que afecta en la disminución de la calidad de vida de las personas que la presentan.*

Antes de que usted acepte participar en este estudio, se le presenta este documento de nombre “Consentimiento Informado”, que tiene como objetivo comunicarle de los posibles riesgos y beneficios para que usted pueda tomar una decisión informada y voluntaria.

El consentimiento informado le proporciona información sobre el estudio al que se le está invitando a participar, por ello es de suma importancia que lo lea cuidadosamente antes de tomar alguna decisión y si usted lo desea, puede comentarlo con quien desee (un amigo, un familiar de confianza, etc.) Si usted tiene preguntas puede hacerlas directamente a su médico tratante o al personal del estudio quienes le ayudarán a resolver cualquier duda

Una vez que tenga conocimiento sobre el estudio y los procedimientos que se llevarán a cabo, se le pedirá que firme esta forma para poder participar en el estudio. Su decisión de que es voluntaria, lo que significa que usted es totalmente libre de ingresar o no en el estudio. Podrá retirar su consentimiento en cualquier momento y sin tener que explicar las razones sin que esto signifique una disminución en la calidad de la atención médica que se le brinde, ni afectará la relación con su médico. Si decide no participar, usted puede platicar con su médico sobre los cuidados médicos regulares. Su médico puede retirarlo o recomendarle no participar en caso de que así lo considere.



Este estudio representará un recurso de investigación útil para conocer cuáles son los factores de herencia involucrados en el desarrollo de la diabetes en población mexicana que implicará:

Toma de una muestra de sangre, mediante punción venosa del brazo de un volumen de aproximadamente 15 ml para que con su sangre se hagan 3 cosas:

La extracción de material genético (ADN) para el estudio de los genes especificados en el protocolo “Búsqueda de polimorfismos y mutaciones en genes relacionados con la aparición de diabetes, en población indígena mexicana”.

Es probable que en un futuro se descubran nuevos genes relacionados con la “Diabetes”, por ello se le solicita que autorice al investigador a almacenar su muestra para el estudio de otros genes que se puedan descubrir en el futuro. Si usted acepta autorizar este almacenamiento, se eliminarán de la muestra todos los vínculos con su identidad, antes de guardarla, y no será posible llegar a conocer su identidad a partir de ella. Esta muestra sólo se utilizará para estudiar genes importantes implicados en la Diabetes y no se realizarán otros estudios con ella.

Evaluación de azúcar y grasas en sangre.

Usted también puede aceptar que en dicha muestra de sangre donde se extraerá el material de herencia (ADN) se realicen otros estudios para estudiar otras enfermedades diferentes.

Si usted acepta sólo los estudios de herencia descritos en el punto 1, su muestra se destruirá después de completar la prueba. Si usted acepta que se guarde esa muestra para futuros estudios como se describe en el punto 2, el investigador garantiza que guardará y utilizará la muestra hasta que ya no quede más. Una vez separada la muestra no podrá ser destruida, pero no se podrá relacionar con usted.

Usted debe otorgar su consentimiento informado por escrito, indicando qué parte del estudio genético acepta y firmando este documento, antes de la obtención del muestra

## **Procedimiento**

Si acepta a participar en el estudio, tendrá lugar lo siguiente:

Se le examinará físicamente, tomarán medidas de peso, estatura, cintura y cadera para determinar el Índice de Masa Corporal (IMC) y presión arterial.



Se someterá a un análisis de laboratorio en el cual le harán una extracción de sangre (el equivalente a 3 tubos de 5mL cada uno). Le pedirán que mantenga un ayuno de al menos 8 horas antes de la toma de muestra.

Le solicitarán que responda a un cuestionario para evaluar sus hábitos alimenticios, nivel de estrés y actividad física. En el mismo cuestionario le pedirán algunos datos personales y antecedentes de enfermedades.

## **Riesgos**

Los riesgos de la extracción de sangre incluyen molestias temporales ocasionadas por la punción con la aguja y/o hematomas.

## **Beneficios**

Se le entregarán al participante los resultados bioquímicos (glucosa, colesterol, triglicéridos, ácido úrico, creatinina) y será de su conocimiento si es diabético, propenso a la diabetes o una persona sana. Y en cuanto a encontrar algún polimorfismo y presentar valores de glucosa normal debe ser continuamente monitoreado, como persona susceptible a desarrollar diabetes.

## **Confidencialidad**

Usted tiene derecho de controlar el uso de sus datos personales de acuerdo a la Ley Federal de Protección de datos Personales en Posición de Particulares, así mismo de solicitar el acceso, corrección y oposición de su información personal. La información será procesada de acuerdo a las regulaciones de protección de datos vigentes. Sin embargo, cierta información no podrá estar disponible hasta que el estudio sea completado, esto es con la finalidad de proteger la integridad del estudio.

No se revelará la identidad de las personas que participen en el estudio en ningún informe o publicación que se genere a partir de este trabajo.

**¿A quién puedo llamar si tengo preguntas sobre este proyecto?**



Si usted tiene preguntas acerca de la recolección de muestras, sus derechos en este proyecto o sobre el almacenamiento de las mismas, puede llamar al Hospital Juárez de México con la Dra. Ma. Guadalupe Ortiz López 015557477684, o a la Facultad de Química, UNAM con la Dra. Marta Menjívar Iraheta al 015556223822. Ya que no se cuenta con número 01800.

### **Consentimiento**

1. Yo \_\_\_\_\_ declaro bajo mi responsabilidad que he leído la hoja de información sobre el estudio y acepto participar en este estudio genético.
2. Se me ha entregado una copia de este consentimiento informado, fechado y firmado. Se me han explicado las características y el objetivo del estudio genético y los posibles beneficios y riesgos que puedo esperar. Se me ha dado tiempo y oportunidad para realizar preguntas. Todas las preguntas fueron respondidas a mi entera satisfacción.
3. Sé que se mantendrá en secreto mi identidad y que se identificará mi sangre y mis muestras de material hereditario (ADN) con un número codificado o clave.
4. Soy libre de retirarme del estudio genético en cualquier momento por cualquier motivo, sin tener que dar explicación y sin que repercuta negativamente sobre mi tratamiento médico futuro. Tras ello se procederá a la destrucción de la muestra codificada. Si se hubiera retirado previamente el vínculo de identificación de la muestra, no se podrá relacionar conmigo, de forma que no se podrá destruir.
5. Me han informado que la evaluación física, de laboratorio clínico y el estudio genético no tiene ningún costo, y no habrá ningún gasto adicional para mí.
6. En que toda la información genética de la muestra sea depositada en bases de datos científicas de libre acceso (públicas) en Internet. Cuya información no contendrá datos personales que puedan favorecer la identificación del sujeto.
7. En que una vez que la muestra haya sido estudiada, no podré retirar la información de mi muestra de las bases de datos científicas.

He leído o escuchado toda la información, he hecho todas las preguntas que he tenido, y todas mis preguntas han sido respondidas satisfactoriamente. Soy consciente que dar una muestra es mi decisión.

Medite su elección, subraye uno de los siguientes puntos y firme si usted está de acuerdo.



**Punto 1.** Yo DOY mi consentimiento voluntariamente para que se pueda realizar el estudio genético referente a la “Diabetes” en mi muestra de material genético (ADN).

**Punto 2.** Yo DOY mi consentimiento voluntariamente para que se guarde mi muestra material genético (ADN), con desvinculación de la identidad. Esto permitirá la realización de nuevas pruebas en el futuro cuando se tengan más conocimientos sobre los genes relacionados con la “Diabetes”.

**Punto 3.** Yo DOY mi consentimiento voluntariamente para que en mi muestra de material genético (ADN) desvinculada se puedan realizar futuros estudios en otras enfermedades.

**Acepto que se me realice la toma de muestra de sangre periférica.**

Lugar y fecha \_\_\_\_\_

Nombre del participante: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

Firma del participante: \_\_\_\_\_

¿Se le otorgó copia al participante?  Sí  No

Firma del Investigador \_\_\_\_\_

Nombre del testigo:	
Firma:	Fecha: _____ dd-mmm-aaaa
Dirección:	Relación con el participante:



Nombre del testigo:	
Firma:	Fecha: _____ dd-mmm-aaaa
Dirección:	Relación con el participante:

\_\_\_\_\_  
**Nombre escrito de la persona que explica el consentimiento**

\_\_\_\_\_  
**Firma de la persona que explica el consentimiento**

\_\_\_\_\_  
dd-mmm-aaaa

**Fecha**



## Anexo II

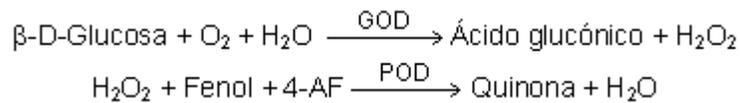
### Determinación de parámetros bioquímicos

#### Fundamento de reacción

##### ➤ Glucosa

La glucosa oxidasa (GOD) cataliza la oxidación de glucosa a ácido glucónico.

El peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) producido, se detecta mediante un aceptor cromogénico de oxígeno, fenol-ampirona en presencia de peroxidasa (POD).



La intensidad del color formado (rojo-violeta) es proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra ensayada.

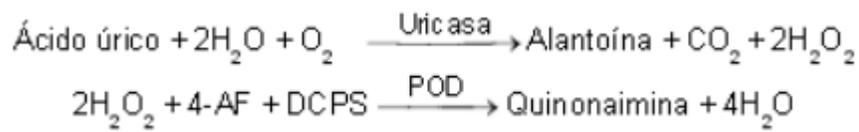
##### ➤ Creatinina

El ensayo de la creatinina está basado en la reacción de la creatinina con el picrato alcalino descrito por Jaffé. La creatinina reacciona con el picrato alcalino formando un complejo rojizo. El intervalo de tiempo escogido para las lecturas permite eliminar gran parte de las interferencias conocidas del método. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de creatinina en la muestra ensayada.

##### ➤ Ácido úrico

El ácido úrico es oxidado por la uricasa a la alantoína y peróxido de hidrógeno ( $2H_2O_2$ ) que en presencia de peroxidasa (POD), 4-aminofenazona (4-AF) y 2-4 diclorofenol sulfonato (DCPS) forma un compuesto rosáceo.

Ácido úrico +  $H_2O$  +  $O_2$



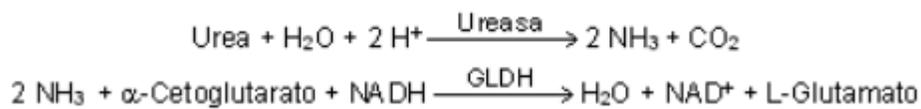


La intensidad de quinonaimina roja formada es proporcional a la concentración de ácido úrico presente en la muestra ensayada.

### ➤ **Urea**

La ureasa cataliza la hidrólisis de la urea, presente en la muestra, en amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) y anhídrido carbónico ( $\text{CO}_2$ ).

El amoníaco formado se incorpora al  $\alpha$ -cetoglutarato por acción de la glutamato deshidrogenasa (GLDH) con oxidación paralela de NADH a  $\text{NAD}^+$ .



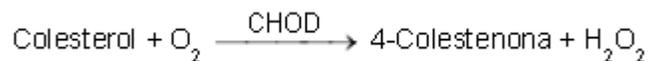
La disminución de la concentración de  $\text{NAD}^+$  en el medio es proporcional a la concentración de urea de la muestra ensayada.

### ➤ **Colesterol Total**

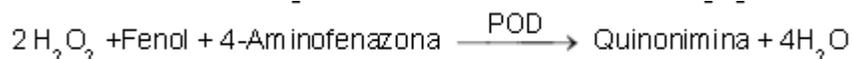
La colesterol esterasa (CE) hidroliza los ésteres de colesterol, produciendo colesterol libre de ácidos grasos.



El colesterol libre se oxida en presencia de la enzima colesterol oxidasa (COX) para formar colestén-3-one y peróxido de hidrógeno.



El peróxido de hidrógeno reacciona con 4-aminofenazona y fenol (contenido en el buffer), en presencia de la peroxidasa (POD). Se produce una quinonimina de color rojo.



La intensidad del color rojo es proporcional a la concentración total de colesterol



### ➤ **Colesterol – HDL (HDL-C)**

El método se basa en la reacción de la enzima colesterol oxidasa con el colesterol no-esterificado, y la disolución selectiva de la HDL utilizando un detergente específico. En el primer reactivo, el colesterol no-esterificado no HDL es sometido a una reacción enzimática tras la cual el peróxido producido es consumido por la enzima peroxidasa con DSBmT, obteniéndose un producto incoloro.

El segundo reactivo consiste en un detergente capaz de solubilizar el HDL específicamente, reaccionando con la enzima colesterol esterasa (CE) y el complejo cromogénico de la etapa anterior, formándose un compuesto coloreado, en forma directamente proporcional a la concentración de colesterol HDL en la muestra.

*HDL, LDL, VLDL Quilomicrones  $\xrightarrow{CO}$  LDL no – reactivo, VLDL Quilomicrones*

*HDL  $\xrightarrow{\text{Detergente específico}}$  HDL disociado*

*HDL Colesterol  $\xrightarrow{CE + CO}$   $\Delta^4$  Colesstenona +  $H_2O_2$*

*$H_2O_2$  + DSBmT + 4 – AAP  $\xrightarrow{\text{Peroxidasa}}$  Complejo coloreado.*

### ➤ **Colesterol LDL (c-LDL)**

Después de la cuantificación de colesterol total y triglicéridos por métodos enzimático-colorimétrico. La determinación de C-LDL se realiza por medio de métodos directos de acuerdo al cálculo de Friedewald. Teniendo validez cuando los niveles de triglicéridos son menores a 400 mg/dL.

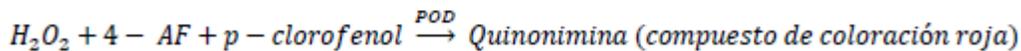
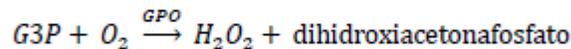
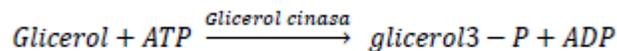
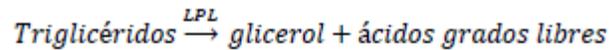
$$C - LDL = CT * C - HDL * \left(\frac{TG}{5}\right)$$

### ➤ **Triglicéridos**

Los triglicéridos, debidos a la acción de lipoproteínas (LPL) liberan glicerol y ácidos grasos libres. El glicerol es fosforilado por glicerolfosfato deshidrogenasa (GPO) y ATP en presencia de glicerol quinasa (GK) para producir glicerol-3-



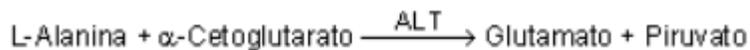
fosfato (G3P) y adenosina-5-difosfato (ADP). El G3P es entonces convertido a dihidroxiacetona fosfato (DAP) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) por GPO. Finalmente, el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) reacciona con 4-aminofenazona (4-AF) y p-clorofenol, reacción catalizada por la peroxidasa (POD) dando una coloración roja.



La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de triglicéridos presentes en la muestra ensayada.

### ➤ Alanina aminotransferasa (ALT)

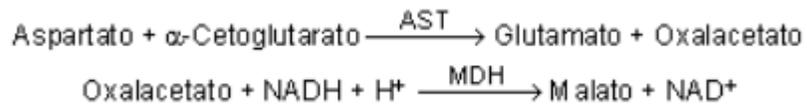
La alanina aminotransferasa (ALT) inicialmente llamada transaminasa glutámico pirúvica (GPT) cataliza la transferencia reversible de un grupo amino de la alanina al  $\alpha$ -cetoglutarato con formación de glutamato y piruvato. El piruvato producido es reducido a lactato en presencia de lactato deshidrogenasa (LDH) y NADH:



La velocidad de disminución de la concentración de NADH en el medio, determinado fotométricamente es proporcional a la concentración catalítica de ALT en la muestra ensayada.

### ➤ Aspartato aminotransferasa (AST)

La aspartato aminotransferasa (AST) inicialmente llamada transaminasa glutamato oxaloacética (GOT) cataliza la transferencia reversible de un grupo amino del aspartato al  $\alpha$ -cetoglutarato con formación de glutamato y oxalacetato. El oxalacetato producido es reducido a malato en presencia de malato deshidrogenasa (MDH) y NADH:



La velocidad de disminución de la concentración de NADH en el medio, determinada fotométricamente, es proporcional a la concentración catalítica de AST en la muestra ensayada.



## Anexo III

### EXTRACCIÓN DE ADN POR EL MÉTODO DE MILLER

La aplicación de técnicas moleculares inicia con la extracción de ADN y la obtención exitosa de datos confiables y reproducibles, en gran medida, de la extracción de ADN íntegro y puro. La extracción consiste en el aislamiento y purificación de moléculas de ADN y se basa en las características fisicoquímicas de la molécula. El ADN está constituido por un azúcar, una base nitrogenada y un grupo fosfato, el cual confiere carga negativa a la doble cadena, característica que es aprovechada para su extracción <sup>[67]</sup>. Los grupos fosfato tienen una fuerte tendencia a repelerse, debido a su carga negativa, lo que permite disolver al ADN en soluciones acuosas y formar una capa hidratante alrededor de la molécula. Pero, en presencia de etanol, se rompe dicha capa y quedan expuestos los grupos fosfato. Bajo estas condiciones se favorece la unión con cationes como  $\text{Na}^+$  que reducen las fuerzas repulsivas entre las cadenas de nucleótidos y permiten que el ADN precipite <sup>[58]</sup>.

Esta técnica consiste en la ruptura de las membranas celulares y eliminación de células anucleadas por tratamiento con detergente, es decir, se lleva a cabo la lisis de leucocitos mediante buffer de lisis, solución de proteinasa K y solución de SDS 10%; se precipitan y eliminan las proteínas por modificación en la concentración de sales; se concentra el ADN por precipitación con alcoholes; se lava y resuspende el extracto.

#### Metodología

- \* En un tubo falcon de 15 mL adicionar:
  - o 2.5 mL de sangre periférica
  - o 6.5 mL de sacarosa tritón 2x (frío)
  - o 3.5 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada (estéril)



- \* Centrifugar a 2000 rpm por 15 min a 4° C.
- \* Decantar el sobrenadante y desechar.
- \* Lavar el botón con 2 mL de solución de sacarosa tritón 1x (frío)
- \* Centrifugar a 2000 rpm por 15 min. 4°C
- \* Tirar cuidadosamente el sobrenadante, el pellet debe verse color rosado, de lo contrario lavar nuevamente con sacarosa tritón 1x (frío)
- \* Agregar:
  - o 1 µL de buffer de lisis nuclear
  - o 55 µL de SDS al 10%
  - o 25 µL de proteinasa K (5mg/mL)
  - o Mezclar suavemente e incubar a 37°C durante toda la noche con agitación constante.

Posterior a la incubación:

- \* Agregar 600µL de cloruro de sodio saturado y agitar vigorosamente.
- \* Centrifugar a 2000 rpm por 15 min. a 4°C.
- \* Transferir el sobrenadante a otro tubo falcon estéril.
- \* Agregar 2 volúmenes de etanol al 100% **FRÍO**.
- \* Mezclar suavemente por inversión y retirar el ADN con una pipeta Pasteur sellada de la punta.
- \* Lavar el ADN con etanol al 70% dentro de un tubo eppendorf.
- \* Dejar secar el ADN (el ADN seco tiene un aspecto transparente).
- \* Disolver el ADN dejando la pipeta Pasteur por 20 min a 37°C en un tubo eppendorf con 200 µL de H<sub>2</sub>O grado molecular.



## **Anexo IV**

### **CUANTIFICACIÓN DE ADN POR ESPECTROFOTOMETRÍA**

La espectrofotometría UV/Visible nos permite confirmar que contamos con cantidad suficiente de ácidos nucleicos (ADN/ARN) de calidad adecuada antes de llevar a cabo ensayos de PCR-Tiempo Real, análisis de SNPs o de secuenciación <sup>[68]</sup>. El fundamento de la espectrofotometría es que cualquier solución que contenga moléculas suspendidas permite el paso de un haz de luz a través de ella en proporción inversa a la cantidad de moléculas que contiene. Los ácidos nucleicos presentan la absorción máxima a una longitud de onda de 260 nm (UV). En la celda de un espectrofotómetro un haz de luz atraviesa la solución de ácidos nucleicos y, cuando ha pasado por la muestra, el fotodetector mide la intensidad de luz absorbida. Mientras más luz absorba la muestra mayor será la concentración de ácidos nucleicos. La densidad óptica es la unidad de absorbancia y tiene valores particulares para cada molécula específica en una determinada longitud de onda por unidad de distancia. En el caso de los ácidos nucleicos, una OD de 1 a 260 nm equivale a 50 µg/mL.

La ventaja de trabajar con el espectrofotómetro NanoDrop1000 es que la cuantificación se lleva a cabo a partir de 1 µL de muestra sin ayuda de ningún tipo de cubeta ya que la muestra se pipetea directamente sobre la superficie de medida. El rango de medida para muestras de ADN es de 2 a 3700 ng/µL. Además, el equipo permite conocer la pureza de la muestra mediante el índice 260/280 <sup>[68]</sup>.

#### Índice 260/280

A pesar de que la técnica de extracción de los ácidos nucleicos está bien realizada, es imposible eliminar la totalidad de las proteínas celulares, así como de solventes y otros residuos orgánicos. Con el fin de valorar la pureza de la



muestra, ésta se compara con la longitud de onda a la que absorben las proteínas, 280 nm.

Dado que las proteínas absorben luz a una longitud de onda de 280nm. Una muestra de ácidos nucleicos pura tiene un índice 260/280 de 1.8 a 2.0. Cuando el valor es menor a 1.8, la cantidad de proteína en la muestra es alta y es conveniente realizar un nuevo proceso de extracción. Así también, un índice mayor a 2.0, indica una rotura de las cadenas de los ácidos nucleicos, y se considera que la calidad es insuficiente.

### **VERIFICACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE ADN POR ELECTROFORESIS**

Así como la concentración e integridad del ADN extraído pueden ser verificadas mediante electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida. La electroforesis consiste en la separación de moléculas a través de una matriz tamponada (agarosa, acrilamida, almidón). La matriz funciona como un filtro, separando las moléculas en un campo eléctrico, de acuerdo al tamaño y la carga neta que poseen. En el caso de los ácidos nucleicos, el grupo fosfato es el responsable por la fuerte carga negativa en condiciones de pH neutro, haciendo que los fragmentos migren hacia el polo positivo (ánodo) durante la electroforesis.

Los ácidos nucleicos separados en geles de agarosa pueden visualizarse mediante tinción con colorantes fluorescentes, lo cual permite evaluar su integridad. Los colorantes fluorescentes actúan mediante inserción entre los pares de bases que conforman el ácido nucleico. El bromuro de etidio es ampliamente utilizado para la visualización de ADN y ARN. Sin embargo, éste es un reactivo altamente tóxico, con propiedades mutagénicas, por lo que debe ser manejado con extremo cuidado. Existen colorantes fluorescentes alternativos, como SYBR Safe, SYBR Gols, SYBR Green y Syto60, desarrollados para reducir los riesgos potenciales de mutagénesis <sup>[69]</sup>.



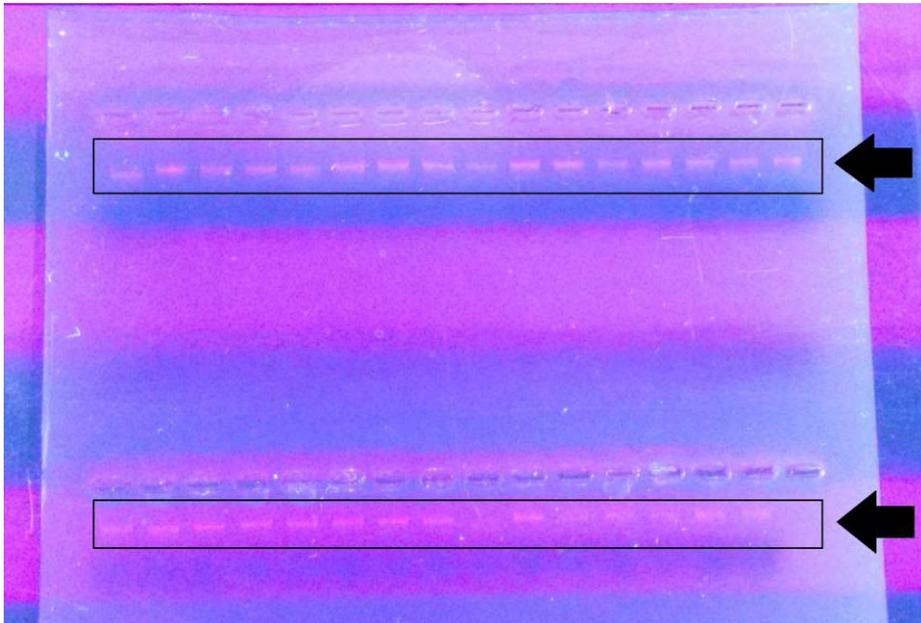
## Metodología:

Preparación del gel de agarosa al 1%:

- \* Pesar – de agarosa y disolverlos en – mL de buffer TBE 1x.
- \* Calentar en el microondas en lapsos de 20 s hasta que la agarosa quede totalmente disuelta.
- \* Cuando la solución de agarosa haya alcanzado una temperatura soportable por la mano, agregar 1 $\mu$ L de bromuro de etidio (10 mg/mL). Mezclar de manera circular evitando que se formen burbujas en el gel.
- \* Colocar el o los peines en el molde de corrida. Verter lentamente el gel líquido por uno de los extremos y retirar las burbujas que queden sobre el área de corrida de las muestras con una punta limpia.
- \* Dejar polimerizar la agarosa.

Para la corrida de electroforesis:

- \* Llenar la cámara de electroforesis con buffer TBE 1x hasta cubrir el gel.
- \* En cada pozo colocar 5  $\mu$ L de muestra de ADN y 3  $\mu$ L de buffer de carga. (rápido)
- \* Conectar los electrodos de la cámara a la fuente de poder y correr la electroforesis a 70V durante 1h.



**Figura 11. Gel de agarosa al 1.5% para verificación de la integridad de ADN**



## ANEXO V

### GENOTIPIFICACIÓN POR PCR-Tiempo Real

La PCR en tiempo real tiene el objetivo de detectar y cuantificar las secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante el uso de reporteros fluorescentes en la reacción. El principio de la técnica se basa en la PCR punto final, sólo que la forma en cómo se detectan y analizan los productos de la amplificación es diferente. El término en tiempo real se refiere a que la detección de los productos amplificados sucede en cada ciclo de la reacción. Por su parte, el término cuantitativo hace referencia a que es posible cuantificar la cantidad de ADN en la muestra. Actualmente, la q-PCR es el método más sensible para detectar y cuantificar los ácidos nucleicos. Aun teniendo una cantidad muy pequeña de templado, el sistema garantiza una alta sensibilidad especificidad y eficacia.

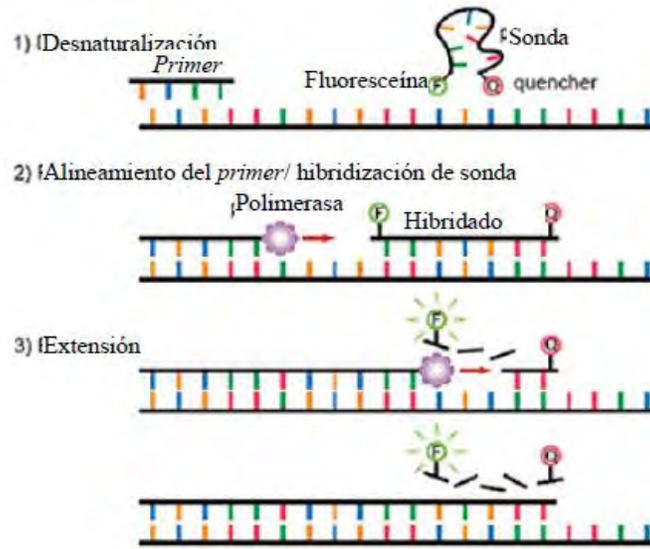
Los reactivos químicos en la PCR-Tiempo Real, son los mismos utilizados en la PCR punto final, sólo que la **enzima, dNTP's, Mg<sup>2+</sup>**, el buffer y el sistema reportero de fluorescencia se venden juntos en la solución conocida como "**Master mix**". Los primers deben ser diseñados especialmente para garantizar una alta especificidad y para que generen amplicones de un tamaño que oscile entre 100-150 pb.

El monitoreo de los productos amplificados se realiza mediante estrategias tecnológicas basadas en sistemas de reporteros fluorescentes. Existen métodos no específicos que usan sondas como el bromuro de etidio y el SYBR-Green; y los métodos específicos que a su vez se clasifican en hidrólisis e hibridación. Uno de los más utilizados es el método específico de hidrólisis que utiliza sondas Taqman <sup>[70]</sup>.



## **Sondas de hibridación específicas**

Son sondas marcadas con dos tipos de fluoróforos, un donador y un aceptor. El proceso también se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET) entre las dos moléculas. Las sondas de hidrólisis Taqman son oligonucleótidos marcados con un fluoróforo donador en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un receptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador. Para que esto ocurra, las moléculas donadora y aceptora deben estar próximos. Además, el espectro de emisión de la primera se ha de solapar con el espectro de absorción de la segunda. Mientras la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor. Sin embargo, durante la amplificación de ADN templado, la sonda se hibrida con su cadena complementaria. Al desplazarse a lo largo de la cadena, en su acción de síntesis, la ADN polimerasa, que tiene **actividad de 5' exonucleasa, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda**, produciéndose la liberación del fluoróforo donador. Como el donador y aceptor están ahora espacialmente alejados, la fluorescencia emitida por el primero es captada por el detector. Una aplicación común de éste tipo de sondas es que se utilizan como método para la genotipificación. Dos son fluorogénicas, con marcadores espectralmente diferentes, pueden ser utilizadas para discriminar entre alelos nativos y mutantes. Si se detecta la amplificación de una muestra de ADN desconocido por la identificación del fluoróforo del alelo nativo y no por la del alelo mutado, la muestra se considera homocigoto del tipo nativo y, de forma inversa, si se encuentra fluorescencia del marcador de identificación mutante, se clasifica como homocigoto de la cepa mutante. Y si presenta ambos marcajes, se designa como heterocigota para los dos alelos <sup>[71]</sup>.



**Figura 12. Fundamento de q-PCR por el método específico de hibridación con sondas Taqman**

### Información de sondas TaqMan®

SNP	Sonda TaqMan	Secuencia
rs9282541	C__11720861_10	GGCTTCAGGATGTCCATGTTGGAAC[A/G]AAGTACTCG CTCTGCTGCAGCCAGT
rs1800961	C___7591528_10	CAGAATGAGCGGGACCGGATCAGCA[C/T]TCGAAGGT CAAGCTATGAGGACAGC
rs10991437	C__31952442_10	GTCCCAACAGCTATACATATTGAAT[A/C]TCTTAATAAC ACCACTTTGCTTCAT