



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud  
**FACULTAD DE MEDICINA**

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO E INVESTIGACIÓN**

**HOSPITAL GENERAL "DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ"**

**"ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS rs312480 T>C, rs312486 G>C, rs9841978 G>A Y rs12487452 C>G DEL GEN QUE CODIFICA PARA EL CANAL DE CALCIO DEPENDIENTE DE VOLTAJE 1.3 (CA<sub>v</sub>1.3) COMO FACTOR DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE COMPLICACIONES MICROVASCULARES EN PACIENTES CON DIABETES TIPO 2 DEL HOSPITAL GENERAL "DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ" EN EL PERÍODO DE MARZO A AGOSTO DE 2020".**

**TÉSIS:**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO EN MAESTRIA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**JUAN DANIEL DÍAZ GARCÍA**

**TUTOR:**

**DR. RICARDO GONZÁLEZ RAMÍREZ**

**INVESTIGADOR EN CIENCIAS MÉDICAS C, ADSCRITO AL  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR E HISTOCOMPATIBILIDAD.  
HOSPITAL GENERAL "DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ"**

**COMITÉ TUTOR:**

**DRA. YOLANDA SALDAÑA ÁLVAREZ**

**DRA. SARA LUZ MORALES LÁZARO**

**DRA. MARÍA ANGÉLICA ALFONSINA OLIVO DÍAZ**

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud

**RESPONSABLE DE LA ENTIDAD ACADÉMICA:**

**DR. CARLOS JIMÉNEZ GUTIERREZ**

**CIUDAD DE MÉXICO, SEPTIEMBRE DE 2021**



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.

**HOSPITAL GENERAL "DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ"**

**AUTORIZACIONES**



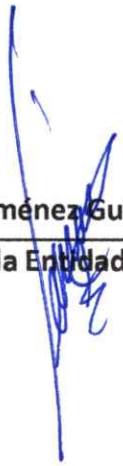
**Dr. Carlos Jiménez Gutiérrez**  
Responsable de la Entidad Académica



**Dr. Ricardo González Ramírez**  
Tutor

**Investigador en Ciencias Médicas C, Adscrito al  
Departamento de Biología Molecular e Histocompatibilidad.**

Este trabajo de tesis con número de registro: 12-04-2020 presentado por el alumno Juan Daniel Díaz García y se presenta en forma con visto bueno por el tutor principal de la tesis Dr. Ricardo González Ramírez con fecha julio de 2021 para su impresión final.

  
**Dr. Carlos Jiménez Gutiérrez**  
Responsable de la Entidad Académica

  
**Dr. Ricardo González Ramírez**  
Tutor

**“ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS rs312480 T>C, rs312486 G>C, rs9841978 G>A Y rs12487452 C>G DEL GEN QUE CODIFICA PARA EL CANAL DE CALCIO DEPENDIENTE DE VOLTAJE 1.3 (CA<sub>v</sub>1.3) COMO FACTOR DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE COMPLICACIONES MICROVASCULARES EN PACIENTES CON DIABETES TIPO 2 DEL HOSPITAL GENERAL “DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ” EN EL PERÍODO DE MARZO A AGOSTO DE 2020”.**

Este trabajo fue realizado en el Hospital General “Dr. Manuel Gea González” en el Departamento de Biología Molecular e Histocompatibilidad y en la División de Medicina Interna bajo la dirección del Dr. Ricardo González Ramírez con el apoyo de los adscritos de la División quienes orientaron y aportaron a la conclusión de este trabajo.

**COLABORADORES:**



---

**Dr. Ricardo González Ramírez**  
**Tutor**



---

**Juan Daniel Díaz García**  
**Alumno**

## **AGRADECIMIENTOS**

### ***A Dios:***

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

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

*Por haberme permitido ser parte de él y abierto las puertas de su seno científico para poder estudiar esta bondadosa maestría en ciencias.*

### ***A mis profesores:***

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

### ***A mi asesor y director de tesis:***

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

### ***A mis padres y hermanos:***

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

## ÍNDICE

I.	Resumen.....	7
II.	Introducción.....	8
III.	Hipótesis.....	11
IV.	Objetivo.....	11
V.	Material y Métodos.....	12
IV.	Resultados.....	17
V.	Discusión.....	21
VI.	Conclusión.....	24
VII.	Referencias bibliográficas .....	25
VIII.	Tablas.....	27
IX.	Figuras.....	32

## 1. RESUMEN

**INTRODUCCIÓN:** Una de las principales características de la diabetes tipo 2 (DT2) es la falta de secreción de insulina, este proceso se encuentra regulado por varias proteínas, dentro de estas se encuentran los canales de calcio dependientes de voltaje, principalmente los canales Cav1.3, cuyos polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) se han asociado en otras poblaciones con la presencia de complicaciones microvasculares en pacientes con de DT2. La importancia de estos canales se ha puesto de manifiesto en estudios anteriores donde se han comprobado que cambios en la función de estos modifican la secreción de la insulina.

**OBJETIVO:** Determinar la asociación de los polimorfismos rs312480 T>C, rs312486 G>C, rs9841978 G>A y rs12487452 C>G del gen que codifica para el Cav1.3 ajustados a factores clínicos (edad, tiempo de evolución con la enfermedad, IMC, descontrol glucémico e hipertensión arterial sistémica), con el riesgo de desarrollar complicaciones microvasculares en pacientes con diabetes tipo 2, del Hospital General “Dr. Manuel Gea González” en el período de marzo a agosto de 2020.

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

**RESULTADOS:** En este estudio participaron un total de 200 pacientes, 125 (62.5%) hombres y 75 (37.5%) mujeres, dentro de los cuáles se dividieron en dos grupos, 100 casos (con diagnóstico de diabetes tipo 2 y presencia de complicaciones microvasculares) y 100 controles (con diagnóstico de diabetes tipo 2 y ausencia de complicaciones microvasculares). Se estudiaron un total de 4 polimorfismos del gen *CACNA1D*. Los alelos silvestres fueron los más frecuentes en todos los grupos. Dentro de los polimorfismos analizados en la regresión logística binaria, resultaron rs9841978 GA (OR, 6.2; CI95%: 1.15-13.48, p=0.03) y rs312486 CC (OR, 6.6; CI95%: 4.60-9.45, p=0.002) con un nivel de significancia de Wald de 4.51 y 9.51 respectivamente.

En el modelo de regresión logística multinomial, en la retinopatía diabética las variables fueron la edad (OR, 1.12; CI95%: 1.03-1.22, p=0.01), HTAS (OR, 5.92; CI95%: 4.55-7.11, p=0.002), rs9841978 GA (OR, 9.72; CI95%: 3.62-10.72, p=0.002) y rs312486 CC (OR, 1.09; CI95%: 1.0004-1.19, p=0.003). En la nefropatía y neuropatía diabéticas la variable fue el polimorfismo rs9841978 GA, con OR, 12.55; CI95%:4.80- 32.80, p=0.03 y OR, 6.18; CI95%:2.90- 13.16, p=0.03, respectivamente.

**DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN:** Nuestro estudio demostró la asociación de variantes genéticas bien establecidas de los polimorfismos del gen *CACNA1D* con la presencia de complicaciones microvasculares en pacientes con diabetes tipo 2, mostrando que estos SNPs específicamente rs9841978 GA y rs312486 CC, pueden representar marcadores importantes en el desarrollo de estas complicaciones de la enfermedad y son un factor predisponente debido a la alta frecuencia y la fuerza de asociación que se observaron en nuestra población estudiada, representando este el primer estudio en América latina. Esto sugiere que existe una alta susceptibilidad de nuestra población a desarrollar no solo DT2 sino también complicaciones que a mediano o largo plazo podrían representar la causa de muerte en este sector cuando se encuentran presentes estos SNPs. Es importante reproducir este estudio en las diferentes áreas geográficas con el fin de poner de manifiesto las variaciones y la gran heterogeneidad étnica de los individuos.

**PALABRAS CLAVE:** *CACNA1D*; Diabetes tipo 2; Complicaciones microvasculares; Polimorfismo de un solo nucleótido.



## 2. INTRODUCCIÓN

La diabetes tipo 2 (DT2) se encuentra clasificada como una enfermedad de atención prioritaria en el esquema nacional de salud. Cifras obtenidas por la Encuesta Nacional de Salud (ENSA) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) han puesto de manifiesto como la DT2 ha incrementado su prevalencia en México. De acuerdo con estos resultados, el 10% de la población mexicana tiene DT2, presentando una mayor incidencia en mujeres (11%) que en hombres (9.7%). Sumado a esto, hay factores de riesgo que predisponen a la población a desarrollar DT2 como la obesidad, el sobrepeso y la inactividad física, todos estos factores han contribuido a que la DT2 ocupe uno de los principales puestos en el número de defunciones por año en nuestro país<sup>1</sup>.

Los esquemas de atención a pacientes con DT2 implantados por los sistemas de salud en México han mejorado considerablemente y han permitido hacerle frente a esta enfermedad, sin embargo, se necesita diseñar nuevos fármacos y desarrollar nuevos métodos de diagnóstico para prevenir esta epidemia<sup>2</sup>.

La DT2 se caracteriza por una escasa secreción de insulina por las células  $\beta$  pancreáticas y la insulina secretada es incapaz de actuar en los tejidos (resistencia a la insulina), apareciendo así la hiperglucemia. En las células  $\beta$  la secreción de insulina estimulada por la glucosa está dirigida por un complejo sistema eléctrico compuesto por varios eventos iónicos, el flujo de iones es sincronizado por múltiples canales iónicos<sup>3</sup>. Las células  $\beta$  del páncreas expresan en su membrana plasmática una gran variedad de receptores y canales iónicos que las ayudan a secretar la insulina. Se conoce desde 1968 que al aumentar la concentración extracelular de glucosa la membrana de las células  $\beta$  se despolariza, esta despolarización genera el disparo de potenciales de acción por estas células<sup>4</sup>.

Para que esta actividad eléctrica ocurra se requiere de la participación de al menos seis tipos de canales iónicos<sup>5</sup>: 1) Al ingresar la glucosa a la célula esta se metaboliza y al hacerlo se produce ATP, este ATP inactiva a los canales de potasio sensibles a ATP (KATP), que son los canales que determinan el potencial de la membrana en reposo y son los que convierten la señal metabólica en eléctrica, al inhibirse estos canales la concentración intracelular de  $K^+$  aumenta promoviendo la activación de los canales transitorios de calcio (TRP). 2) Los canales TRP se activan en las condiciones anteriores y producen una ligera despolarización de la membrana plasmática, los

canales TRP son poco selectivos y pueden permear al  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{Mg}^{2+}$  y al entrar estos iones a las células  $\beta$  permiten la activación de otros canales para continuar con la respuesta generada por la entrada de glucosa. 3) La entrada de iones por parte de los canales TRP permite alcanzar el umbral de activación de los canales de calcio de pendientes de voltaje ( $\text{Ca}_v$ ), los canales  $\text{Ca}_v$  que se activan primero son los de bajo umbral de activación o LVA, estos canales permiten la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  que activa a los canales de sodio dependientes de voltaje ( $\text{Na}_v$ ). 4) Los  $\text{Na}_v$  permiten entrar  $\text{Na}^+$  y es en este momento cuando se generan los potenciales de acción, esta despolarización fuerte de la membrana activa a otros  $\text{Ca}_v^6$ , los de alto umbral de activación o HVA. 5) Los canales de alto umbral de activación aumentan drásticamente la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  y es esta actividad la que desencadena la exocitosis de la insulina<sup>7</sup>. 6) Finalmente, la actividad de los canales rectificadores de potasio dependientes de voltaje ( $\text{K}_v$ ) y los canales de potasio dependientes de voltaje sensibles a calcio (BK) repolarizan la membrana plasmática de las células  $\beta$  pancreáticas y esto detiene la secreción de insulina<sup>8</sup>.

En la actualidad se han estudiado de forma importante los factores clínicos que influyen y representan un factor de riesgo para la aparición de complicaciones microvasculares (retinopatía, nefropatía y neuropatía) en pacientes diabéticos, dentro de las principales se encuentran: tiempo de evolución de la enfermedad (OR 1.45), descontrol glucémico (OR 1.67) que se define por una hemoglobina glucosilada  $>7\%$  en un período de tres meses y glucosa en ayunas  $>130$  mg/dL, índice de masa corporal (sobrepeso y obesidad) (OR 1.39) y contar con el diagnóstico de hipertensión arterial sistémica (OR 1.55)<sup>7,8</sup>. Sin embargo, en los últimos años, se han intensificado los esfuerzos en todo el mundo por encontrar marcadores genéticos relacionados estrechamente con la DT2 como factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad y la aparición de complicaciones microvasculares como respuesta al tratamiento farmacológico, estos marcados son principalmente polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs)<sup>9</sup>. La ventaja de estudiar este tipo de marcadores genéticos es doble<sup>10</sup>: 1) se tiene la posibilidad de encontrar alteración en los genes involucrados en el metabolismo de los fármacos, por ejemplo, se pueden encontrar SNPs que alteren la función de las enzimas que pertenecen al citocromo P450<sup>11</sup>, estas enzimas son las encargadas de metabolizar en el hígado la mayoría de los fármacos hipoglucemiantes; 2) los SNPs pueden ser utilizados como

marcadores genéticos asociados a las enfermedades, debido a que es posible detectar en la secuencia de un gen diferencias de un nucleótido entre individuos no emparentados<sup>12</sup>. El estudio de los SNPs asociados a la DT2 ha cobrado fuerza porque se quiere tener un grupo de polimorfismos que se puedan utilizar en un futuro cercano como una herramienta pronóstica relacionada al riesgo de desarrollar complicaciones micro y macrovasculares así como respuesta al tratamiento para control de esta enfermedad.

En la población mexicana se han realizado varios estudios en búsqueda de SNPs relacionados con la DT2. Se han encontrado varios polimorfismos en el gen de la calpaína 10 que aumenta el riesgo de desarrollar DT2 en poblaciones de la Ciudad de México, Orizaba y en una población México-Americana<sup>13</sup>, los polimorfismos son SNP-44, SNP-110, SNP-43, SNP-63 e INDEL-19, estos SNP presentaron una relación de momios que van de 1.3 a 2.72, sugiriendo una fuerte asociación con la DT2. Otro de los polimorfismos interesantes es el que se encuentra en el gen del factor de transcripción TCF7L2, esta variación también se ha asociado fuertemente con el riesgo a desarrollar DT2 en poblaciones mexicana y México-Americana, no se conoce con certeza como está relacionado este SNP con la diabetes, sin embargo, se cree que este factor de transcripción regula al péptido parecido a glucagón (GLP-1 por sus siglas en inglés) que puede afectar la secreción de insulina<sup>14</sup>. Otro estudio relacionado a los polimorfismos del gen del factor de transcripción TCF7L2, evaluó la asociación con el desarrollo de complicaciones crónicas, demostrando que la variabilidad genética de TCF7L2 también contribuye al a la aparición de complicaciones como la retinopatía y la neuropatía autonómica cardiovascular<sup>15</sup>.

Como comentamos anteriormente, la secreción de insulina depende de la actividad de diversos canales iónicos, se han encontrado SNP en genes que codifican para algunos canales iónicos, uno de los más estudiados es el canal de potasio dependiente de voltaje 1.9 (Kv1.9). Este canal es codificado por en el gen *KCNQ1*, y polimorfismos en este gen aumenta el riesgo de tener DT2<sup>16</sup>.

De forma interesante, se han identificado en poblaciones escandinavas tres SNPs en el gen que codifica para el canal de calcio dependiente voltaje Cav1.3, este canal junto con otras proteínas regula la secreción de insulina en las células  $\beta$  pancreáticas<sup>17</sup>. Estos canales median la entrada de  $Ca^{2+}$  en las células en respuesta a la despolarización de la membrana y están compuestos por una

subunidad principal formadora del poro (subunidad  $\alpha 1$ ) y múltiples subunidades auxiliares. Con respecto al gen que codifica para este canal (*CACNA1D*: Subunidad Alfa1D del canal de calcio dependiente de voltaje), se han identificado tres SNPs en poblaciones escandinavas asociados con DT2 y alteraciones en la secreción de insulina. El alelo C del SNP rs312480 se asoció con la DT2 y, sobre todo, con la disminución en la secreción de insulina por las células  $\beta$ -pancreáticas de pacientes diabéticos, mientras que rs312486/G, rs9841978/G y rs12487452/C se asociaron solamente con DT2<sup>26,27</sup>.

El rs312486 G>C, fue asociado con la DT2 presentando una frecuencia del 61.9% y el rs9841978 G>A con una frecuencia del 53.4%<sup>18</sup>.

Por lo tanto, considerando que estos canales iónicos participan en la regulación de la secreción de insulina, nuestro objetivo, es identificar si los polimorfismos del gen *CACNA1D* que codifican para el canal Cav1.3, serán un factor de riesgo asociado para el desarrollo de complicaciones microvasculares en los pacientes con diabetes tipo 2, tipificando y determinando las frecuencias alélicas y genotípicas en pacientes con y sin complicaciones microvasculares. Estos hallazgos nos permitirán determinar si los SNPs identificados previamente ayudarían a predecir la aparición de retinopatía, nefropatía y neuropatía diabética en población mexicana.

### **3. HIPÓTESIS**

Los pacientes con presencia de los rs312480 T>C, rs312486 G>C, rs9841978 G>A y rs12487452 C>G del gen que codifica para el CaV1.3 con DT2, presentarán un OR igual o mayor a 2 en el desarrollo de complicaciones microvasculares.

### **4. OBJETIVOS**

#### **Objetivo general**

Determinar la asociación de los polimorfismos rs312480 T>C, rs312486 G>C, rs9841978 G>A y rs12487452 C>G del gen que codifica para el CaV1.3 con el riesgo de desarrollar complicaciones microvasculares en pacientes con diabetes tipo 2, del Hospital General “Dr. Manuel Gea González” en el período de marzo a agosto de 2020.

## Objetivos específicos

### Primarios

- Determinar la frecuencia de sujetos con Diabetes tipo 2 con presencia de los polimorfismos rS312480 T>C, rS312486 G>C, rS9841978 G>A y rs12487452 C>G del gen que codifica para el Cav1.3.
- Calcular el riesgo de los polimorfismos rS312480 T>C, rS312486 G>C, rS9841978 G>A y rs12487452 C>G del gen que codifica para el Canal de Calcio dependiente de Voltaje 1.3, para el desarrollo de retinopatía, nefropatía y neuropatía diabética.
- Tipificar los polimorfismos rS312480 T>C, rS312486 G>C, rS9841978 G>A y rs12487452 C>G del gen que codifica para el Canal de Calcio dependiente de Voltaje 1.3 en pacientes con y sin complicaciones microvasculares y diabetes tipo 2.

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio de Casos y Controles, fue comparativo (se consideraron dos poblaciones), observacional (solo se observaron los fenómenos sin alterarlos), ambispectivo (información que se recopiló de manera retrospectiva y prospectiva) y transversal (las variables se midieron una vez). Se incluyeron a 200 sujetos de estudio, 100 pacientes con diagnóstico de DT2 con complicaciones microvasculares y 100 pacientes con diagnóstico de DT2 sin estas complicaciones, no pareados.

**Universo de estudio:** Pacientes adultos de 30 a 90 años de edad con diagnóstico de diabetes tipo 2 que acudieron al Servicio de Medicina Interna del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”.

### **Población de estudio:**

**Casos:** Pacientes adultos mexicanos de 30 – 90 años de edad con diabetes tipo 2 con complicaciones microvasculares que acudan al Servicio de Medicina Interna del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”, de marzo a agosto de 2020.

**Controles:** Pacientes adultos mexicanos de 30 – 90 años de edad con diabetes tipo 2 sin complicaciones microvasculares que acudan al Servicio de Medicina Interna del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”, de marzo a agosto de 2020.

### Tamaño de muestra:

El tamaño de muestra se calculó con el software Epidat versión 4.2 (<https://www.sergas.es/Saude-publica/EPIDAT>). Para nuestro estudio se calculó un tamaño de muestra no pareada. En Epidat 4.2, el cálculo del tamaño de muestra para estudiar si existe asociación entre la exposición de los polimorfismos y las complicaciones de la enfermedad en un estudio de casos y controles, se basa en la prueba de Connor RJ.

Los factores que intervienen en el cálculo son:

1. Frecuencia del polimorfismo menos frecuente rS9841978 G>A en los casos (P1).
2. Frecuencia del polimorfismo menos frecuente rS9841978 G>A en los controles (P2).
3. Razón de momios a detectar (Odds ratio, OR).

Estos tres valores están relacionados entre sí del modo siguiente:

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

La expresión queda finalmente así:

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

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

Tomando en cuenta esta información y la frecuencia del polimorfismo menos frecuente (rS9841978 G>A) de casos y controles, se calculó el tamaño de muestra para la población de estudio con los siguientes parámetros:

<b>Frecuencia de casos (rS9841978 G&gt;A)</b>	<b>43%</b>
<b>Frecuencia de controles (rS9841978 G&gt;A)</b>	<b>67%</b>
Odds ratio a detectar	2.0
Nivel de confianza	95%
<b>Resultados</b>	
<b>Potencia</b>	<b>80%</b>
<b>Número de Pares</b>	<b>135 Casos y 135 Controles</b>

El tipo de muestreo que se incluirá en el estudio será probabilístico aleatorio simple tanto para los casos como para los controles, a través de la generación de números al azar por medio de un software (Microsoft Excel).

Es importante mencionar que debido a la pandemia producida por el virus SARS-CoV-2 (COVID-19) no se consiguió completar el tamaño de muestra calculado, sin embargo, este estudio se logró realizar con 100 controles y 100 casos, siendo un total de 200 sujetos de estudio.

**Criterios de Inclusión de los Casos:**

- Pacientes hombres y mujeres mexicanos entre 30 a 90 años de edad con diagnóstico confirmado de diabetes tipo 2 de acuerdo con las guías de la Asociación Americana de Diabetes atendidos en la consulta externa del servicio de medicina interna, del Hospital General Dr. Manuel Gea González de marzo a agosto de 2020.
- Con complicaciones microvasculares de la enfermedad, posterior al diagnóstico establecido de DT2: retinopatía diabética, nefropatía diabética y neuropatía diabética.
- Autorización con consentimiento informado por parte del paciente.

**Criterios de exclusión de los Casos:**

- Pacientes con alguna otra patología ocular no relacionada a la DT2.
- Pacientes con diagnóstico de enfermedad renal crónica independiente de la DT2.
- Pacientes con diagnóstico de neuropatía periférica independiente de la DT2.
- Pacientes embarazadas.

**Criterios de Inclusión de los Controles:**

- Pacientes hombres y mujeres, mexicanos entre 30 a 90 años de edad con diagnóstico confirmado de diabetes tipo 2 de acuerdo con las guías de la Asociación Americana de Diabetes atendidos en la consulta externa del servicio de medicina interna, del Hospital General Dr. Manuel Gea González de marzo a agosto de 2020.
- Sin complicaciones microvasculares de la enfermedad diagnosticadas posterior al diagnóstico establecido de DT2: retinopatía diabética, nefropatía diabética y neuropatía diabética.
- Autorización con consentimiento informado por parte del paciente.

**Criterios de exclusión de los Controles:**

- Pacientes con alguna otra patología ocular, renal o neurológica no relacionada a la DT2.
- Pacientes embarazadas.

**Descripción de los procedimientos:**

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

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

**Análisis estadístico**

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

Los cálculos se llevaron a cabo usando los programas SPSS v24 y EpilInfo v6.1.



#### Análisis Univariado:

- Para variables cualitativas se realizó descripción de proporciones (porcentajes).
- Para variables cuantitativas se describió media, intervalo de confianza de la media, mediana, intervalo cuartil y desviación estándar.
- Se utilizaron gráficos o de sectores y box plot.

#### Análisis Bivariado:

- Variables cualitativas: se realizó análisis con todas las variables dicotómicas en función de la variable dependiente utilizando comparación de proporciones.
- Se calculó la  $X^2$  de Pearson y se observó que cumpliera el supuesto de los valores esperados (igual o mayor a 5).
- Variables cuantitativas: Con relación con la variable dependiente se realizó comparación de medias con la prueba T de Student y Fisher y se reportó la diferencia de la media aritmética con su respectivo IC al 95%.
- Supuesto de simetría: Kolmogorov smirnov (muestra grande).
- Para probar homogeneidad de varianzas se utilizó el estadístico de Levene.

#### Análisis Multivariado:

- Se analizaron todas las variables (cualitativas o cuantitativas) que tuvieron un nivel de significancia cuya  $p < 0.05$ .
- Se realizó un modelo de regresión logística binaria y multinomial.
- Los resultados fueron analizados a través del nivel de significancia de Wald, OR e intervalo de confianza.

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

## **6.RESULTADOS**

### **Descripción general de la población**

Participaron en el estudio un total de 200 pacientes, se dividieron en dos grupos, 100 casos (con diagnóstico de diabetes tipo 2 y presencia de una o más complicaciones microvasculares) y 100 controles (con diagnóstico de diabetes tipo 2 y sin presencia de complicaciones microvasculares).

La media aritmética de la edad de ambos grupos fue de 60.64 años (IC 95% 55.31 a 65.96, RIC 10), con una media del tiempo en años de diagnóstico de la enfermedad de 13 años (IC 95% 9.46 a 16.54, RIC 10) y un IMC de 26.91 kg/m<sup>2</sup> (IC 95% 23.56 a 30.26, RIC 9.3). Con relación a la variable de control glucémico compuesta por la HbA1c presentaron una media de 11.83% (IC 95% 10.02 a 13.64, RIC 3) y una media de glucosa en ayunas de 185.36 mg/dl (IC 95% 152.07 a 218.64, RIC 89). Con respecto al perfil lipídico, presentaron una media de LDL de 87.90 mg/dl (IC 95% 68.42 a 107.39, RIC 47), HDL de 42.45 mg/dl (IC 95% 34.2 a 50.7, RIC 7) y triglicéridos de 205.45 mg/dl (IC 95% 93.1 a 317.7, RIC 135). Por último, con relación al tiempo de diagnóstico de cada una de las complicaciones microvasculares presentaron las siguientes medias en años: retinopatía diabética 6.45 años (IC95% 4.3 a 8.61, RIC 5), nefropatía diabética 3.64 (IC 95% 2.46 a 4.81, RIC 2) y neuropatía diabética 1.82 años (IC95% 1.16 a 2.48, RIC 1), (Cuadro 1).

### **Descripción de la población según grupo de estudio**

De acuerdo a las características clínicas de los pacientes según el grupo de estudio, se llevó a cabo un análisis bivariado con las variables cuantitativas en relación con la variable dependiente, en el cual se realizó comparación de medias con la prueba T de Student (Cuadro 2), donde se encontró que con respecto a la edad, la media aritmética en años de los casos fue de 58.63 años IC95% 56.07 a 61.19 siendo mayor a comparación de los controles 53.85 años IC 95% 51.07 a 56.63, siendo estadísticamente significativa ( $p= 0.013$ ) tal como se muestra en el box plot (Figura 1) presentando homogeneidad de varianzas utilizando el estadístico de Levene con un nivel de significancia de 0.058. En cuanto al tiempo de evolución de la enfermedad, la media aritmética de los casos en años fue de 13.09 IC95% 12.06 a 14.2 y en controles de 14.14 IC95% 13.09 a 15.19, siendo mayor en este último, presentando igualdad de varianzas con un nivel de significancia de 0.14 (Figura 2). Con

relación al IMC este fue mayor en el grupo de casos 28.45 IC95% 27.62 a 29.7, a comparación del grupo control 25.11 IC95% 24.43 a 25.78 con un valor  $p=0.25$ , sin presentar homogeneidad de varianzas (Figura 3). Con respecto al control glucémico, la hemoglobina glucosilada en el grupo de casos fue mayor que en el grupo control (10.04 IC95% 8.10 a 11.99 vs 8.69 IC95% 7.3 a 10.04)  $p=0.001$ , probando igualdad de varianzas por la prueba de Levene (Figura 4), por otro lado con respecto a la glucosa en ayunas como parte de la evaluación del control glucémico, fue mayor de igual manera en el grupo de casos a comparación con el grupo control (152.83 IC95% 146.08 a 159.58 vs 135.79 IC95% 131.09 a 140.48), siendo estadísticamente significativo con una  $p=0.001$  sin mostrar homogeneidad de varianzas (Figura 5).

En el perfil lipídico, se evaluó el LDL en casos y controles presentando una media aritmética mayor en este último grupo (85.57 IC95% 79.95 a 91.19 vs 101.84 IC95% 96.5 a 107.08) con un valor  $p=0.04$ , y probando igualdad de varianzas (Figura 6). El HDL fue mayor en el grupo control con respecto al grupo de casos (43.21 IC95% 41.67 a 44.74 vs 42.79 IC95% 40.31 a 45.27)  $p=0.77$  sin probar homogeneidad de varianzas (Figura 7) y los triglicéridos en ambos grupos estuvieron elevados, siendo mayor en el grupo control con respecto a los casos (212.32 IC95% 194.83 a 229.80 vs 184.64 IC95% 157.8 a 211.48) presentando homogeneidad de varianzas utilizando el estadístico de Levene con un nivel de significancia de 0.09 (Figura 8).

El supuesto de simetría fue realizado por la prueba de Kolmogorov smirnov al ser una muestra grande, sin presentar cada una de las variables estudiadas una distribución normal.

De igual manera, se llevó a cabo un análisis bivariado con las variables cualitativas, donde se realizó un análisis con todas las variables dicotómicas en función de la variable dependiente utilizando comparación de proporciones, donde se calculó la  $X^2$  de Pearson y se observó que cumplieran el supuesto de los valores esperados (igual o mayor a 5) (Cuadro 3), encontrándose que con respecto a la variable sexo, predominaron los hombres en ambos grupos, el 67% (67) en casos y 58% (58) en los controles con  $p=0.18$ . Con relación al antecedente de hipertensión arterial sistémica fue mayor en el grupo de casos 60% (60) a comparación del grupo control 32% (32), representando una variable estadísticamente significativa ( $p=0.0001$ ).

### **Distribución de alelos, genotipos y haplotipos del gen *CACNA1D*.**

Se estudiaron un total de 4 polimorfismos del gen *CACNA1D* (rs312480, rs312486, rs9841978, rs12487452) que se muestran en el Cuadro 4. La asociación de los alelos y los genotipos en la población estudiada con DT2, tanto en los casos como en los controles se muestran en los cuadros 5 y 6 respectivamente. Los alelos silvestres fueron los más frecuentes en todos los grupos.

Con relación a los alelos de los 4 polimorfismos estudiados, tres de ellos se asociaron con susceptibilidad a la presencia de complicaciones microvasculares, dentro de estos se encuentran el alelo C del SNP rs12487452 con un OR 1.54; CI95%: 1.03-2.30,  $p=0.0005$ , el alelo A del SNP rs9841978 con un OR 5.78; CI95%: 2.99-11.19,  $p=0.0009$  y el alelo G del SNP rs312486 con un OR 8.03; CI95%: 3.52-18.27,  $p=0.02$ , siendo estadísticamente significativos, con una frecuencia mayor en el grupo de casos del 65%, 27% y 23% de acuerdo a los SNPs respectivamente antes mencionados y con sus contrapartes correspondientes que fueron de protección. Los alelos del polimorfismo rs312480 no mostraron asociación con la presencia de las complicaciones microvasculares sin mostrar diferencias significativas en la frecuencia de ambos grupos.

Con respecto a los genotipos de los polimorfismos, se encontró asociación con frecuencias estadísticamente significativas en cada uno de ellos a excepción del SNP rs312480, mostrando los genotipos rs12487452CC con un OR 3.17; CI95%: 1.62-6.18,  $p=0.0005$ , rs9841978GA con un OR 2.34; CI95%: 1.31-6.85,  $p=0.04$  y rs312486CG con un OR 10.91; CI95%: 4.61-25.83,  $p=0.03$ , siendo mayores las frecuencias en el grupo de casos, con 38%, 54% y 45% respectivamente de los polimorfismos antes mencionados. Todos los SNPs estudiados se encontraron en el equilibrio de Hardy-Weinberg. En todas las comparaciones de genotipos de los SNPs, prevaleció el modelo codominante. La tasa de éxito general de la técnica de tipificación fue del 98.9%. El software Haploview v4.2 estableció 7 haplotipos para la población estudiada de pacientes con diabetes tipo 2 y presencia de complicaciones microvasculares, (Cuadro 7). Cuando se analizaron a todos los sujetos, se encontró que el haplotipo CGAC del gen *CACNA1D* fue de susceptibilidad (OR;5.87; CI95%: 2.38-14.5,  $p=0.05$ ) al igual que haplotipo TCAC, (OR, 17.31; CI95%: 2.08-19.4,  $p=0.013$ ), mientras que los haplotipos CCGC (OR, 0.54; CI95%: 0.36-0.80,  $p=0.002$ ) y CCGG (OR, 0.59; CI95%: 0.39-0.89,  $p=0.012$ ) fueron de protección mostrando significancia estadística.

### **Resultados obtenidos en la regresión logística binaria y multinomial**

Se realizó un modelo de regresión logística binaria y multinomial, donde se analizaron todas las variables (cualitativas o cuantitativas) que tuvieron un nivel de significancia cuya  $p < 0.05$ . Los resultados fueron analizados a través del nivel de significancia de Wald, OR e intervalo de confianza (Cuadros 8 y 9). En la regresión logística binaria, las variables dependientes fueron la presencia o ausencia de complicaciones microvasculares, donde las variables independientes clínicas estudiadas estadísticamente significativas fueron la edad (OR, 1.97; CI95%: 1.93-2.01,  $p=0.01$ ), glucosa en ayunas (OR, 1.97; CI95%: 1.95-1.99,  $p=0.0005$ ), LDL (OR, 1.35; CI95%: 1.13-1.94,  $p=0.04$ ), HTAS (OR, 1.02; CI95%: 1.01-1.04,  $p=0.005$ ) y hemoglobina glucosilada (OR, 1.34; CI95%: 1.02-1.76,  $p=0.001$ ). Dentro de los polimorfismos analizados en la regresión logística binaria, resultaron rs9841978 GA (OR, 6.2; CI95%: 1.15-13.48,  $p=0.03$ ) y rs312486 CC (OR, 6.6; CI95%: 4.60-9.45,  $p=0.002$ ) con un nivel de significancia de Wald de 4.51 y 9.51 respectivamente.

En el modelo de regresión logística multinomial, de acuerdo con la complicación microvascular en específico, se analizaron las variables independientes con significancia estadística. En la retinopatía diabética las variables fueron la edad (OR, 1.12; CI95%: 1.03-1.22,  $p=0.01$ ), HTAS (OR, 5.92; CI95%: 4.55-7.11,  $p=0.002$ ), rs9841978 GA (OR, 9.72; CI95%: 3.62- 10.72,  $p=0.002$ ) y rs312486 CC (OR, 1.09; CI95%: 1.0004-1.19,  $p=0.003$ ). En la nefropatía y neuropatía diabéticas la variable fue el polimorfismo rs9841978 GA, con OR, 12.55; CI95%:4.80- 32.80,  $p=0.03$  y OR, 6.18; CI95%:2.90- 13.16,  $p=0.03$ , respectivamente.

### **Desequilibrio de ligamiento (LD)**

El gráfico generado en Haploview (v4.2) para determinar el LD ( $D'$ ) para los 4 SNPs se presenta en la Figura 9. El cual indica que los SNPs rs312480, rs312486, rs9841978 y rs12487452 parecen ser casi independientes entre sí, encontrándose en regiones intrónicas de los genes (Cuadro 4).

## 7.DISCUSIÓN

La DT2 se encuentra clasificada como una enfermedad de atención prioritaria en nuestro país, con un aumento progresivo de la prevalencia en los últimos años, representando uno de los principales puestos en el número de defunciones por año, secundario a la aparición de complicaciones crónicas de la enfermedad, dentro de ellas se encuentran las complicaciones microvasculares, tal como la retinopatía, nefropatía y neuropatía diabética<sup>1</sup>. En la actualidad se han estudiado de forma importante los factores clínicos que influyen y representan un factor de riesgo para la aparición de estas complicaciones microvasculares en pacientes diabéticos, dentro de las principales se encuentran: tiempo de evolución de la enfermedad (OR 1.45), descontrol glucémico (OR 1.67) que se define por una hemoglobina glucosilada >7% en un período de tres meses y glucosa en ayunas >130 mg/dL, índice de masa corporal (sobrepeso y obesidad) (OR 1.39) y contar con el diagnóstico de hipertensión arterial sistémica (OR 1.55)<sup>7,8</sup>, sin embargo se han intensificado los esfuerzos en todo el mundo por encontrar marcadores genéticos relacionados estrechamente con la DT2 como factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad y la aparición de complicaciones microvasculares, estos marcados son principalmente polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs)<sup>9</sup>.

Una de las principales características de la DT2 es la falta de secreción de insulina, este mecanismo de secreción esta finamente controlado por la expresión de varias proteínas y el mal funcionamiento de estas proteínas o la incorrecta expresión de los genes que codifican a esas proteínas provocan la disminución de insulina secretada y la consecuencia fisiológica es la aparición de la hiperglucemia. De todas las proteínas que intervienen en este proceso se encuentran los canales de calcio dependientes de voltaje, principalmente los canales Cav1.3<sup>6</sup>.

En algunas poblaciones europeas y asiáticas se han encontrado SNPs asociados a DT2, el impacto que tienen los SNPs sobre la función fisiológica de los canales iónicos se ha puesto de manifiesto en estudios previos donde se ha comprobado que el cambio de una sola base es suficiente para modificar la secreción de la insulina<sup>2</sup>, sin embargo son pocos los estudios que se han realizado a nivel mundial para encontrar si existe asociación sobre la aparición de complicaciones crónicas de la enfermedad, como las microvasculares en pacientes que cuenten con estos polimorfismos, principalmente relacionados a canales iónicos.

El objetivo de este estudio fue determinar si existe una asociación de los polimorfismos rs312480 T>C, rs312486 G>C, rs9841978 G>A y rs12487452 C>G del gen que codifica para el Ca<sub>v</sub>1.3 con el riesgo de desarrollar complicaciones microvasculares en pacientes con diabetes tipo 2, representando este el primer estudio de SNPs del canal de calcio dependiente de voltaje 1.3, en América latina y por supuesto en población mexicana. Utilizamos un diseño de casos y controles basado en la población en una muestra mexicana, centrándonos en 4 SNPs del gen *CACNA1D*.

En nuestro estudio, la evaluación de los polimorfismos antes mencionados del canal Ca<sub>v</sub>1.3, codificado por el gen *CACNA1D* presentaron una importante asociación de susceptibilidad con la presencia de complicaciones microvasculares en población diabética, de los SNPs estudiados se encontraron el alelo alelo C rs12487452, el alelo A rs9841978 y el alelo G rs312486 con una fuerza de asociación estadísticamente significativa y con frecuencias del 65%, 27% y 23% respectivamente, cabe mencionar que el SNP rs12487452C fue el que presentó una mayor frecuencia en nuestra población, representando más del doble de las frecuencias de los otros SNPs estudiados.

Al evaluar la frecuencia genotípica, se encontró asociación estadísticamente significativa en cada uno de los polimorfismos a excepción del SNP rs312480 donde no se presentó ningún sujeto de estudio en el grupo control con la presencia del genotipo rs312480CT. De esta manera los pacientes con los genotipos rs12487452CC (OR 3.17; CI95%: 1.62-6.18, p=0.0005), rs9841978GA (OR 2.34; CI95%: 1.31-6.85, p=0.04) y rs312486CG (OR 10.91; CI95%: 4.61-25.83, p=0.03), tuvieron mayor susceptibilidad con la presencia de complicaciones microvasculares, con frecuencias de 38%, 54% y 45% respectivamente de los polimorfismos antes mencionados.

Por último, al realizar el análisis de haplotipos se encontraron 7, dentro de los cuáles 4 de ellos fueron estadísticamente significativos, 2 de estos fueron haplotipos de protección, CCGC y CCGG y 2 de riesgo, CGAC y TCAC.

De esta manera, al realizar los modelos de regresión logística binaria y multinomial, tomando en cuenta en el modelo binario la presencia de complicaciones microvasculares como variable dependiente, se encontraron dentro de las variables clínicas con mayor significancia la edad del paciente, la glucosa en ayunas, hemoglobina glucosilada, niveles de LDL e hipertensión arterial sistémica, que son las variables con mayor asociación para el desarrollo de estas complicaciones en

el paciente diabético y que refuerza lo que ya es conocido en la literatura mundial<sup>7,8</sup>, sin embargo resalta la presencia de dos polimorfismos con una importante fuerza de asociación dentro de los cuatro que fueron analizados en este estudio, rs9841978 GA y rs312486 CC, que de forma general estarían involucrados en la aparición de dichas complicaciones microvasculares. De tal manera, al realizar el modelo de regresión logística multinomial, donde ahora se analizaron cada una de las complicaciones microvasculares en específico como variables dependientes, se encontró con respecto a la retinopatía diabética que la hipertensión arterial sistémica y la edad del paciente como variables clínicas, tienen un rol fundamental en el desarrollo de esta complicación en particular, sin embargo existen factores genéticos que pudieran tener una participación fundamental para la aparición la retinopatía que son los SNPs rs9841978 GA y rs312486 CC, y que específicamente el SNP rs9841978 GA, una vez presentada la retinopatía en el paciente, probablemente actuaría como un factor genético independiente de algún otro factor clínico que impulsaría el desarrollo tanto de la nefropatía como de la neuropatía diabética, siendo la única variable en nuestro estudio en este modelo multinomial que se presentó con mayor significancia y con una importante fuerza de asociación.

Estos SNPs ya se habían identificado en poblaciones escandinavas como factores de riesgo asociados con DT2, además de producir alteraciones en la secreción de insulina<sup>26,27</sup>, sin embargo no se había realizado un estudio que mostrará la asociación con la aparición de complicaciones crónicas de la DT2, por esta razón creemos que nuestros resultados, marcaran la pauta para realizar estudios más grandes y en diferentes poblaciones, buscando encontrar una asociación con la presencia de las complicaciones de la enfermedad y que podría contrastar con los resultados de otras poblaciones no semejantes a la nuestra debido a las diferencias étnicas, resaltando las distintas variantes genéticas en las múltiples regiones geográficas.



## 8. CONCLUSIÓN

Nuestro estudio demostró la asociación de variantes genéticas bien establecidas de los polimorfismos del gen *CACNA1D* con la presencia de complicaciones microvasculares en pacientes con diabetes tipo 2, mostrando que estos SNPs, específicamente rs9841978 GA y rs312486 CC, pueden representar marcadores importantes en el desarrollo de estas complicaciones de la enfermedad y son un factor predisponente debido a la alta frecuencia y la fuerza de asociación que se observaron en nuestra población estudiada, representando este el primer estudio en América latina. Esto sugiere que existe una alta susceptibilidad de nuestra población a desarrollar no solo DT2 sino también complicaciones que a mediano o largo plazo podrían representar la causa de muerte en este sector cuando se encuentran presentes estos SNPs.

Es importante reproducir este estudio en las diferentes áreas geográficas con el fin de poner de manifiesto las variaciones y la gran heterogeneidad étnica de los individuos.

Los estudios de los SNPs asociados a la DT2 a nivel mundial han cobrado fuerza por lo que ahora se tienen que realizar también estudios que se asocien a la aparición de complicaciones de la enfermedad ya que creemos que de esta manera se podrá contar con un grupo de polimorfismos que se puedan utilizar en un futuro cercano como una herramienta pronóstica en el control de esta patología.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE). (2016). Crecimiento de mortalidad por diabetes mellitus por cada 100 mil habitantes.
- (2) Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Información (INEGI) (2014). Principales causas de mortalidad por residencia habitual, grupos de edad y sexo del fallecido.
- (3) Yang, S.N., Shi, Y., Yang, G., Li, Y., Yu, J. and Berggren, P.O. (2014) Ionic mechanisms in pancreatic beta cell signaling. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 71, 4149-4177.
- (4) Dean, P.M. and Matthews, E.K. (1968) Electrical activity in pancreatic islet cells. *Nature*, 219, 389-390.
- (5) Velasco, M., Diaz-Garcia, C.M., Larque, C. and Hiriart, M. (2016) Modulation of Ionic Channels and Insulin Secretion by Drugs and Hormones in Pancreatic Beta Cells. *Molecular pharmacology*, 90, 341-357.
- (6) Braun, M., Ramracheya, R., Bengtsson, M., Zhang, Q., Karanauskaite, J., Partridge, C., Johnson, P.R. and Rorsman, P. (2008) Voltage-gated ion channels in human pancreatic beta- cells: electrophysiological characterization and role in insulin secretion. *Diabetes*, 57, 1618- 1628.
- (7) Rorsman, P. and Braun, M. (2013) Regulation of insulin secretion in human pancreatic islets. *Annual review of physiology*, 75, 155-179.
- (8) Gonzalez-Ramirez, R. and Felix, R. (2018) Transcriptional regulation of voltage-gated Ca (2+) channels. *Acta physiologica (Oxford, England)*, 222.
- (9) Voight, B.F., Scott, L.J., Steinthorsdottir, V., Morris, A.P., Dina, C., Welch, R.P., Zeggini, E., Huth, C., Aulchenko, Y.S., Thorleifsson, G. et al. (2010) Twelve type 2 diabetes susceptibility loci identified through large-scale association analysis. *Nature genetics*, 42, 579-589.
- (10) Below, J.E., Gamazon, E.R., Morrison, J.V., Konkashbaev, A., Pluzhnikov, A., McKeigue, P.M., Parra, E.J., Elbein, S.C., Hallman, D.M., Nicolae, D.L. et al. (2011) Genome-wide association and meta-analysis in populations from Starr County, Texas, and Mexico City identify type 2 diabetes susceptibility loci and enrichment for expression quantitative trait loci in top signals. *Diabetologia*, 54, 2047-2055.

- (11) Yasuda, S.U., Zhang, L. and Huang, S.M. (2008) The role of ethnicity in variability in response to drugs: focus on clinical pharmacology studies. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 84, 417-423.
- (12) Li, P., Guo, M., Wang, C., Liu, X. and Zou, Q. (2015) An overview of SNP interactions in genome-wide association studies. *Briefings in functional genomics*, 14, 143-155.
- (13) Del Bosque-Plata, L., Aguilar-Salinas, C.A., Tusie-Luna, M.T., Ramirez-Jimenez, S., Rodriguez-Torres, M., Auron-Gomez, M., Ramirez, E., Velasco-Perez, M.L., Ramirez-Silva, A., Gomez-Perez, F. et al. (2004) Association of the calpain-10 gene with type 2 diabetes mellitus in a Mexican population. *Molecular genetics and metabolism*, 81, 122-126.
- (14) Parra, E.J., Cameron, E., Simmonds, L., Valladares, A., McKeigue, P., Shriver, M., Wachter, N., Kumate, J., Kittles, R. and Cruz, M. (2007) Association of TCF7L2 polymorphisms with type 2 diabetes in Mexico City. *Clinical genetics*, 71, 359-366.
- (15) Ciccacci C. (2013) TCF7L2 gene polymorphisms and type 2 diabetes: association with diabetic retinopathy and cardiovascular autonomic neuropathy. *Acta Diabetol.* 50(5):789-99.
- (16) Gamboa M. (2012). Contribution of Common Genetic Variation to the Risk of Type 2 Diabetes in the Mexican Mestizo Population *Diabetes*. 61(12):3314-21
- (17) Vincenzo M. (2017) Loss of  $\alpha_2\delta-1$  Calcium Channel Subunit Function Increases the Susceptibility for Diabetes. *Diabetes* ;66: 897–907.
- (18) Reinbothe T. (2013) The human L-type calcium channel Cav1.3 regulates insulin release and polymorphisms in CACNA1D associate with type 2 diabetes. *Diabetologia*. 56:340–349.

## 10. CUADROS

**Cuadro 1. Distribución de las Características Clínicas en 200 sujetos atendidos en el Hospital General Dr. Manuel Gea González de Marzo a Agosto de 2020**

<b>Variables de Estudio</b>	<b>Media Aritmética IC95%</b>	<b>Mediana Rango Intercuartil</b>	<b>Valor Mínimo-Máximo</b>
<b>Edad (años)</b>	60.64 55.31 a 65.96	62 10	46 a 77
<b>Tiempo de evolución (años)</b>	13 9.46 a 16.54	15 10	5 a 20
<b>IMC kg/m<sup>2</sup></b>	26.91 23.56 a 30.26	23.8 9.3	22.9 a 35.10
<b>HbA1c (%)</b>	11.83 10.02 a 13.64	11.9 3	6.6 a 16.2
<b>Glucosa en ayuno (mg/dl)</b>	185.36 152.07 a 218.64	174 89	107 a 270
<b>LDL (mg/dl)</b>	87.90 68.42 a 107.39	85 47	49 a 140
<b>HDL (mg/dl)</b>	42.45 34.2 a 50.7	41 7	49 a 140
<b>Triglicéridos (mg/dl)</b>	205.45 93.1 a 317.7	173 135	69 a 674
<b>Tiempo de evolución retinopatía (años)</b>	6.45 4.3 a 8.61	8 5	1 a 10
<b>Tiempo de evolución nefropatía (años)</b>	3.64 2.46 a 4.81	3 2	1 a 6
<b>Tiempo de evolución neuropatía (años)</b>	1.82 1.16 a 2.48	2 1	1 a 4

IC95%: Intervalo de Confianza al 95% . IMC: Índice de masa corporal. HbA1C: Hemoglobina glucosilada. LDL: Colesterol de baja densidad. HDL: Colesterol de alta densidad.

**Cuadro 2. Distribución de las Características Clínicas en 200 sujetos, según grupo de estudio, atendidos en el Hospital General Dr. Manuel Gea González de Marzo a Agosto de 2020**

Variables de Estudio	Caso (n=100)	Control (n=100)	Prueba Estadística  Nivel de Significancia
	Media Aritmética IC95%	Media Aritmética IC95%	
	Mediana Rango Intercuartil	Mediana Rango Intercuartil	
Edad (años)	58.63 56.07 a 61.19	53.85 51.07 a 56.63	T-Student= 2.51 P = 0.013
	62 14	58 21	
Tiempo de evolución (años)	13.09 12.06 a 14.2	14.14 13.09 a 15.19	T-Student= -1.41 P =0.15
	12 6	13.5 9	
IMC kg/m <sup>2</sup>	28.45 27.62 a 29.7	25.11 24.43 a 25.78	T-Student=6.21 P =0.25
	28.4 7.3	23.85 4.20	
HbA1c (%)	10.04 8.10 a 11.99	8.69 7.3 a 10.04	T-Student=1.137 P =0.001
	9.1 1.9	7 0.7	
Glucosa en ayuno (mg/dl)	152.83 146.08 a 159.58	135.79 131.09 a 140.48	T-Student= 4.11 P =0.001
	149 35	129 14	
LDL (mg/dl)	85.57 79.95 a 91.19	101.84 96.5 a 107.08	T-Student=-4.2 P =0.04
	85 47	110 35	
HDL (mg/dl)	42.79 40.31 a 45.27	43.21 41.67 a 44.74	T-Student=-0.28 P =0.77
	39 8	40 12	
Triglicéridos (mg/dl)	184.64 157.8 a 211.48	212.32 194.83 a 229.80	T-Student=-1.71 P =0.08
	173 103	190 60	

n: Número de pacientes. IC95%: Intervalo de Confianza al 95% . IMC: Índice de masa corporal. HbA1C:Hemoglobina glucosilada. LDL: Colesterol de baja densidad. HDL: Colesterol de alta densidad. Nivel de significancia en  $p \leq 0.05$ .

**Cuadro 3. Distribución de las Características Clínicas en 200 sujetos, según grupo de estudio, atendidos en el Hospital General Dr. Manuel Gea González de Marzo a Agosto de 2020**

VARIABLES DE ESTUDIO	POBLACIÓN n (%)	CASO n (%)	CONTROL n (%)	PRUEBA ESTADÍSTICA NIVEL DE SIGNIFICANCIA
<b>SEXO</b>				
▪ Masculino	125 (62.5%)	67 (67%)	58 (58%)	X <sup>2</sup> = 1.72 P = 0.18
▪ Femenino	75 (37.5%)	33 (33%)	42 (42%)	
<b>HAS</b>				
▪ Sí	92 (46%)	60 (60%)	32 (32%)	X <sup>2</sup> = 15.78 P = 0.0001
▪ No	108 (54%)	40 (40%)	68 (68%)	

n: Número de pacientes. HAS: Hipertensión arterial sistémica. Valor de p con chi cuadrada de Pearson, nivel de significancia en  $p \leq 0.05$ .

**Cuadro 4. Información de los SNPs estudiados\***

Gen	SNP	Cromosoma	Posición en el gen	Alelos reportados	Ubicación
<i>CACNA1D</i>	rs312480	3	53495113	T>C	5' UTR
	rs312486		53511427	G>A / G>C	Intrón
	rs9841978		53696708	G>A	Intrón
	rs12487452		53758384	C>A / C>G	Intrón

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

**Cuadro 5. Frecuencia alélica de los polimorfismos de los genes de los canales iónicos *CACNA1D***

Gen	Alelos	Casos (%)	Controles (%)	p	OR (95%CI) *
<i>CACNA1D</i>	rs312480C	94	100	0.72	0.03 (0.01-0.3)
	rs312480T	6	0	0.72	26.03 (0.76-29.49)
	<b><i>rs12487452C</i></b>	<b>65</b>	<b>55</b>	<b>0.0005</b>	<b>1.54 (1.03-2.30)</b>
	<b><i>rs12487452G</i></b>	<b>35</b>	<b>45</b>	<b>0.0005</b>	<b>0.65 (0.43-0.97)</b>
	<b><i>rs9841978G</i></b>	<b>73</b>	<b>94</b>	<b>0.0009</b>	<b>0.17 (0.09-0.33)</b>
	<b><i>rs9841978A</i></b>	<b>27</b>	<b>6</b>	<b>0.0009</b>	<b>5.78 (2.99-11.19)</b>
	<b><i>rs312486C</i></b>	<b>77</b>	<b>96</b>	<b>0.02</b>	<b>0.12 (0.05-0.28)</b>
	<b><i>rs312486G</i></b>	<b>23</b>	<b>4</b>	<b>0.02</b>	<b>8.03 (3.52-18.27)</b>

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

**Cuadro 6. Frecuencia genotípica de los polimorfismos de los genes de los canales iónicos CACNA1D.**

Gen	Genotipos	Casos (%)	Controles (%)	p	OR (95%CI) *
CACNA1D	<i>rs312480CC</i>	<b>88</b>	<b>100</b>	<b>0.0004</b>	<b>0.04 (0.02-0.6)</b>
	<i>rs312480CT</i>	<b>12</b>	<b>0</b>	<b>0.0004</b>	<b>27.76 (4.15-30.56)</b>
	<i>rs12487452CC</i>	<b>38</b>	<b>16</b>	<b>0.0005</b>	<b>3.17 (1.62-6.18)</b>
	<i>rs12487452CG</i>	<b>55</b>	<b>78</b>	<b>0.003</b>	<b>0.35 (0.18-0.64)</b>
	rs12487452GG	7	6	0.79	1.17 (0.38-3.60)
	<i>rs9841978AA</i>	<b>0</b>	<b>6</b>	<b>0.03</b>	<b>0.07 (0.01-0.10)</b>
	<i>rs9841978GA</i>	<b>54</b>	<b>0</b>	<b>0.04</b>	<b>2.34 (1.31-6.85)</b>
	rs9841978GG	46	94	0.30	0.06 (0.02-0.15)
	<i>rs312486CC</i>	<b>55</b>	<b>93</b>	<b>0.03</b>	<b>0.09 (0.04-0.21)</b>
	<i>rs312486CG</i>	<b>45</b>	<b>7</b>	<b>0.03</b>	<b>10.91 (4.61-25.83)</b>
	rs312486GG	0	0	0.15	0.98 (0.50-1.25)

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

**Cuadro 7. Frecuencia de haplotipos de los polimorfismos de los genes de los canales iónicos CACNA1D.**

Gen	Haplotipos	Casos (%)	Controles (%)	p	OR (95%CI) *
CACNA1D	<b><u>CCGC</u></b>	<b><u>36.40</u></b>	<b><u>51.50</u></b>	<b><u>0.002</u></b>	<b><u>0.54 (0.36-0.80)</u></b>
	<b><u>CCGG</u></b>	<b><u>30.00</u></b>	<b><u>42.00</u></b>	<b><u>0.012</u></b>	<b><u>0.59 (0.39-0.89)</u></b>
	<b>CGAC</b>	<b>15.20</b>	<b>2.90</b>	<b>0.05</b>	<b>5.87 (2.38-14.5)</b>
	CCAG	4.10	4.10	0.73	1.36 (0.46-3.99)
	CGGC	4.70	4.70	0.73	6.82 (0.86-7.40)
	<b>TCAC</b>	<b>3.90</b>	<b>0.01</b>	<b>0.013</b>	<b>17.31 (2.08-19.4)</b>
	CCAC	3.00	3.00	0.40	11.28 (0.02-58.51)

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

**Cuadro 8. Resultados obtenidos en la regresión logística binaria.**

Variable	Error estándar	Wald	p	OR	95% C.I. para OR	
					Inferior	Superior
<b>Edad</b>	0.02	2.65	0.01	1.97	1.93	2.01
<b>Glucosa en ayunas</b>	0.01	12.04	0.0005	1.97	1.95	1.99
<b>LDL</b>	0.51	4.30	0.04	1.35	1.13	1.94
<b>HTAS</b>	0.01	7.75	0.005	1.02	1.01	1.04
<b>Hb glicosilada</b>	0.14	4.43	0.001	1.34	1.02	1.76
<b>rs9841978 GA</b>	0.86	4.51	0.03	6.20	1.15	13.48
<b>rs312486 CC</b>	1.36	9.51	0.002	6.60	4.60	9.45

La variables dependientes para este análisis fue: con complicaciones microvasculares y sin complicaciones microvasculares. Variables independientes utilizadas para el análisis: Edad del Paciente (años), Género (mujer, hombre), IMC (kg/m<sup>2</sup>), Hipertensión (presente, ausente), Hemoglobina Glicosilada (%), Glucosa en ayunas (mg/dL), Tabaquismo (presente, ausente), LDL (mg/dL), HDL (mg/dL), TAG (mg/dL), rs312480, rs9841978, rs312486 y rs12487452.

**Cuadro 9. Resultados obtenidos en la regresión logística multinomial.**

Complicaciones Microvasculares	Variable	Error estándar	Wald	p	OR	95% CI para OR	
						Límite inferior	Límite superior
<b>Retinopatía</b>	<b>Edad</b>	0.05	6.49	0.01	1.12	1.03	1.22
	<b>HTAS</b>	1.29	9.84	0.002	5.92	4.55	7.11
	<b>rs9841978 GA</b>	3.21	9.47	0.002	9.72	3.62	10.72
	<b>rs312486 CC</b>	1.60	8.90	0.003	1.09	1.0004	1.19
<b>Nefropatía</b>	<b>rs9841978 GA</b>	6.36	4.87	0.03	12.55	4.80	32.80
<b>Neuropatía</b>	<b>rs9841978 GA</b>	5.09	4.70	0.03	6.18	2.90	13.16

Variables utilizadas para el análisis: Edad del Paciente (años), Género (mujer, hombre), IMC (kg/m<sup>2</sup>), Hipertensión (presente, ausente), Hemoglobina Glicosilada (%), Glucosa en ayunas (mg/dL), Tabaquismo (presente, ausente), LDL (mg/dL), HDL (mg/dL), TAG (mg/dL), rs312480, rs9841978, rs312486 y rs12487452.



## 11. FIGURAS

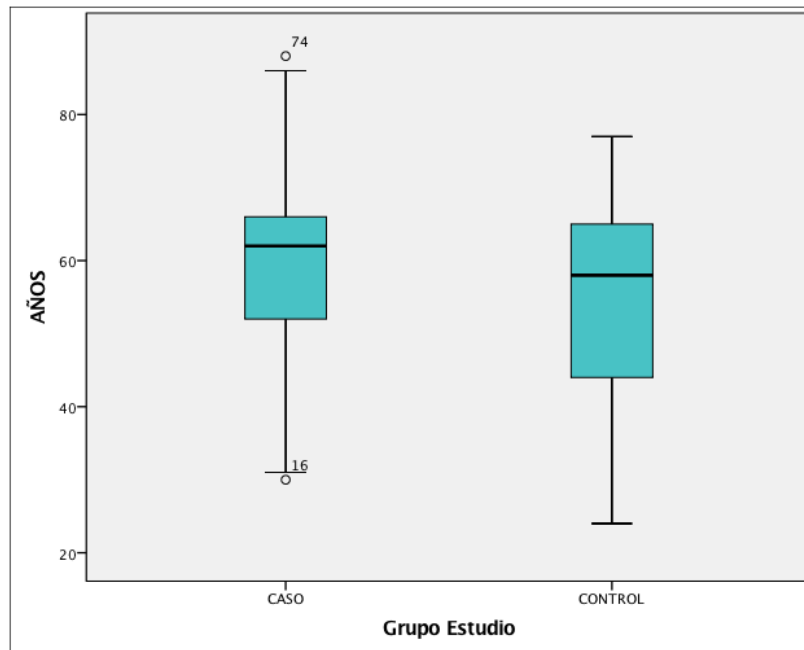


Figura 1: Gráfico de cajas y bigotes de la variable Edad, según grupo de estudio.

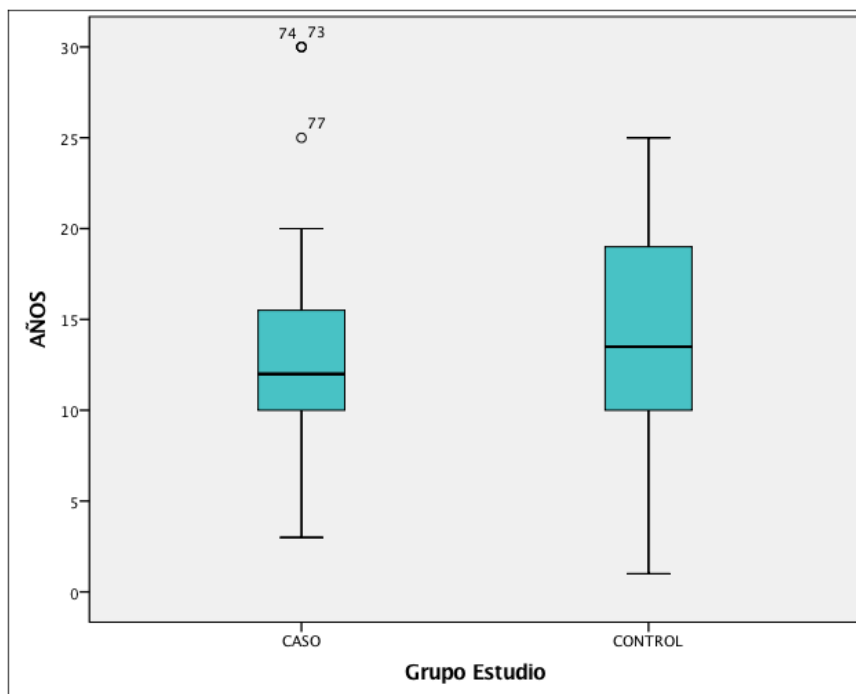


Figura 2: Gráfico de cajas y bigotes de la variable Tiempo con la Diabetes tipo 2, según grupo de estudio.

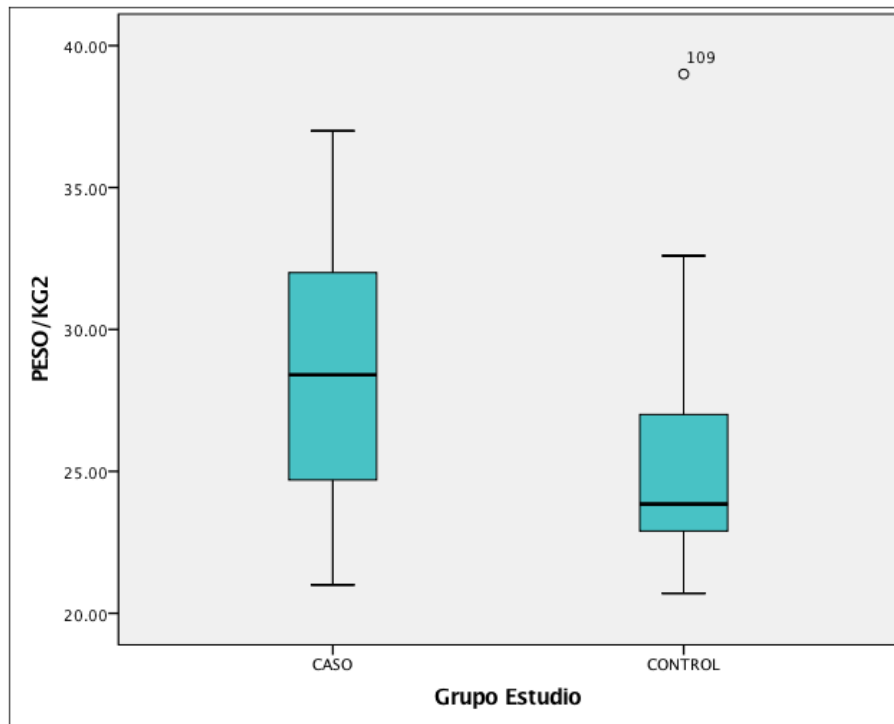


Figura 3: Gráfico de cajas y bigotes de la variable Índice de Masa Corporal, según grupo de estudio.

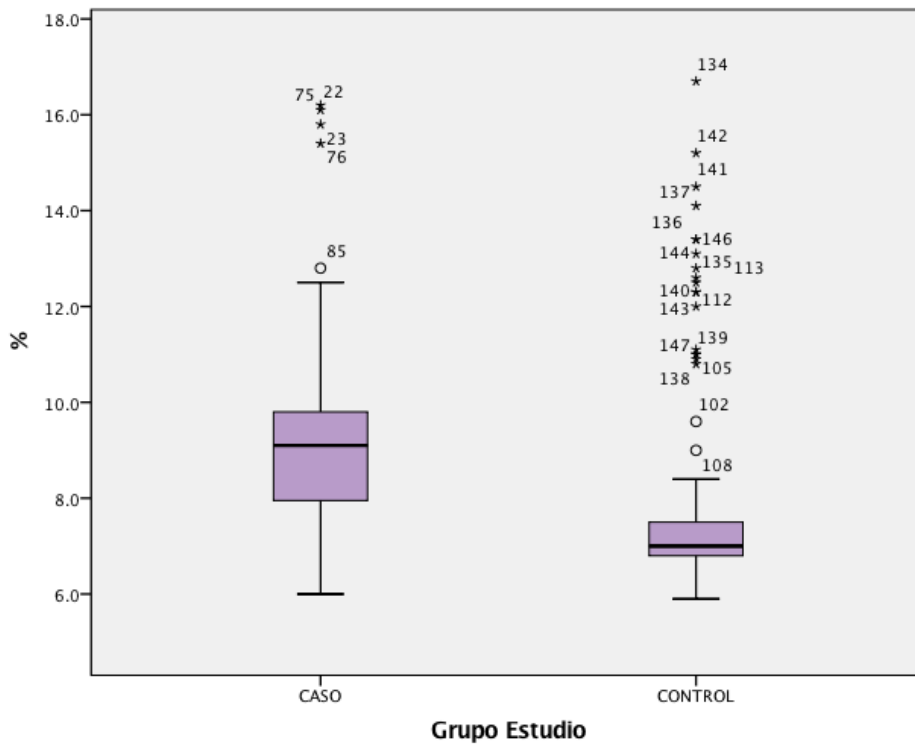


Figura 4: Gráfico de cajas y bigotes de la variable Hemoglobina Glucosilada, según grupo de estudio.

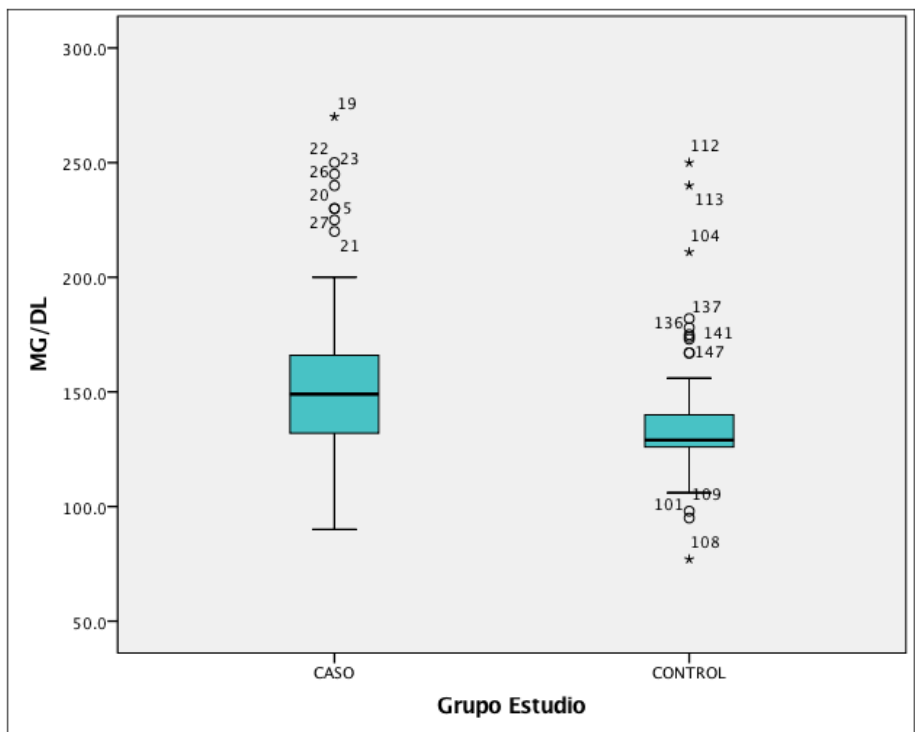


Figura 5: Gráfico de cajas y bigotes de la variable Glucosa en Ayunas, según grupo de estudio.

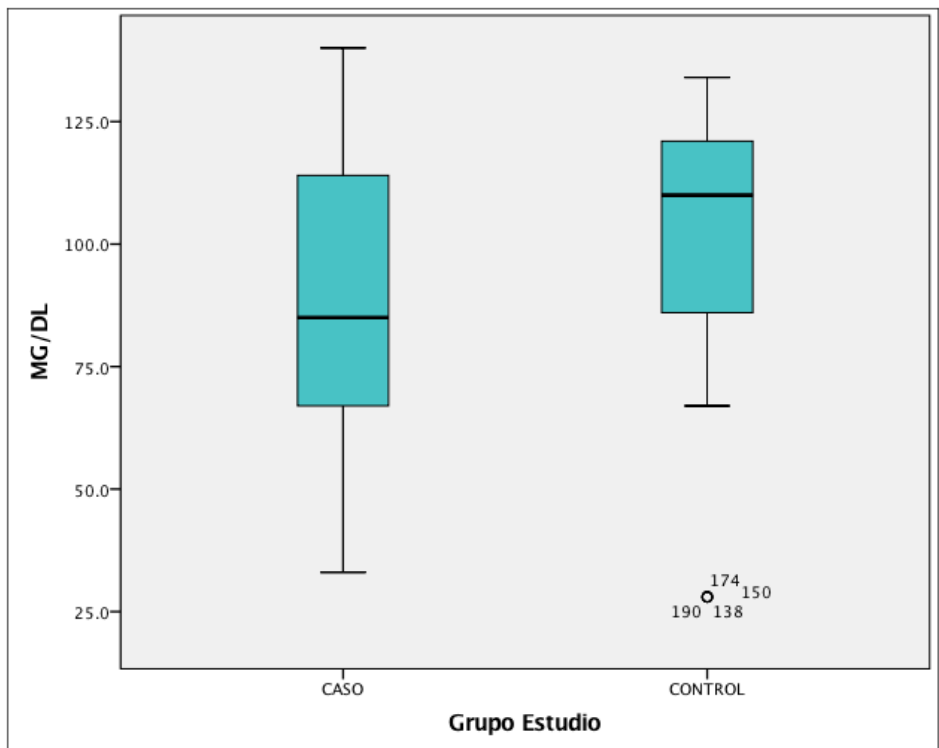


Figura 6: Gráfico de cajas y bigotes de la variable LDL, según grupo de estudio.

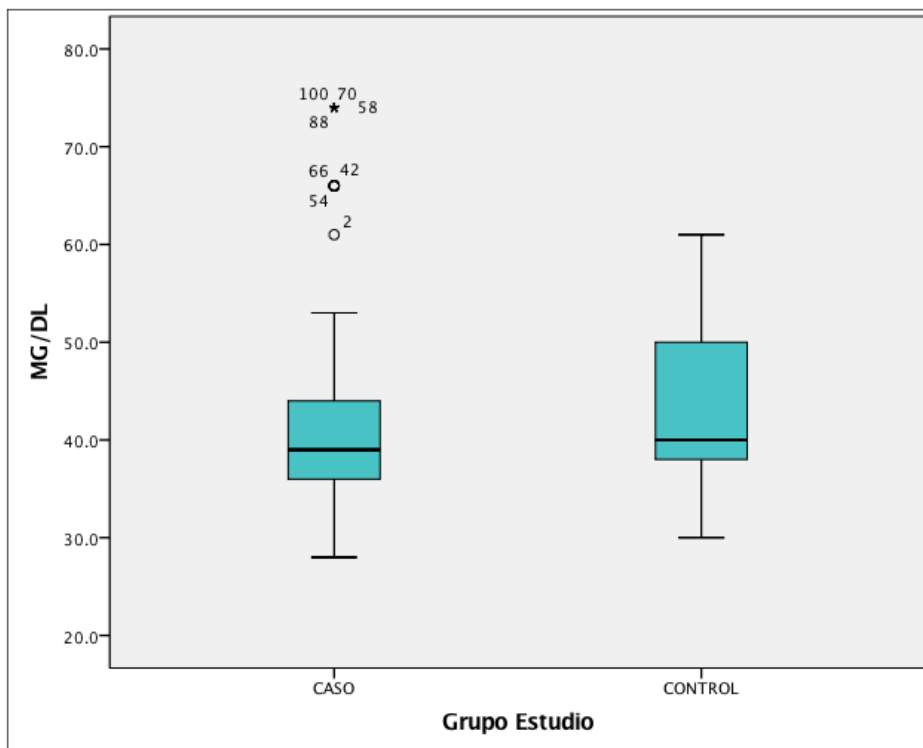


Figura 7: Gráfico de cajas y bigotes de la variable HDL, según grupo de estudio.

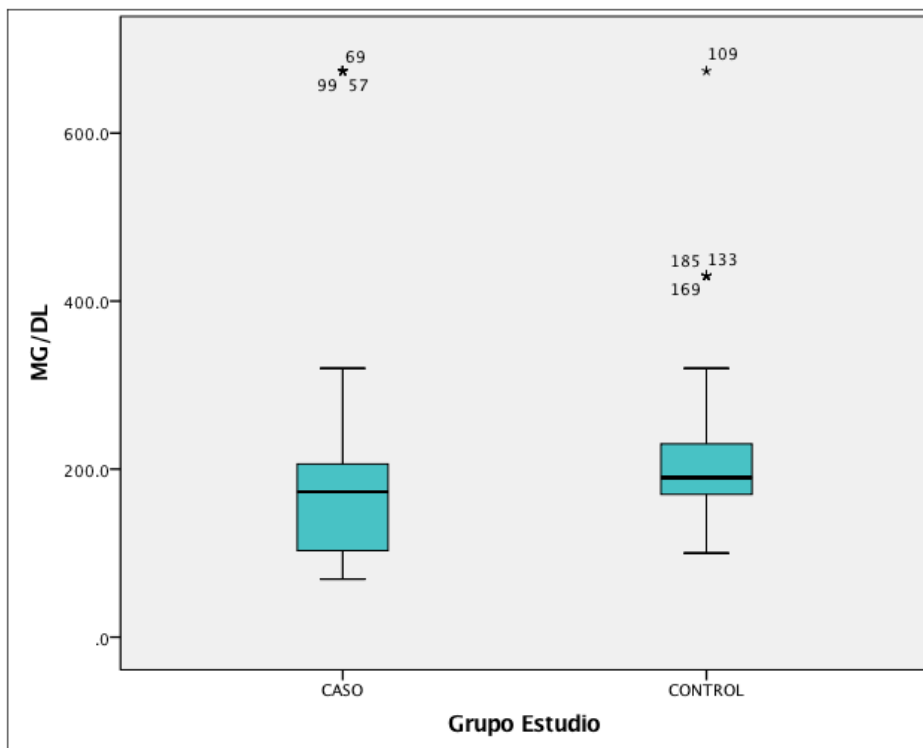
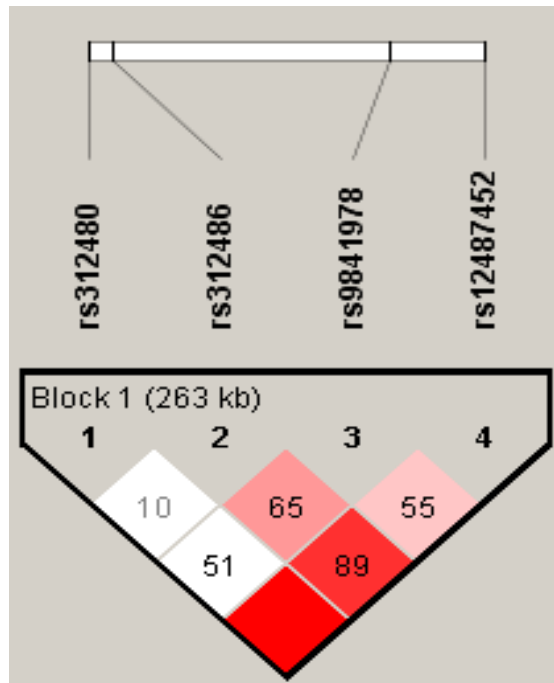


Figura 8: Gráfico de cajas y bigotes de la variable Triglicéridos, según grupo de estudio.



**Figura 9.** Desequilibrio de ligamiento (LD) entre los SNPs de *CACNA1D*, genotificados en la diabetes tipo 2. La gráfica de LD fue creada por HAPLOVIEW 4.2.