



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN LA REGIÓN CONTROL
DEL GEN *INS* ASOCIADOS A DIABETES MELLITUS TIPO 2 EN MÉXICO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIOL. BARRERA SÁNCHEZ ELIZABETH

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JAIME BERUMEN CAMPOS.
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DRA. MARTHA PATRICIA OSTROSKY SHEJET.
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS, UNAM.
DR. MIGUEL CRUZ LÓPEZ.
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

CD. MX., ENERO DE 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN LA REGIÓN CONTROL
DEL GEN *INS* ASOCIADOS A DIABETES MELLITUS TIPO 2 EN MÉXICO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIOL. BARRERA SÁNCHEZ ELIZABETH

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JAIME BERUMEN CAMPOS.

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DRA. MARTHA PATRICIA OSTROSKY SHEJET.

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS, UNAM.

DR. MIGUEL CRUZ LÓPEZ.

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MEDICA EN BIOQUIMICA, IMSS.

MÉXICO, CD. MX., ENERO DE 2020

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/033/2020

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **11 de noviembre de 2019** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biomedicina** de la estudiante **BARRERA SÁNCHEZ ELIZABETH** con número de cuenta **307062033** con la tesis titulada **"IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN LA REGIÓN CONTROL DEL GEN /NS ASOCIADOS A DIABETES MELLITUS TIPO 2 EN MÉXICO"**, realizada bajo la dirección del **DR. JAIME BERUMEN CAMPOS**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. VERÓNICA GUARNER LANS
Vocal: DRA. MARÍA CRISTINA FERNÁNDEZ MEJÍA
Secretario: DRA. MARTHA PATRICIA OSTROSKY SHEJET
Suplente: DRA. ANDREA SACHI DÍAZ VILLASEÑOR
Suplente: DRA. MYRIAM MARLENNE ALTAMIRANO BUSTAMANTE

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 10 de enero de 2020

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIDAD DE POSGRADO

Edificio D, 1º Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX
Tel. (+5255)5623 7002 <http://pcbiol.posgrado.unam.mx/>

Agradecimientos institucionales

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por las oportunidades que permitieron mi desarrollo académico y profesional, a través del Posgrado en Ciencias Biológicas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (CVU 850425).

A mí tutor el Dr. Jaime Berumen Campos, por la confianza depositada en mí para realizar este proyecto, por compartir conmigo sus conocimientos, por sus consejos académicos y personales.

Al comité tutorial, la Dra. Martha Patricia Ostrosky Shejet y el Dr. Miguel Cruz López por sus observaciones y consejos en las evaluaciones tutorales.

Agradecimientos personales

A mis padres Angeles y Ernesto,

Porque sin duda la conclusión de este proyecto no es más que el resultado del apoyo y la educación que me han dado.

A mis hermanos Daniel y Ernesto,

Por su apoyo que ha sido fundamental en mis logros.

A los integrantes de la Unidad de Medicina Genomica, del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga” por su amistad durante mi estancia en el laboratorio. En especial a la M. en C. Eligia Juarez y a la Dra. Valeria Barrón, por su asesoría y consejos.

*“...la ciencia no es más que la investigación de un milagro inexplicable,
y el arte, la interpretación de ese milagro”*

Ray Bradbury

Índice

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Justificación	7
Hipótesis	7
Objetivos	8
Metodología	9
1. Selección de muestra	9
2. Identificación del polimorfismo STR <i>TH01</i>	9
3. Análisis de la frecuencia alélica y genotípica del locus <i>TH01</i>	10
4. Identificación de los alelos asociados a la DT2 en México.....	10
5. Análisis de desequilibrio de ligamiento.....	11
6. Identificación y análisis de la frecuencia haplotípica.....	11
Resultados	12
Discusión	31
Conclusiones	34
Literatura citada	35

Resumen

El minisatélite *VNTR INS* se ha asociado a la DT1 y DT2 en poblaciones caucásicas, sin embargo, su asociación con la DT2 es controversial. Este minisatélite se encuentran en desequilibrio de ligamiento con el microsatélite *TH01* localizado en el gen *TH*, río abajo del gen *INS*. El *TH01* está localizado relativamente cerca de los loci *rs149483638 (INS_IGF2)* y *rs2237897 (KCNQ1)* asociados previamente a la DT2 en población mexicana. Dado que no existen estudios de asociación entre *TH01* y la DT2, el objetivo de este estudio fue identificar si el locus *TH01* están asociados a la DT2 en México, e investigar si existe desequilibrio de ligamiento entre el microsatélite *TH01* y los SNPs *rs149483638* y *rs2237897*. Se realizó un estudio de casos y controles que incluyó 364 casos con DT2 y 393 controles. El microsatélite *TH01* se genotipó por análisis de fragmentos y se confirmó la secuencia del repetido por secuenciación tipo Sanger. La asociación con la DT2 se realizó con un modelo de regresión logística univariada utilizando el programa SPSS 24, y el desequilibrio de ligamiento se exploró con el programa Arlequín 3.5. Se identificaron 9 alelos del locus *TH01*, 5 de ellos tuvieron una frecuencia $\geq 5\%$ en la población: 6 (32.8%), 7 (35.2%), 8 (5.5%), 9 (5.6%) y 9.3 (20.3%). Las frecuencias genotípicas observadas se encontraron de acuerdo al equilibrio de Hardy-Weinberg ($p > 0.05$). El alelo 9 se asoció con un efecto protector para desarrollar DT2 en mujeres antes de los 40 años (OR=0.344, CI=0.13-0.89, $p=0.028$), mientras que el alelo 9.3 se asoció significativamente con un riesgo mayor para desarrollar DT2 en hombres mayor de 39 años (OR=1.902, CI=1.17-3.09, $p=0.009$). El locus *TH01* se encontró en desequilibrio de ligamiento con el *rs149483638 (INS_IGF2)*. Ambos alelos 9 y 9.3 del locus *TH01* se encontraron ligados al alelo de riesgo (C) del *rs149483638 (INS_IGF2)*, No obstante, el alelo protector (9) de *TH01* no se encontró asociado al alelo protector (T) de *INS-IGF2*, lo que sugiere que el mecanismo protector de *TH01* debe ser diferente al involucrado con ese SNP. Es necesario replicar estos resultados en diferentes poblaciones en México y a nivel mundial e investigar los mecanismos por los cuales los alelos de riesgo y protección del *TH01* ejercen su efecto sobre la DT2.

Abstract

The *INS VNTR* minisatellite has been associated with T1D and T2D in Caucasian populations, however, its association with T2D is controversial. This minisatellite is in linkage disequilibrium with the *TH01* microsatellite located in the TH gene, downstream of the *INS* gene. *TH01* is located relatively close to loci *rs149483638* (*INS_IGF2*) and *rs2237897* (*KCNQ1*) previously associated with T2D in the Mexican population. There are no association studies between *TH01* and T2D, the objective of this study was to identify whether the *TH01* locus is associated with T2D in Mexico and investigate whether there is a linkage disequilibrium between the *TH01* microsatellite and the SNPs *rs149483638* and *rs2237897*. A case-control study was conducted that included 364 cases with T2D and 393 controls without T2D. *TH01* microsatellite was genotyped by fragment analysis and the repeat sequence was confirmed by Sanger type sequencing. The association with T2D was carried out with a univariate logistic regression model using the SPSS 24 program, and the linkage imbalance was explored with the Harlequin 3.5 program. 9 alleles of the *TH01* locus were identified, 5 of them had a frequency $\geq 5\%$ in the population: 6 (32.8%), 7 (35.2%), 8 (5.5%), 9 (5.6%) and 9.3 (20.3%). The observed genotypic frequencies were found according to the Hardy-Weinberg equilibrium ($p > 0.05$). Allele 9 was associated with a protective effect to develop T2D in women before age 40 years (OR = 0.34, CI: 0.13-0.89, $p = 0.028$), while allele 9.3 was significantly associated with a higher risk for developing T2D in men older than 39 years (OR = 1.902, CI: 1.17-3.09, $p = 0.009$). The *TH01* locus was in linkage disequilibrium with *rs149483638* (*INS_IGF2*). Both alleles 9 and 9.3 of the *TH01* locus were found linked to the risk allele (C) of *rs149483638* (*INS_IGF2*), however, the protective allele (9) of *TH01* was not found associated with the protective allele (T) of *INS_IGF2*, which suggests that the protective mechanism of *TH01* should be different from that involved with that SNP. It is necessary to replicate these results in different populations in Mexico and worldwide and investigate the mechanisms by which the risk and protection alleles of *TH01* exert their effect on T2D.

1. Introducción

La Diabetes es un problema de salud pública a nivel mundial, cuya incidencia ha incrementado rápidamente en diversos países (Rutter A. 2014). La Federación Internacional de Diabetes (IDF) estimó el número de personas con Diabetes en casi 500 millones de personas afectadas por diabetes a partir de 2017 (y casi 700 millones para 2045), (Cho N. *et al.*, 2018). Actualmente el 90% de los casos de Diabetes corresponden a Diabetes Mellitus Tipo 2 (DT2) (Rutter A. 2014).

La población de indios Pima presenta la incidencia de DT2 más alta a nivel mundial, (23.5 - 25.3 por cada 1000 personas por año) (Villalpando G. *et al.*, 2014), mientras que poblaciones europeas presentan incidencia muy baja (1.2 - 4.1 por cada 1000 personas por año) (Jarrett J. *et al.*, 1979; Keen H. *et al.*, 1982). En México, la DT2 es una enfermedad crónica muy frecuente, cuya incidencia es considerada de las más altas (13.7 - 14.4 por cada 1000 personas por año) (Villalpando G. *et al.*, 2014). De acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición la DT2 afecta al 9.2 % (6.4 millones de personas) de la población entre 20 y 69 años en Mexico (ENSANUT 2012), sin embargo, considerando también los no diagnosticados, la prevalencia aumenta hasta 18.9%. Además, la DT2 pasó de ocupar el segundo lugar en número de defunciones por año (ENSANUT 2012) a ocupar el primer lugar en tan solo 4 años (SEGOB, 2016).

La Diabetes mellitus tipo 2 es una enfermedad metabólica multifactorial que se caracteriza por la resistencia de los tejidos periféricos a la acción de la insulina y un déficit de la secreción de insulina que aparece como resultado de la hiperglucemia sostenida y la sobre estimulación persistente de las células β (ADA, 2010.). El origen de la DT2 esta dado por la interacción de factores genéticos y ambientales. Los factores genéticos incrementan la susceptibilidad mientras que los factores ambientales actúan como disparadores o desencadenantes (Rodríguez G. 2014). Los factores ambientales juegan un papel importante en el aumento a la resistencia de los tejidos periféricos a la acción de la insulina, así como en el desarrollo de la DT2 (Kaur J. 2014).

La obesidad es uno de los principales factores ambientales asociados al desarrollo de la enfermedad, de hecho, el 58% del incremento global en la prevalencia de DT2 ha sido atribuido principalmente a éste factor (Yisahak S. *et al.*, 2014), y se ha visto que el riesgo de DT2 aumenta linealmente con el incremento en el índice de masa corporal (IMC) (DeFronzo, R. y Ferrannini E. 1991); sin embargo, esta relación podría no ser tan directa, ya que en poblaciones como China, India y Japón, en los que la prevalencia de la obesidad es relativamente baja y la prevalencia de DT2 es alta. (Wells, J. 2017). En contraste en países como Australia y Reino Unido, que tienen una prevalencia alta de obesidad, tienen una prevalencia baja de DT2 (OECD, 2017).

Mediante estudios de asociación de todo el genoma (GWAS) se han identificado más de 100 polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) asociados a la DT2 en la última década (Welter, D. *et al.*, 2014), la mayoría de ellos localizados en genes, en regiones no codificantes (Bell, *et al.*, 1984; Owerbach, D. and Gabbay, K. 1993). Sin embargo, estos polimorfismos explican solo una pequeña parte de la variabilidad estimada para el desarrollo de la enfermedad (Hara K. *et al.*, 2014). En un estudio, en población Europea, en el que reportaron 36 SNPs asociados a DT2 encontraron que la variabilidad aportada por estas variantes es aproximadamente del 10% (Herder C. and Roden M. 2011).

La asociación más fuerte conocida hasta el momento en población Mexicana son los SNPs ubicados en los genes *TCF7L2* (Pradas *et al.*, 2014), *SLC16A11* y *HNF1A* (*SIGMA Type 2 Diabetes Consortium*. Williams A. *et al.*, 2014; *SIGMA Type 2 Diabetes Consortium*. Estrada K. *et al.*, 2015). En estudio de casos y controles también en población mexicana en el cual evaluaron la influencia de diferentes factores cómo la obesidad, la historia parental (HP) de DT2, y 16 SNPs asociados al desarrollo de DT2, encontraron que la influencia de los SNPs era solo del 8.4%, de la obesidad fue de 7.1 % y de la HP del 11.8% (Berumen J. *et al.*, 2019).

El gen de la insulina humana (*INS*) se localiza en el brazo corto del cromosoma 11p15.5 en una región de aproximadamente 40 kb, que incluye además los genes del Factor de Crecimiento similar a Insulina 2 (*IGF2*) y el de

Tirosina Hidroxilasa (TH) (Julier *et al.*, 1991; Lucassen *et al.*, 1993), los cuales comparten mecanismos de regulación a nivel transcripcional (Mutskov and Felsenfeld. 2009). Estudios de asociación y de ligamiento demostraron que el *VNTR INS* está relacionado a la diabetes mellitus tipo 1 (TD1) (Bennett, T. *et al.*, 1997), y confiere susceptibilidad a la DT2 (Bell, *et al.*, 1984; Owerbach, D. and Gabbay, K. 1993). Alelos del *VNTR INS* confieren susceptibilidad a la DT2 cuando son heredados vía materna (Huxtable S. *et al.*, 2000). Incluso, se ha demostrado que este minisatélite se encuentra involucrado en la regulación del gen *INS* (Lucassen *et al.*, 1995). Sin embargo, en estudios más recientes no han confirmado tal asociación (Khoshroo M, *et al.*, 2017).

Muy cercano al *VNTR INS*, se localizan dos SNPs asociados previamente a DT2 en población mexicana (Figura 1), el rs149483638 ubicado en el segundo intrón del gen *IGF2* localizado 2 kb 5' al gen *INS*, y el rs2237897, localizado en el gen Subunidad Primaria del Canal de Potasio dependiente de Voltaje (*KCNQ1*), ~ 60 Kb 3' del gen de la *INS*. (Berumen J. *et al.*, 2019).

Aproximadamente 10 kb 5' de *INS*, en el primer intrón del gen *TH* se localiza el microsatélite *TH01* (Figura 1), un repetido del tetranucleótido "AATG" que se ha asociado a enfermedades como Obesidad (Gu *et al.*, 2002), Hipertensión (Sharma, P. *et al.*, 1998; Jindra, A. *et al.*, 2000), Enfermedad Coronaria (Sankaranarayanan, K. 1999), Síndrome Metabólico y altos niveles de triglicéridos (Haffner, S.M. 2002). Además este microsatélite se ha utilizado como marcador subrogado para evaluar la asociación del *VNTR INS* con la DT1 en poblaciones caucásicas, ya que el *TH01* se encuentra en desequilibrio de ligamiento con el *VNTR INS* (McGinnis y Spielman 1995). Y debido a la variación en la estructura y longitud del *VNTR INS*, el microsatélite *TH01* ha sido más fácil de explorar (Jeffreys *et al.*, 1991; Stead y Jeffreys 2000, 2002).

Además, este microsatélite se ha utilizado para identificación de individuos e investigación forense en todo el mundo (Butler J. y Hill R, 2012). Sin embargo, dado que no se ha estudiado en ninguna población la asociación directa del microsatélite *TH01* con la DT2, en este estudio investigamos si el *TH01* está asociado a la DT2 mediante la realización de un estudio de casos y controles.

GRCh38 Cromosoma 11p15.5 (*IGF2_INS-TH01-KCNQ1*)

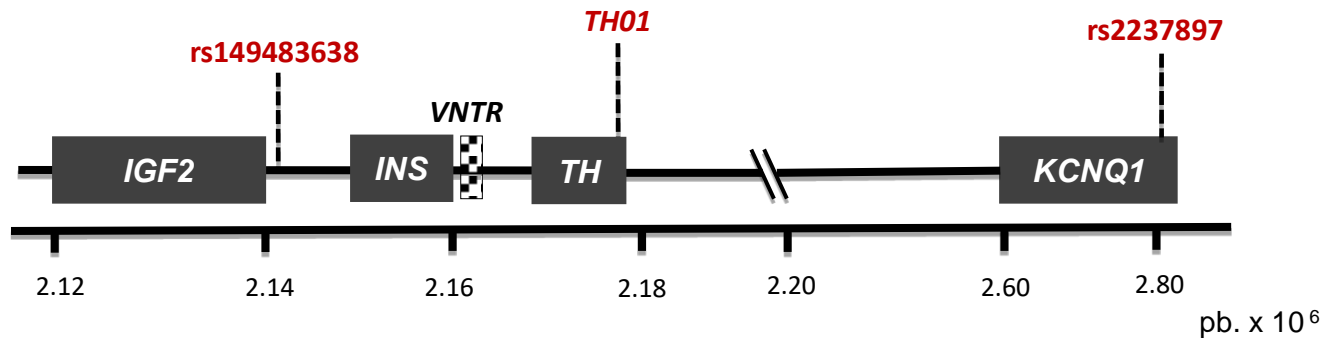


Figura 1. Ubicación de los loci *rs149483638* entre el gen del Factor de Crecimiento similar a Insulina 2 y el gen de Insulina (*IGF2_INS*); *TH01* en el gen Tirosina Hidroxilasa (*TH*) y *rs2237897* la Subunidad Primaria del Canal de Potasio dependiente de Voltaje (*KCNQ1*) en el cromosoma 11.

2. Justificación

Desde hace más de dos décadas se han estudiado polimorfismos en la región cercana al gen *INS* para evaluar su asociación con la DT2 en poblaciones europeas, particularmente se ha utilizado al *VNTR INS*. Sin embargo, debido a la dificultad para explorarlo, se ha utilizado al microsatélite *TH01* que se encuentra en desequilibrio de ligamiento con el *VNTR INS* como un marcador subrogado para evaluar la asociación con la DT2, no obstante, los resultados han sido inconsistentes (Ong K, *et al.*, 1999; Bell, *et al.*, 1984; Owerbach, D. and Gabbay, K. 1993). Por otra parte, se ha demostrado que el microsatélite *TH01* participa en la regulación del gen *INS* (Lucassen *et al.*, 1995) y, además se ha asociado a enfermedades relacionadas a la DT2, como obesidad (Gu *et al.*, 2002), Hipertensión (Sharma, P. *et al.*, 1998; Jindra, A. *et al.*, 2000) y síndrome metabólico (Haffner, M. 2002).

Hasta el momento no se han asociado directamente los alelos del microsatélite *TH01* con la predisposición a la DT2 en México y en el mundo, dado que el locus *TH01* se localiza en una zona relativamente cercana a los loci *rs149483638 (INS_IGF2)* y *rs2237897 (KCNQ1)* asociados a DT2 en población mexicana (Berumen J. *et al.*, 2019) es posible que se encuentren en desequilibrio de ligamiento y que compartan una asociación a la DT2.

3. Hipótesis

Algunos alelos del locus *TH01* se encuentran asociados a la DT2 y en desequilibrio de ligamiento con los SNPs *rs149483638 (IGF2_INS)* y *rs2237897 (KCNQ1)*.

4. Objetivo general

1.- Identificar los alelos del locus *TH01* asociados a la DT2 en México.

5. Objetivos particulares

1.- Identificar las frecuencias alélicas y genotípicas de los alelos del locus *TH01* en población mexicana.

2.- Investigar si alelos y/o genotipos del locus *TH01* están asociación a la DT2 en México.

3.- Evaluar si los loci *TH01*, *rs149483638 (INS_IGF2)* y *rs2237897 (KCNQ1)* se encuentran en desequilibrio de ligamiento.

4.- Identificar los haplotipos formados entre los loci *TH01*, *rs149483638 (INS_IGF2)* y *rs2237897 (KCNQ1)* asociados a la DT2.

6. Metodología

1. Selección de muestra

Se realizó un estudio de casos y controles. Los casos y controles incluidos en este estudio forman parte del Estudio de Diabetes en México (DMS), cuyo diseño se ha descrito previamente y es parte de la Iniciativa Slim en Medicina Genómica para las Américas (SIGMA) y el Consorcio de diabetes Tipo 2 (Diabetes tipo 2 SIGMA Consorcio 2013, 2014). Los participantes fueron reclutados del IMSS e ISSSTE. Los criterios de inclusión se realizaron de acuerdo con los criterios de la Asociación Americana de Diabetes (ADA) para el diagnóstico de DT2. Se seleccionaron aleatoriamente de la base de datos DMS 416 casos (individuos no relacionados, mayores de 20 años con diagnóstico previo de DT2 o niveles de glucosa en ayunas superiores a 125 mg/dL) y 443 controles (sujetos sanos, mayores de 50 años y con niveles de glucosa en ayunas por debajo de 100 mg/dL). Estos casos y controles fueron reclutados entre los años 2009 - 2013. Todos los participantes tienen ascendencia mexicana mestiza, según lo informado por ellos mismos y confirmado por análisis de componentes principales de genotipos (SIGMA Consorcio Diabetes tipo 2, 2014). Se obtuvo el consentimiento informado de todos los participantes y el estudio se realizó con la aprobación de los Comités de Ética e Investigación del Instituto Nacional de Medicina Genómica y el Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

2. Identificación del polimorfismo STR *TH01*.

Los *primers Forward* 5'- GTGGGCTGAAAAGCTCCCGATTAT 3' y *Reverse* 5'- CCAGAGCCCAGATACCCTTTGAAT 3' fueron diseñados utilizando el software Primer Express v3.0.1, el *primer Forward* 5' se marcó con fluorescencia (VIC) (Applied Biosystems). Se determinó la concentración de las muestras de DNA en el Espectrofotómetro / Fluorómetro DS-11 FX+ (DeNovix). Se realizaron las diluciones correspondientes para dejarlas a una concentración final de 20 ng/ul. Para la PCR se utilizaron 40 ng de DNA total en una reacción de 10 µl que con 2 mM de MgCl₂, 1x buffer de PCR (50 mM de KCl, 10 mM TrisHCl, pH8.3), 200 µM de cada deoxinucleótido trifosfato, 1 µM de cada "primer" y 1 U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen), las amplificaciones fueron realizadas en el termociclador

MaxyGene II. Axygen®. Para verificar el correcto diseño de los *primers* y seleccionar las condiciones óptimas de PCR de acuerdo con la calidad del producto amplificado, se prepararon geles de agarosa al 1.5%, y se corrieron 5 µl de cada producto de PCR.

Los alelos del locus *TH01* fueron identificados mediante electroforesis capilar por análisis de fragmentos (AF) con el secuenciador genético ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems), se utilizó el marcador de peso molecular GeneScan 500 LIZ y el *ladder* alelico AmpFLSTR™ Identifiler™ (Applied Biosystems). El análisis se realizó con el software GeneMapper v4.0 (Applied Biosystems). Debido a que no se utilizó el set de *primers* del *ladder* AmpFLSTR Identifiler se observó un desfase entre el *ladder* y la asignación de alelos en los electroferogramas, por lo que se verificó la secuencia del repetido y los alelos del locus *TH01* seleccionando las muestras homocigotas de los alelos identificados por AF. La secuenciación se realizó por el método tipo Sanger con nucleótidos fluorescentes (Big Dye Terminator Ready Reaction, Applied Biosystems). La electroforesis de las secuencias se realizó en el secuenciador genético ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems), y el análisis se realizó con el software “Sequencing Analysis” y Chromas 2.4. La comparación de las secuencias exploradas se realizó mediante un BLAST con la secuencia de referencia de la última versión del genoma (*GRCh38*). Una vez realizado el AF en todas las muestras se corrigió la asignación de alelos manualmente mediante observación directa.

3. Análisis de la frecuencia alélica y genotípica del locus *TH01*.

La distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas se analizaron con el software SPSS Statistics versión 24 IBM. El equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) se calculó con el software Arlequín versión 3.5 (Excoffier, L. and H.E. L. Lischer, 2010), basado en la prueba exacta de Fisher (Guo and Thompson 1992).

4. Identificación de los alelos del locus *TH01* asociados a la DT2 en México.

La identificación de los alelos y/o genotipos del locus *TH01* asociados a la DT2 se realizó con un modelo de regresión logística invariada, utilizando el software SPSS Statistics versión 24 IBM. Se consideraron positivos aquellos alelos y/o genotipos cuya razón de momios o valor de r^2 fue estadísticamente significativo ($p < 0.05$).

5. Análisis de desequilibrio de ligamiento.

Para este análisis se incluyeron los SNPs *rs149483638* y *rs223789* que fueron genotipados en las mismas muestras en un estudio previo de DT2 en población mexicana (Berumen J. *et al.*, 2019). El desequilibrio de ligamiento se calculó entre cada par de loci con el software Arlequín versión 3.5 (Excoffier, L. and H.E. L. Lischer, 2010), basado en la prueba de razón de verosimilitud y la prueba de X^2 (Slatkin y Excoffier 1996).

6. Identificación y análisis de la frecuencia haplotípica.

Las frecuencias haplotípicas se calcularon con el software Arlequín versión 3.5 (Excoffier, L. and H.E. L. Lischer, 2010), la distribución entre casos y controles se calculó en SPSS Statistics versión 24 IBM.

7. Resultados

1. Descripción clínica y demográfica de las muestras.

De los 443 controles y 416 casos incluidos inicialmente en este estudio, 16 controles y 31 casos fueron excluidos debido a la mala calidad de sus muestras de DNA, quedando un total de 757 participantes, 393 controles y 364 casos. Las características clínicas de los pacientes con DT2 y los controles sin diabetes se presentan en la Tabla 1. El 60.9% de la muestra fueron mujeres y 31.9% hombres. La edad promedio de los controles no diabéticos fue de 61.4 ± 10 años, mientras que la edad de los casos fue de 47.7 ± 8.8 . La edad promedio en el momento del diagnóstico de DT2 fue de 39 ± 6 años, y el número de años con la enfermedad varió en un amplio rango de años, desde 0 a 39 años, con un promedio de 9 ± 9 años. El 64.3% de los controles no reportó antecedentes de DT2 en ningún progenitor, mientras que sólo el 3.4% lo presentó en ambos progenitores. En los casos, el 24.3% tuvo antecedentes de DT2 en ambos progenitores. El antecedente materno fue mayor (52.5%) comparado con el antecedente paterno (41.2%). En el momento del reclutamiento del estudio, la mayoría de los pacientes (89.5%) estaban tomando medicamentos para la DT2 y solo un pequeño porcentaje de casos (24.3%) y controles (21.1%) se identificaron como fumadores.

Tabla 1. Características clínicas de casos y controles (n=757)						
Variable	Mujeres		Hombres		Ambos géneros	
	Controles (n = 251)	Casos (n = 210)	Controles (n = 142)	Casos (n = 154)	Controles (n = 393)	Casos (n = 364)
Variables continuas: media ± SD (n)						
Edad (Años)	61.8 ± 9.9 (251)	47.3 ± 9 _c (210)	60.8 ± 10 (142)	48.3 ± 8.5 _c (154)	61.4 ± 10 (393)	47.7 ± 8.8 _c (364)
IMC (kg/m ²)	28.51 ± 5.1 (249)	30.2 ± 5.7 _b (210)	27.8 ± 4 (141)	29.1 ± 4.1 _b (154)	28.2 ± 4.7 (390)	29.7 ± 5.1 _c (364)
Cintura (cm)	93.9 ± 11.2 (176)	97.8 ± 12.5 _a (135)	96.9 ± 11.2 (77)	101.2 ± 11.7 _a (72)	94.8 ± 11.3 (253)	98.9 ± 12.3 _c (207)
Cadera (cm)	105.4 ± 10.7 (164)	107.2 ± 12.7 (133)	101.9 ± 8.5 (73)	104.3 ± 9.7 (70)	104.3 ± 10.2 (237)	106.2 ± 11.8 (203)
ICC (cm)	0.89 ± 0.07 (164)	0.91 ± 0.06 _a (133)	0.94 ± 0.06 (73)	0.96 ± 0.05 _a (70)	0.90 ± 0.07 (237)	0.93 ± 0.06 _c (203)
Edad de diagnóstico de DT2 (años)		39 ± 6.5 (210)		38.1 ± 5.9 (154)		38.6 ± 6.3 (364)
Años con la enfermedad		8.3 ± 8.5 (210)		10.1 ± 9.6 (154)		9.1 ± 9 (364)
Historia parental de diabetes: % (n)						
Ninguna	61.6 (125)	27 (53)	68.8 (86)	35.2 (51)	64.3 (211)	30.5 (104)
Padre	16.3 (34)	44.2 (88)	12.7 (16)	37 (54)	15 (50)	41.2 (142)
Madre	26.1 (59)	52.9 (108)	20.3 (27)	52 (79)	24 (86)	52.5 (187)
Ambos padres	3.4 (7)	24.5 (48)	4.6 (17)	24.1 (35)	3.4 (11)	24.3 (83)
Total	100 (203)	100 (196)	100 (125)	100 (145)	100 (328)	100 (341)
Tabaquismo: % (n)						
No	87.2 (211)	83.7 (174)	64.2 (88)	64.9 (100)	78.9 (299)	75.7 (274)
Si	12.8 (31)	16.3 (34)	35.8 (49)	35.1 (54)	21.1 (80)	24.3 (88)
Total	100 (242)	100 (208)	100 (137)	100 (154)	100 (379)	100 (362)
Tratamiento de DT2: % (n)						
No		9.1 (18)		12.3 (18)		10.5 (36)
Si		90.9 (180)		87.7 (128)		89.5 (308)
Total		100 (198)		100 (146)		100 (344)

Tabla 1. Características clínicas de casos y controles (n = 757). El IMC, las circunferencias de cintura y cadera que se muestran son las medidas al momento del reclutamiento en el estudio. Para las diferencias de medias entre los grupos, los valores de *p* se evaluaron mediante la prueba *t*. Para las diferencias en la distribución de frecuencia entre los grupos, los valores de *p* se evaluaron con la prueba de chi-cuadrada. Los superíndices indican los valores *p* de la siguiente manera: _a *p* <0.05, _b *p* <0.01 y _c *p* <0.001. *La suma del porcentaje de Ninguno _d, Padre y Madre menos el porcentaje de ambos padres da el 100%.

2. Identificación del polimorfismo STR *TH01*.

Previo a realizar los análisis de fragmentos se verificaron los productos de PCR en geles de agarosa al 1.5 % en los que se observaron bandas de aproximadamente 200 pares de bases, correspondientes a los tamaños esperados para el microsatélite *TH01* (Figura 2).

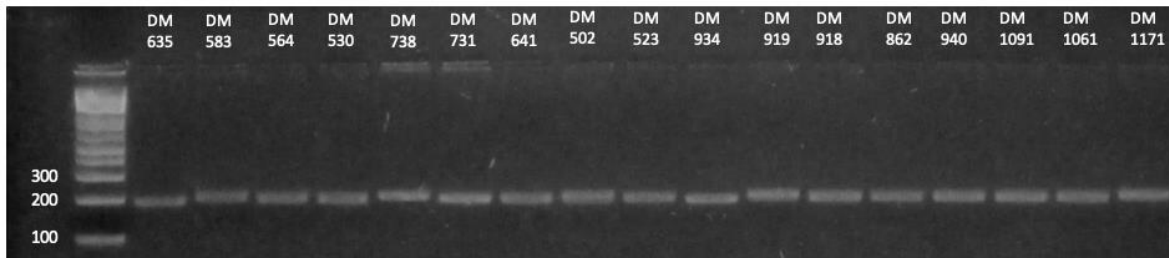


Figura 2. Amplificación del locus *TH01* en 17 de las muestras estudiadas.

En la identificación de los alelos por análisis de fragmentos en el Secuenciador Automático de DNA se observó un desfase de los alelos en las muestras respecto al *ladder* (Figura 3), algo esperado dado que se utilizó un ladder comercial. Sin embargo, verificó el número de repeticiones “AATG” de cada de alelo detectado del locus *TH01* mediante secuenciación, en muestras homocigotas, y se observó que el desfase era de dos repetidos y dos nucleótidos más (Figura 4), por lo que con estos datos se corrigió la identificación de los alelos restando esos nucleotidos en cada muestra explorada.

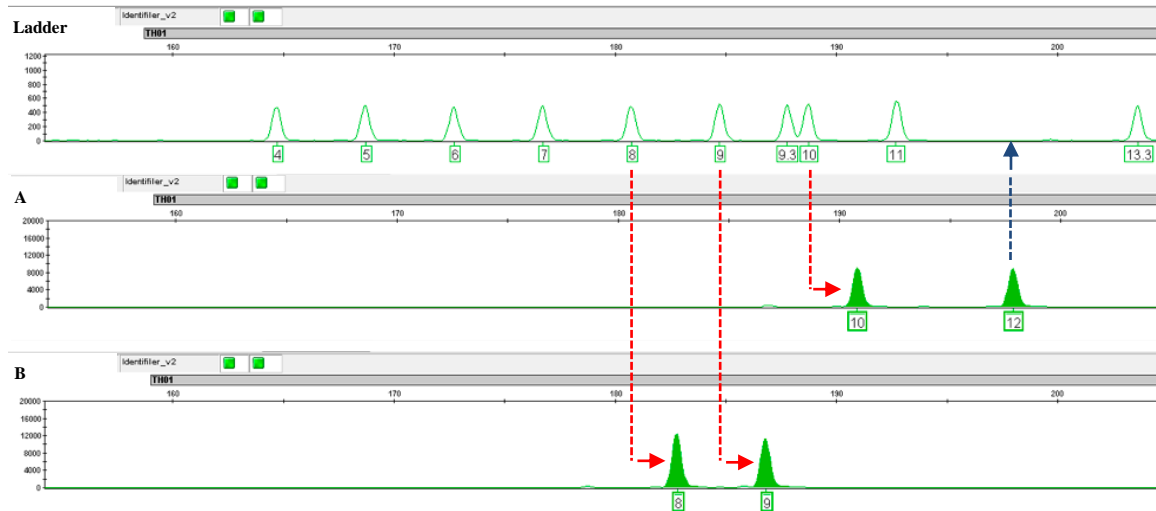
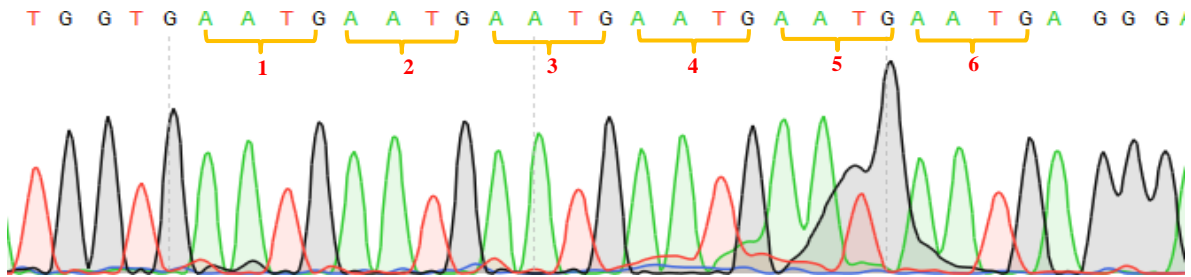
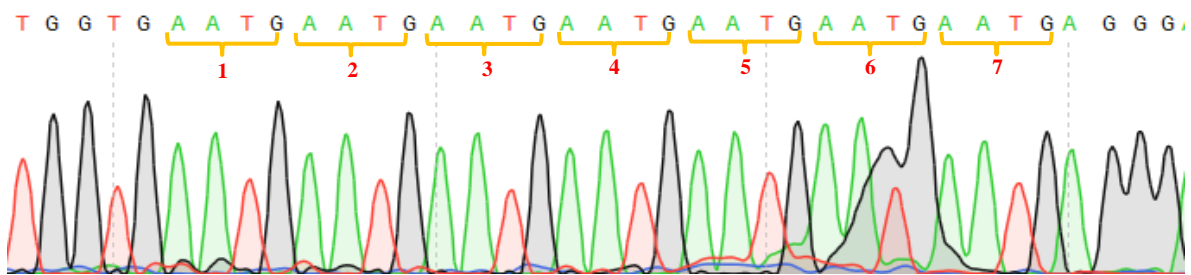


Figura 3. Electroferograma del análisis de fragmentos del locus *TH01* en dos muestras representativas. En el panel A se observa una muestra heterocigota con los alelos 10-12, panel B se observa una muestra heterocigota con los alelos 8-9. Las líneas rojas punteadas indican el desfase en la asignación de alelos, la línea azul discontinua indica la presencia de un alelo no incluido en el ladder utilizado.

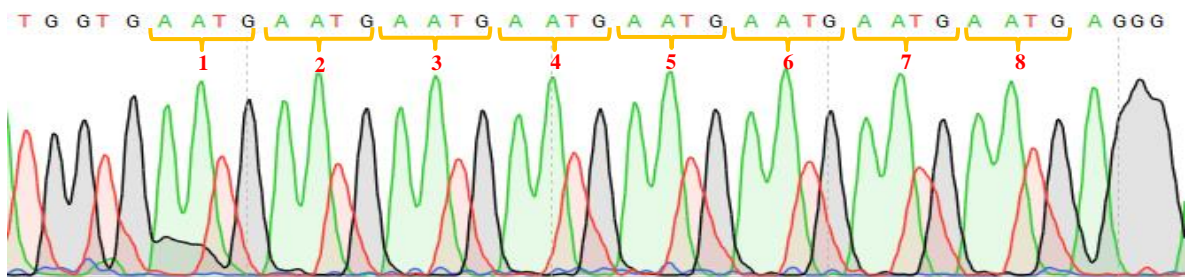
A) (AF) alelo 8; (S) alelo 6



B) (AF) alelo 9; (S) alelo 7



C) (AF) alelo 10; (S) alelo 8



D) (AF) alelo 12; (S) alelo 9.3

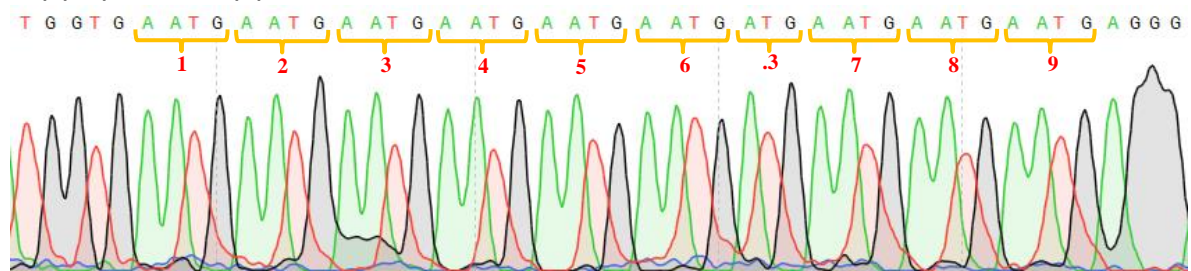


Figura 4. Electroferogramas de secuencia de los alelos detectados por análisis de fragmentos (AF) y confirmados por secuenciación (S). Cada panel (A - D) corresponde a una muestra homocigota de los alelos del 8 al 12 respectivamente.

3. Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas del locus *TH01* en casos y controles.

Se analizaron las muestras de 393 controles y 364 casos, y se identificaron solo 9 de los más de los 20 alelos reportados para el microsatélite *TH01* (Tabla 2). Solo los alelos 6, 7, 8, 9 y 9.3 tuvieron una frecuencia $\geq 5\%$ en casos y/o controles (Figura 5).

Tabla 2. Frecuencias alélicas del locus *TH01*. % (n)

Alelos	Controles	Casos	Total
3	0.1 (1)	0.1 (1)	0.1 (2)
4	0 (0)	0.3 (2)	0.1 (2)
5	0.1 (1)	0.3 (2)	0.2 (3)
6	34.5 (271)	30.9 (225)	32.8 (496)
7	35.9 (282)	34.5 (251)	35.2 (533)
8	5 (39)	6.2 (45)	5.5 (84)
9	6.9 (54)	4.3 (31)	5.6 (85)
9.3	17.4 (137)	23.4 (170)	20.3 (307)
11	0.1 (1)	0.1 (1)	0.1 (2)
Total	100 (786)	100 (728)	100 (1514)

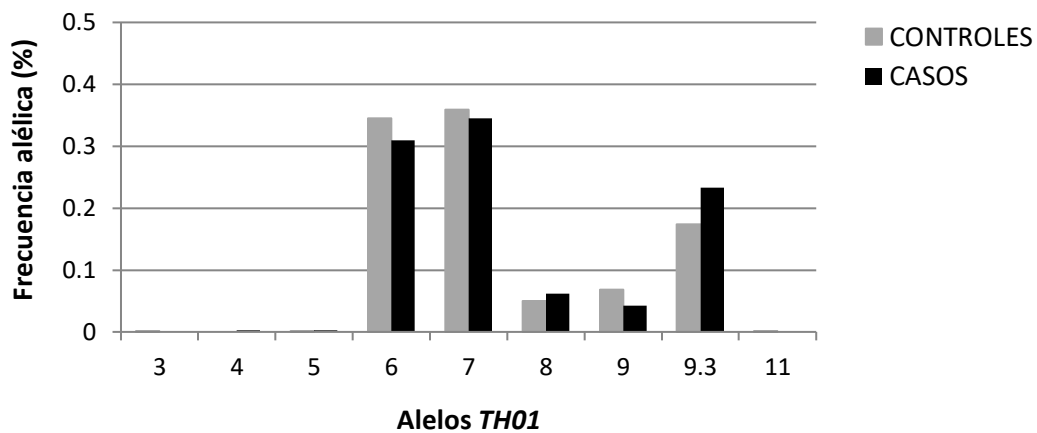


Figura 5. Histograma de las frecuencias alélicas del locus *TH01* en casos y controles.

Se encontraron 22 genotipos del locus *TH01*, los genotipos con mayor frecuencia fueron 6-6, 6-7, 6-9.3, 7-7 y 7-9.3 (Tabla 3). Las frecuencias genotípicas se encontraron distribuidas de acuerdo al equilibrio de Hardy-Weinberg.

Tabla 3. Frecuencias genotípicas del locus *TH01*. % (n)

Genotipos	Controles	Casos	Total
3 - 4	0 (0)	0.3 (1)	0.1 (1)
3 - 6	0.3 (1)	0 (0)	0.1 (1)
4 - 7	0 (0)	0.3 (1)	0.1 (1)
5 - 5	0 (0)	0.3 (1)	0.1 (1)
5 - 6	0.3 (1)	0 (0)	0.1 (1)
6 - 6	12.7 (50)	8.2 (30)	10.6 (80)
6 - 7	24.9 (98)	25.8 (94)	25.4 (192)
6 - 8	3.1 (12)	2.2 (8)	2.6 (20)
6 - 9	5.6 (22)	2.5 (9)	4.1 (31)
6 - 9.3	9.2 (36)	14.6 (53)	11.8 (89)
6 - 11	0.3 (1)	0.3 (1)	0.3 (2)
7 - 7	13.7 (54)	11.3 (41)	12.5 (95)
7 - 8	2.3 (9)	3.3 (12)	2.8 (21)
7 - 10	4.8 (19)	2.5 (9)	3.7 (28)
7 - 9.3	12 (47)	14.6 (53)	13.2 (100)
8 - 8	0.8 (3)	1.1 (4)	0.9 (7)
8,9	1 (4)	0.5 (2)	0.8 (6)
8 - 9.3	2 (8)	4.1 (15)	3 (23)
9 - 9	0.3 (1)	0 (0)	0.1 (1)
9 - 9.3	1.8 (7)	3 (11)	2.4 (18)
9.3 - 7	0.3 (1)	0 (0)	0.1 (1)
9.3 - 9.3	4.8 (19)	5.2 (19)	5 (38)
Total	100 (393)	100 (364)	100 (757)

4. Distribución de las frecuencias alélicas ($\geq 5\%$) del locus *TH01* en casos y controles estratificando por edad de diagnóstico de la DT2 y género.

Se evaluó la distribución de los alelos cuya frecuencia fue $\geq 5\%$ (6,7,8,9 y 9.3) y el resto de los alelos agrupados y definidos como alelo (0). entre casos y controles (Tabla 4). El alelo 9 fue más frecuente en los controles que en los casos (6.9% vs. 4.3%, $p=0.027$), mientras que el alelo 9.3 presentó una distribución inversa, fue más frecuente en los casos (23.4% vs. 17.4%, $p=0.004$). Interesantemente cuando se analizó la frecuencia por género, la diferencia en la frecuencia del alelo 9 entre casos y controles se mantiene, pero únicamente en las mujeres (7.2% vs. 3.6%, $p=0.017$) (Tabla 4). Lo contrario se observó en alelo 9.3, cuya frecuencia fue mucho mayor en los casos únicamente en hombres (24.7% vs. 16.5 %, $p=0.015$) (Tabla 4). Por otra parte, cuando la muestra se estratificó con la edad de diagnóstico de la DT2, se observó que la frecuencia del alelo 9 en los controles es mayor a la frecuencia encontrada en los pacientes diagnosticados ≤ 39 años (6.9% vs. 4.4 %, $p=0.031$), pero no a la frecuencia en los pacientes diagnosticados ≥ 40 años (Tabla 4). En contraste, la frecuencia del alelo 9.3 en los casos es mayor a la frecuencia en los controles, solo en el grupo diagnosticados ≥ 40 años (25.7% vs. 17.4%, $p=0.001$), pero no en el grupo que fue diagnosticado a edades menores (Tabla 4). Como era de esperar, cuando el análisis se realizó estratificando las muestras con las dos variables al mismo tiempo, se observó que la frecuencia del alelo 9 fue mayor en los controles solo cuando se compara con los casos de las mujeres ≤ 39 años (7.2% vs. 2.6%, $p=0.02$), pero no cuando se comparó con las mujeres de mayor edad ni en los dos grupos de hombres. En contraste, cuando se comparó la frecuencia del alelo 9.3 entre los controles y los casos, la diferencia fue significativa tanto en hombres (16.5% vs. 27.4%, $p=0.008$) como en mujeres (17.9% vs. 24.6%, $p=0.039$) diagnosticados ≥ 40 años, aunque la diferencia fue mucho mayor en los hombres, pero no en los grupos diagnosticados ≤ 39 años (Tabla 4).

Tabla 4. Frecuencia alélica ($\geq 5\%$) del locus *TH01* en casos y controles estratificado por edad de diagnóstico de la DT2 y género.

Género	Alelos	Frecuencia alélica % (n)			
		Controles (n=786)	Casos		
			Diagnóstico ≤ 39 años (n=350)	Diagnóstico ≥ 40 años (n=362)	Global (n=1514)
Mujeres	0	66.1 (332)	66.3 (130)	70.1 (157)	68.3 (287)
	6	33.9 (170)	33.7 (66)	29.9 (67)	31.7 (133)
	0	63.9 (321)	64.3 (126)	67 (150)	65.7 (276)
	7	36.1 (181)	35.7 (70)	33 (74)	34.3 (144)
	0	95.6 (480)	94.9 (186)	95.1 (213)	95 (399)
	8	4.4 (22)	5.1 (10)	4.9 (11)	5 (21)
	0	92.8 (466)	97.4 (191)	95.5 (214)	96.4 (405)
	9	7.2 (36)	2.6 (5) ^a	4.5 (10)	3.6 (15) ^a
Hombres	0	82.1 (412)	80.1 (157)	75.4 (169)	77.6 (326)
	9.3	17.9 (90)	19.9 (39)	24.6 (55) ^a	22.4 (94)
	0	64.4 (183)	69.1 (112)	73.3 (107)	71.1 (219)
	6	35.6 (101)	30.9 (50)	26.7 (39)	28.9 (89)
	0	66.5 (189)	64.8 (105)	69.2 (101)	66.9 (206)
	7	33.5 (95)	35.2 (57)	30.8 (45)	33.1 (102)
	0	94 (267)	94.4 (153)	91.1 (133)	92.9 (286)
	6	6 (17)	5.6 (9)	8.9 (13)	7.1 (22)
Ambos	0	93.7 (266)	95.1 (154)	94.5 (138)	94.8 (292)
	9	6.3 (18)	4.9 (8)	5.5 (8)	5.2 (16)
	0	83.5 (237)	77.8 (126)	72.6 (106)	75.3 (232)
	9.3	16.5 (47)	22.2 (36)	27.4 (40) ^b	24.7 (76) ^a
	0	65.5 (515)	67.6 (242)	71.4 (264)	69.5 (506)
	6	34.5 (271)	33.4 (116)	28.6 (106)	30.5 (222)
Ambos	0	64.9 (510)	64.5 (231)	67.8 (251)	66.2 (482)
	7	35.1 (276)	27.3 (127)	32.2 (119)	33.8 (246)
	0	95 (747)	94.7 (339)	93.5 (346)	94.1 (685)
	8	5 (39)	5.2 (19)	6.5 (24)	5.9 (43)
	0	93.1 (732)	96.4 (345)	95.1 (352)	95.7 (697)
	9	6.9 (54)	4.4 (13) ^a	4.9 (18)	4.3 (31) ^a
Ambos	0	82.6 (649)	79.1 (283)	74.3 (275)	76.6 (558)
	9.3	17.4 (137)	20.9 (75)	25.7 (95) ^b	23.4 (170) ^b

a, $p < 0.05$; b, $p < 0.01$, los valores no etiquetados no fueron estadísticamente significativos.

5. Análisis de asociación de los alelos 9 y 9.3 del locus *TH01* con la DT2 en la muestra global y estratificada por edad de diagnóstico de la DT2 y género.

A partir de los resultados de frecuencia alélica, se realizó un análisis de regresión logística entre la frecuencia de los alelos 9, 9.3 y el resto de los alelos agrupados y definidos como alelo (0). En el análisis incluyendo toda la población se observó que el alelo 9.3 confiere un mayor riesgo (OR=1.40, CI=1.09-1.81; $p=0.009$) para la DT2 (Tabla 5, cuadros rojos Figura 5C). Cuando se analizó a la muestra estratificada por género, el alelo 9 se asoció significativamente solo en las mujeres (OR=0.50, CI=0.27-0.94, $p=0.03$) (Tabla 5, cuadros verdes Figura 5C), mientras que el alelo 9.3 se asoció a la DT2 solo en los hombres (OR=1.64, CI=1.09-2.47, $p=0.018$) (Tabla 5, cuadros azules Figura 5C) para la DT2. Cuando se estratifica la muestra por la mediana de la edad de diagnóstico de la DT2 (≤ 39 y ≥ 40 años), se observa que el alelo 9 se asocia solo a los pacientes diagnosticados ≤ 39 años (OR=0.53, CI=0.28-0.99, $p=0.046$; Tabla 5, cuadros rojos Figura 5A) y el alelo 9.3 solo a la DT2 diagnosticada ≥ 40 años (OR=1.60, CI=1.19-2.17, $p=0.002$; Tabla 5, cuadros rojos Figura 5B). El efecto protector del alelo 9 asociado a los diagnosticados ≤ 39 años, se presenta solo en mujeres (OR=0.34, CI=0.13-0.89, $p=0.028$; cuadros verdes Figura 5A) y no en los hombres. Interesantemente, el mayor riesgo conferido por el alelo 12 en los diagnosticados en ≥ 40 años se presenta solo en los hombres (OR=1.90, CI=1.17-3.09, $p=0.009$; cuadros azules Figura 5B).

Tabla 5. Asociación alélica del locus TH01 con DT2 estratificando por edad de diagnóstico de DT2 y género (n = 1514).

Género	Genotipos	Regresión logística univariada (casos)					
		Diagnostico ≤ 39 años		Diagnostico ≥ 40 años		Global	
		OR (95% CI)	p-value	OR (95% CI)	p-value	OR (95% CI)	p-value
Mujeres	0	(n=196)		(n=224)		(n=420)	
	9	0.34 (0.13-0.89)	0.028	0.65 (0.32-1.36)	0.256	0.50 (0.27-0.94)	0.03
	9.3	1.07 (0.7-1.63)	0.746	1.44 (0.99-2.12)	0.06	1.26 (0.91-1.75)	0.16
Hombres	0	(n=162)		(n=146)		(n=308)	
	9	0.82 (0.35-1.95)	0.662	0.99 (0.42-2.36)	0.988	0.90 (0.45-1.81)	0.771
	9.3	1.42 (0.87-2.32)	0.158	1.90 (1.17-3.09)	0.009	1.64 (1.09-2.47)	0.018
Ambos	0	(n=358)		(n=370)		(n=728)	
	9	0.53 (0.28-0.99)	0.046	0.77 (0.44-1.34)	0.359	0.64 (0.41-1.02)	0.063
	9.3	1.20 (0.88-1.65)	0.245	1.60 (1.19-2.17)	0.002	1.40 (1.09-1.81)	0.009

En el análisis con los genotipos agrupados 9.3-X (9.3 con cualquier otro alelo) y 9-X (9 con cualquier otro alelo), se confirmaron las asociaciones alélicas observadas (ver Tabla 3). Aunque, el genotipo (9.3-X) se asoció a un mayor riesgo de DT2 tanto en hombres como en mujeres diagnosticadas ≥ 40 años (Tabla 6).

Tabla 6. Asociación genotípica del locus *TH01* con DT2 estratificando por edad de diagnóstico de DT2 y género (n = 757)

Género	Genotipos	Regresión logística univariada (casos)					
		Diagnostico ≤ 39 años		Diagnostico ≥ 40 años		Global	
		OR (95% CI)	p-value	OR (95% CI)	p-value	OR (95% CI)	p-value
Mujeres	0	(n=98)		(n=112)		(n=210)	
	9 - X	0.33(0.11-0.98)	0.046	0.54(0.21-1.37)	0.194	0.43(0.2-0.92)	0.029
	9.3 - X	1.04(0.63-1.72)	0.881	1.71(1.07-2.75)	0.025	1.36(0.92-2.02)	0.124
Hombres	0	(n=81)		(n=73)		(n=154)	
	9 - X	0.83(0.32-2.17)	0.709	0.41(0.12-1.52)	0.185	0.64(0.28-1.49)	0.302
	9.3 - X	1.59(0.88-2.87)	0.123	1.97(1.09-3.59)	0.026	1.76(1.08-2.9)	0.024
Ambos	0	(n=179)		(n=185)		(n=364)	
	9 - X	0.53(0.27-1.08)	0.081	0.49(0.23-1.05)	0.066	0.51(0.3-0.9)	0.02
	9.3 - X	1.25(0.86-1.84)	0.241	1.81(1.25-2.62)	0.002	1.51(1.12-2.07)	0.008

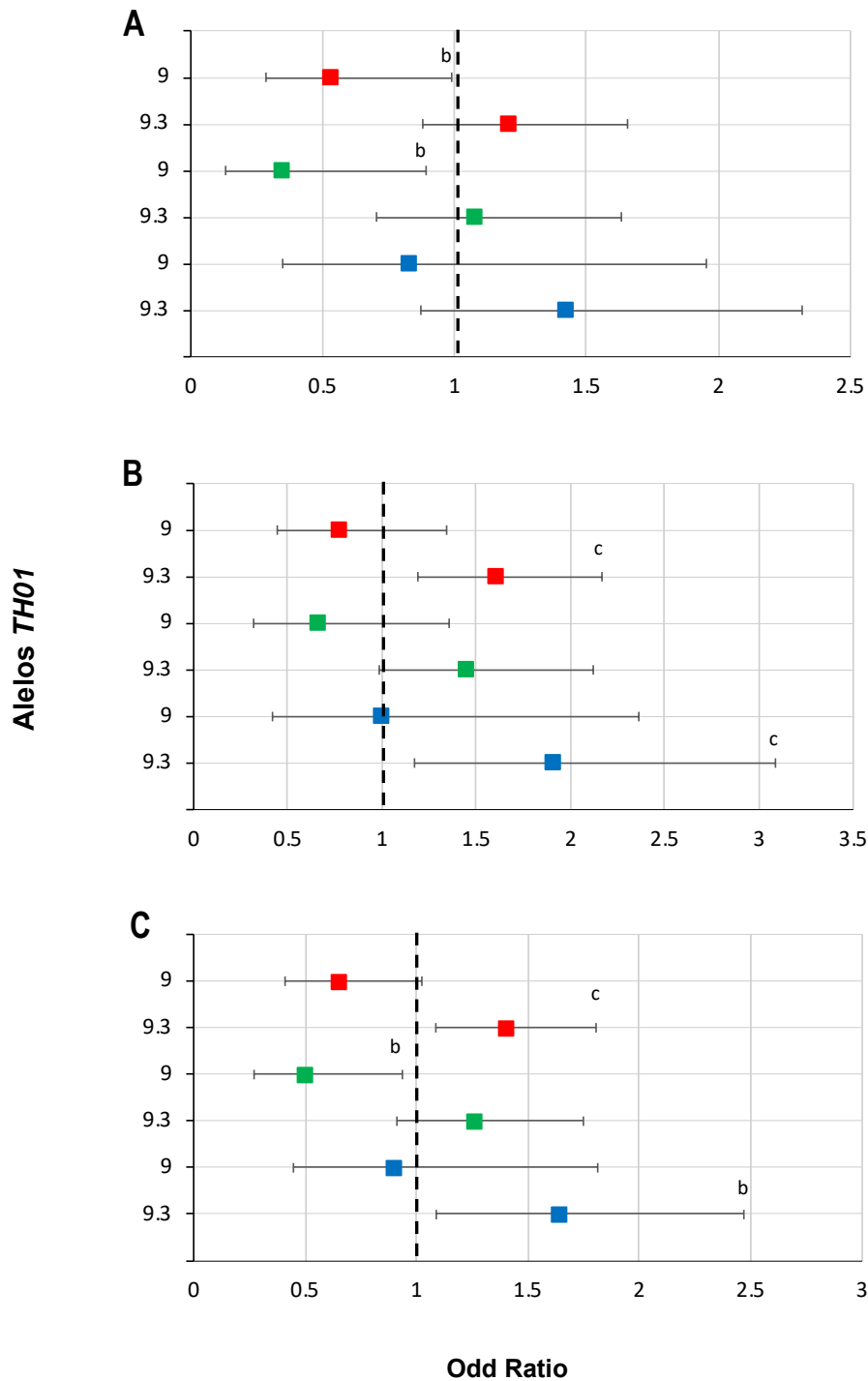


Figura 5. Odd ratio (OR) y el intervalo de confianza (IC) del 95% de los alelos 9 y 9.3 del locus *TH01* asociados a DT2. Los OR y el IC del 95% de los alelos se calcularon en modelos de regresión logística (RL). En el panel A los casos diagnosticados ≤ 39 años de edad ($n=358$), panel B los casos diagnosticados ≥ 40 años de edad ($n=370$), panel C todos los casos incluidos en el análisis ($n=728$). Para los tres análisis se incluyó al mismo grupo control ($n=786$). Los cuadrados rojos indican los valores obtenidos para ambos géneros juntos, los cuadrados verdes los valores para mujeres y los cuadrados azules los valores para hombres. La línea discontinua indica el valor de referencia (cero alelos de riesgo), OR = 1.

Las letras b y c indican los valores de $p < 0.05$ y $p < 0.01$ respectivamente. Los puntos que no tienen letras tuvieron una $p > 0.5$. Los valores p se calcularon en los modelos RL con la prueba de X^2 .

6. Análisis de asociación de los locus *rs149483638 (IGF2_INS)* con la DT2 en toda la muestra y estratificada por edad de diagnóstico de la DT2 y género.

En los casos con edad de diagnóstico ≥ 40 años se observó una asociación significativa tanto en los casos con un alelo de riesgo (OR=2.69, CI: 1.33-5.43; $p=0.006$) como en aquellos con ambos alelos de riesgo (OR=2.97, CI:1.49-5.93; $p=0.002$) en ambos géneros (cuadros rojos Figura 6C). Al estratificar la muestra por género, el efecto fue mucho mayor en hombres (OR=5.87, CI: 1.32-26.09; $p=0.02$) con un alelo de riesgo, y (OR=5.23, CI: 1.19-22.88; $p=0.028$) con ambos alelos de riesgo (cuadros azules Figura 6B). En mujeres se observó una asociación más moderada pero estadísticamente significativa únicamente con ambos alelos de riesgo (OR=2.4, CI: 1.09-5.30; $p=0.029$) (cuadros verdes Figura 6B). No se observaron asociaciones significativas tanto en el grupo con edad de diagnóstico ≤ 39 años como en el total (Figuras 6A y 6C).

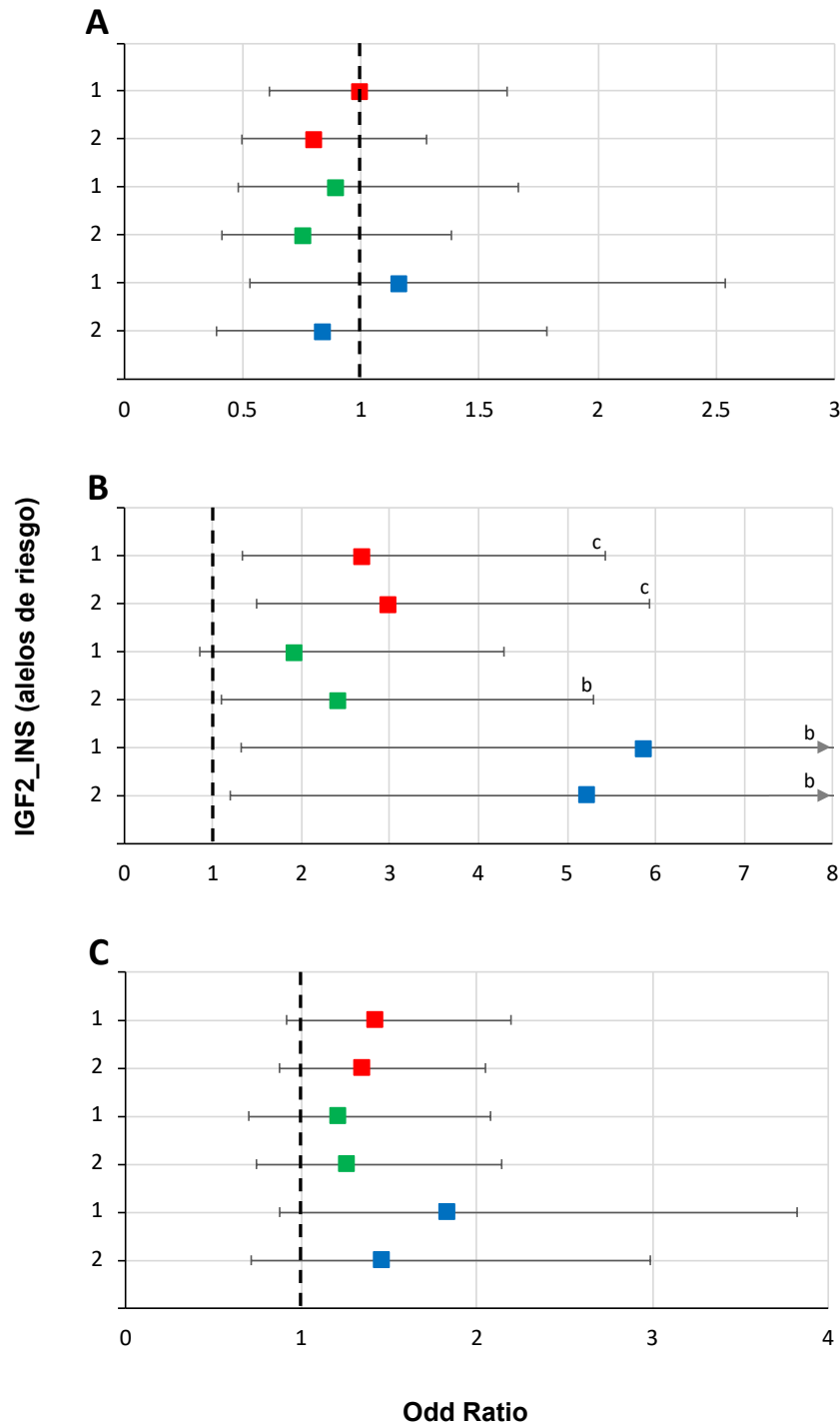


Figura 6. Odd ratio (OR) y el intervalo de confianza (IC) del 95% de los alelos de riesgo del locus *rs149483638* (*IGF2_INS*) asociados a DT2. Los OR y el IC del 95% de los alelos se calcularon en modelos de regresión logística (RL). En el panel A los casos diagnosticados ≤ 39 años de edad ($n=358$), panel B los casos diagnosticados ≥ 40 años de edad ($n=370$), panel C todos los casos incluidos en el análisis ($n=728$). Para los tres análisis se incluyó al mismo grupo control ($n=786$). Los cuadrados rojos indican los valores obtenidos para ambos géneros juntos, los cuadrados verdes los valores para mujeres y los cuadrados azules los valores para hombres. La línea discontinua indica el valor de referencia (cero alelos de riesgo), OR = 1.

Las letras b y c indican los valores de $p < 0.05$ y $p < 0.01$ respectivamente. Los puntos que no tienen letras tuvieron una $p > 0.5$. Los valores p se calcularon en los modelos RL con la prueba de X^2 .

7. Análisis de asociación del locus *rs2237897 (KCNQ1)* con la DT2 en toda la muestra y estratificando por edad de diagnóstico de la DT2 y género.

En el análisis de la población global se observó una asociación significativa con la DT2 tanto en los casos con un alelo de riesgo como en los casos con ambos alelos de riesgo, aunque el efecto es mayor en aquellos con ambos alelos, en ambos géneros (OR=1.47, CI:1.028-2.10; $p=0.035$ vs. OR=2.3, CI:1.64-3.34; $p=0.000$) (cuadros rojos Figura 7C), En mujeres (OR=1.8, CI:1.12-2.89; $p=0.014$ vs. OR=2.28, CI:1.43-3.66; $p=0.001$) (cuadros verdes Figura 7C), sin embargo, en hombres únicamente se observó una asociación significativa en aquellos con ambos alelos de riesgo (OR=2.47, CI:1.42-4.30; $p=0.001$) (cuadros azules Figura 7C). En el análisis incluyendo ambos géneros se observó una asociación significativa en los casos que presentaron ambos alelos de riesgo tanto en el grupo con edad de diagnóstico ≤ 39 años de edad (OR=2.25, CI:1.43-3.55; $p=0.000$) (cuadros rojos Figura 7A), como en el grupo con diagnóstico ≥ 40 años de edad (OR=2.42, CI:1.54-3.81; $p=0.000$) (cuadros rojos Figura 7B). En mujeres con edad de diagnóstico ≤ 39 años se observa que el efecto aumenta con ambos alelos de riesgo (OR=2.0, CI:1.032-3.89; $p=0.04$ vs. OR=2.83, CI:1.46-5.46; $p=0.002$) (cuadros verdes Figura 7A), a diferencia del grupo con diagnóstico ≥ 40 años de edad, en las que sólo se observó una asociación significativa con ambos alelos de riesgo (OR=1.92, CI:1.09-3.403; $p=0.024$) (cuadros verdes Figura 7B). Interesantemente, en hombres únicamente se observó una asociación significativa en aquellos con ambos alelos de riesgo y edad de diagnóstico ≥ 40 años (OR=3.43, CI:1.62-7.27; $p=0.001$) (cuadros azules Figura 7B).

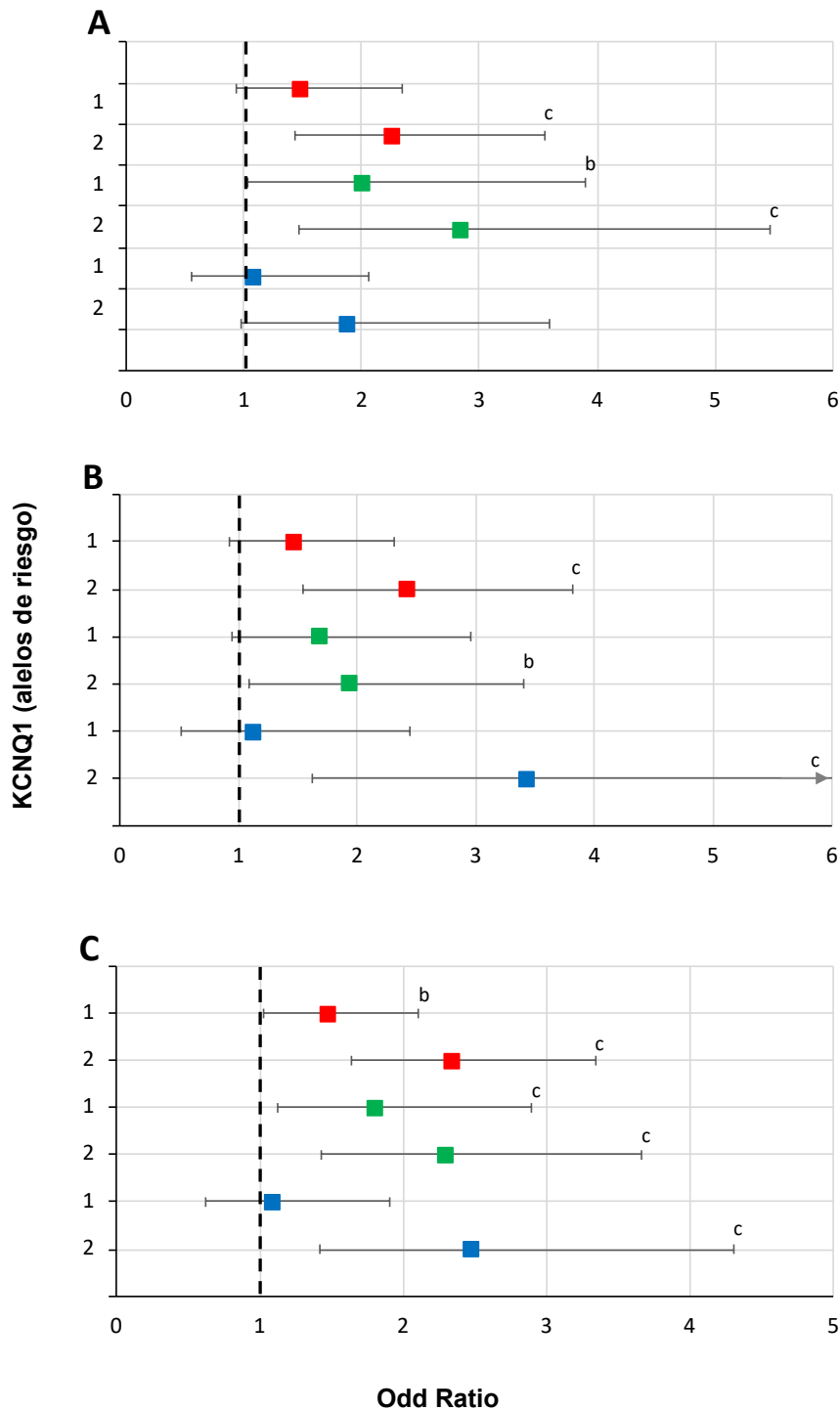


Figura 7. Odd ratio (OR) y el intervalo de confianza (IC) del 95% de los alelos de riesgo del locus rs2237897 (KCNQ1) asociados a DT2. Los OR y el IC del 95% de los alelos se calcularon en modelos de regresión logística (RL). En el panel A los casos diagnosticados ≤ 39 años de edad ($n=358$), panel B los casos diagnosticados ≥ 40 años de edad ($n=370$), panel C todos los casos incluidos en el análisis ($n=728$). Para los tres análisis se incluyó al mismo grupo control ($n=786$). Los cuadrados rojos indican los valores obtenidos para ambos géneros juntos, los cuadrados verdes los valores para mujeres y los cuadrados azules los valores para hombres. La línea discontinua indica el valor de referencia (cero alelos de riesgo), $OR = 1$.

Las letras b y c indican los valores de $p < 0.05$ y $p < 0.01$ respectivamente. Los puntos que no tienen letras tuvieron una $p > 0.5$. Los valores p se calcularon en los modelos RL con la prueba de X^2 .

8. Análisis del desequilibrio de ligamiento (DL) entre los loci *TH01*, *rs149483638* (*INS_IGF2*) y *rs2237897* (*KCNQ1*).

El desequilibrio de ligamiento en los controles se encontró en los tres loci, *TH01* vs. *rs149483638* ($p=0.00000$); *TH01* vs. *rs2237897* ($p= 0.00178$) y *rs14948363* vs. *rs2237897* ($p= 0.03436$). Mientras que en los casos el desequilibrio de ligamiento solo fue significativo entre los loci *TH01* vs. *rs149483638* ($p=0.00000$) y entre ambos SNPs: *rs14948363* vs. *rs2237897* ($p= 0.00376$).

Tabla 7. Desequilibrio de ligamiento (DL)		
Pares de loci	Controles	Casos
	<i>Exact P</i>	<i>Exact P</i>
(<i>TH01</i> – <i>rs149483638</i>)	0.00000	0.00000
(<i>TH01</i> – <i>rs2237897</i>)	0.00178	0.06149
(<i>rs149483638</i> – <i>rs2237897</i>)	0.03436	0.00376

Tabla 7. DL calculado en Arlequín 3.5 con la prueba de razón de verosimilitud (*ExactP*) para todos los pares de loci. *rs149483638* (*INS_IGF2*) y *rs223789* (*KCNQ1*).

9. Distribución de las frecuencias haplotípicas de los loci *TH01*, *rs149483638* (*INS_IGF2*) y *rs2237897* (*KCNQ1*) en casos y controles.

Se encontraron 26 haplotipos, sólo 9 de ellos tuvieron una frecuencia $\geq 5\%$ en casos y/o controles (H7, H9, H10, H11, H12, H15, H18, H21 y H22). La diferencia en la distribución de la frecuencia haplotípica entre casos y controles fue significativa ($p= 0.00013$). El alelo 9.3 de *TH01* se encontró en los haplotipos H21 al H24, el haplotipo H21 que incluye los alelos de riesgo de los tres loci tuvo una frecuencia mayor en los casos (19% vs 12%, $p= 0.0005$). La distribución en la frecuencia del haplotipo H24 también fue significativa (1.1% vs 0.3%, 0.04), sin embargo, la frecuencia del haplotipo H24 fue muy baja en casos y controles. El haplotipo H18 incluye el alelo 9 del locus *TH01* y los alelos de riesgo (CC) de ambos SNPs tuvo una frecuencia mayor en los controles (6.4% vs 4.1%), aunque la diferencia no fue significativa. Por otra parte, el haplotipo H12 que incluye al alelo 7, cuya frecuencia en la población es la más alta (35.2 %, ver tabla 2), y a

ambos alelos de riesgo (CC) de los dos SNPs, tuvo una mayor frecuencia en los controles (16.5% vs 10.4%, $p= 0.001$).

Tabla 8. Frecuencia haplotípica. % (n)

Haplotipos	ID	Controles	Casos
03 CC CC	H1	0.1 (1)	0 (0)
03 CC TT	H2	0 (0)	0.1 (1)
04 CC CC	H3	0 (0)	0.1 (1)
04 TT CC	H4	0 (0)	0.1 (1)
05 CC CC	H5	0.1 (1)	0 (0)
05 TT CC	H6	0 (0)	0.3 (2)
06 CC CC	H7	11.2 (88)	8.4 (61)
06 CC TT	H8	1.3 (10)	0.5 (4)
06 TT TT	H9	13.1 (103)	11.3 (82)
06 TT CC	H10	8.9 (70)	10.7 (78)
07 CC CC	H11	18.4 (145)	23.6 (172)
07 CC TT	H12	16.5 (130)	10.4 (76) ^b
07 TT TT	H13	0.4 (3)	0.3 (2)
07 TT CC	H14	0.5 (4)	0.1 (1)
08 CC CC	H15	4.2 (33)	5.6 (41)
08 CC TT	H16	0.5 (4)	0.3 (2)
08 TT TT	H17	0.3 (2)	0 (0)
09 CC CC	H18	6.4 (50)	4.1 (30)
09 CC TT	H19	0.4 (3)	0.1 (1)
09 TT CC	H20	0.1 (1)	0 (0)
9.3 CC CC	H21	12 (94)	19 (138) ^c
9.3 CC TT	H22	3.8 (30)	3.2 (23)
9.3 TT TT	H23	0.5 (4)	1 (7)
9.3 TT CC	H24	1.1 (9)	0.3 (2) ^a
11 CC CC	H25	0 (0)	0.3 (2)
11 CC TT	H26	0.1 (1)	0.1 (1)
Total		100 (786)	100 (728)

Tabla 8. Frecuencia haplotípica. (ID) Nombre asignado a los haplotipos encontrados. El orden de los loci que conforman los haplotipos: *TH01*, rs149483638 (*INS_IGF2*) y rs2237897 (*KCNQ1*). (03 – 11) genotipos homocigotos del locus *TH01*. Los genotipos homocigotos de los loci rs149483638 (*INS_IGF2*) y rs2237897 (*KCNQ1*) se indican con las letras (CC) para ambos alelos de riesgo, y (TT) para ambos alelos de protección. El nivel de significancia se indica con las letras: a, $p<0.05$; b, $p<0.01$; c, $p<0.001$, los valores no etiquetados no fueron estadísticamente significativos.

8. Discusión

Este es el primer estudio a nivel mundial en el que se encuentra el microsatélite *TH01* asociado con la DT2. La magnitud de las asociaciones encontradas fue diferente entre los géneros y la edad de diagnóstico de la DT2; el alelo 9 se asoció con un efecto protector para desarrollar DT2 en mujeres antes de los 40 años, mientras que el alelo 9.3 se asoció significativamente con un riesgo mayor para desarrollar DT2 en hombres mayores de 39 años.

Interesantemente, nuestros hallazgos de *TH01* confirman que el papel de los polimorfismos genéticos pudiera ser diferente entre hombres y mujeres, y entre la presentación temprana y tardía de la enfermedad, como se observó en un estudio previo de nuestro grupo de trabajo, en ese estudio se encontraron varios SNPs asociados a la DT2 exclusivamente en los hombres (*rs4402960*, *IGF2BP2*; *rs7903146*, *TCF7L2* y *rs4458523*, *WFS1*) y otros exclusivamente en las mujeres (*rs10811661*, *CDKN2B*), e incluso algunos asociados a ambos géneros, pero con mayor riesgo en los hombres (*rs149483638*, *INS_IGF2*). Por otra parte, en ese mismo estudio encontraron ocho SNPs asociados a la DT2 diagnosticada ≤ 45 años, y seis SNPs asociados a la DT2 diagnosticada ≥ 46 años (Berumen J. *et al.*, 2019).

Una limitación de este estudio fue la media de la edad de diagnóstico de la DT2, 39 años, casi 10 años menos que la media de estudios de casos en población mexicana (Velasco *et al.*, 2010; Villalpando *et al.*, 2014). Esta diferencia se debe a que los pacientes incluidos en este estudio fueron seleccionados intencionalmente con diagnóstico temprano de DT2, dado que la aparición de la enfermedad a edades tempranas es más probable que se deba a factores genéticos (Willer A. *et al.*, 2016). Sin embargo, es claro que aun es necesario investigar estas asociaciones encontradas en este estudio, en una muestra de pacientes diagnosticados a edades mayores.

Interesantemente, el alelo 9.3 de *TH01* se encontró en desequilibrio de ligamiento con el alelo de riesgo (C) del SNP *rs149483638* del gen *INS_IGF2*, principalmente en los casos, lo que indica que ambos alelos se heredan de manera conjunta. Esto concuerda con el riesgo incrementado que confieren ambos alelos para la DT2

diagnosticada a edades mayores (≥ 40 años y ≥ 46 años, respectivamente), principalmente en hombres. La desregulación en la expresión del gen IGF2 se ha asociado a varias enfermedades metabólicas, incluyendo obesidad (Frystyk J, *et al.*, 1999) y diabetes (Estilles E, *et al.*, 2009), aunque no se sabe con precisión como participa en el desarrollo de la DT2. El riesgo incrementado del alelo (C) del SNP rs149483638 del gen *INS_IGF2* está relacionado con la expresión de la isoforma 2 de *IGF2*. No sabemos aún si el riesgo incrementado conferido por el alelo 9.3 del locus *TH01* es solo por el ligamiento con el gen *INS_IGF2*, o por un mecanismo diferente. Por otra parte, es importante notar que el alelo de protección (9) de *TH01* no está ligado al alelo de protección (T) del SNP rs149483638 del gen *INS_IGF2*, sino, sorprendentemente, se encontró ligado, en todos los casos, al alelo de riesgo (C). El alelo de protección (T) del SNP rs149483638 del gen *INS_IGF2* interrumpe la expresión de la isoforma 2 de *IGF2* (*SIGMA Type 2 Diabetes Consortium. 2014*), y la menor expresión de esta isoforma se correlaciona con niveles más bajos de hemoglobina glucosilada en la sangre (HbA_{1c}) en individuos con DT2 (Mercader J. *et al.*, 2017). De acuerdo al análisis del desequilibrio de ligamiento, es claro que el efecto protector del alelo 9 de *TH01* no ocurre a través de este mismo mecanismo, sino a través de otro mecanismo que aún desconocemos. Y en consecuencia, algunos individuos podrían tener ambos alelos protectores. La frecuencia haplotipo H20 con ambos alelos fue del 1%, sólo en los controles. El alelo T del SNP rs149483638 del gen *INS_IGF2* es muy raro en población europea (0.01%), mientras que su frecuencia en población Mexicana es alta, alrededor de 17% (Mercader J. *et al.*, 2017).

La diferencia entre el alelo protector (9) y el alelo de riesgo (9.3) es de tan solo 3 nucleótidos; el alelo 9.3 es una microvariante que contiene el trinucleótido ATG entre la sexta y séptima unidad de repetición de tetranucleótidos: [AATG]₆ ATG [AATG]₃ (Gettings K.B., *et al.*, 2015). Se ha comprobado que las variaciones alélicas de microsatélites pueden tener distintos efectos funcionales aún cuando la diferencia sea el cambio en solo un nucleótido (Meloni R. *et al.*, 1998). Interesantemente, en un estudio encontraron que el alelo de riesgo 9.3, conocido como 10 imperfecto (10i) (Puers C. *et al.*, 1993), aumenta significativamente la

transcripción del gen *TH in vitro*, y que el motivo “AATG” de éste microsatélite actúa como un sitio de unión al factor de transcripción ZNF191, cuya unión estimula la transcripción, aunque su efecto depende del tamaño de alelo. Se ha sugerido que su efecto como “enhancer” podría ocurrir en otros genes ya que éste repetido se encuentra en varios sitios a lo largo de todo el genoma (Albanese, V. *et al.*, 2001). Estos datos podrían sugerir que este locus, aunque esta a 10 Kb de distancia, podría tener un efecto sobre la expresión del gen INS.

Hasta el momento, se han identificado muy pocos microsatélites asociados a la DT2. Quizá el más relevante es el microsatélite *DG10S478*, el cual está localizado en el gen *TCF7L2* (Struan F. *et al.*, 2006), uno de los genes más fuertemente asociados a la DT2 en todo el mundo (Pradas *et al.*, 2014). Otros microsatélites se han asociado a enfermedades o complicaciones relacionadas con la DT2, como el microsatélite *D18S880* asociado a nefropatía diabética, y cuyo efecto depende de la longitud del repetido (Siu W *et al.*, 2012). Otro microsatélite es el trinucleótido CAG localizado en el receptor de andrógenos, los alelos cortos de éste locus afectan la actividad transcripcional del receptor y se asocian con bajos niveles de testosterona y colesterol HDL (Stanworth D, *et al.*, 2011).

Probablemente existan muchos otros microsatélites asociados a la DT2, sin embargo, hasta el momento no existen tecnologías capaces de analizar cientos de miles o millones de STRs al mismo tiempo. Por el contrario, la gran mayoría de los estudios de asociación se han enfocado en polimorfismos tipo SNPs, principalmente a través de tecnologías genómicas de alto rendimiento que permiten analizar millones de SNPs como los GWAS (Welter, D. *et al.*, 2014). Quizá una estrategia para identificar más STRs asociados a la DT2 es explorar el polimorfismo en STRs localizados en genes blanco, importantes para el desarrollo de la DT2. En especial, nuestros resultados y los hallazgos reportados en la literatura, sugieren que algunos microsatélites, especialmente los ubicados en regiones de control, podrían ser buenos candidatos para explorar su asociación con la DT2.

9. Conclusiones

Se identificaron 9 alelos del locus *TH01*, los alelos más frecuentes en la población fueron: 6, 7, 8, 9 y 9.3. El alelo 9 se asoció con un efecto protector para desarrollar DT2 en mujeres antes de los 40 años, mientras que el alelo 9.3 se asoció significativamente con un riesgo mayor para desarrollar DT2 en hombres mayores de 39 años.

Se encontró desequilibrio de ligamiento entre los tres loci (*TH01*; *rs149483638* (*INS_IGF2*) y *rs2237897* (*KCNQ1*) en los controles, en tanto que en los casos sólo se encontró en desequilibrio a los loci *TH01* y *rs149483638* (*INS_IGF2*).

Se encontraron 26 haplotipos formados entre los tres loci (*TH01*, *rs149483638* (*INS_IGF2*) y *rs2237897* (*KCNQ1*). El haplotipo H21 que incluye los alelos de riesgo de los tres loci tuvo una frecuencia mayor en los casos (19% vs 12%, $p=0.0005$).

Las asociaciones dependientes del género y la edad de diagnóstico de la enfermedad nos permiten plantear más estudios dirigidos a investigar los mecanismos moleculares por los cuales los alelos de riesgo y protección de *TH01* ejercen su efecto sobre la DT2.

Dado que este es el primer estudio en el que se encuentra asociado el locus *TH01* a la DT2 es necesario replicar estos resultados en diferentes poblaciones de México y a nivel mundial tomando en cuenta la ancestría ya que la historia evolutiva de la población mexicana es muy diferente y con una complejidad mayor debido al mestizaje.

Literatura citada

Ashcroft F. 2005. ATP-sensitive potassium channelopathies: focus on insulin secretion. *J Clin Invest.* 115: 2047-2058.

Aguilar E. 1990. *Cartas a un Diabético: Como prolongar la vida saludable.* Edit. Trillas, México.

Albanese, V., Biguet, N.F., Kiefer, H., Bayard, E., Mallet, J. and Meloni, R. 2001. Quantitative effects on gene silencing by allelic variation at a tetranucleotide microsatellite. *Hum. Mol. Genet.* 10:1785–1792.

American Diabetes Association 2005. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 28: S37-S42.

American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care*; 2010; 33 (suppl 1): S11-S53.

American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*; 2010; 33: S62-S69.

Barbeau, P, Litaker, MS, Jackson, RW, Treiber, FA: A tyrosine hydroxylase microsatellite and hemodynamic response to stress in a multi-ethnic sample of youth. *Ethn Dis* 13:186-192, 2003

Barquera, S., Campos I., Aguilar C., López R., Arredondo A. 2013. Diabetes en México: costo y manejo de la diabetes y sus complicaciones y retos para la política de salud. *Salud Global.* 9:3

Bell GI, Selby MJ, Rutter WJ. 1982. The highly polymorphic region near the insulin gene is composed of simple tandemly repeating sequences. *Nature* 295:31–35.

Bell, GI., Horita, S. and Karam, JH. 1984. *Diabetes* 33, 176-183.

Bennett ST., Lucassen AM., Gough SC., Powell EE., Undlien DE., et al. 1995. Susceptibility to human type 1 diabetes at IDDM2 is determined by tandem repeat variation at the insulin gene minisatellite locus. *Nat. Genet.* 9:284–92

Bennett T. and Todd A. 1996. Human type 1 diabetes and the insulin gene: principles of mapping polygenes. *Annu Rev Genet* 30:343–370.

Bennett T., Wilson AJ., Esposito L., Bouzekri N, Undlien DE, Cucca F, Nisticò L, Buzzetti R, Bosi E, Pociot F, Nerup J, Cambon-Thomsen A, Pugliese A, Shield JP, McKinney PA, Bain SC, Polychronakos C, Todd JA. 1997. Insulin VNTR allele-specific effect in type 1 diabetes depends on identity of untransmitted paternal allele. The IMDIAB Group. *Nat Genet.*17(3):350-2.

Bermúdez V., Bermúdez F., Arraiz N., Leal E., Linares S., Mengual E., Valdelamar L., Rodríguez M., Seyfi H., Amell A., Carrillo M., Silva C., Acosta A., Añez J., Andara C., Angulo V., Martins G. 2007. Biología molecular de los transportadores de glucosa: clasificación, estructura y distribución. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica.* 26:76-86.

Berumen J., Orozco L., Betancourt M., Gallardo H., Zulueta M., Mendizabal L., Simon L., Benuto R., Ramírez E., Marin M., Juárez E., García H., Martínez A., Venegas C., Peralta J., Cruz M., Tapia R. 2019. Influence of obesity, parental history of diabetes, and genes in type 2 diabetes: A case-control study. *Scientific Reports.* 9(1):2748.

Buraczynska M., Zukowski P., Ksiazek P., Kuczmaszewska A., Janicka J., Zaluska W. 2014. Transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene polymorphism and clinical phenotype in end stage renal disease patients. *Mol Biol Rep.* 41(6):4063-8.

Checa A. 2007. Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. *REV INST NAL ENF RESP MEx.* 20(3):213-221.

Cho NH, Shaw JE, Karuranga S, Huang Y, da Rocha Fernandes JD, Ohlrogge AW, Malanda B. 2018. IDF Diabetes Atlas: global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract.* 138:271–281.

Conesa A., Díaz O., Conesa del Río J., Domínguez E. 2010. Mortalidad por diabetes mellitus y sus complicaciones, Ciudad de La Habana, 1990-2002. *Revista Cubana de Endocrinología*. 21(1):35-50.

Coronado A., Del Razo M., García G., Sanmiguel F., Escobedo J. 2007. Inorganic arsenic exposure and type 2 diabetes mellitus in Mexico. *Environ Res*. 104: 383-389.

Cruz A. 2011. Análisis Genético Poblacional de la Ciudad de México utilizando 20 Loci STR. UNAM.

DeFronzo R. y Ferrannini E. 1991. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease, *Diabetes Care* 14. 173-194.

Díaz A., Sánchez C., Cebrián E., Ostrosky P., Hiriart M. 2006. Sodium arsenite impairs insulin secretion and transcription in pancreatic beta-cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 214:30-34.

Dongfeng G., O'Dell S., Chen X., Miller G and Day I. 2002. Evidence of multiple causal sites affecting weight in the IGF2-INS-TH region of human chromosome 11. *Hum Genet*. 110:173-181.

Estilles E., Téllez N., Soler J, Montanya E. 2009. High sensitivity of beta-cell replication to the inhibitory effects of interleukin-1beta: modulation by adenoviral overexpression of IGF2 in rat islets. *J Endocrinol*. 203(1):55-63.

Estrada K., Aukrust I., Bjørkhaug L., Burt NP., Mercader JM., García-Ortiz H., Huerta A., Moreno H., Walford G., Flannick J., Williams AL., Gómez MJ., Fernandez JC., Martínez A, Jiménez S., Centeno F., Mendoza E., Revilla C., Islas S., Córdova J., Soberón X., González E., Henderson E., Wilkens R., Le Marchand L., Arellano O., Ordóñez L., Rodríguez M., Rodríguez R., Riba L., Najmi A., Jacobs B., Fennell T., Gabriel S., Fontanillas P., Hanis C., Lehman D., Jenkinson P., Abboud E., Bell I., Cortes L., Boehnke M., González V., Orozco L., Haiman C., Tusié T., Aguilar A., Altshuler D., Njølstad R., Florez J., MacArthur G., et al. 2015. Association of a low-frequency variant in HNF1A with type 2 diabetes in a Latino population. *311(22):2305-14*.

Excoffier, L. and H.E. L. Lischer 2010. A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 10: 564-567.

Frystyk J, Skjaerbaek C, Vestbo E, Fisker S, Orskov H. 1999. Circulating levels of free insulin-like growth factors in obese subjects: the impact of type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 15(5):314-22.

Fu J., Woods C.G., Yehuda-Shnaidman E., Zhang Q., Wong V., et al. 2010. Low-level arsenic impairs glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic beta cells: involvement of cellular adaptive response to oxidative stress. *Environ Health Perspect*. 118: 864-870.

Gamboa M. 2016. Identificación de variantes genéticas de riesgo para diabetes tipo 2 y distintas comorbilidades en la población mexicana. Instituto de Investigaciones Biomedicas, UNAM. pp 73.

Gemayel R., Legendre. M., Vinces D. and Verstrepen K. 2010. Variable Tandem Repeats accelerate evolution of coding and regulatory sequences. *Annu. Rev. Genet*. 44:445-77

Gettings K.B., Aponte R.A., Vallone P.M. and Butler J.M. (2015). STR Allele Sequence Variation: Current Knowledge and Future Issues. *Forensic Science International: Genetics*.

González-Villalpando C, Dávila-Cervantes C, Zamora-Macorra M, Trejo-Valdivia B, González-Villalpando M. Incidencia de diabetes tipo 2 en México. *Resultados del Estudio de*

Gu, D., O'Dell, S.D., Chen, X.H., Miller, G.J. and Day, I.N. 2002. Evidence of multiple causal sites affecting weight in the IGF2-INS-TH region of human chromosome 11. *Hum. Genet*. 110:173-181.

Hara K., Shojima N., Hosoe J., Kadowaki T. 2014. Genetic architecture of type 2 diabetes.

Biochem Biophys Res Commun. 452(2):213-220.

Hayden MR y Tyagi SC. Islet redox stress: the manifold toxicities of insulin resistance, metabolic syndrome and amylin derived islet amyloid in type 2 diabetes mellitus. 2002. JOP. J Pancreas. 3:86-108.

Hayden MR., y Tyagi SC. 2000. Remodeling of the endocrine pancreas: the central role of amylin and insulin resistance. South Med J. 93:24-8.

Hayden MR y Tyagi SC. 2001. 'A' is for amylin and amyloid in type 2 diabetes mellitus. JOP. J Pancreas. 2:124-39.

He T, Zhong PS, Cui Y. 2014. A set-based association test identifies sets of sex-specific genes associated with type 2 diabetes. Genet front. 5: 395.

Herder C. Roden M. 2011. Genética de la diabetes tipo 2: relevancia fisiopatológica y clínica. Eur J Clin Invest. 41(6): 679-92.

Holt. I.G, Clives S, et al., 2010. Textbook of Diabetes. Edit. Goldstein, 4ª edición. Inglaterra, pp. 85-91.

Huxtable S., Saker P., Haddad L., Walker M., Frayling T., Levy J., Hitman G., O'Rahilly S., Hattersley A. and McCarthy M. 2000. Analysis of parent-offspring trios provides evidence for linkage and association between the insulin gene and type 2 diabetes mediated exclusively through paternally transmitted class III variable number tandem repeat alleles. Diabetes. 49(1):126-30.

Jindra, A., Jachymova, M., Horky, K., Peleska, J., Umnerova, V., Bultas, J. and Savlikova, J. 2000. Association analysis of two tyrosine hydroxylase gene polymorphisms in normotensive offspring from hypertensive families. Blood Press., 9:250–254.

Julier, C, Hyer, R. N., Davies, J., Merlin, F., Soularue, P., Briant, L., Cathelineau, G., Deschamps, I., Rotter, J. I., Froguel, P. 1991. Nature 354, 155-159.

Kaur J. 2014. A Comprehensive Review on Metabolic Syndrome. Cardiol Res Pract. 943162.p 21.

Kautzky-Willer A, Harreiter J, 2019. Sex and gender-specific aspects in prediabetes and diabetes mellitus-clinical recommendations. 131(Suppl 1):221-228.

Kautzky-Willer A, Harreiter J, Pacini G. 2016. Sex and Gender Differences in Risk, Pathophysiology and Complications of Type 2 Diabetes Mellitus. Endocr Rev. Jun; 37(3):278-316.

Kennedy C, German S, Rutter J. 1995. The minisatellite in the diabetes susceptibility locus IDDM2 regulates insulin transcription. Nat Genet 9:293-298.

Lai M.S., Hsueh Y.M., Chen C.J., et al. 1994. Ingested inorganic arsenic and prevalence of diabetes mellitus. Am J Epidemiol. 139:484-492.

Lang J. 1999. Molecular mechanisms and regulation of insulin exocytosis as a paradigm of endocrine secretion. Eur J Biochem. 259: 3-17.11.

Lee YH, Yu Ho Lee, Yang Gyun Kim, Ju-Young Moon, Jin Sug Kim, Kyung-Hwan Jeong, Tae Won Lee, Chun-Gyoo Ihm, Sang Ho Lee. 2016. Electrolyte Blood Press. 14:21-26.

Lim J.S., Lee D.H., Jacobs D.R., 2008. Jr Association of brominated flame retardants with diabetes and metabolic syndrome in the U.S. population. Diabetes Care. 31:1802–1807.

Lodish M. 2005. Biología Celular y Molecular, 5ª. Ed. Editorial Médica Panamericana, México, p.397.

Lozano G.E; Reza G.O; Urtiz E.N; López G.O; Vertiz H. Á.A. 2010. Polimorfismos genéticos asociados a la diabetes mellitus tipo 2. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. 41:4. pp. 7-17.

Lucassen, A. M., Julier, C, Beressi, J. P., Boitard, C, Froguel, P., Lathrop, M. and Bell, J. I. 1993. Nature Genet. 4:305-310.

Lucassen, A. M., Sreaton, G. R., Julier, C., Elliott, T. J., Lathrop, M., and Bell, J. I. 1995. Regulation of insulin gene expression by IDDM associated insulin gene locus haplotype. *Hum. Mol. Genet.* 4:501-506

Ludvik B., Kautzky-Willer, Prager R., Thomaseth K., Pacini G. 1997. Amylin: history and overview. *Diabetes Medicine.* 14(Suppl 2):S9-13.

MacGinnis E., Spielman S. 1995. Insulin gene 5' flanking polymorphism: length of class I alleles in number of repeat units. *Diabetes* 44:1296-1302.

Mardones L., Ormazabal V., Romo X., Jaña C., Binder P., Peña E., Vergara M., Zúñiga F. 2011. The glucose transporter-2 (GLUT2) is a low affinity dehydroascorbic acid transporter. *Biochem Biophys Res Commun.* 410: 7-12.

Meloni R., Albanese V., Ravassard P., Treilhou F. and Mallett J. 1998. A tetranucleotide polymorphic microsatellite, located in the first intron of the tyrosine hydroxylase gene, acts as a transcription regulatory element in vitro. *Hum. Mol. Genet.* 7:423-428.

Meloni R., Laurent C., Campion D., Ben Hadjali B., Thibaut F., Dollfus S., Petit M., Samolyk D., Martinez M., Poirier M. and Mallet J. (1995) A rare allele of a microsatellite located in the tyrosine hydroxylase gene found in schizophrenic patients. *C. R. Acad. Sci. III.* 318: 803-809.

Meloni R., Leboyer M., Bellivier F., Barbe B., Samolyk D., Allilaire J. and Mallet J. 1995 Association of manic-depressive illness with tyrosine hydroxylase microsatellite marker. *Lancet*, 345, 932.

Mercader M. Josep, Rachel G. Liao, Avery D. Bell, Zachary Dymek, Karol Estrada, Taru Tukiainen, Alicia Huerta-Chagoya, Hortensia Moreno-Macías, Kathleen A. Jablonski, Robert L. Hanson, Geoffrey A. Walford, Ignasi Moran, Ling Chen, Vineeta Agarwala, María Luisa Ordoñez-Sánchez, Rosario Rodríguez-Guillen, Maribel Rodríguez-Torres, Yayoi Segura-Kato, Humberto García-Ortiz, Federico Centeno-Cruz, Francisco Barajas-Olmos, Lizz Caulkins, Sobha Puppala, Pierre Fontanillas, Amy L. Williams, Sílvia Bonàs-Guarch, Chris Hartl, Stephan Ripke, Diabetes Prevention Program Research Group, Katherine Tooley, Jacqueline Lane, Carlos Zerrweck, Angélica Martínez-Hernández, Emilio J. Córdova, Elvia Mendoza-Caamal, Cecilia Contreras-Cubas, María E. González-Villalpando, Ivette Cruz-Bautista, Liliana Muñoz-Hernández, Donaji Gómez-Velasco, Ulises Alvirde, Brian E. Henderson, Lynne R. Wilkens, Loic Le Marchand, Olimpia Arellano-Campos, Laura Riba, Maegan Harden, Broad Genomics Platform, Stacey Gabriel, DT2-GENES Consortium, Hanna E. Abboud, Maria L. Cortes, Cristina Revilla-Monsalve, Sergio Islas-Andrade, Xavier Soberon, Joanne E. Curran, Christopher P. Jenkinson, Ralph A. DeFronzo, Donna M. Lehman, Craig L. Hanis, Graeme I. Bell, Michael Boehnke, John Blangero, Ravindranath Duggirala, Richa Saxena, Daniel MacArthur, Jorge Ferrer, Steven A. McCarroll, David Torrents, William C. Knowler, Leslie J. Baier, Noel Burt, Clicerio González-Villalpando, Christopher A. Haiman, Carlos A. Aguilar-Salinas, Teresa Tusié-Luna, Jason Flannick, Suzanne B.R. Jacobs, Lorena Orozco, David Altshuler, Jose C. Florez. 2017. A loss Diabetes. 66(11): 2903-2914.

Miguel Cruz, Jaime García-Mena, Eduardo López-Orduña, Adán Valladares, Reyna Sánchez, Niels Wachter-Rodarte, Rocío Aguilar-Gaytán y Jesús Kumate. 2005. Genes candidatos marcadores de susceptibilidad a DT2. *REB* 24(3,4): pp. 81-86.

Moss P.A., Davies K.E., Boni C., Mallet J. and Reeders S.T. (1986) Linkage of tyrosine hydroxylase to four other markers on the short arm of chromosome 11. *Nucleic Acids Res.* 14: 9927-9932.

Myers M. y White M. 2002. The Molecular Basis of Insulin Action. En: *Insulin Signaling: From cultured cells to animal models.* Editor: Gruenberg G, Zick Y. Taylor and Francis, New York, pp 55-87.

Neel B. A., Sargis, R. M. 2011. The paradox of progress: environmental disruption of

metabolism and the diabetes epidemic. *Diabetes* 60: 1838-1848.

Ng MC, Shriner D, Chen BH, Li J, Chen WM, Guo X, Liu J, Bielinski SJ, Yanek LR, Nalls MA, Comeau ME, Rasmussen-Torvik LJ, Jensen RA, Evans DS, Sun YV, An P, Patel SR, Lu Y, Long J, Armstrong LL, Wagenknecht L, Yang L, Snively BM, Palmer ND, Mudgal P, Langefeld CD, Keene KL, Freedman BI, Mychaleckyj JC, Nayak U, Raffel LJ, Goodarzi MO, Chen YD, Taylor HA Jr, Correa A, Sims M, Couper D, Pankow JS, Boerwinkle E, Adeyemo A, Doumatey A, Chen G, Mathias RA, Vaidya D, Singleton AB, Zonderman AB, Igo RP Jr, Sedor JR, FIND Consortium., Kabagambe EK, Siscovick DS, McKnight B, Rice K, Liu Y, Hsueh WC, Zhao W, Bielak LF, Kraja A, Province MA, Bottinger EP, Gottesman O, Cai Q, Zheng W, Blot WJ, Lowe WL, Pacheco JA, Crawford DC, eMERGE Consortium., DIAGRAM Consortium., Grundberg E, MuTHER Consortium., Rich SS, Hayes MG, Shu XO, Loos RJ, Borecki IB, Peyser PA, Cummings SR, Psaty BM, Fornage M, Iyengar SK, Evans MK, Becker DM, Kao WH, Wilson JG, Rotter JI, Sale MM, Liu S, Rotimi CN, Bowden DW, MEta-analysis of type 2 Diabetes in African Americans Consortium. 2014. Meta-analysis of genome-wide association studies in African Americans provides insights into the genetic architecture of type 2 diabetes. *PLoS Genet.* 10(8):e1004517.

Ong KK, Phillips DI, Fall C, Poulton J, Bennett ST, Golding J, Todd JA, Dunger DB: 1999. The insulin gene VNTR, type 2 diabetes and birth weight. *NatGenet.* 21:262–263.

Ong KK, Phillips DI, Fall C, Poulton J, Bennett ST, Golding J, Todd JA, Dunger. D B. 1990. The insulin gene VNTR, type 2 diabetes and birth weight. *Nat Genet* 21:262–263.

Owerbach, D. and Gabbay, K. H.1994. Localization of a type I diabetes susceptibility locus to the variable tandem repeat region flanking the insulin gene. *Diabetes* 42:1708-1714.

Paquette J, Giannoukakis N, Polychronakos C, Vafiadis P, Deal C. 1998. The INS 5_ variable number of tandem repeats is associated with IGF2 expression in humans. *J. Biol. Chem.* 273:14158–64

Paul D.S., Harmon A.W., Devesa V., Thomas D.J., Styblo M. 2007. Molecular mechanisms of the diabetogenic effects of arsenic: inhibition of insulin signaling by arsenite and methylarsonous acid. *Environ Health Perspect.* 115: 734-742.

Pettit DJ, Talton J, Dabelea D, Divers J, Imperatore G, Lawrence JM. 2009. Prevalence of Diabetes in U.S. Youth in 2009: The SEARCH for Diabetes in Youth Study. *Diabetes Care.* 2014; 37:402-8.

Pradas M, Nicod N, Fernández E, and Gomis R. 2014. Differential transcriptional and posttranslational transcription Factor 7-Like 2 regulation among nondiabetic individuals and Type 2 Diabetic patients. *Molecular Endocrinology.* 28:1558–1570

Prevalence of Diabetes in U.S. Diabetes in Youth Study. *Diabetes Care.* 37:402-408.

Puers C., Hammond H.A., Jin L., Caskey T. and Schumm J.W. (1993). Identification of repeat sequence heterogeneity at the polymorphic short tandem repeat locus HUMTH01 (AATG) n and reassignment of alleles in population analysis by using a locus-specific allelic ladder. *Am. J. Hum. Genet.* 53: 953–958.

Quirós R., Lardoeyt F., Arrieta G., Medina A. 2011. Influence of the genome-environment interaction in type 2 diabetes mellitus in a municipality of Camagüey province. *Rev Cub Gen.* 5:1.

Rahman M., Tondel M., Ahmad S. A., Axelson O. 1998. Diabetes mellitus associated with arsenic exposure in Bangladesh. *Am J Epidemiol.* 148: 198-203.

Rita Gemayel, Matthieu Legendre, Marcelo D. Vincés, Kevin J. Verstrepen. 2010. Variable Tandem Repeats Accelerate Evolution of Coding and Regulatory

Rodriguez G. 2014. *Genética y Diabetes. Guía de práctica clínica.* OSECAC. pp12.

Ronal C. y et al., 2005. *Joslin's Diabetes Mellitus*, Edit., Lippincott Williams Wilkins. Boston, Estados Unidos.

Rutter GA. 2014. Understanding genes indentified by genome-wide association studies for Type 2 diabetes. *Diabet Med.* 31:1480-87.

Sánchez C. J., Flores M.S.E., Machorro L. M.V., Galaviz H.C., Morán M.C., Perea F.J., Mújica J.K.I., Vargas A.L., Lavíada M.H.A., Fernández V., Pardío J., Arroyo P., Barrera H., Hanson R.L. 2004. Polymorphisms in candidate genes for type 2 diabetes mellitus in a Mexican population with metabolic syndrome findings. *Diabetes Research and Clinical Practice.* 63:1 pp. 47-55.

SEGOB-ENSANUT. Secretaria de gobernación, Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 20 (ENSANUT). En línea: <http://www.dof.gob.mx/documentos/3868/Salud/Salud.htm>.

Sequences. *Annu. Rev. Genet.* 44:445–77.

Sharma, P., Hingorani, A., Jia, H., Ashby, M., Hopper, R., Clayton, D. and Brown, M.J. 1998. Positive association of tyrosine hydroxylase microsatellite marker to essential hypertension. *Hypertension*, 32:676–682.

SIGMA Type 2 Diabetes Consortium, Williams AL, Jacobs SB, Moreno-Macías H, Huerta-Chagoya A, Churchhouse C, Márquez-Luna C, García-Ortiz H, Gómez-Vázquez MJ, Burt NP, Aguilar-Salinas CA, González-Villalpando C, Florez JC, Orozco L, Haiman CA, Tusié-Luna T, Altshuler D., et al. 2014. Sequence variants in SLC16A11 are a common risk factor for type 2 diabetes in Mexico. *506(7486):97-101.*

SIGMA Type 2 Diabetes Consortium. 2014. Sequence variants in SLC16A11 are a common risk factor for type 2 diabetes in Mexico. *Nature.* 506(7486):97-101.

Smyth C., Kalsi G., Brynjolfsson J., O'Neill J., Curtis D., Rifkin L., Moloney E., Murphy P., Sherrington R., Petursson H. and Gurling H. (1996) Further tests for linkage of bipolar affective disorder to the tyrosine hydroxylase gene locus on chromosome 11p15 in a new series of multiplex British affective disorder pedigrees. *Am. J. Psychiatry.* 153: 271–274.

Stahlhut R.W., van Wijngaarden E., Dye T.D., Cook S., Swan S.H. 2007. Concentrations of urinary phthalate metabolites are associated with increased waist circumference and insulin resistance in adult U.S. males. *Environ Health Perspect.* 115:876–882.

Stanworth D, Kapoor D, Channer S. and Jones H. 2011. Dyslipidaemia is associated with testosterone, oestradiol and androgen receptor CAG repeat polymorphism in men with type 2 diabetes. *Clinical Endocrinology.* 74:624–630

Tseng C. H, Tai T. Y, Chong C. K, Tseng C. P, Lai M. S, et al. 2000. Long-term arsenic exposure and incidence of non-insulin-dependent diabetes mellitus: a cohort study in arseniasis-hyperendemic villages in Taiwan. *Environ Health Perspect.* 108: 847-851.

Ukropec J., Radikova Z., Huckova M., et al. 2010. High prevalence of prediabetes and diabetes in a population exposed to high levels of an organochlorine cocktail. *Diabetologia.* 53:899–906.

Velasco H, y col. (2010) Evaluación del riesgo de diabetes en mexicanos y mexicoamericanos: los efectos del historial de diabetes de los padres se modifican según el nivel de adiposidad. *Cuidado de la diabetes.* 33 : 2260–2265.

Vesco Mutskov and Gary Felsenfeld. 2009. The human insulin gene is part of a large open chromatin domain specific for human islets. *PNAS.* 106:41 pp. 17419–17424.

Wändell PE, Carlsson AC. Gender differences and time trends in incidence and prevalence of type 2 diabetes in Sweden—a model explaining the diabetes epidemic worldwide today? *Diabetes Res Clin Pract.* 2014 Dec; 106(3):e90-2.

Weiss M., Steiner D., and Philipson L., 2014. Insulin Biosynthesis, Secretion, Structure, and Structure-Activity Relationships. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279029/>

Welter, D. et al., 2014. The NHGRI GWAS catalog, a curated resource of SNP-trait associations. *Nucleic Acids Res.* 42, D1001–D1006.

Wright E. y Loo D. 2011. Hirayama BA: Biology of human sodium glucose transporters. *Physiol Rev.* 91:733-794.

Xue F., Kidd J.R., Pakstis A.J., Castiglione C.M., Mallet J. and Kidd K.K. (1988). Tyrosine hydroxylase maps to the short arm of chromosome 11 proximal to the insulin and HRAS1 loci. *Genomics.* 2: 288–293.

Xue P., Hou Y., Zhang Q., Woods C.G., Yarborough K., et al. 2011. Prolonged inorganic arsenite exposure suppresses insulin-stimulated AKT S473 phosphorylation and glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes: involvement of the adaptive antioxidant response. *Biochem Biophys Res Commun.* 407: 360-365.

Ye J. M., Lim-Fraser M., Cooney G.J., Cooper G.J., Iglesias M.A., Watson D.G., et al. 2001. Evidence that amylin stimulates lipolysis in vivo: a possible mediator of induced insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 280:E562-9.

Yisahak SF, BeagleyJ, Hambleton IR, Venkat-Narayan KM. 2014. IDF Diabetes Atlas: Diabetes in North America and The Caribbean: An update. *Diabetes Res Clin Pract. Diabetes Res Clin Pract.* 2014 Feb; 103:2 pp.223-30.

Zamora. V., Chávez N, Méndez. S., 2014. Mecanismos moleculares de resistencia a la insulina. *Médica Sur. México.* 11(3); 149-156.

Zhang, L, Rao, F, Wessel, J, Kennedy, BP, Rana, BK, Taupenot, L, Lillie, EO, Cockburn, M, Schork, NJ, Ziegler, MG, O'Connor, DT: Functional allelic heterogeneity and pleiotropy of a repeat polymorphism in tyrosine hydroxylase: prediction of catecholamines and response to stress in twins. *Physiol Genomics* 19:277-291, 2004

Zheng Y., Scow J., Duenes J., Sarr M. 2012. Mechanisms of glucose uptake in intestinal cell lines: role of GLUT2. *Surgery.* 151:13-25.

Zimmet P. 1979. *Diabetes Care.* 2:2 pp.144-53.

Zorzano A., Palacín M., Gumà A. 2005. Mechanisms regulating GLUT4 glucose transporter expression and glucose transport in skeletal muscle. *Acta Physiol Scand.* 183: 43-58.