



**INSTITUTO POLITECNICO
NACIONAL**



**ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
POSGRADO**

Detección de los polimorfismos SNP-43, SNP-19 y SNP-63 del gen de la
Calpaina 10 en población sinaloense con Diabetes Mellitus Tipo 2

T E S I S

**PARA OBTENER EL TITULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

ENRIQUE SÁINZ GONZÁLEZ

DIRECTORES DE TESIS

DRA. VERÓNICA JUDITH PICOS CÁRDENAS
DR. ÁNGEL MILIAR GARCÍA

MEXICO D.F.

ENERO 2012



SIP-14-BIS

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 14:00 horas del día 28 del mes de Noviembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la E.S.M para examinar la tesis titulada:

"Detección de los polimorfismos, SNP-43, SNP-19 y SNP-63 del gen de la Calpaina 10 en población sinaloense con Diabetes Mellitus Tipo 2"

Presentada por el alumno:

Sainz

Apellido paterno

González

Apellido materno

Enrique

Nombre(s)

Con registro:

A	1	0	0	8	6	6
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

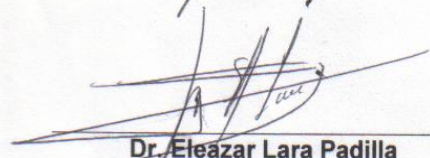
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

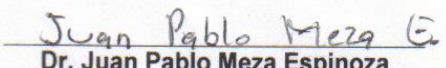
Directores de tesis


Dr. Ángel Miliar García

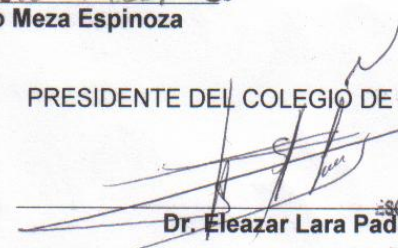

M. en C. Verónica Judith Picos Cárdenas


Dr. Eleazar Lara Padilla


M. en C. Evangelina Muñoz Soria


Dr. Juan Pablo Meza Espinoza

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


Dr. Eleazar Lara Padilla



ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
I.P.N.
SECCION DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACION



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México el día 28 del mes noviembre del año 2011, el que suscribe Sainz González Enrique alumno del Programa de Maestría en Ciencias de la Salud con número de registro A100866 adscrito a La Escuela Superior De Medicina, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Ángel Miliar García, M. en C. Verónica Judith Picos Cárdenas y cede los derechos del trabajo intitulado “Detección de los polimorfismos, SNP-43, SNP-19 y SNP-63 del gen de la Calpaina 10 en población sinaloense con Diabetes Mellitus Tipo 2”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección sainz_nielsen@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Enrique Sainz González

Nombre y firma

AGRADECIMIENTOS

A mis directores, Dr. Ángel Miliar, Verónica Picos y Juan Pablo Meza, por la dirección de este trabajo y por la confianza depositada en mi durante la duración de este proyecto.

A Itzel, por todo su apoyo e invaluable ayuda.

A los médicos, Alejandro Romero, Ricardo Quintero y Paula Flores, así como a Fernanda, Trinidad y Carmelita por todo su apoyo y las facilidades otorgadas para la captación de las muestras y los datos necesarios de los pacientes con DM2.

A las pacientes con DM2 y personas sanas del grupo control, que nos apoyaron con su colaboración mil gracias.

A mis compañeros de trabajo tanto del Hospital General de Culiacán, como a los del Laboratorio de Biología Molecular del IPN, por apoyo, sus comentarios y ocurrencias gracias.

A María José, Marcela y Gabriela, gracias por su apoyo y amistad

A Araceli de control escolar por su valiosa información y paciencia.

A mis padres y hermanos, Mil gracias.

A mi esposa, quien siempre me ha impulsado para seguir adelante, por su amor y comprensión mil gracias. Te amo

A mis hijos, Marbella y Luis Enrique que son las personas que más amo en el mundo junto con mi esposa. A ellos que me llenan de alegría y de orgullo gracias por su comprensión y sus sonrisas. Los amo

ÍNDICE DE CONTENIDO

Acta de revisión de Tesis

Agradecimientos

Índice de contenido

Índice de cuadros y figuras I

Abreviaturas III

Resumen..... VII

Summary..... IX

I.INTODUCCIÓN..... 1

II. ANTECEDENTES..... 2

2.1. La Diabetes Mellitus 2

2.2. Panorama Epidemiológico de la DM en México..... 3

2.3. Clasificación de la DM..... 6

2.3.1. Diabetes Mellitus Tipo 1 (DM1) 6

2.3.2. Diabetes Mellitus Gestacional (DMG)..... 6

2.3.3. Otros tipos de Diabetes 7

2.3.4. Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) 8

2.4. Fisiopatología de la DM2..... 9

2.4.1. Secreción normal de insulina 9

2.4.1.1. Calpaína y secreción de insulina 10

2.4.2. Secreción anormal de insulina 11

2.4.3. Mecanismos de resistencia a la insulina 13

2.5. Criterios diagnósticos para la DM2 14

2.6. Genética de la DM2 15

2.7. Las Calpaínas	15
2.7.1. Estructura de la Calpaínas	15
2.7.1.1. Las unidades de las Calpaínas	16
2.7.1.1.1. Unidad catalítica	17
2.7.1.1.2. Unidad reguladora	17
2.7.2. Clasificación de las Calpaínas.....	18
2.7.2.1. Típicas.....	18
2.7.2.2. Atípicas.....	18
2.7.3. Activación de las Calpaínas	19
2.7.4. Inactivación del las Calpaínas	19
2.8. La Calpaína 10	19
2.9. Polimorfismos en el gen de la <i>Calpaína 10</i>	20
III. JUSTIFICACIÓN.....	22
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
V. HIPÓTESIS.....	23
VI. OBJETIVOS	23
6.1. Objetivo general	23
6.2. Objetivos particulares.....	23
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	24
7.1. Características del estudio.....	24
7.1.1. Universo de estudio.....	24
7.1.2. Tamaño de la muestra.....	24
7.1.3. Criterios de inclusión	24
7.1.4. Criterios de exclusión	24

7.1.5. Criterios de eliminación	24
7.2. Análisis Molecular	25
7.2.1. Identificación del polimorfismo SNP-19	25
7.2.2. Identificación de los polimorfismos SNP-43 y 63.....	25
7.3. Análisis estadístico.....	29
VIII. RESULTADOS	30
IX. DISCUSIÓN.....	41
X. CONCLUSIONES.....	47
GLOSARIO	49
BIBLIOGRAFÍA	52
ANEXOS	60
1. Consentimiento informado	60
2. Hoja de captación de datos casos	61
3. Hoja de captación de datos controles	62
4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	63
5. Método de extracción de ADN, determinación de concentración y pureza.....	67
6. Electroforesis	70
7. Preparación de reactivos	73
8. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real	77
9. Cuadro de frecuencias de genotipos del gen CAPN10 controles	79
10. Cuadro de frecuencias de genotipos del gen CAPN10 casos	85

11. Cálculos estadísticos para SNP-43, SNP-19 y SNP-63.....	93
12. Comparación entre varones y mujeres del grupo de casos	95
13. Comparación entre mujeres de ambos grupos	97
14. Comparación entre casos, clasificados de acuerdo al IMC	99

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

CUADROS

Cuadro 1. Mortalidad general México 1960-2007(DM2).....	3
Cuadro 2. Clasificación de la DM2. Otros tipos de diabetes.....	8
Cuadro 3. Polimorfismo SNP-19, iniciadores y fragmentos esperados	25
Cuadro 4. Secuencia de Iniciadores y sondas utilizados para los SNP-43 y 63	26
Cuadro 5. Componentes de PCR-RT	26
Cuadro 6. Programa de PCR-TR para el SNP-43	27
Cuadro 7. Programa de PCR-TR para el SNP-63	27
Cuadro 8. Características físicas y clínicas de los grupos de estudio	31
Cuadro 9. Frecuencias alélicas y genotípicas del SNP-43	32
Cuadro 10. Frecuencias alélicas y genotípicas del SNP-19	34
Cuadro 11. Frecuencias alélicas y genotípicas del SNP-63	35
Cuadro 12. Frecuencias alélicas y genotípicas para los tres polimorfismos entre varones y mujeres del grupo de pacientes.....	37
Cuadro 13. Frecuencias alélicas y genotípicas para los tres polimorfismos entre mujeres	38
Cuadro 14. Frecuencias alélicas y genotípicas para los tres polimorfismos distribuidas de acuerdo al IMC	39
Cuadro 15. Haplotipos formados por los SNP-43,19 y 63 del gen CAPN10	40

FIGURAS

Figura 1. Prevalencia estimada de DM para el año 2025.....	3
Figura 2. Tasa de mortalidad por entidad federativa 2008	4
Figura 3. Incidencia acumulada semana 9 del 2009	5
Figura 4. Incidencia de DM en México 2003-2008	5
Figura 5. Proceso de inducción de la secreción de insulina por glucosa en células beta pancreáticas.....	10
Figura 6. Mecanismo de movilización de las vesículas de insulina para su liberación por exocitosis.....	11
Figura 7. Esquema representativo de la glucotoxicidad en las células beta pancreáticas.....	12
Figura 8. Evolución natural de la DM2	14
Figura 9. Estructura cristalina de la m-calpaina.....	16
Figura 10. Dominios que forman las Calpainas atípicas 5, 6 y 10.....	18
Figura 11. Curvas de disociación obtenidas para el SNP-63	28
Figura 12. Curvas de disociación obtenidas para el SNP-43	29
Figura 13. Número de individuos analizados por género	30
Figura 14. Resultados obtenidos para el SNP-43	33
Figura 15. Fotografía de un gel de poliacrilamida en el que se muestran resultados del SNP-19	34
Figura 16. Resultados obtenidos para el SNP-63	36
Figura 17. Termociclador marca Eppendorf.	63
Figura 18. Termociclador LigthCycler 1.5 de Roche	77

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y SIGLAS

$\Delta\psi_{mb}$	Despolarización de la membrana plasmática
$\Delta\psi_{mit}$	Potencial de membrana mitocondrial
μ -calpaína	Micromolar-calpaína
μ g	Microgramo
μ l	Microlitro
ACC	Acetil-CoA carboxilasa
ADA	Asociación Americana de Diabetes
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AG	Ácidos grasos
AGL	Ácidos Grasos Libres
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosin trifosfato
BSA	Albúmina sérica bovina
Ca²⁺	Ion Calcio
cAMP	Monofosfato de adenosina cíclico
CAPN10	Calpaína 10
CAST	Calpastatina
cm	Centímetro
CTAB	Bromuro de cetiltrimetilamonio
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DMG	Diabetes mellitus gestacional
DMS	Dimetilsulfóxido

dNTP_s	Deoxi-nucleótidos trifosfatados
DTAB	Bromuro de dodeciltrimetilamonio
EDTA	Ácido etilendiamin tetraacético
ej	Ejemplo
FAS	Ácido graso sintetasa
G	Glucosa
G6P	Glucosa 6 fosfato
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GK	Enzima Glucokinasa
Gln	Glutamina
GLUT1	Transportador de glucosa 1
GLUT2	Transportador de glucosa 2
GLUT4	Transportador de glucosa 2
H₂O	Agua
HLA	Antígeno Leucocitario Humano
HNF1A	Factor nuclear del hepatocito 1 alfa
HNF4A	Factor nuclear del hepatocito 4 alfa
HSL	Lipasa sensible a hormonas
ICA512	Islotes autoantígeno celular
IMC	Índice de Masa Corporal
INSR	Receptor de Insulina
IRI	Radioinmunoensayo
ITG	Intolerancia a la glucosa
KATP	Canales de potasio dependientes de ATP
KCl	Cloruro de potasio

kDa	Kilodaltones
L-PK	L-piruvato kinasa
m-calpaína	Milimolar-calpaína
ME	Enzima málico
MgCl₂	Cloruro de magnesio
min	Minuto
Mit	Mitocondria
ml	Mililitro
mm	Milímetro
NaCl	Cloruro de sodio
nm	Nanómetro
OMS	Organización Mundial de la Salud
PC	Piruvato carboxilasa
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PCR-TR	PCR en tiempo real
PDH	Piruvato deshidrogenasa
PFK-1	Fosfofructokinasa-1
PPAR-γ	Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma
RI	Resistencia a la Insulina
rpm	Revoluciones por minuto
SSA	Secretaria de Salubridad y Asistencia
SUIVE	Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica
TBE	Tris-Borato-EDTA
TCF7L2	Factor de transcripción 7 parecido al 2
TEMED	N,N,N,N'-tetrametilen-diamina

TG	Triglicéridos
TPE	Tris-Fosfato-EDTA
uM	Micromolar
UV	Luz ultravioleta

RESUMEN

Antecedentes: El gen de la calpaína 10 (*CAPN10*) está implicado en una gran variedad de procesos celulares, entre los que se encuentra la exocitosis de insulina. *CAPN10* presenta variantes polimórficas que han asociadas con diabetes mellitus tipo 2 (DM2), particularmente los SNP-43, SNP-19 y SNP-63, así como haplotipos formados por estos polimorfismos.

Objetivo: Determinar si existe asociación entre los polimorfismos SNP-43, SNP-19 y SNP-63 del gen *CAPN10* y la DM2 en pacientes de Sinaloa.

Material y Métodos: Se analizaron 200 pacientes con DM2 y 140 controles, ambos residentes de Sinaloa. Para la identificación de los alelos del SNP-19 se aplicó la técnica de PCR clásica, y para los SNP-43 y SNP-63 la PCR en tiempo real. Para el análisis estadístico se utilizaron diversas pruebas y programas según los datos que se compararon (t de student, χ^2 , razón de momios, Exacta de Fisher y el Hapstat 3.0).

Resultados. En general, los polimorfismos analizados no muestran diferencias significativas entre casos y controles, y todos están en Equilibrio de Hardy-Weinberg. Para el SNP-43 las frecuencias alélicas en controles resultaron G=70% y A=30%, para casos G=72% y A=28%. Las frecuencias genotípicas en controles fueron 49%, 43% y 9% para GG, GA y AA, respectivamente; mientras que en los casos éstas se observaron en 51%, 42% y 7%, respectivamente. Respecto al SNP-19, la frecuencia del alelo 1 (del) fue de 32%, y la del alelo 2 (ins) de 68% en controles; mientras que en pacientes éstas fueron de 39% y 61%, respectivamente. El genotipo ins/ins tiene una frecuencia de 36% en controles y 46% en casos; el heterocigoto ins/del una frecuencia de 51% en controles y 43% en casos y el homocigoto del/del 13% en controles y 11% en casos. En cuanto al SNP-63, las frecuencias alélicas fueron C=87% y T=13% para controles, y C=83% y T=17%, para los casos. Las frecuencias genotípicas fueron 76% (CC), 23% (CT) y 1% (TT), y 70%, 27% y 3%, para controles y pacientes, respectivamente. Un hallazgo que llamó la atención fue que al comparar mujeres sanas contra mujeres enfermas se encontró una asociación del

alelo 1 del SNP-19 para DM2 (OR=1.52, p=0.04). El análisis de haplotipos mostró un efecto protector para la combinación 122 (OR=0.044; p=0.001).

Discusión: No se encontraron diferencias significativas al comparar las frecuencias alélicas y genotípicas en nuestra población para los polimorfismos SNP-43, SNP-19 y SNP-63, lo que es similar a lo encontrado en otras poblaciones. Sin embargo, también hay diferencias con otros estudios. Por ejemplo, para el SNP-43, el alelo G y el genotipo GG se han asociado con riesgo incrementado para DM2, concentraciones bajas de glucosa plasmática, reducción en la expresión de mRNA en músculo esquelético, concentraciones elevadas de insulina y de ácido grasos. En cuanto al SNP-19, el genotipo 1/1 se ha asociado a una disminución de la actividad lipolítica, y el genotipo 2/2 a un IMC elevado. En nuestro estudio el alelo 1 (del) lo encontramos asociado con DM2 sólo en mujeres (OR=1.52, p=0.04). En lo que respecta al SNP-63, se ha reportado asociación del alelo T con riesgo para DM2.

En nuestro estudio, el haplotipo 122 sólo estuvo presente en el grupo control (p=0.001) lo que nos puede sugerir protección de éste contra DM2. Este podría ser un hallazgo fortuito, ya que no se ha reportado como haplotipo de protección en otros estudios. El haplotipo 222 lo encontramos asociado con DM2, pero no hubo diferencias significativas (p=0.14). En este sentido el haplotipo 111 ha sido asociado con riesgo para DM2 en árabes (p=0.034).

Conclusión: Si bien, el tamaño de la muestra analizada pudiera sesgar la interpretación de nuestras observaciones, no debemos descartar alelos o haplotipos de riesgo para DM2 en nuestra población.

Summary

Background: Calpain 10 (*CAPN10*) gene is involved in a wide variety of cellular processes, among them the exocytosis of insulin. *CAPN10* presents polymorphic variants that have been associated with diabetes mellitus type 2 (DM2), particularly the SNP-43, SNP-19, and SNP-63, as well as haplotypes formed by these polymorphisms.

Objective: To determine whether there is association between the polymorphisms SNP-43, SNP-19, and SNP-63 of the *CAPN10* gene and DM2 patients in Sinaloa.

Material and methods: We analyzed 200 patients with DM2 and 140 controls, both residents of Sinaloa. Simple PCR was applied for the identification of alleles of SNP-19, and for the SNP-43 and SNP-63 real timePCR was used. Several tests and software according to the data being compared were used for statistical analysis (t of student, Chi-square, Fisher Exact, Odds ratio, and the software Hapstat 3.0).

Results. In general, analyzed polymorphisms do not show significant differences between cases and controls, and all them are in the Hardy-Weinberg equilibrium. For SNP-43 controls allele frequencies were G=70% and A=30%, for cases G=72% and A=28%. The genotype frequencies in controls were 49%, 43% and 9% for GG, GA and AA, respectively; while in the cases they were observed in 51%, 42%, and 7%, respectively. Regarding to the SNP-19, the frequency of the allele 1 (del) was 32%, and the allele 2 (ins) 68% in controls; while in patients they were 39% and 61%, respectively. The ins/ins genotype has a frequency of 36% in controls and 46% in cases; the heterozygote ins/del a frequency of 51% in controls and 43% in cases and the homozygous del/del controls 13% and 11% in cases. SNP-63, the allele frequencies were C=87% and T=13% for controls, and C=83% and T=77% for the cases. The genotype frequencies were 76% (CC), 23% (CT), and 1% (TT), and 70%, 27%, and 3% for controls and patients, respectively. Moreover, to comparing control women *versus* case women we found an association of the allele 1 of the SNP-19 to DM2 (OR=1.52, p=0.04). Haplotype analysis showed a protective effect for combination 122

(OR=0.044; p=0.001).

Discussion: We found no significant differences to compare allele frequency and genotype in our population for the polymorphism SNP-43, SNP-19, and SNP-63, which is similar to that found in other populations. However, there are also differences with other studies. For example, for the SNP-43, the G allele and the GG genotype have been associated with increased risk for DM2, low concentrations of glucose in plasma, reduction of mRNA expression in skeletal muscle, high concentrations of insulin and fatty acid. The SNP-19 1/1 genotype has been related with a decrease in lipolytic activity, and genotype 2/2 to a high body mass index. In our study the allele 1 (del) was associated with DM2 only in women (OR=1.52, p=0.04). Regarding SNP-63, association of the allele T and DM2 has been reported.

The haplotype 122 was only present in the group control (p=0.001), which may suggest a protect effect *versus* DM2. This could be a fortuitous finding, because it has not been reported as a haplotype of protection in other studies. The haplotype 222 was associated with DM2, but there were no significant differences (p=0.14). In this sense the haplotype 111 has been associated with risk for DM2 in Arabs (p=0.034).

Conclusion: Even if a bias could be in the interpretation of our observations because of the size analyzed sample, we must not discard alleles or haplotypes of DM2 risk in our population.

I. INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad sistémica crónico-degenerativa muy heterogénea, con predisposición hereditaria y participación de diversos factores ambientales. Se caracteriza por hiperglucemia crónica, debido a la deficiencia en la producción o acción de la insulina, que afecta al metabolismo intermedio de los hidratos de carbono, proteínas y grasas¹⁻³.

En la actualidad la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es una de las enfermedades más comunes en nuestro país. El estilo de vida, fundamentalmente el exceso de ingesta calórica, la obesidad y el sobrepeso han provocado un incremento acelerado en la última década. En 2008, la tasa de incidencia de DM2 fue de 371.55/100,000 habitantes. A nivel nacional la tasa de mortalidad en 2008 fue de 70.9/100,000 habitantes. Alrededor del 70% de las personas que padecen DM2 muere antes de cumplir la edad promedio de la población mexicana⁴⁻⁶.

El paciente diabético tiene un riesgo de 2 a 4 veces más alto de presentar un derrame cerebral que los no diabéticos y se estima que entre el 60 y 65% de los diabéticos son hipertensos. La DM2 es la principal causa de ceguera en adultos, la neuropatía se presenta en el 50% de los casos y ésta aumenta con la duración y el grado de descontrol metabólico. El pie diabético es de las principales causas de hospitalización, y el 70% de estos casos termina en amputación. La diabetes es causante del 60% de individuos con insuficiencia renal terminal, seguida de la hipertensión arterial^{7,8}.

La diabetes se ve asociada también con alteraciones macrovasculares que pueden clasificarse como enfermedad cardiovascular, enfermedad vascular cerebral y claudicación vascular intermitente. La complicación crónica más frecuente es la enfermedad cardiovascular aterosclerosa, incluyendo la enfermedad coronaria, la cerebrovascular y la vascular periférica, la cual es la primera causa de muerte en diabéticos⁸.

La participación de variantes genéticas en la etiología de la DM2 está bien documentada; un individuo tiene más riesgo de sufrir la enfermedad si existen antecedentes familiares. La aplicación de las técnicas de biología molecular ha permitido la asociación de marcadores genéticos con diversas enfermedades crónicas. Sin embargo, el factor limitante ha sido encontrar

verdaderos marcadores genéticos de causalidad para enfermedades como la DM2⁹.

II. ANTECEDENTES

2.1. LA DIABETES MELLITUS (DM)

La Diabetes Mellitus (DM) es una enfermedad metabólica de tipo multifactorial, cuya característica principal es la hiperglucemia, debida a que el organismo falla para producir suficiente insulina o por resistencia a la acción de ésta. Esta situación de hiperglucemia ocasiona complicaciones crónicas de tipo microvascular, macrovascular y/o neuropático que son comunes a todos los tipos de DM^{1,2,10}.

La DM es una de las principales enfermedades crónicas en el momento actual y se encuentra extendida por todo el mundo. Los nuevos hábitos de vida, fundamentalmente el exceso de ingesta calórica, la obesidad y el sedentarismo, permiten predecir un gran incremento en la prevalencia de la DM en las próximas décadas, en especial en los países que en la actualidad están en vías de desarrollo. Se estima que para el año 2025 aproximadamente un 5.4% de la población total estará enferma de diabetes. En este sentido se cree que México presente una prevalencia entre el 8 y el 11% de la población⁴. (Figura 1). La población mayor de 40 años es la más afectada, especialmente individuos con índice de masa corporal (IMC) $>25\text{kg/m}^2$ ^{1,2,10}. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que en el mundo hay más de 180 millones de personas con diabetes, y es probable que esta cifra aumente a más del doble en el 2030. También se calculó que en el año 2005 hubo 1.1 millones de muertes debidas a la diabetes¹⁰. Este trastorno tiene gran morbilidad debido a ceguera, falla renal y amputaciones; además, está entre las principales causas de muerte debido a falla cardiovascular prematura, enfermedad cerebro-vascular y falla renal. Cerca del 80% de las muertes por diabetes se registran en países de ingresos bajos o medios y casi la mitad ocurre en pacientes de menos de 70 años. Hay algunos factores que incrementan el riesgo de padecer y acelerar el desenlace de la enfermedad; tales como: la obesidad, el sedentarismo, la mala dieta y la carga genética¹¹.

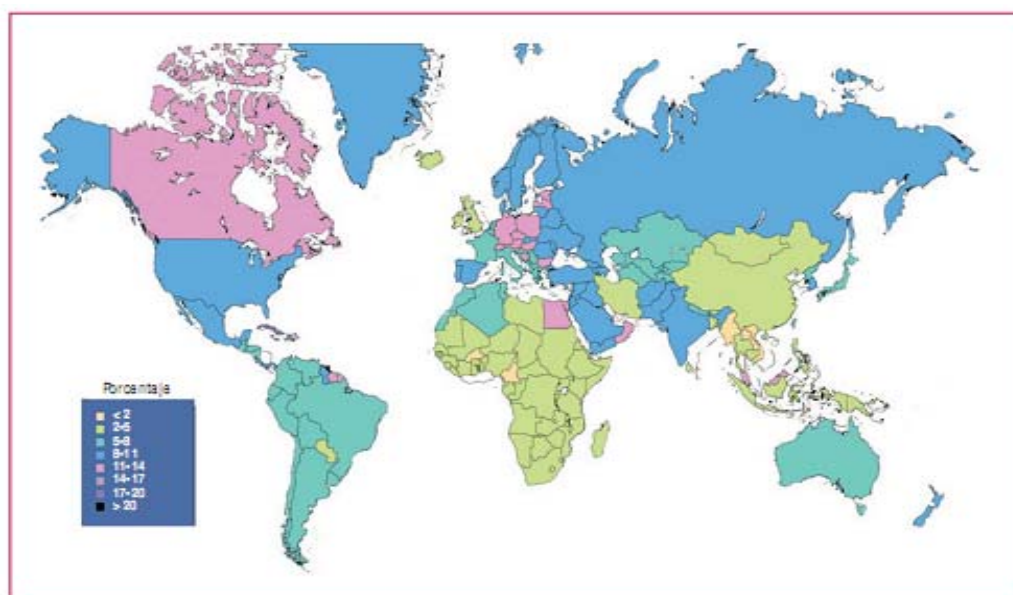


Figura 1. Prevalencia estimada de Diabetes Mellitus para el año 2025.
Tomado de la Federación Internacional de Diabetes, 2003.

2.2 PANORAMA EPIDEMIOLÓGICO DE LA DM EN MÉXICO

La DM2 se considera un problema de salud pública en nuestro país. A partir de la década de los 60 la diabetes se ubica dentro de las primeras veinte causas de mortalidad general, y desde hace dos décadas dentro de las primeras diez. En el año 2004 ocupó el 2° lugar con 62,243 defunciones y una tasa de mortalidad de 59.1/100,000 habitantes (Cuadro 1); además, es la principal causa de muerte en población productiva (15-64 años)⁵.

Cuadro 1. Tasa de mortalidad por diabetes a través del tiempo

AÑO	TASA*	LUGAR
1960	7.9	19°
1970	16.9	15°
1980	21.8	9°
1990	31.73	4°
1995	36.4	4°
2000	46.8	3°
2004	59.1	2°

Tasa por 100,000 habitantes. Fuente Anuarios de Mortalidad/SEED/DGE/SSA/INEGI/1960-2000.
Información preliminar/SEED/INEGI/DGE/SSA.

La tasa de mortalidad observada para DM2 en 2008 es de 70.9/100,000 habitantes. El Distrito Federal (99), Coahuila (87.4), Morelos (84.3), Guanajuato (82.9) y Michoacán (80.4) tienen las mayores tasas de mortalidad por esta afección¹²(Figura 2).

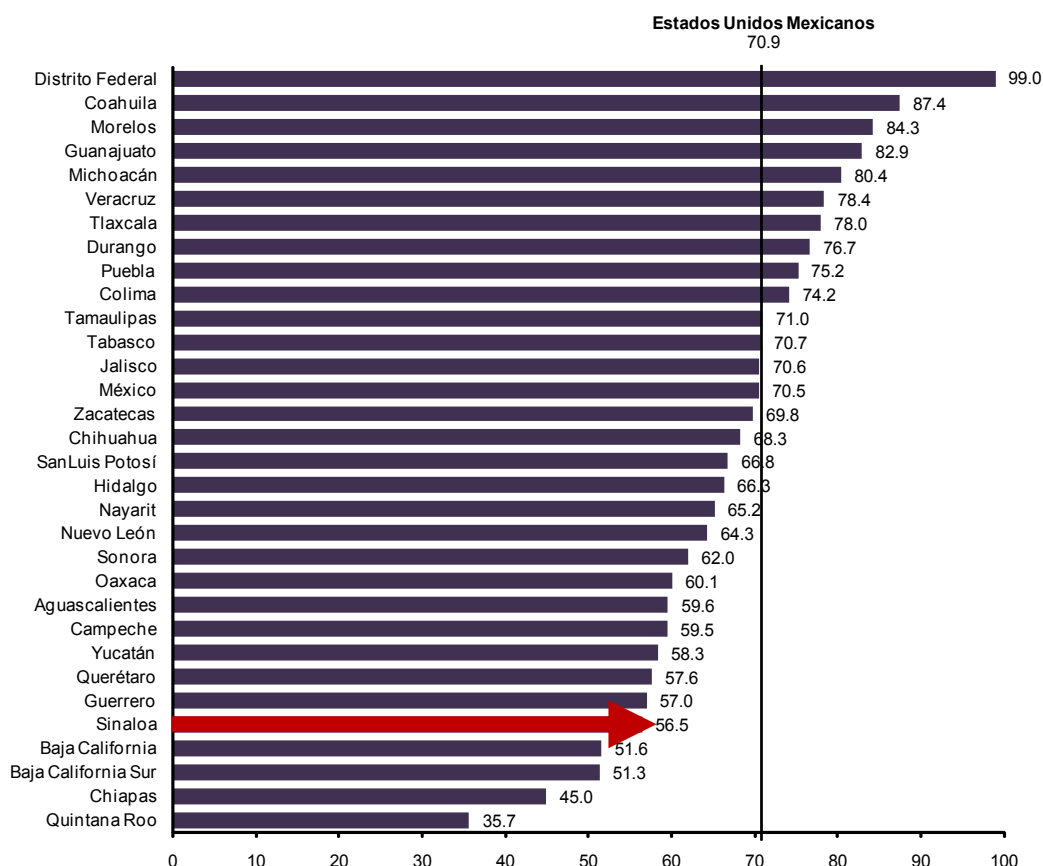
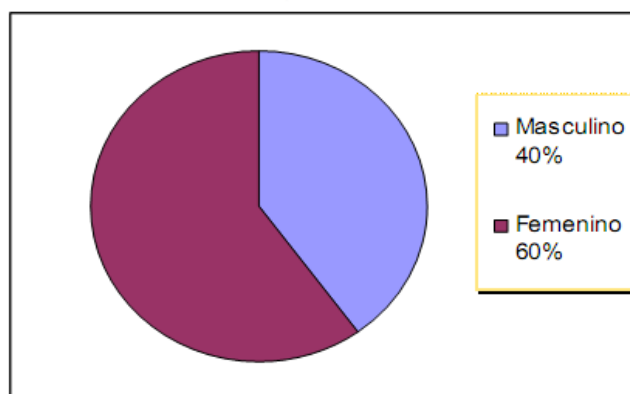


Figura 2. Tasa de mortalidad por 100,000 habitantes observadas para DM2 por entidad federativa. México 2008.

Por otra parte, ha sido estimado que para el año 2025 11.7 millones de mexicanos padecerán esta enfermedad, lo que ubicaría a nuestro país en el séptimo lugar del mundo¹³. El Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica (SUIVE), ha reportado que al inicio del año 2009 (semana 13) se han acumulado un total de 112,182 casos de DM2 en México, de los cuales, el 40% se presentó en pacientes del sexo masculino y 60% en el femenino (Figura 3), lo que equivale a una razón de 1.5 mujeres con DM2 por cada hombre afectado¹⁴.

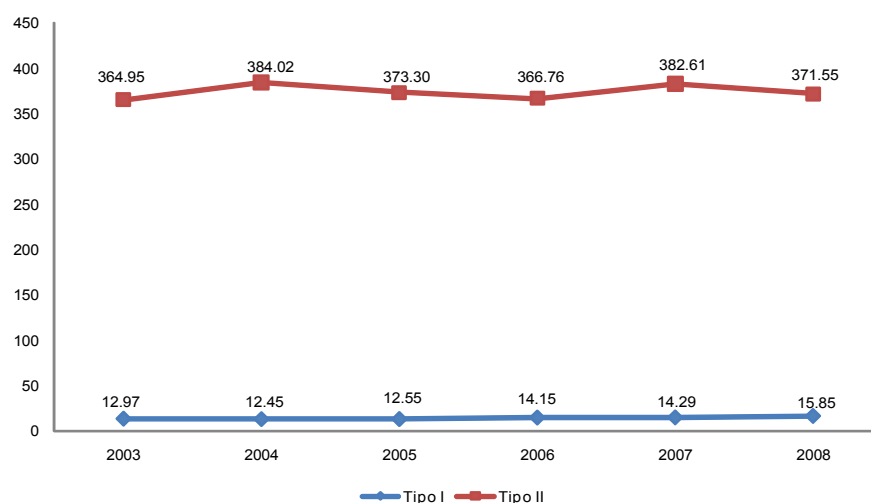


FUENTE: SUIVE/DGAE/Secretaría de Salud

Figura 3. Incidencia acumulada a la semana 13 de 2009 y los porcentajes entre hombres y mujeres reportados.

La tasa de incidencia de DM2 varió de 364.95 a 384.02 de 2003 a 2008, con el mayor pico de incidencia en el 2004¹⁴(Figura 4). Los estados con mayor incidencia son: Coahuila, Jalisco y el Distrito federal, que presentan una incidencia superior a la media nacional de 373.3/100,000 habitantes (Figura 3). Los estados de Veracruz y Quintana Roo son los que presentan menor incidencia, por debajo de los 200/100,000 habitantes¹⁴.

**Tasa de incidencia de diabetes mellitus por tipo
2003-2008
Por cada 100 mil habitantes**



Fuente: Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica y Dirección General de Epidemiología (2010). *Compendio de Anuarios de Morbilidad 1984-2008*. Información revisada en: <http://www.dgepi.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>

Figura 4. Tasa de incidencia de diabetes mellitus por tipo, por 100 mil habitantes.

En lo que respecta a Sinaloa, hubo al menos 2,000 defunciones en 2005 a causa de la DM2, que corresponde a una tasa de mortalidad de 90.8/100,000 habitantes, lo cual ubicó a nuestro estado por arriba de la media nacional (63/100,000 habitantes). Para el 2008 Sinaloa presenta una tasa de mortalidad de 56.5/100,000 habitantes lo que ubicó a nuestro estado por debajo de la media nacional de 70.9/10,000 habitantes. Esto representa un gran avance en materia de salud para el estado de Sinaloa al disminuir la tasa de mortalidad de 90.8/100,000 en el 2005 a 56.5/100,000 para el 2008¹⁴.

2.3 CLASIFICACIÓN DE LA DM

La nueva clasificación elimina los términos de insulín dependiente y no insulín dependiente y los sustituye por las denominaciones de diabetes tipo 1 y 2. La Asociación Americana de Diabetes (ADA) establece una clasificación etiológica de la DM y la agrupa en cuatro tipos¹⁵.

2.3.1 DIABETES MELLITUS TIPO 1 (DM1)

Corresponde del 5 al 10% de todos los casos. Generalmente ocurre en niños y jóvenes, pero puede desarrollarse a cualquier edad, aunque no se ha observado en mayores de 80 años². Se caracteriza por un déficit absoluto de insulina. La mayor parte de estos pacientes presentan una destrucción de sus células β del páncreas, asociada a un mecanismo autoinmune con el antígeno leucocitario humano (HLA) con ligamiento a los genes *DQA* y *DQB* e influenciado por los genes *DRB*, pero en algunos casos hay un proceso desconocido o idiopático que conduce a una pérdida de las células β ¹⁵.

2.3.2 DIABETES MELLITUS GESTACIONAL (DMG)

La DMG incluye cualquier grado de intolerancia a carbohidratos, que aparece y se reconoce por vez primera durante el embarazo. La gravedad de la DMG está relacionada con la disfunción de las células β ¹⁶. Según la SSA, el 0.3% de las mujeres en edad fértil son diabéticas y entre el 0.2 y 0.3% tienen diabetes previa al embarazo. La DMG se presenta como una complicación del embarazo en el 5% de todos los embarazos^{5,16}. Su prevalencia a nivel

mundial varía del 1 al 14% dependiendo de la raza, predisposición genética, edad y sobrepeso^{3,4}.

2.3.3 OTROS TIPOS DE DIABETES

Se subdividen en ocho categorías que incluyen: a) defectos monogenéticos que afectan la función de la célula β (MODYS), b) defectos genéticos en la acción de la insulina, c) enfermedades del páncreas exocrino, d) endocrinopatías, e) inducidas por químicos o fármacos, f) infecciones, g) formas raras de diabetes mediadas por el sistema inmune y h) otros síndromes genéticos asociados en ocasiones con diabetes (Cuadro 2)².

Cuadro 2. Clasificación otros tipos de diabetes

3. Otros tipos específicos de diabetes	a) Defectos genéticos de la función de las células β • Cromosoma 12, HNF-1 alfa (MODY 3) • Cromosoma 7, glucoquinasa (MODY 2) • Cromosoma 20, HNF-4 alfa (MODY 1) • DNA mitocondrial • Otros b) Defectos genéticos en la acción de la insulina • Insulinorresistencia tipo A • Leprechaunismo • Síndrome de Rabson-Mendenhall • Diabetes lipotrófica • Otros c) Enfermedades del páncreas exocrino • Pancreatitis • Traumatismos/pancreatectomía • Neoplasia • Fibrosis quística • Hemocromatosis • Pancreopatía fibrocalculosa • Otros d) Endocrinopatías • Acromegalia • Síndrome de Cushing • Glucagonoma • Feocromocitoma • Hipertiroidismo • Somatostatina • Hiperaldosteronismo (síndrome de Conn) • Otros e) Inducida por drogas o fármacos • Vacor • Pentamidina • Ácido nicotínico • Glucocorticoides • Hormona tiroidea • Diazóxido • Agonistas β-adrenérgicos • Tiazidas • α-interferón • Otros f) Infecciones • Rubéola congénita • Citomegalovirus • Otras g) Formas raras de diabetes mediadas por procesos inmunes • Síndrome de Stiff-man • Anticuerpos antirreceptores de insulina • Otras h) Otros síndromes genéticos ocasionalmente asociados con diabetes • Síndrome de Down • Síndrome de Klinefelter • Síndrome de Turner • Síndrome de Wolfram • Ataxia de Friedreich • Corea de Huntington • Distrofia miotónica • Síndrome de Lawrence-Moon-Bield • Porfiria • Síndrome de Prader-Willi • Otros
---	--

2.3.4 DIABETES MELLITUS TIPO 2 (DM2)

Es el tipo más común de diabetes, ya que afecta entre el 90-95% de los individuos que padecen esta enfermedad. Es un trastorno metabólico de tipo multifactorial, causado por deficiencia absoluta o relativa de insulina y se caracteriza principalmente por una hiperglicemia inapropiada, determinada

fundamentalmente por dos procesos. Por una parte, la resistencia a la insulina (RI), la cual se define como la incapacidad de la insulina para ejercer sus acciones biológicas en los tejidos diana típicos, como el músculo esquelético, el hígado o el tejido adiposo; y por otra parte, el fracaso de las células β que intentan compensar dicha RI, aumentando la secreción de insulina⁴. Existe además un deterioro y disminución de las células β . Todo ello da lugar a una enfermedad crónica de tipo microvascular, neuropática y macrovascular^{13,17}.

2.4 FISIOPATOLOGÍA DE LA DM2

La DM2 se caracteriza, fisiopatológicamente, por dos hechos: la RI en tejidos blanco (músculos, hígado, riñones y tejido adiposo) y el deterioro de la función de las células β . Es probable que la RI preceda en varios años al inicio de la enfermedad. Aunque no todos los sujetos con RI desarrollan DM2, ésta es un factor predictivo importante para el desarrollo de diabetes^{18,20}.

2.4.1 SECRECIÓN NORMAL DE INSULINA

La exposición aguda a la glucosa es el principal inductor de secreción de insulina por parte de las células β pancreáticas. La glucosa proveniente de los alimentos entra en las células β a través del transportador de glucosa GLUT1 y equilibra la concentración de glucosa extracelular con la del interior de la célula. Rápidamente la enzima glucocinasa (GK) inicia la glucólisis. Este aumento de la actividad glucolítica desemboca en un incremento en el flujo metabólico en el ciclo de Krebs con la elevación consiguiente en la concentración de ATP, equivalentes reducidos (NAD(P)H) e hiperpolarización de la membrana mitocondrial. El incremento del ATP citosólico produciría el cierre de los canales de potasio dependientes de ATP (KATP), despolarización por consiguiente de la membrana plasmática y la apertura de los canales de Ca^{2+} tipo L dependientes de voltaje. La entrada y, por consiguiente, la elevación del Ca^{2+} en el interior de la célula, activaría proteínas de la maquinaria de secreción desencadenando la liberación de insulina. Esto correspondería a la fase de secreción dependiente de Ca^{2+} y

que coincidiría con el primer pico de liberación de insulina²¹ (Figura 5).

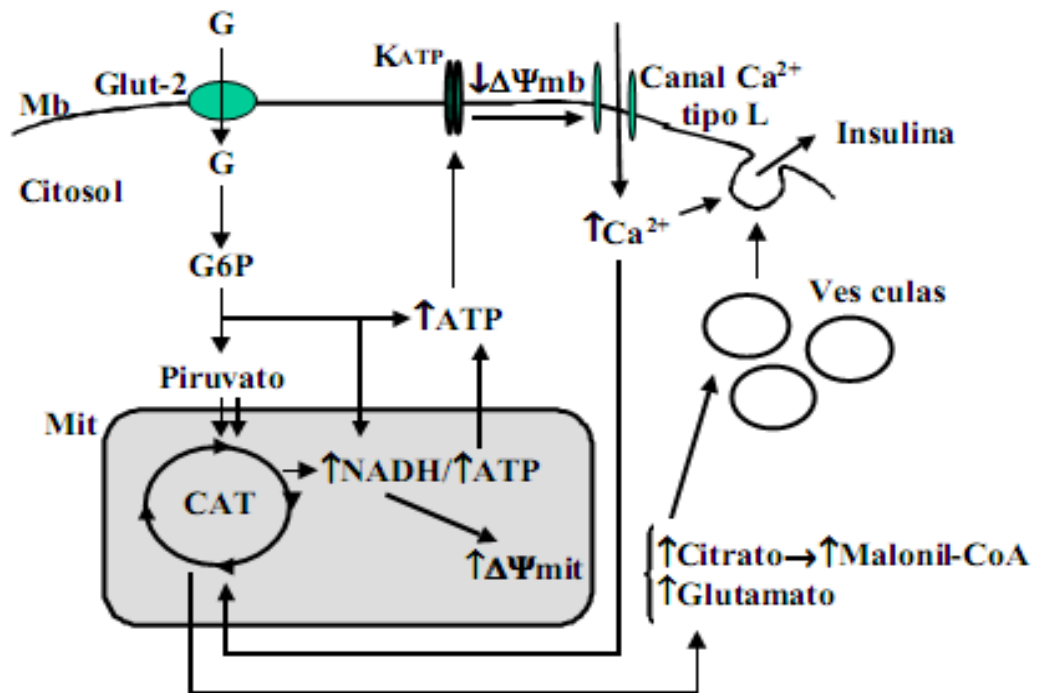


FIGURA 5. Proceso de inducción de la secreción de insulina por glucosa en la célula β .

2.4.1.1 CALPAÍNA Y SECRECIÓN DE INSULINA

Para la liberación de insulina, deben ocurrir varios procesos. El ICA512 (islotes autoantígenos celular) es un receptor tirosina-proteinfosfatasa que se encuentra asociado a los gránulos o vesículas de insulina en las células β . ICA512 está unido a un complejo formado por β 2-Syntrophin-utrofina y actina, el cual puede anclar los gránulos de secreción al citoesqueleto de actina²². La entrada de Ca^{2+} estimula la desfosforilación de β 2-Syntrophin y promueve la disociación del complejo (β 2-Syntrophin-utrofina y F-actina), el cual se une con ICA512 que está unido a los gránulos de insulina. Una vez disociados, el dominio citoplasmático de ICA512 es dividido por calpaína (activado por Ca^{2+}), lo que promueve la movilización de los gránulos de insulina y facilita la exocitosis (Figura 6)²².

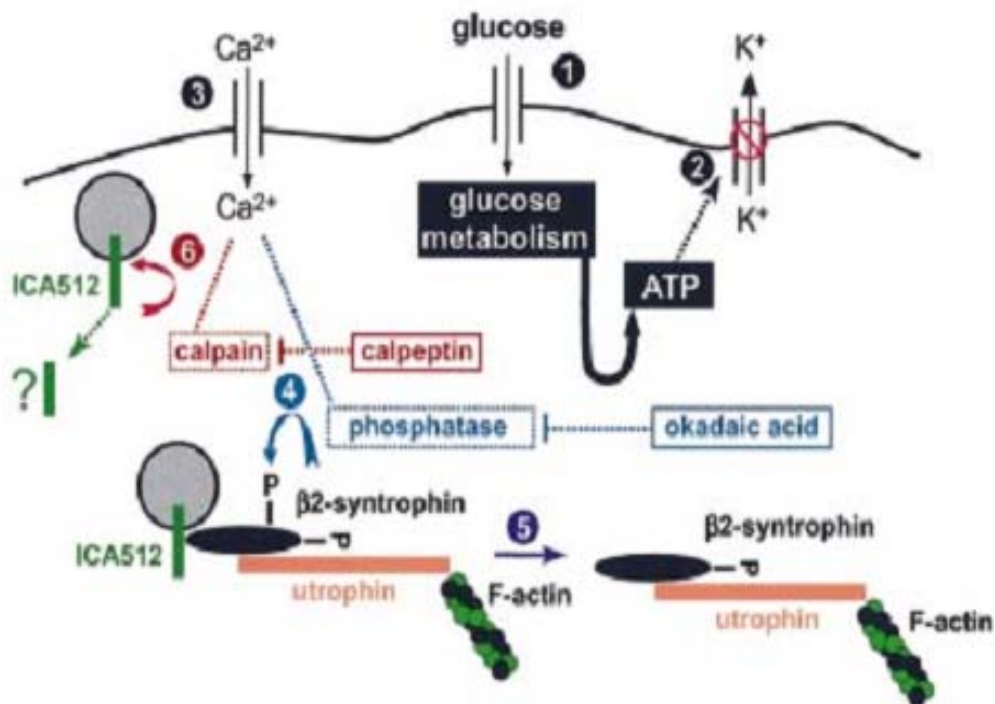


Figura 6. Mecanismo de movilización de las vesículas de insulina para su liberación por exocitosis. 1).- La glucosa entra a la célula y al ser metabolizada produce un aumento en la concentración de ATP. 2).- El incremento de ATP o provoca el cierre de los canales de K⁺. 3).-La entrada de Ca²⁺ estimula la desfosforilación de β2-Syntrophin. 5).- Ocurre la disociación del complejo 2-Syntrophin-utrofina y F-actina. 6).- Se libera insulina.

2.4.2 SECRECIÓN ANORMAL DE INSULINA

Encasos de hiperglucemia crónica, la historia se complica, y la glucosa es capaz de modificar directa e indirectamente diversos programas génicos. Así, se ha observado en diversos modelos animales y de células cultivadas que la alta concentración de glucosa modifica el perfil de expresión del gen codificador del transportador de glucosa GLUT2, activa la GK, primera enzima de la vía glucolítica, y causa una inducción coordinada de genes que codifican enzimas de la glucólisis, anaplerosis y litogénesis. Todos estos efectos vienen acompañados con una activación temprana de genes implicados en la regulación del ciclo celular como *MYC*, *FOS*, *JUN*, *ZIF-268* o *NUR-77*. En estos casos se observa una desdiferenciación de la propia célula β, que comienza a expresar proteínas típicas de estadios primitivos en el desarrollo, como son la hexokinasa-I o la lactato deshidrogenasa-A, enzimas que raramente aparecen en la célula β madura. También

pueden presentarse un aumento en los procesos apoptóticos si hay ácidos grasos (AG) (Figura 7)²². Todos estos cambios vienen acompañados de alteraciones metabólicas y funcionales, como es una curva de secreción de insulina alterada, deposición de glucógeno, flujo glucolítico aumentado, al igual que los procesos anapleróticos y lipogénicos, con una marcada producción de triglicéridos y lípidos complejos. En conjunto, estas alteraciones han dado pie a la hipótesis de la glucotoxicidad, postulando efectos nocivos a nivel de las células β a altas concentraciones de glucosa²².

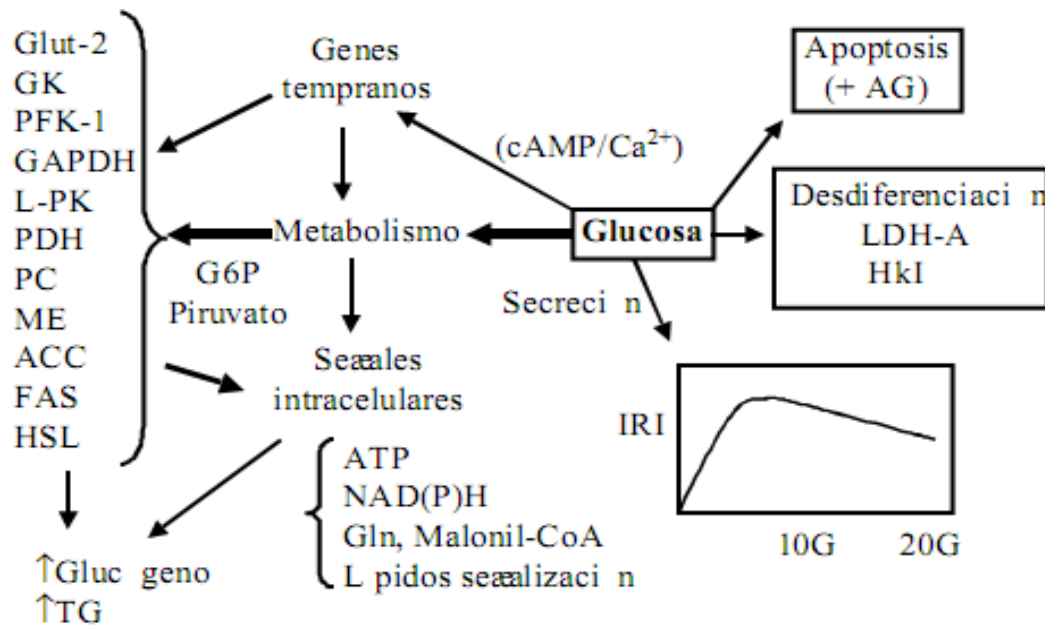


Figura 7. Esquema representativo de la glucotoxicidad en la célula pancreática. En una primera instancia puede observarse una respuesta adaptativa a través de la inducción de determinados genes tempranos o del propio metabolismo, participando el cAMP o el Ca^{2+} . Tanto los genes tempranos, como algunos factores metabólicos (Glucosa-6-Fosfato (G6P), piruvato, etc) modularían la expresión y la actividad de diversos genes y enzimas, como: el transportador de glucosa Glut-2, glucokinasa (GK), fosfofructokinasa-1 (PFK-1), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), L-piruvato kinasa (L-PK), piruvato deshidrogenasa (PDH), piruvato carboxilasa (PC), enzima málico (ME), acetil-CoA carboxilasa (ACC), ácido graso sintetasa (FAS), lipasa sensible a hormonas (HSL). Esta activación metabólica produce por un lado un incremento en los depósitos de energéticos de la célula, como son glucógeno y triglicéridos (TG), y por otro lado, un aumento en intermediarios metabólicos como ATP, equivalentes reducidos (NAD(P)H), glutamina (Gln), malonil-CoA y lípidos de señalización. El patrón de secreción detectado por radioinmunoensayo (IRI) presenta una alta secreción de insulina por debajo de 10 mM glucosa (10G) y una falta de inducción de la secreción entre 10 y 20 mM (20G), resultando en una pérdida de la sensibilidad a la glucosa.

2.4.3. MECANISMOS DE RESITENCIA A LA INSULINA

La RI está íntimamente relacionada con el tejido adiposo y, especialmente, con el depósito abdominal o centrípeto. El aumento de la grasa abdominal se relaciona con el número y el tamaño de adipocitos presentes, los cuales dependen del equilibrio entre la proliferación, la diferenciación y la apoptosis. La diferenciación de preadipocitos a adipocitos maduros se produce por la exposición de los primeros a diversas hormonas, como la insulina y los glucocorticoides, que actúan a través del receptor PPAR- γ y del C/EBP- α . El primero es necesario para la diferenciación celular, mientras que el segundo es imprescindible para la transformación en adipocito maduro sensible a la insulina⁴. Algunas hipótesis indican que la RI se inicia en el tejido adiposo. La insulina inhibe la lipólisis del tejido adiposo; en consecuencia, el defecto secretor de insulina podría estimular esta lipólisis y aumentar la liberación de ácidos grasos libres (AGL). Los valores elevados de AGL disminuyen la sensibilidad a la insulina en el hígado y el tejido muscular, lo que da lugar a hiperglucemia. Además, estimulan la neoglucogénesis e inhiben el catabolismo de la insulina, mecanismos que inducen hiperglucemia, hiperinsulinemia y dislipemia⁴. La disminución de los islotes de las células β pancreáticas precede en el tiempo al desarrollo de la diabetes clínicamente manifiesta. Incluso, hasta que la masa de células β disminuye por abajo del 50% se altera la glucemia basal (aquella que se realiza con ausencia de ingesta calórica por al menos 8 horas) (Figura 8). Las causas de la reducción de la masa de células β no están bien conocidas; sin embargo, se ha postulado una apoptosis acelerada, la cual podría, al menos de forma parcial, estar determinada genéticamente²³.

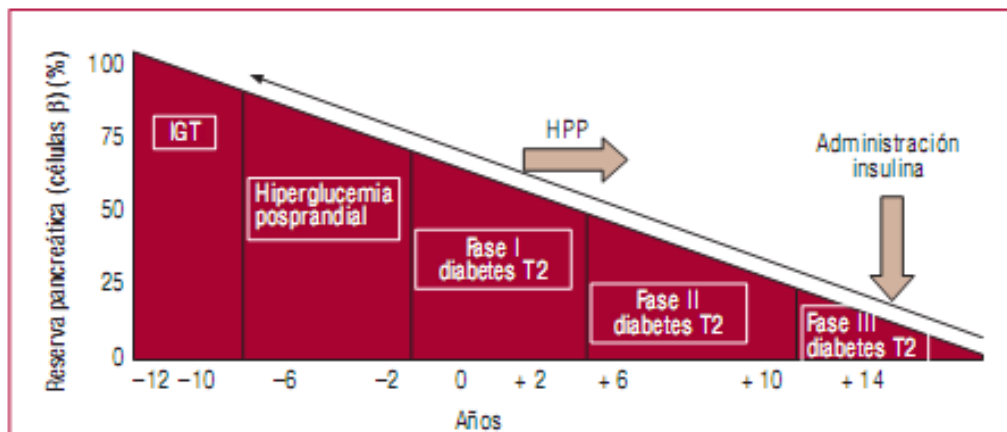


Figura 8. Evolución natural de la DM2. Pérdida de célula beta secretoras de insulina antes y después del diagnóstico de la enfermedad. ITG: Intolerancia a la glucosa.

Las células β son capaces de adaptarse a valores elevados de AGL. Sin embargo, en presencia de hiperglucemia los AGL inducen disfunción de las células β . Los AGL saturados incrementan la apoptosis y reducen la regeneración celular, mientras que los poliinsaturados producen el efecto inverso. Además, la acumulación de AGL inhibe la secreción de insulina, así como el paso de proinsulina a insulina²³.

2.5. CRITERIOS DIAGNÓSTICOS PARA DM2

Los criterios diagnósticos actuales, según la última modificación de la ADA¹, incluyen los parámetros de la hemoglobina glucosilada (A1c). Así, el diagnóstico de DM2 puede establecerse ante las siguientes situaciones:

1. Un valor de A1c: 6.5 %.
2. Síntomas típicos de diabetes y una glucosa plasmática casual mayor o igual a 200 mg/dl (la hiperglucemia casual es aquella que aparece en cualquier momento del día, sin considerar el tiempo desde la última comida).
3. Glucemia plasmática basal mayor o igual a 126 mg/dl.
4. Resultado de la prueba de tolerancia oral a la glucosa con (75 g de glucosa) mayor o igual a 200 mg/dl. La prueba debe ser realizada según lo estandarizó la OMS: utilizar 75 g de glucosa anhidra disueltos en 400 ml de agua.

Estos valores deben ser confirmados con una nueva determinación, a menos que estén presentes síntomas inequívocos de hiperglucemia (poliuria, polidipsia y pérdida de peso sin motivo aparente). Cuando los valores de glucemia superan los valores normales (110 mg/dl en ayunas o 140 mg/dl a las dos horas post carga), se habla de glucemia en ayunas alterada o tolerancia a la glucosa alterada. Se considera un estadio precoz de la alteración del metabolismo de la glucosa, que evoluciona a DM a un ritmo aproximado del 5% anual si no se aplican intervenciones adecuadas (incremento de la actividad física y alimentación adecuada para reducir y mantener el peso corporal)².

2.6. GENÉTICA DE LA DM2

La DM2 es una enfermedad multifactorial en la que intervienen factores genéticos y ambientales. Respecto a lo genético, han sido implicados al menos 45 *loci*, entre los que se encuentran el gen de la Insulina, *GK*, *INSR* (Receptor de insulina), *HNF4A* (Factor nuclear del hepatocito 4 alfa), *HNF1A* (Factor nuclear del hepatocito 1 alfa), *TCF7L2* (Factor de transcripción 7 parecido al 2) Transportadores de glucosa (*GLUT2*, *GLUT4*) y *CAPN10* (Calpaína 10). Diversos polimorfismos y/o mutaciones en estos genes se han asociado con DM2 ya que intervienen en la etiología de la DM2 al ocasionar RI, inhibir la síntesis de insulina, desequilibrar la homeostasis de la glucosa, intolerancia a la glucosa, obesidad, entre otros²⁴.

2.7. LAS CALPAÍNAS

Las calpaínas son proteasas de cisteína no lisosomales, dependientes de Ca^{2+} , son peptidasas que modulan la acción de proteínas estructurales por hidrólisis y al ser activadas participan en los procesos de regulación de señalización intracelular, diferenciación y proliferación^{25,26}.

2.7.1. ESTRUCTURA DE LAS CALPAÍNAS

Inicialmente, dos calpaínas identificadas fueron denominadas según el requerimiento de Ca^{2+} : la micromolar-calpaína (u-CAPN) y milimolar-calpaína (m-CAPN) (Figura 9). La primera actualmente se le conoce como

CAPN1 y necesita 35 μM de Ca^{2+} , la otra es CAPN2 y requiere 325 μM . Tienen dos unidades^{25,27}.

2.7.1.1. LAS UNIDADES DE LAS CALPAÍNAS

La calpaína consta de una unidad catalítica y una reguladora. Además de estas unidades, en la m-calpaína se expresa una región extra, formada por 248 aminoácidos, que al unirse con la unidad catalítica produce una proteólisis de la enzima, activándola en un 70%, por lo que puede sustituir a la unidad reguladora²⁸.

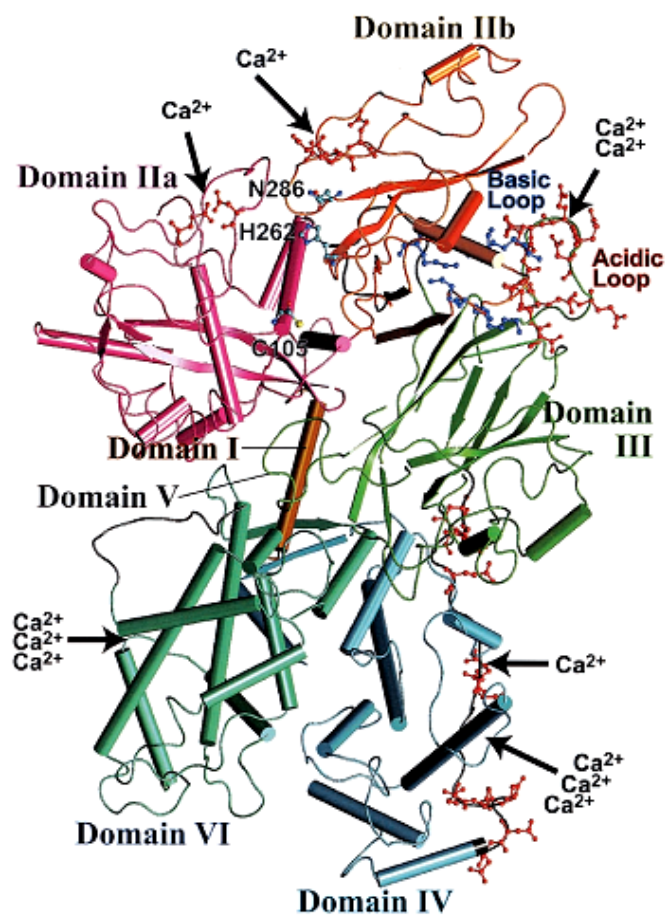


Figura 9. Estructura cristalina de la m-calpaína. Tomada de Suzuki *et al.* 2004.

2.7.1.1.1. UNIDAD CATALÍTICA

La unidad catalítica tiene un peso molecular de aproximadamente 80 kDa. Los genes que la codifican están en el cromosoma 11 para la u-calpaína y en el cromosoma 1 para la m-calpaína²⁸. Tiene cuatro dominios:

Dominio I.- Corresponde al NH₂-terminal.

Dominio II.- Es la porción proteolítica que está formada por dos subdominios (IIa y IIb) que se encuentran separados, pero que se unen al activarse la enzima. En el dominio IIa se encuentra la Cys en la posición 105 (m-Calpaína) o 115 (u-Calpaína), y en el dominio IIb la His en la posición 262 (m-Calpaína) o 272 (u-Calpaína) y la Asn en la 272 (u-Calpaína) o 286 (m-Calpaína). Estos aminoácidos forman una triada característica de las proteasas de cisteína, y son los que cumplen con la función catalítica^{25,28,29}.

Dominio III.- Se relaciona con la regulación de la actividad de la calpaína por medio de uniones electrostáticas con los fosfolípidos de la membrana celular, y estabiliza el dominio II por medio de un lazo ácido. Presenta dos secuencias EF-hand de unión a Ca²⁺, las que se distribuyen una en cada subdominio: III y III'. Al parecer, el EF-hand que se encuentra cerca del dominio II en los residuos de aminoácidos 329-341 no se une a Ca²⁺ en algunas calpaína^{28,29}.

Dominio IV.- Es el ligando con la unidad pequeña por medio de una dimerización que se da con las cinco secuencias EF-hand de unión a Ca²⁺. La m-calpaína posee dos dominios extra; uno de 18 residuos de aminoácidos que se ubican entre el dominio I y II, y el otro es de 17 entre los dominios III y IV; denominándolos dominios de unión²⁸.

2.7.1.1.2. UNIDAD REGULADORA

Esta unidad tiene un peso molecular de 28 kDa. Cumple con función de chaperona. Está constituida 2 dominios:

Dominio V.- Tiene una porción hidrofílica y una hidrofóbica, la cual es rica en Gly (39.6%) cerca de la región NH₂-terminal, que se asocia a los fosfolípidos. La forma como se ordenan los residuos de aminoácidos es muy variante, lo que probablemente permite la unión a diferentes moléculas²⁸.

Dominio VI.- Presenta cuatro EF-hands que se unen a Ca^{2+} para formar un complejo que permite la unión con la membrana celular²⁸.

2.7.2. CLASIFICACIÓN DE LAS CALPAÍNAS

Las calpaínas se clasifican, dependiendo de las unidades que las constituyen, en típicas y atípicas.

2.7.2.1. TÍPICAS

Están formadas por los dominios identificados para *u* y *m* calpaínas, se parecen a la calmodulina en el COOH terminal; Incluyen las CAPNs 1, 2 3, 8, 9, 11, 12 y 13²⁸. Las calpaínas 1, 2 y 9 se asocian con la unidad pequeña. La unidad grande es propia de cada CAPN, y la unidad pequeña (30kDa codificada por CAPN4) que es común. Las calpaínas 3, 8, 11, 12 y 13 aparentemente no interaccionan con la unidad pequeña²⁹.

2.7.2.2 ATÍPICAS

Son calpaínas que se caracterizan por la pérdida o sustitución de alguno de los dominios. La unidad grande carece del dominio IV, por lo que ella sola lleva a cabo la actividad proteolítica, y no se une a la unidad pequeña. Algunas necesitan unirse a otros polipéptidos que van a cumplir la función de la subunidad pequeña²⁹. Las calpaínas que pertenecen a este grupo son la 5, 6, 7, 10 y 15. Las CAPNs 5, 6 y 10 tienen el dominio T en el extremo COOH terminal (Figura 10)²⁸. La CAPN 10 no presenta las uniones para Ca^{2+} típicas en el dominio II. El dominio III se caracteriza por la ausencia de las uniones para los fosfolípidos²⁸⁻³⁰.



Figura 10. Dominios que forman la Calpaina 5, 6 y 10. Fuente: Evans, 2007.

2.7.3. ACTIVACIÓN DE LAS CALPAÍNAS

Se encuentran inactivas en el citosol. Al incrementar la cantidad de Ca^{2+} las calpaínas van hacia la membrana, y se unen a una molécula de Ca^{2+} en el dominio IIa y dos en el IIb haciendo que estas dos subunidades se unan. Otra molécula de Ca^{2+} se une al dominio III, lo que permite la unión de esta proteína con la fosfolipasa C y la proteína quinasa C en la membrana. Para facilitar el paso de la CAPN a la membrana se produce una hidrólisis en el dominio I, proceso que es autocatalítico²⁹.

2.7.4. INACTIVACIÓN DE LAS CALPAÍNAS

La actividad de las calpaínas cesa cuando disminuye la concentración intracelular de Ca^{2+} , pues las subunidades IIa y IIb se separan y se inactiva la enzima. La quinasa A es capaz de mantener las CAPNs en un estado inactivo por medio de una fosforilación en la Ser-369 del dominio III²⁹. El único inhibidor intracelular específico de las calpaínas es la calpastatina (CAST), la cual se ubica en el citosol y está formada por tres regiones conservadas: A, B y C; las dos primeras se unen con los dominios IV y VI de las calpaínas para inactivarlas, y la tercera se encarga de la auto-regulación. De acuerdo a estas características la CAST sólo inactiva a aquellas calpaínas de tipo diméricas (1, 2 y 9)²⁹. La CAST pertenece a la familia de las calpaínas, por lo que requiere Ca^{2+} para cumplir su función²⁸. Adicionalmente, las CAPNs pueden ser inhibidas por moléculas que reaccionan con el sitio activo en la unidad grande, como por ejemplo la leupeptina, E64 y N-Ac-Leu-Leu-norleucinal²⁹.

2.8. LA CALPAÍNA 10

El gen *CAPN10* es miembro de una familia de proteasas no lisosomales que regulan gran variedad de funciones celulares y pueden intervenir en la diferenciación de los adipocitos y en la desregulación del receptor de insulina³¹. Aunque no se conoce por completo la función fisiológica de *CAPN10*, se cree que está implicada en una variedad de procesos celulares regulados por calcio, tales como; señales de transducción, proliferación celular, diferenciación, apoptosis, progresión del ciclo celular, fusión de

membranas y activación de plaquetas²⁹. El gen *CAPN10* se localiza en 2q37.3 en la región D2S125-D2S140, está formado por 15 exones, abarca 16 kilobases y produce una proteína de 672 aminoácidos²⁴. Se conocen ocho isoformas de *CAPN10* generadas por empalme alternativo, denominadas: CAPN10a–CAPN10h. La CAPN10a se expresa en gran cantidad en el corazón, y en aquellos tejidos que cumplen un papel importante en el metabolismo de la glucosa como el hígado, músculo, islotes pancreáticos y adipocitos. La CAPN10c y g se han detectado en muchos tejidos, en tanto que las CAPN10b, d, e y f son raras^{29,32}.

Los estudios llevados a cabo para *CAPN10* la han involucrado formando parte del complejo proteolítico de la maquinaria de secreción de las células β y que en respuesta a un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular proteolisa parcialmente a la proteína SNAP-25, hecho que produce la fusión del gránulo de insulina con la membrana celular, para dar lugar a la exocitosis de la insulina²⁶. Otra de las funciones observadas en las células β para la *CAPN10*, es la reorganización de la actina durante la secreción de insulina estimulada por glucosa²⁶.

La *CAPN10* se expresa en todos los tejidos, pero su actividad es mayor en tejidos importantes en el metabolismo de la glucosa, lo cual sugiere que *CAPN10* pudiera afectar la secreción y acción de la insulina y la producción de glucosa hepática^{27,28}. Sin embargo, Rasmussen *et al.* no encontraron asociación significativa entre variantes de *CAPN10* y resistencia a la insulina o secreción de insulina anormal³³. La identificación de *CAPN10* como un probable gen en la etiología de la diabetes sugiere una nueva ruta bioquímica involucrada en la regulación de la concentración de glucosa en la sangre³³.

2.9. POLIMORFISMOS DEL GEN DE LA CAPN10

Polimorfismos de un solo nucleótido o haplotipos creados por SNP-43 (G4852A; rs3792267), SNP-19 (7920ins/del32bp) y SNP-63 (C16378T; rs5030952) han sido asociados con un riesgo incrementado para DM2. En este sentido, el alelo G (alelo silvestre) del SNP-43 se ha asociado a un ligero incremento a padecer la enfermedad en Afro-

Americanos³⁴, Japoneses³⁵, y en población de la india con DM2³⁶, el genotipo GG se ha relacionado con reducción de la expresión del ARNm en músculo esquelético³⁷, con concentración elevada de glucosa plasmática³⁸ y valores elevados de insulina y AGL²². Por su parte, el SNP-19 no mostró asociación con DM2 en un estudio realizado por Tsai *et al.*³⁹, caso contrario a lo encontrado por Paredes *et al.*, quienes encontraron que ambos alelos muestran diferencias significativas⁴⁰. Por su parte el alelo variante (T) del SNP-63 se ha asociado con DM2 y concentración elevada de AGL²²; sin embargo, en un estudio realizado por Fingerlin *et al.* no encontraron asociación⁴¹; mientras que en otro estudio el alelo común C del SNP-63 mostró relación con el síndrome de ovario poliquístico⁴². En lo que respecta a los haplotipos formados por estos polimorfismos se ha encontrado que el diplotipo 112/121 se asocia a susceptibilidad DM2 en Mexico-Americanos³², Samoanos y Polinesios³⁹. Sin embargo, en un trabajo realizado en población finlandesa sobre los polimorfismos SNP-43, SNP-56 y SNP-63 no se detectó asociación entre éstos y una susceptibilidad mayor a padecer DM2⁴¹.

III. JUSTIFICACIÓN

La DM2 es un problema mundial con aproximadamente 180 millones de personas afectadas. En México por su elevada incidencia, prevalencia y su mortalidad con una tasa de 70.9/10,000 habitantes, es considerada un grave problema de salud pública, Además de ser la principal causa de muerte en población productiva (15-64 años), sin dejar de mencionar los altos costos en el tratamientos y hospitalización de estas personas; así como las secuelas físicas y psicológicas en los pacientes y sus familias. La diabetes se está presentando en etapas de la vida cada vez más tempranas, con el consecuente incremento de las complicaciones.

Debido a que actualmente la DM2 es un problema de salud pública muy grave y a que la población diabética del estado de Sinaloa no ha sido analizada genéticamente, creemos necesario realizar una investigación que nos permita identificar si en dicha población diabética hay frecuencia elevada de los polimorfismos que se asocian con DM2. Esta enfermedad es multifactorial, y algunas variaciones en diversos *loci* han sido asociadas con un riesgo incrementado a desarrollarla. Si bien, es difícil un abordaje molecular integral para la detección de individuos genéticamente expuestos, es importante empezar por el análisis de genes que se han asociado con DM2 en población de origen mexicano. En este aspecto, creemos importante el estudio de SNP-43, SNP-19 y SNP-63 del gen *CAPN10*. Por lo que aquí nos proponemos determinar si estos polimorfismos están asociados con dicha enfermedad en población diabética de Sinaloa.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Hay asociación entre los polimorfismos SNP-43, SNP-19 y SNP-63 del gen *CAPN10* y la DM2 en pacientes de Sinaloa?

V. HIPÓTESIS

Existe asociación entre los polimorfismos SNP-43, SNP-19 y SNP-63 del gen *CAPN10* y la DM2 en pacientes de Sinaloa.

VI. OBJETIVOS

6.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar si existe asociación entre los polimorfismos SNP-43, SNP-19 y SNP-63 del gen *CAPN10* y la DM2 en pacientes de Sinaloa.

6.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Estimar las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos SNP-43, SNP-19 y SNP-63 del gen *CAPN10* en población con DM2 Sinaloa.
- Estimar las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos SNP-43, SNP-19 y SNP-63 del gen *CAPN10* en población general de Sinaloa.
- Determinar si dichos polimorfismos se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg en esta población.
- Determinar si cada polimorfismo (por separado) o algún haplotipo en particular de este gen se asocia con más frecuencia con DM2 en población del estado de Sinaloa.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. CARACTERÍSTICAS DEL ESTUDIO

Casos y controles.

7.1.1. UNIVERSO DE ESTUDIO

Se analizaron pacientes con diagnóstico de DM2 en cualquier etapa de la enfermedad, de 40 años o más residentes del estado de Sinaloa.

También se analizó un grupo de individuos no diabéticos de la misma población sin antecedentes familiares de la enfermedad (grupo control).

7.1.2. TAMAÑO DE LA MUESTRA

Para obtener una potencia estadística confiable, se analizaron el mayor número de personas posible. Se obtuvo una n de 200 pacientes y 140 controles.

7.1.3. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Pacientes. Personas no emparentadas, de 40 años o más, con diagnóstico de DM2, residentes del estado de Sinaloa que aceptaron participar (**Anexo 1**).

Grupo control. Individuos sanos residentes del estado de Sinaloa sin antecedentes familiares de DM2, de 40 años o más, que aceptaron participar en el estudio (**Anexo 1**).

7.1.4. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Pacientes o individuos del grupo de control que no aceptaron participar.

Pacientes o individuos del grupo de control que fueron transfundidos recientemente.

7.1.5. CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

Pacientes o individuos del grupo de control en quienes no se obtuvo cantidad de ADN suficiente para llevar a cabo el análisis, en quienes no se obtuvieron resultados confiables o aquellos individuos en los que no se completó la

hoja de registro de variables (**Anexo 2 y Anexo 3**, para pacientes y controles, respectivamente).

7.2. ANÁLISIS MOLECULAR

7.2.1. DETECCIÓN DEL SNP-19

El análisis del polimorfismo denominado SNP-19 se realizó mediante la técnica de PCR (**Anexo 4**), para lo cual se llevó a cabo extracción de ADN (**Anexo 5**) a partir de 5 ml de sangre venosa y PCR de acuerdo a condiciones previamente descritas^{34,42}. Los resultados se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 6%, teñidos con nitrato de plata (**Anexo 6**).

Se amplificó un fragmento de 187 pares de bases (pb) dentro del intrón 6, para lo cual se emplearon las siguientes condiciones de PCR: desnaturalización inicial a 96°C/12 min, 35 ciclos (96°C/30 s, 60°C/30 s y 72°C/30 s) y una extensión final de 72°C/10 min⁴². Este polimorfismo es una inserción/delección de 32 pb, por lo que el alelo 1 da un fragmento de 155 pb, mientras que para el alelo 2 la banda es de 187 pb (Cuadro 3). La preparación de los reactivos para la extracción de ADN, para la PCR, la electroforesis y la tinción se muestran en el **Anexo 7**.

Cuadro 3. Polimorfismo SNP-19, iniciadores utilizados y fragmentos esperados en la amplificación

SNP	Iniciadores	Fragmento	Digestión
SNP-19 (ins-del)	5'-GTTTGGTTCTCTTCAGCGTGGAG-3' 5'-CATGAACCCTGGCAGGGTCTAAG-3'	155 pb 187 pb	Alelo 1: 155 pb Alelo 2: 187 pb

7.2.2. IDENTIFICACIÓN DE LOS SNP-43 Y SNP-63

La identificación de los polimorfismos SNP-43 y 63 se realizó por PCR en Tiempo Real (PCR-TR) (**Anexo 8**). Las reacciones se llevaron a cabo con los reactivos del kit comercial *Light Cycler-DNA Fast Start master*

Hybridization probe (Roche). Las secuencias de los cebadores y las sondas utilizadas, así como las condiciones de reacción y los programas de amplificación utilizados se describen en los Cuadros 4, 5, 6 y 7.

Cuadro 4. Secuencia de iniciadores y sondas utilizados para los SNP-43 y 63

Gen		Cebadores y Sondas
CAPN10	SNP-43 Cambio G → A	F 5'- TCCATCCCAAGGGCTGTT-3' R 5'- TCTGTAGCACCCCAAATCG-3' Aceptora 5'-GAAGTAAGGCATTTGAAGGTGA-FL -3' Donadora 5'-LCR640-GCTAAGCCTTGACTTGGTGAGGATGAGG-PH-3'
	SNP-63 Cambio C → T	F 5'- CCTGGTCACTGGATGTTG-3' R 5'- ggCTggAgTTTggAgAAgTT-3' Aceptora 5'-GGGTGGAGCGAGGGGT-FL -3' Donadora 5'-LCR640-GGCCGCGTCTGTGCAGGC-PH-3'

Abreviaturas: F: Forward, R: Reverse, FL: Fluoresceina, PH: Grupo Fosfato.

Cuadro 5. Componentes de la PCR-TR

Reactivos y concentraciones	
Cebadores	0.25 µM
Sondas	0.2 µM
MgCl ₂	3 mM
Mezcla 10X	2 µL
ADN molde	1µL (100ng)
H ₂ O	cbp 10µL

PROCEDIMIENTO

El programa de PCR-TR (versión 3.5 de Roche) se introduce al ordenador, el cual se encuentra acoplado al termociclador Ligth Cycler 1.5 y consta de cuatro fases: desnaturalización, amplificación la cual consta de tres pasos (desnaturalización, hibridación y extensión), disociación y enfriamiento. Los programas utilizados para los SNP-43 y 63 se muestran en las Cuadros 6 y 7.

Cuadro 6. Programa de RT-PCR para el SNP-43

Programa Núm. ciclos	Segmento	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	T transición (°C/s)	Detección fluorescencia
Desnaturalización 1	1	95	600	20	Ninguna
Amplificación 40	1(desnat.)	95	10	20	Ninguna
	2(Hibrid.)	55	20	20	Única
	3(ext.)	72	20	20	Ninguna
Curva de Disociación 1	1	95		20	Ninguna
	2	48	60	20	Ninguna
	3	80		0.1	Continua
Enfriamiento 1	1	40	30	20	Ninguna

Cuadro 7. Programa de RT-PCR para el SNP-63

Programa Núm. ciclos	Segmento	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	T transición (°C/s)	Detección fluorescencia
Desnaturalización 1	1	95	600	20	Ninguna
Amplificación 40	1(desnat.)	95	10	20	Ninguna
	2(Hibrid.)	53	20	20	Única
	3(ext.)	72	20	20	Ninguna
Curva de Disociación 1	1	95		20	Ninguna
	2	47	60	20	Ninguna
	3	80		0.1	Continua
Enfriamiento 1	1	40	30	20	Ninguna

La sonda aceptora fue diseñada con el fluorocromo Red 640, la fluorescencia se midió a 640 nm al final de cada fase de hibridación y de manera continua durante la fase de disociación. Después de la amplificación, la identificación de los genotipos se realizó por medio del análisis de las curvas de disociación. La obtención de un solo pico a la temperatura de disociación esperada (T_m 65°C para el SNP-63 y T_m 54°C para el SNP-43) indica homocigosis para el alelo silvestre; así mismo, distinguimos homocigosis para el alelo polimórfico o que presenta la variante por la presencia de un solo pico a una T_m más baja (T_m 54°C para el SNP-63 y T_m 61°C para el SNP-43). Los heterocigotos fueron identificados por la presencia de dos picos a las temperaturas antes mencionadas para cada polimorfismo (Figuras 11 y 12).

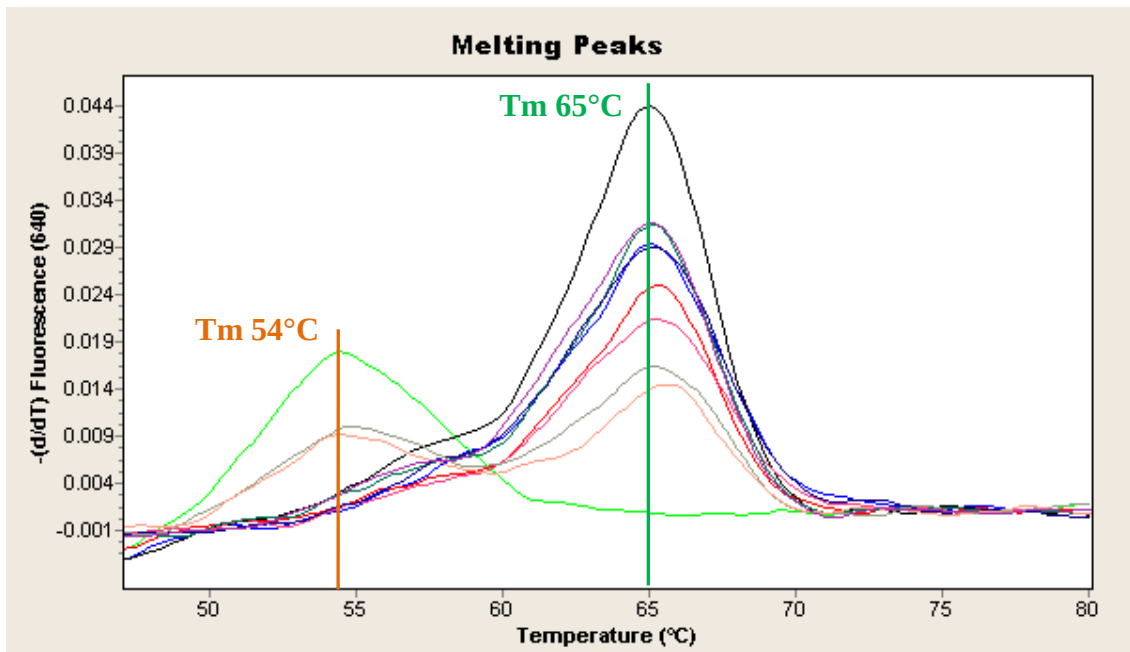


Figura 11. Curvas de disociación obtenidas para el SNP-63. Muestras Homocigotas sin cambio para el alelo C (T_m 65°C), muestra homocigota para el alelo polimórfico T (T_m 54°C) y muestras heterocigotas C/T (ambos picos).

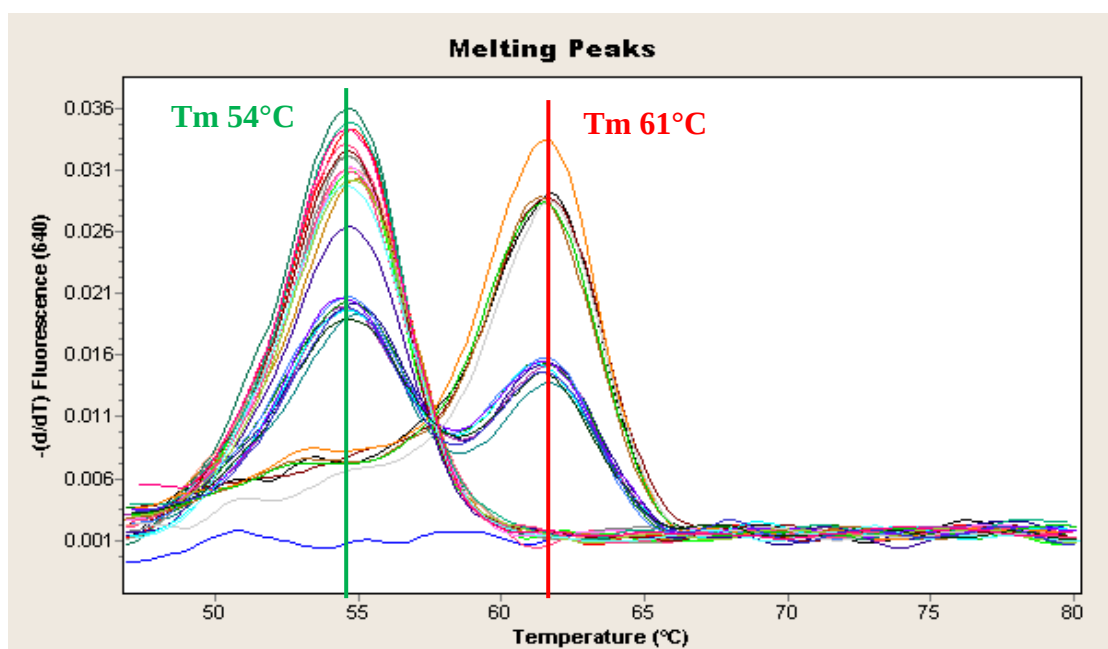


Figura 12. Curvas de disociación obtenidas para el SNP-43. Muestras Homocigotas sin cambio G (Tm 54°C), muestra homocigota para el alelo polimórfico A (Tm 61°C) y muestras heterocigotas G/A (ambos picos).

7.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de las variables bioquímicas y antropométricas se utilizó la prueba t de student (programa de Microsoft Office Excel 2007). Para el análisis de los polimorfismos se utilizó la página Web <http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/ihg/snps.html> del Institute of Human Genetics de Helmholtz Center Munich, Alemania. Este programa estima la frecuencias alélicas y genotípicas poblacionales de cada polimorfismo a partir de la muestra analizada y determina si estas variantes se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg, lo cual se analizó con la prueba Exacta de Fisher. Igualmente, evalúa la asociación de los polimorfismos con el riesgo a desarrollar diabetes (en este caso) mediante la prueba de razón de momios (odds ratio).

Para la construcción de haplotipos se tomaron los datos del **Anexo 9** y **Anexo 10** y se utilizó el siguiente programa: "Software for the statistical analysis of haplotype-disease association Hapstat 3.0" (Tammy Bailey, Danyu Lin and the University of North Carolina at Chapel Hill, Department of Biostatistics, 3101 McGavran-Greenberg CB #7420, Chapel Hill, North Carolina 27599-7420, USA).

VIII. RESULTADOS

ANÁLISIS DE CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS Y BIOQUÍMICAS

En el presente estudio analizamos las características físicas y clínicas de ambos grupos de estudio (Cuadro 8); 1) Casos: formado por 200 individuos, 139 mujeres (69.5%) y 61 hombres (30.5%) diagnosticados con DM2 y 2). Controles: formado por 140 individuos, 95 mujeres (67.86%) y 45 hombres (32.14%) no diabéticos (Figura 13). Observamos que en el grupo de casos el promedio de edad es significativamente mayor (58.5 ± 10.20 años) que la del grupo control (50.43 ± 12.89 años) ($p < 0.001$; t de student). En ambos grupos de estudio las mujeres representan más del 60% de la población, lo cual corresponde aproximadamente a una razón de 2:1 de mujeres a hombres. Al analizar la glicemia en ayunas entre ambos grupos, encontramos resultados estadísticamente significativos (147.78 ± 66.13 versus 92.86 ± 15.53 ; $p < 0.001$; t de student). Al comparar las medias en colesterol y triglicéridos entre ambos grupos, observamos resultados significativos sólo para los triglicéridos ($p = 0.0012$; t de student).

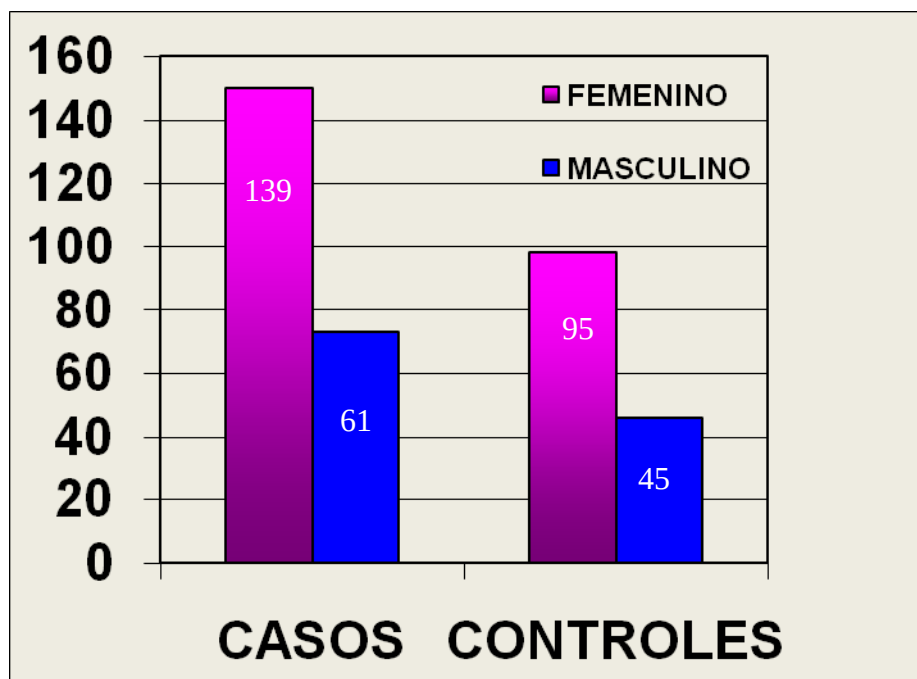


Figura 13. Número de individuos analizados por sexo.

Respecto al índice de masa corporal (IMC), detectamos que éste es significativamente mayor en pacientes (30.98 ± 5.58 versus 28.42 ± 5.29 ; $p < 0.001$; t de student). De acuerdo con el IMC, formamos cuatro grupos: el primero incluyó a los individuos con IMC de 18-25 kg/m², considerados dentro del peso normal, entre los casos encontramos sólo 26 sujetos (13%), mientras que en el grupo control hubo 35 (25%); en el segundo grupo, conformado por individuos con IMC >25 <30 kg/m², considerado ya con sobrepeso, se detectaron 70 individuos (35%), mientras que en controles hubo 63 (45%); en el tercer grupo compuesto por individuos con IMC >30 <40 kg/m², considerados obesos, hubo 91 casos (45.5%) y 39 controles (27.86%); y finalmente, el cuarto grupo con IMC >40 kg/m², encontramos 13 pacientes (6.5%) y 3 controles (2.14%)(Cuadro 8). De acuerdo a la clasificación de la OMS, los individuos con IMC >25 kg/m² son considerados con sobrepeso, lo que representa un factor de riesgo para estos individuos ya que la obesidad y el sobrepeso son considerados factores determinantes en la aparición de la DM2.

Cuadro 8. Características físicas y clínicas de los grupos de estudio

	Grupo control n= 140			Grupo problema n= 200			Valor p*
	n	%	Media±DS	n	%	Media±DS	
Edad			50.42±13.33			58.5±10.19	<0.001
Sexo							
Hombres	45	32.14		61	30.5		
Mujeres	95	67.86		139	69.5		
Glicemia			92.85±15.52			147.77±66.13	<0.001
Colesterol			199.29±41.6			206.9±43.29	0.1008
Triglicéridos			140.4±79.13			173.04±105.7	0.0120
IMC			28.41±5.28			30.98±5.57	<0.001
18-25	35	25		26	13		
>25<30	63	45		70	35		
>30<40	39	27.86		91	45.5		
>40	3	2.14		13	6.5		

Abreviaturas: DS: Desviación estándar, IMC: Índice de masa corporal. *Prueba t de student.

ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS

POLIMORFISMO SNP-43

Las frecuencias alélicas y genotípicas para el polimorfismo SNP-43 se muestran en el Cuadro 9. Las frecuencias alélicas, tanto para controles (G=0.70 y A=0.30) como para casos (G=0.72 y A=0.28) no muestran valores significativos (**Anexo 11**). En el grupo control se obtuvieron frecuencias genotípicas de 49%, 43% y 9% para los genotipos GG, GA y AA, respectivamente; mientras que en los casos éstas se observaron en 51% para GG, 42% para GA y 7% para AA. Al comparar el grupo de casos por sexo obtuvimos que el genotipo AA presenta un OR=2.32 (0.462-11.623; $p=0.30$) (**Anexo 12**). El genotipo GG tiene una frecuencia en el total de la población de 50%, el GA de 42% y el AA de 8%. No se encontraron diferencias entre las frecuencias genotípicas observadas y las esperadas por el Equilibrio de Hardy-Weinberg ni en controles, ni en pacientes ($p=1$ y $p=0.73$, respectivamente; Exacta de Fisher, **Anexo 11**). En la Figura 14 se muestran algunos resultados de PCR-TR para este SNP.

Cuadro 9. Frecuencias alélicas y genotípicas del SNP-43

FRECUENCIA ALÉLICA				
Alelo	Controles n = 140	Casos n=200	OR (IC 95%)	Valor p*
G	0.70	0.72	Referencia	
A	0.30	0.28	OR=0.91 (0.65-1.27)	p=0.57
FRECUENCIAS GENOTÍPICAS				
Genotipo	Controles	Casos	OR (IC 95%)	Valor p*
G/G	68	102	Referencia	
G/A	60	84	OR=0.93 (0.59-1.47)	p=0.76
A/A	12	14	OR=0.78 (0.34-1.78)	p=0.55

Abreviaturas:OR: Odds Ratio, IC: Intervalo de confianza. *Chi cuadrada.

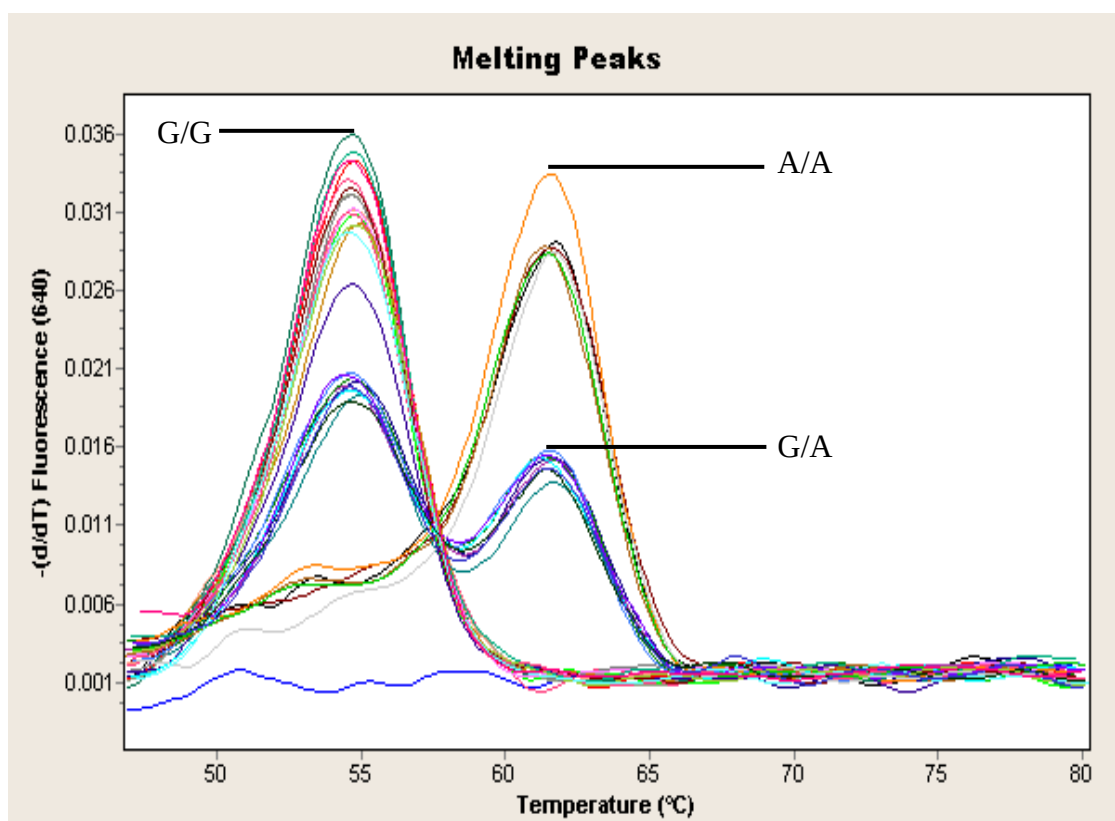


Figura 14. Gráfica de una PCR-TR donde se muestran algunos resultados para el SNP-43.

POLIMORFISMO SNP-19

Se estimaron las frecuencias alélicas y genotípicas para los tres polimorfismos. En cuanto al SNP-19, se obtuvo una frecuencia del 39% para el alelo 1 (del) y un 61% para el alelo 2 (ins) en el grupo de casos, y un 32% (del) y un 68% (ins) en controles (Cuadro 10). Al comparar dichas frecuencias no se encontraron diferencias significativas (**Anexo 11**). El genotipo ins/ins tiene una frecuencia de 36% en casos y 46% en controles; el heterocigoto ins/del una frecuencia de 50% en casos y 43% en controles y el homocigoto del/del 13% en casos y 10% en controles. Según las frecuencias genotípicas observadas, esta población se encuentra en Equilibrio de Hardy-Weinberg ($p=1$ y $p=0.38$, para controles y pacientes, respectivamente; Exacta de Fisher, **Anexo 11**). En la Figura 15 se observan resultados de algunas muestras analizadas para el SNP-19.

Cuadro 10. Frecuencias alélicas y genotípicas del SNP-19

FRECUENCIA ALÉLICA				
Alelo	Controles n = 134	Casos n=210	OR (IC 95%)	Valor p*
ins	0.68	0.61	Referencia	
del	0.32	0.39	OR=1.33 (0.96-1.84)	p=0.08
FRECUENCIAS GENOTÍPICAS				
Genotipo	Controles	Casos	OR (IC 95%)	Valor p*
ins/ins	62	76	Referencia	
del/ins	58	106	OR=1.49 (0.94-2.37)	p=0.09
del/del	14	28	OR=1.63 (0.79-3.37)	p=0.18

Abreviaturas:ins: Inserción del: delección, OR: Odds Ratio, IC: Intervalo de confianza. *Chi cuadrada.

SNP-19 (inserción/delección de 32 pb)

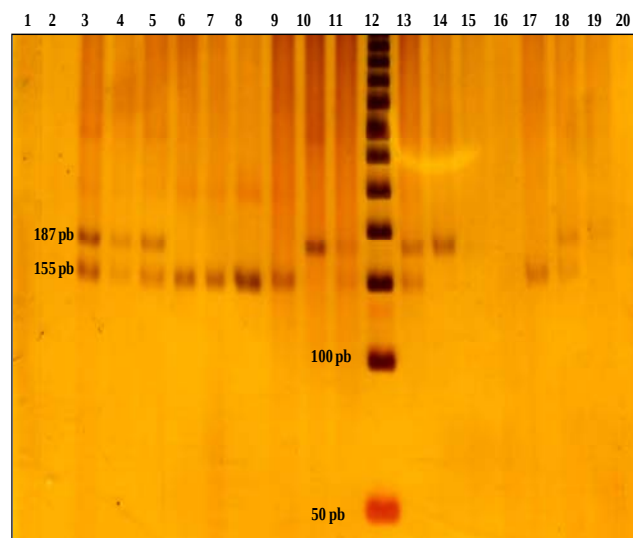


Figura 15. Fotografía de un gel de poliacrilamida en el que se muestran algunos individuos analizados. **Carriles 1 y 2.** No muestra. **Carriles 3-5, 11, 13, 18:** Heterocigotos (ins/del). **Carriles 6-9, 17:** Homocigotos para el alelo 1 (del/del). **Carriles 10 y 14.** Homocigotos para el alelo 2 (ins/ins). **Carriles 15, 16 y 19.** Muestras no amplificadas: **Carril 20.** Blanco de reacción. **Carril 12:** Marcador de 50 pb.

POLIMORFISMO SNP-63

Las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo SNP-63 se muestran en el Cuadro 11, así como los efectos de los genotipos del SNP-63 y el riesgo de presentar DM2 en los grupos en estudio. Las frecuencias alélicas tanto para controles (C=0.87 y T=0.13), como para casos (C=0.83 y T=0.17), no muestran valores significativos ($p=0.20$) (**Anexo 11**). El genotipo CC tiene una frecuencia en el total de la población de 72%, el CT de 25% y el TT de 3%. No hubo diferencias entre las frecuencias genotípicas observadas y las esperadas por el Equilibrio de Hardy-Weinberg en controles ni en pacientes ($p=1$ y $p=0.80$, respectivamente; Exacta de Fisher, **Anexo 11**). En la Figura 16 se muestra una gráfica de PCR-TR con resultados del SNP-63.

Cuadro 11. Frecuencias alélicas y genotípicas del SNP-63

FRECUENCIA ALÉLICA				
Alelo	Controles n = 139	Casos n=196	OR (IC 95%)	Valor p*
C	0.87	0.83	Referencia	
T	0.13	0.17	OR=1.34 (0.86-2.07)	p=0.20
FRECUENCIAS GENOTÍPICAS				
Genotipo	Controles	Casos	OR (IC 95%)	Valor p*
C/C	105	137	Referencia	
C/T	32	53	OR=1.27 (0.76-2.11)	p=0.36
T/T	2	6	OR=2.30 (0.46-11.62)	p=0.30

Abreviaturas:OR: Odds Ratio, IC: Intervalo de confianza.*Chi cuadrada.

El valor de OR de 2.30 (0.46-11.62) para el homocigoto TT (variante mutante) indica que los individuos con este genotipo tienen más de dos veces riesgo de desarrollar DM2; sin embargo, este hallazgo no es estadísticamente significativo ($p=0.30$).

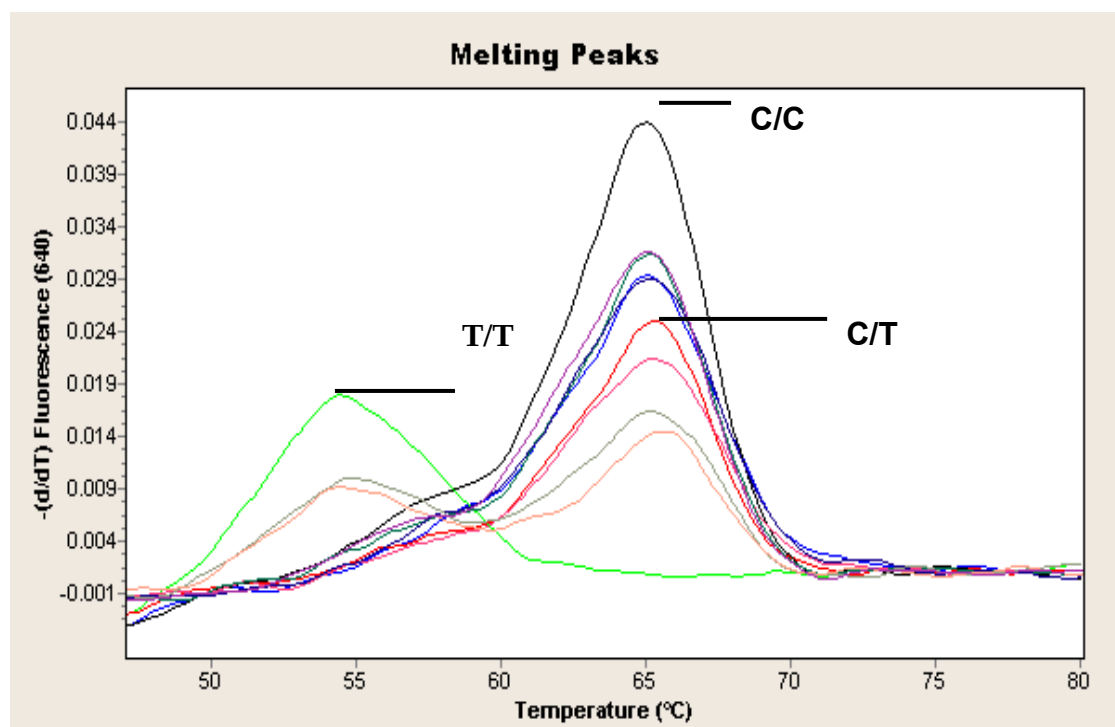


Figura 16. Gráfica de una PCR-TR donde se muestran algunos resultados para el SNP-63.

ANÁLISIS ENTRE SEXOS

Realizamos un análisis entre varones y mujeres del grupo de pacientes para ver la influencia del sexo en el desarrollo de la enfermedad cuando se es portador de algún genotipo en particular, y no encontramos diferencias significativas en la distribución de los genotipos para ninguno de los tres polimorfismos analizados. Sin embargo, en la mayoría de los casos hubo ORs mayores de 1.0, sobre todo para el estado homocigoto variante. Incluso el homocigoto TT mostró una OR de 5.40($p=0.12$)(Cuadro 12; **Anexo 12**).

Cuadro 12. Frecuencias alélicas y genotípicas para los tres polimorfismos entre varones y mujeres del grupo de pacientes

FRECUENCIAS GENOTÍPICAS				
SNP-43	Varones n=63	Mujeres n=137	OR (IC 95%)	Valor p*
G/G	35	67	Referencia	
G/A	24	60	OR=1.31 (0.70-2.44)	p=0.40
A/A	4	10	OR=1.31 (0.38-4.47)	p=0.67
SNP-19				
	n=68	n=142		
ins/ins	25	51	Referencia	
del/ins	34	72	OR=1.14 (0.62-2.12)	p=0.67
del/del	9	19	OR=2.29 (0.45-11.67)	p=0.31
SNP-63				
	n=60	n=136		
C/C	40	97	Referencia	
C/T	20	33	OR=0.68 (0.35-1.33)	p=0.26
T/T	0	6	OR=5.40 (0.30-98.11)	p=0.12
FRECUENCIA ALÉLICA				
SNP-43	Varones	Mujeres	OR (IC 95%)	Valor p*
G	0.75	0.71	Referencia	
A	0.25	0.29	OR=1.21 (0.75-1.95)	p=0.43
SNP-19				
ins	0.62	0.61	Referencia	
del	0.38	0.39	OR=1.30 (0.77-2.19)	p=0.33
SNP-63				
C	0.83	0.83	Referencia	
T	0.17	0.17	OR=0.99 (0.56-1.77)	p=0.98

Abreviaturas:OR: Odds Ratio, IC: Intervalo de confianza. *Chi cuadrada.

ANÁLISIS ENTRE MUJERES

Llevamos a cabo un análisis entre mujeres del grupo control y mujeres pacientes, y sólo encontramos diferencias significativas para el SNP-19, en donde la frecuencia del alelo 1 (del) se observó aumentada, con un OR=1.52(1.02-2.26; p=0.04) (Cuadro 13; **Anexo 13**). Respecto a los varones, no realizamos un análisis similar debido a que el tamaño de la muestra no fue representativa.

Cuadro 13. Frecuencias alélicas y genotípicas para los tres polimorfismos entre mujeres

FRECUENCIAS GENOTÍPICAS				
SNP-43	Mujeres controles n= 95	Mujeres casos n=137	OR (IC 95%)	Valor p*
G/G	44	67	Referencia	
G/A	41	60	OR=0.96 (0.56-1.67)	p=0.89
A/A	10	10	OR=0.66 (0.25-1.71)	p=0.39
SNP-19	n=92	n=142		
ins/ins	46	51	Referencia	
del/ins	38	72	OR=1.71 (0.98-2.99)	p=0.06
del/del	8	19	OR=2.14 (0.86-5.36)	p=0.10
SNP-63	n=98	n=136		
C/C	74	97	Referencia	
C/T	22	33	OR=1.14 (0.62-2.12)	p=0.67
T/T	2	6	OR=2.29 (0.45-11.67)	p=0.31
FRECUENCIAS ALÉLICAS				
SNP-43	Mujeres Controles	Mujeres Casos	OR (IC 95%)	Valor p*
G	0.68	0.71	Referencia	
A	0.32	0.29	OR=0.87 (0.58-1.30)	p=0.50
SNP-19				
ins	0.71	0.61	Referencia	
del	0.29	0.39	OR=1.52 (1.02-2.26)	p=0.04
SNP-63				
C	0.87	0.83	Referencia	
T	0.13	0.17	OR=1.30 (0.77-2.19)	p=0.33

Abreviaturas:OR: Odds Ratio, IC: Intervalo de confianza. *Chi-cuadrada.

RELACIÓN ENTRE EL IMC Y LOS POLIMORFISMOS ANALIZADOS

Para este análisis dividimos a los pacientes en dos grupos: el primero incluyó a los individuos con $IMC < 30 \text{ kg/m}^2$, y el segundo a sujetos con $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$. Los resultados se muestran en el Cuadro 14.

Cuadro 14. Frecuencias alélicas y genotípicas para los tres polimorfismos distribuidas de acuerdo al IMC

FRECUENCIAS GENOTÍPICAS				
SNP-43	Individuos IMC con <30 n=93	Individuos con $IMC \geq 30$ n=104	OR (IC 95%)	Valor p*
G/G	46	55	Referencia	
G/A	41	41	OR=0.83 (0.47-1.50)	p=0.55
A/A	6	8	OR=1.11 (0.36-3.45)	p=0.85
SNP-19				
	n=98	n=112		
ins/ins	32	44	Referencia	
del/ins	53	53	OR=0.73 (0.40-1.31)	p=0.29
del/del	13	15	OR=0.84 (0.35-2.00)	p=0.69
SNP-63				
	n=92	n=104		
C/C	66	71	Referencia	
C/T	25	28	OR=1.04 (0.55-1.97)	p=0.90
T/T	1	5	OR=4.65 (0.53-40.83)	p=0.13
FRECUENCIAS ALÉLICAS				
SNP-43	Individuos con $IMC < 30$	Individuos con $IMC \geq 30$	OR (IC 95%)	Valor p*
G	0.72	0.73	Referencia	
A	0.28	0.27	OR=0.94(0.61-1.47)	p=0.81
SNP-19				
ins	0.60	0.37	Referencia	
del	0.40	0.63	OR=0.87 (0.59-1.29)	p=0.49
SNP-63				
C	0.85	0.82	Referencia	
T	0.15	0.18	OR=1.30 (0.76-2.23)	p=0.34

Abreviaturas:OR: Odds Ratio, IC: Intervalo de confianza. *Chi-cuadrada.

Como se observa en el cuadro 14, no hubo diferencias estadísticamente significativas para ningún SNP entre pacientes con $IMC < 30 \text{ kg/m}^2$ y pacientes con $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$ (**Anexo 14**). El genotipo TT del SNP-63 mostró una OR=4.65, sin embargo, este hallazgo no es significativo (p=0.13).

ANÁLISIS DE HAPLOTIPOS

En el Cuadro 15 se muestra la frecuencia de haplotipos estimada para las frecuencias genotípicas encontradas en los grupos analizados. El haplotipo 122, presente sólo en el grupo control, muestra diferencias estadísticamente significativas entre pacientes y controles con una OR de 0.044 ($p=0.001$), lo cual pudiera sugerir protección contra DM2. Caso contrario del haplotipo 222 que solamente se encontró en el grupo de pacientes con un OR de 5.24, lo que sugiere una fuerte influencia de éste para DM2 pese a que no mostró diferencias significativas.

Cuadro 15. Haplotipos formados por los SNP-43, 19 y 63 del gen CAPN10

Haplotipo	Controles n = 294	Pacientes n = 400	OR (IC 95%)	Valor p*
111	62	83	1.0 (Referencia)	
112	31	65	1.57 (0.91-2.69)	0.10
121	104	140	1.0 (0.66-1.52)	0.98
122	8	0	0.044(0.002-0.78)	0.001
211	2	5	1.87(0.35-9.95)	0.46
212	0	0	ND	ND
221	87	104	0.89 (0.58-1.38)	0.61
222	0	3	5.24(0.27-103.3)	0.14

Comparación de frecuencias de haplotipos entre pacientes y controles. n = alelos.
ND = No determinado. *Prueba de Chi-cuadrada.

ENFERMEDADES ASOCIADAS A DM2

Con respecto a las enfermedades asociadas a DM2, la más frecuente fue la hipertensión arterial, presente en 33 de los 200 casos analizados, lo que representa un 16.5%, seguida por la retinopatía con 6 individuos afectados (3%); en 5 pacientes (2.5%) se presentó al menos un infarto después del diagnóstico de DM2, la insuficiencia renal se presentó en 3 casos (1.5%), al igual que el pie diabético.

IX. DISCUSIÓN

Las enfermedades crónico-degenerativas como la diabetes, la hipertensión y la obesidad tienen, sin duda, un fondo genético; sin embargo, estos trastornos están condicionados también por la influencia de factores ambientales, los cuales interaccionan conjuntamente con los genes para aumentar o disminuir el riesgo de dichas enfermedades. Respecto a los factores genéticos, han sido implicados al menos 45 *loci*, entre los que se encuentra el gen de la calpaína 10, que es una cisteín-proteasa dependiente Ca^{2+} que participa en la regulación de la exocitosis de insulina en células β pancreáticas, apoptosis, tiempo de supervivencia de células β , translocación de los transportadores de glucosa a las células, resistencia a insulina, diferenciación de células musculares, entre otras^{26,28,29,31,42}. Por tal motivo, en nuestro estudio analizamos los polimorfismos SNP-43 (G4852A; rs3792267), SNP-19 (7920 ins/del de 32 pb) y SNP-63 (C16378T; rs5030952) de este gen.

La edad, el sexo, la raza y determinados factores ambientales como la obesidad y el sedentarismo son factores importantes que se asocian con un mayor riesgo de padecer DM2. En relación con la edad, la enfermedad se presenta más frecuentemente en adultos mayores de 40 años, tanto en hombres como en mujeres, y le siguen las personas de la tercera edad⁶. Sin embargo, es preocupante que ésta se esté presentando en personas más jóvenes^{5,6}. De acuerdo a lo anterior, decidimos que los individuos a participar en nuestro estudio, serían adultos mayores de 40 años de edad con o sin DM2 para evitar posibles sesgos que pudieran presentarse al momento del diagnóstico, ya que existen otros tipos de diabetes, como las tipo MODY, que suelen presentarse en personas de entre 20 a 25 años⁴³. Para el grupo de pacientes obtuvimos una media de 58.5 ± 10.20 años y de 50.43 ± 12.89 para controles con un valor de $p < 0.001$. Sin embargo, esta diferencia pudiera estar dada por la disparidad en el tamaño de la muestra entre ambos grupos.

Por otra parte, existen grandes diferencias geográficas y étnicas en la prevalencia de la DM2. Estas diferencias se mantienen pese a cambios del estilo de vida por emigración, lo que sugiere la existencia de bases genéticas

que influyen en la patogenia de la enfermedad. Con respecto al sexo y raza, en nuestro estudio analizamos individuos mestizos del estado de Sinaloa, y encontramos mayor prevalencia de la enfermedad en mujeres que en varones (69.5% vs 30.5%, respectivamente, Figura 13), lo cual concuerda con lo reportado en otras poblaciones con predominio de DM2 en mujeres^{6,44}.

Al comparar la glicemia en ayunas entre ambos grupos, obtuvimos resultados estadísticamente significativos con medias de 147.78 ± 66.13 en el grupo de casos, frente a 92.86 ± 15.53 en controles, ($p < 0.001$; Cuadro 8), lo cual era de esperarse puesto que comparamos enfermos *versus* personas sin la enfermedad. En este sentido, el genotipo GG del SNP-43 se ha asociado con una influencia en control de las concentraciones de glucosa plasmática; así como incremento en la concentración de AGL⁴⁵. Así mismo, el genotipo TT del SNP-63 se ha asociado con incremento en las concentraciones de AGL, caso contrario del SNP-19 que no muestra esta característica²². Al comparar las medias en colesterol y triglicéridos, se obtuvieron resultados significativos sólo en triglicéridos con $p = 0.012$ (Cuadro 8), resultados similares se encontraron en estudios realizados en otras poblaciones^{36,46,47}.

Algunos polimorfismos del gen de la calpaína 10 han sido analizados para evaluar el riesgo de DM2 en diferentes poblaciones alrededor del mundo^{25,27,28,30,35,46-57}, los cuales han arrojado resultados discordantes.

En el presente trabajo se obtuvo una frecuencia del alelo G en el grupo de casos de 72%, valor similar reportado por Malecky *et al.* en un estudio realizado en Polonia⁵⁸ (73.1%). Al comparar las frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes del SNP-43 entre casos y controles de nuestra población no encontramos diferencias significativas para este polimorfismo (Cuadro 9). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en otras poblaciones^{35,39,58}; pero, también difieren de otros estudios^{22,34,51}. Por ejemplo Garant *et al.* reportaron que el alelo G y el genotipo GG se asocian con riesgo incrementado para DM2³⁴. El genotipo GG también se ha asociado con concentraciones bajas de glucosa plasmática³⁸ y reducción en la expresión de mRNA en músculo esquelético³⁷. Los genotipos GG y GA se han asociado con concentraciones elevadas de insulina y de AGL²², y en

individuos obesos el alelo A se asocia con incremento en la grasa abdominal en varones y no en mujeres⁵¹.

En cuanto al SNP-19, no encontramos diferencias estadísticamente significativas al comparar las frecuencias genotípicas entre casos y controles (Cuadro 10), resultado similar fue observado por del Bosque-plata *et al.* en una población mestiza de la ciudad de México ($p=0.84$)⁵⁹, en otra de españoles ($p=0.51$) por Sáez *et al.*⁶⁰ y un grupo de mujeres americanas procedentes de varias etnias ($p=0.57$)⁶¹. En relación a las frecuencias alélicas, tampoco hubo diferencia significativa entre casos y controles, igual que lo observado en otras poblaciones^{30,35,53,58,62}. En este trabajo la frecuencia del alelo 1 (del) en casos fue de (39%), similar a lo reportado por Horikawa *et al.* en población japonesa con (38%)³⁵, en británicos por (38%) Evans *et al.*³⁰, en chinos por Shu-feng *et al.* (34%)⁶¹ y en polacos (34%)⁵⁸. Así mismo, el genotipo 1/1 del SNP19 estaría asociado a una disminución de la actividad lipolítica, y el genotipo 2/2 a un IMC elevado⁵⁵. Caso contrario fue reportado por Paredes *et al.*, quienes encontraron que ambos alelos de este polimorfismo muestran resultados significativos, por lo que estos nos pueden ser discriminados como alelos de susceptibilidad o de resistencia⁴⁰.

En lo que respecta al SNP-63, no detectamos diferencias significativas al comparar las frecuencias genotípicas entre casos y controles (Cuadro 11), lo cual es similar a lo encontrado por Bodhini *et al.*³⁶, Horikawa *et al.*³⁵, Tsai *et al.*³⁹ y Fingerlin *et al.*⁴¹. Contrario a lo reportado por Orho-Melander *et al.*, quienes encontraron el alelo T asociado con riesgo a DM2 ($p=0.01$)²². Sin embargo cabe aclarar que, aunque no hubo diferencias significativas en nuestro estudio, el alelo T muestra ORs de 1.27 y 2.30 para heterocigotos y homocigotos, respectivamente. Por otra parte, se ha reportado que el alelo común (C) de este polimorfismo está relacionado con riesgo a síndrome de ovario poliquístico⁴² e incremento en la concentración de AGL²². En cambio, ningún alelo del SNP-63 se encontró asociado con incremento de la grasa abdominal⁵¹.

Al comparar mujeres sanas contra mujeres enfermas, encontramos la frecuencia del alelo 1 del SNP-19 (del) aumentada en el grupo de pacientes (OR=1.52, 1.02-2.26; $p=0.04$) lo que sugiere que las mujeres portadoras de

este alelo tienen mayor riesgo de padecer DM2. Para los alelos del SNP-43 y SNP-63 no hubo diferencias significativas.

Debido a que la obesidad es el factor de riesgo de mayor relevancia en el desarrollo de DM2, comparamos los individuos de ambos grupos de acuerdo al IMC y obtuvimos resultados estadísticamente significativos ($p < 0.001$; Cuadro 8). Resultados similares fueron encontrados por Shu-Feng *et al.* en población diabética China⁶¹. La asociación positiva entre obesidad y riesgo de DM2 es un hallazgo constante en todos los estudios epidemiológicos. El aumento en las tendencias de obesidad que empiezan en la niñez y adolescencia implica que la diabetes empezará a afectar cada vez a grupos más jóvenes, perjudicando a las personas durante su período de vida económicamente activo (15-64 años)⁵.

Cabe aclarar que, al parecer, los polimorfismos estudiados no tienen alguna influencia en el desarrollo de obesidad, como fue evidenciado al comparar individuos con $IMC < 30 \text{ kg/m}^2$ contra individuos de $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$. Sin embargo, el genotipo TT del SNP-63 presentó un valor de OR de 4.65 (0.53-40.83; $p = 0.13$). De acuerdo con esto, se puede sugerir fuerte influencia de este genotipo con el desarrollo de obesidad en pacientes con DM2. En un estudio realizado en peruanos por Paredes *et al.* se encontró que el polimorfismo SNP-19 se asocia con obesidad, hipertensión, hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia⁴⁰.

Al realizar el análisis de haplotipos en nuestro estudio encontramos que el haplotipo 112 formado por los SNP-43, 19 y 63, respectivamente, no presenta asociación con DM2 ($p = 0.10$) (Cuadro 15). Estos resultados difieren de los obtenidos en otros estudios donde el diplotipo 112/121 muestra asociación con DM2 en México-Americanos (OR=3.02), en alemanes (OR=4.97) y en finlandeses (OR=2.55)³². Incluso, se ha encontrado que este diplotipo influye en la concentración sérica de glucosa en individuos no diabéticos debido a una disminución en la secreción de insulina³². Sin embargo, en un estudio en población mexicana en el que analizaron cinco polimorfismos (SNP-43, SNP-44, SNP-19, SNP-63 y SNP-110) no detectaron asociación del diplotipo 112/121 formado por los polimorfismos SNP-43, SNP-19 y SNP-63 con riesgo para DM2⁵⁹.

Igualmente, en estudios llevados a cabo en ingleses³⁰, escandinavos²⁹, japoneses³⁵ y samoanos³⁹ no se encontró asociación entre estas variantes y el desarrollo de DM2. Así mismo, en un estudio en caucásicos no hubo asociación de alguna de estas variantes con riesgo incrementado para diabetes; sin embargo, el diplotipo 111/221 sí mostró asociación con DM2⁶³. En este sentido, Kang *et al.* no detectaron asociación entre el diplotipo 112/121 y DM2 en población coreana⁴⁹; en cambio, este mismo grupo encontró evidencia de que el diplotipo 111/121 incrementa el riesgo para desarrollar síndrome metabólico en pacientes con DM2⁵⁰. Por su parte, Chen *et al.* estudiaron los polimorfismos SNP-43, SNP-56 y SNP-63 y sugirieron que estos no juegan un papel importante en el riesgo de padecer diabetes en individuos del occidente de África; sin embargo, ellos encontraron asociación del haplotipo 221 con DM2 en pacientes nigerianos (OR: 3.7)⁴⁸. Por otra parte, estudios realizados en población China⁴⁶ y en población finlandesa²² acerca de los polimorfismos SNP-44, SNP-43, SNP-19 y SNP-63 mostraron asociación entre ciertas variantes y un riesgo incrementado para DM2 e hipertensión. Sin embargo, en otro trabajo realizado también en población finlandesa sobre los polimorfismos SNP-43, SNP-56 y SNP-63 no se detectó asociación entre éstos y una susceptibilidad mayor a padecer DM2⁶³.

En el presente estudio encontramos que el haplotipo 122 sólo estuvo presente en el grupo control ($p=0.001$) lo que nos puede sugerir protección de este haplotipo contra DM2. Este podría ser un hallazgo fortuito e interesante ya que no se ha reportado como haplotipo de resistencia en otros estudios. En un estudio realizado por Malecky *et al.*⁵⁸, este haplotipo se encontró solamente en uno de los controles y no se asoció con DM2; mientras que en la India Bodhini *et al.*³⁶ no lo detectaron en su estudio. En población Árabe, (Túnez) el haplotipo 122 tampoco mostró asociación con DM2 ($p=0.52$); en esta misma población se encontró asociación del haplotipo 111 con riesgo incrementado para desarrollar DM2 ($p=0.034$)⁶⁴.

El haplotipo 222 se encontró en sólo tres individuos del grupo de pacientes (OR=5.24), esto puede de cierta forma sugerir que dicho haplotipo se asocia con riesgo a padecer DM2, pese a no tener valores significativos ($p=0.14$);

sin embargo, el tamaño de la muestra pudiera sesgar la interpretación de estas observaciones, aun así no debe descartarse como haplotipo de susceptibilidad.

X. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados y la discusión presentados en el presente estudio se derivan las siguientes conclusiones:

- En relación a la edad pudimos determinar que la edad es un factor determinante en la presentación de la enfermedad ya que obtuvimos valores significativos $p < 0.001$ al comparar las medias de las edades de los grupos en estudio.
- El sexo femenino se presenta en una proporción de 2:1 con respecto al masculino, lo cual está acorde con lo reportado en otras poblaciones con un predominio del sexo femenino en personas con DM2.
- Pudimos constatar el descontrol metabólico presente en personas con DM2, en relación con personas no diabéticas, ya que se obtuvieron diferencias significativas al comparar las medias obtenidas para algunos parámetros bioquímicos como glucosa y triglicéridos.
- El polimorfismo SNP-43 no afecta la susceptibilidad a padecer DM2 en población sinaloense. Sin embargo, en mujeres presenta $OR=2.32(p=0.30)$ para el genotipo homocigoto GG. Este resultado podría indicar predisposición de mujeres con este genotipo para DM2.
- El polimorfismo SNP-19 no se asoció en a riesgo incrementado para padecer DM2. Tampoco está asociado con obesidad en el grupo de casos con $IMC > 30 \text{ Kg/m}^2$.
- El polimorfismo SNP-63 no se asocia a riesgo de padecer DM2 en nuestra población.
- Los genotipos CC, CT y TT del SNP-63 parecen tener una fuerte asociación con el sexo femenino y riesgo a DM2, ya que para todos ellos hubo valores de OR muy elevados.
- La obesidad es el factor de riesgo de gran relevancia en el desarrollo de DM2 en nuestra población, lo cual fue muy evidente en nuestro estudio.

- Ninguno de los polimorfismos estudiados en nuestra población tiene influencia sobre la susceptibilidad a padecer DM2 cuando se analizan por separado.
- El haplotipo 112 formado por los SNPs 43,19 y 63 no se asocia como haplotipo de riesgo a DM2 en población sinaloense.
- El haplotipo 122 formado por los polimorfismos mencionados presenta un valor de $p=0.001$ en nuestra población y sólo estuvo presente en el grupo control. Al parecer esta combinación haplotípica representa una variante de protección en población sinaloense.
- El haplotipo 222 con $OR=5.24$, se presentó solamente en el grupo de casos y pese a no encontrar resultados significativos no debe de descartarse como haplotipo de susceptibilidad.

Cabe mencionar que los individuos del grupo de pacientes pertenecen a grupos de apoyo a diabéticos donde se les brinda información acerca de su enfermedad y sobre la alimentación que deben seguir. Además, se les da un seguimiento y control por medio de análisis clínicos y medidas antropométricas y de presión arterial periódicamente. Les imparten cursos y pláticas motivacionales para evitar que estos pacientes caigan en depresión, lo cual suele ser muy frecuente en enfermos crónicos con enfermedades degenerativas.

Fue grato ver el interés de los servicios de salud hacia estas personas, y esta atención se refleja en cierto grado en el control de la glicemia, los triglicéridos y el colesterol de algunos pacientes.

GLOSARIO

Anaplerosis: Mecanismo mediante el cual los intermediarios de la vía de el ciclo del ácido cítrico salen de éste y pasan a formar glucosa (gluconeogénesis).

Apoptosis: Muerte celular programada, la cual está regulada genéticamente. Es parte integral del desarrollo de los tejidos, tanto de plantas como de animales pluricelulares. Cuando una célula muere por apoptosis, empaqueta su contenido citoplasmático, lo que evita que se produzca la respuesta inflamatoria, característica de la muerte accidental o necrosis.

Ciclo de Krebs: También llamado ciclo del ácido cítrico o ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Es una ruta metabólica, es decir, una sucesión de reacciones químicas que forma parte de la respiración celular en todas las células aeróbicas. En células eucariotas se realiza en la mitocondria; en las procariotas, en el citoplasma.

Dislipidemias: Son una serie de diversas condiciones patológicas cuyo único elemento común es una alteración del metabolismo de los lípidos, con su consecuente alteración de las concentraciones de lípidos y lipoproteínas en la sangre. En algunos países se le conoce como dislipemia.

Exocitosis: Proceso celular por el cual las vesículas situadas en el citoplasma se fusionan con la membrana citoplasmática y liberan su contenido.

Glucólisis: Del griego *glycos* (azúcar) y *lysis* (ruptura). Es la vía metabólica encargada de oxidar la glucosa con la finalidad de obtener energía para la célula. Consiste en 10 reacciones enzimáticas consecutivas que convierten a la glucosa en dos moléculas de piruvato, el cual es capaz de seguir otras vías metabólicas y así continuar entregando energía al organismo.

Hidrófilico: De la palabra griega *hydros* (agua) y *philia* (amistad). Es el comportamiento de toda molécula que tiene afinidad por el agua. En una disolución o coloide, las partículas hidrófilas tienden a acercarse y mantener

contacto con el agua. Las moléculas hidrófilas son a su vez **lipófilas**, es decir no tienen afinidad por los lípidos o grasas y no se mezclan con ellas.

Hidrofóbicas: En el contexto fisicoquímico, el término se aplica a aquellas sustancias que son repelidas por el agua o que no se pueden mezclar con ella. Un ejemplo de sustancias hidrófobas son los aceites.

Hidrólisis: Del griego: *hudōr* (agua) y *lisis* (ruptura o disociación). Es una reacción química entre una molécula de agua y otra molécula, en la cual la molécula de agua se divide y sus átomos pasan a formar parte de otra especie química. Esta reacción es importante por el gran número de contextos en los que el agua actúa como disolvente.

Hiperglucemia o hiperglicemia: Significa cantidad excesiva de glucosa en la sangre. Etimológicamente *hyper-* en griego significa "demasiado"; *-glyc-* en griego significa "dulce"; *-emia* significa "de la sangre".

Hiperinsulinemia: Elevación de la concentración circulante de insulina. Puede producirse como consecuencia de la secreción autónoma de las células β del páncreas, como sucede en los insulinomas o en la nesidioblastosis, o secundariamente a alteraciones en el vaciamiento gástrico o a la insulinoresistencia de los tejidos periféricos.

Homeostasis: Del griego *'homo* ($\mu\omicron\varsigma$) que significa "similar" y *estasis* ($\sigma\tau\acute{\alpha}\sigma\iota\varsigma$) "posición", "estabilidad"). Es la característica de un sistema abierto o de un sistema cerrado o una conjugación entre ambos, especialmente en un organismo vivo, mediante la cual se regula el ambiente interno para mantener una condición estable y constante.

Incidencia: Número de casos nuevos de una enfermedad que se desarrollan en una población durante un período de tiempo determinado. Hay dos tipos de medidas de incidencia: la incidencia acumulada y la tasa de incidencia.

Lipolisisolipólisis: Proceso metabólico mediante el cual los lípidos del organismo son transformados para producir ácidos grasos y glicerol para cubrir las necesidades energéticas. También se le llama movilización de las grasas o hidrólisis de triacilglicéridos en ácidos grasos y glicerol.

Morbilidad: Del inglés *morbidity*. Es la cantidad de personas o individuos que son considerados enfermos o que son víctimas de enfermedad en un

espacio y tiempo determinados. Es un dato estadístico de altísima importancia para poder comprender la evolución y avance o retroceso de alguna enfermedad, así también como las razones de su surgimiento y las posibles soluciones.

Neoglucogénesis: Del griego *neos* (nuevo), *glykos* (azucarado) y *gennan* (engendrar). Sinónimo: gluconeogénesis. Formación en el organismo (particularmente, en el hígado) de glucógeno a partir de proteínas y de lípidos.

Polimorfismo genético: Hace referencia a la existencia en una población de múltiples alelos de un gen. Es decir, un polimorfismo es una variación en la secuencia de un lugar determinado del ADN entre los individuos de una población, la cual debe aparecer en al menos el 1% de la población.

Prevalencia (P): Proporción de individuos de una población que padecen una enfermedad en un momento o periodo de tiempo determinado. Su cálculo se estima mediante la expresión:

$$P = \frac{\text{Nº de casos con la enfermedad en un momento dado}}{\text{Total de población en ese momento}}$$

Proteólisis: Es la degradación de proteínas ya sea mediante enzimas específicas, llamadas proteasas, o por medio de digestión intramolecular.

Sedentarismo: Es la carencia de actividad física fuerte, como el deporte, lo que por lo general pone al organismo humano en situación vulnerable ante enfermedades especialmente cardíacas. Se presenta con mayor frecuencia en la vida moderna urbana, en sociedades altamente tecnificadas en donde todo está pensado para evitar grandes esfuerzos físicos.

Susceptibilidad genética: Aumento heredado del riesgo de padecer una enfermedad. También se le conoce como predisposición genética.

Tasa de mortalidad: Expresa el número de **defunciones** por cada 1,000 habitantes durante un año. Se expresa en tantos por mil.

$$\text{Tasa de mortalidad} = \frac{\text{Nº de fallecidos} \times 1,000}{\text{Nº de habitantes}}$$

BIBLIOGRAFÍA

1. American Diabetes Association. "Standards of medical Care in Diabetes-2007", Diabetes Care, 3, S4-S38.
2. American Diabetes Association. "Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus-2008", Diabetes Care, 31, 1, S55-S60.
3. American Diabetes Association. "Standards of medical Care in Diabetes-2008", Diabetes Care, 31, 1, S17, S13-14.
4. Calderón M. Epidemiología, genética y mecanismos patogénicos de la diabetes mellitus. Rev Esp Cardiol Supl. 2007;7:3H-11H.
5. SSA. <http://www.salud.gob.mx> (Base de datos de defunciones INEGI/Secretaría de Salud. Dirección General de Información en Salud). (2007).
6. SSA. <http://www.salud.gob.mx> (Base de datos de defunciones INEGI/Secretaría de Salud. Dirección General de Información en Salud). (2009).
7. Ziegler D. Diabetic Cardiovascular Autonomic Neuropathy: Prognosis, diagnosis and Treatment. Diab Metab Rev 1994;10:339-383.
8. Villalpando S, Shamah-Levy T, Rojas R, Aguilar-Salinas CA. Trends for type 2 diabetes and other cardiovascular risk factors in Mexico from 1993-2006. Salud Publica Mex 2010;52 suppl 1:S72-S79.
9. Cruz M, García-Mena J, López-Orduña E, Valladares A, Sánchez R, Wachter-Rodarte N, Aguilar-Gaytán R, Kumate J. Genes candidatos como posibles marcadores de susceptibilidad a Diabetes tipo 2. REB 2005;24:81-86.
10. Organización Mundial de la Salud (2010). *Día Mundial de la Diabetes*. Documento revisado el 27 de septiembre de 2010 de: <http://www.worlddiabetesday.org/es>.
11. Taylor SI. Insulin Action, Insulin Resistance, and Type 2 Diabetes Mellitus. En: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. (Eds). 8^{va} ed, McGraw-Hill NY, USA, 2001;1433-1470.
12. INEGI, CONAPO. Indicadores demográficos básicos, 1990-2050. http://www.conapo.gob.mx/index.php?option=com_content&view=artic

[le&id=125&Itemid=193.](#)

13. King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of Diabetes, 1995-2025. Prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 1998;21:1414-1431.
14. Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica (SUIVE). <http://www.dgepi.salud.gob.mx>.
15. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2006;29 Suppl 1:S43-8.
16. Silva C, Escobedo F, Tusie M. Propuesta para identificar alteraciones genómicas para diabetes gestacional en población Mexicana. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*. 2009;14:83-87.
17. Coutinho M, Gerstein HC, Wang Y, Yusuf S. The relationship between glucose and incident cardiovascular events: A metaregression analysis of published data from 20 studies of 95,782 individual followed for 12,4 yerars. *Diabetes Care* 1999;22:233-240.
18. Matthaei S, Stumvoll M, Kellerer M, Haring HU. Pathophysiology and pharmacological treatment of insulin resistance. *Endocrine Reviews* 2002;21:585-618.
19. Zierath JR, Krook A, Wallberg-Henriksson H.. Insulin action and insulin resistance in human skeletal muscle. *Diabetologia* 2000;43:821-835.
20. Axelseri M, Smith U, Eriksso JW, Taskinen MR, Jansson PA. Postprandial hypertriglyceridemia and insulin resistance in normoglycemic first-degree relatives of patients with type 2 diabetes. *Ann Intern Med*. 1999;131:27-31.
21. Roche E. Diabetes tipo 2: gluco-lipo-toxicidad y disfunción de la célula β pancreática. *Ars Pharmaceutica* 2003;44:313-332.
22. Orho-Melander M, Klannemark M, Svensson MK, Ridderstrale M, Lindgren CM, Groop L. Variants in the calpain-10 gene predispose to insulin resistance and elevated free fatty acid levels. *Diabetes* 2002;51:2658-64
23. Maedler K, Spinas GA, Dyntar D, Moritz W, Kaiser N, Donath MY. Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on beta cell turnover and function. *Diabetes* 2001;50:69-76.

24. Online Mendelian Inheritance in Man.
www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=125853 (noviembre 2011).
25. Bosques J, 2007. Segregación de polimorfismos identificados en los genes de u-calpaína y calpastatina y su relación con el crecimiento el crecimiento corporal y características de la canal de bovinos para carne en Puerto Rico, Universidad de Puerto Rico Recinto Universitario de Mayagüez, 7-10.
26. Díaz-Villaseñor A, Burns A, Hiriart M, Cebrián M, Ostrosky-Wegman. The activity of calpains in lymphocytes is glucose-dependent and is decreased in diabetic patients. *Blood Cells Mol Dis* 2008;40:414-419.
27. Lynn S, Evans JC, White C, Frayling TM, Hattersley AT, Turnbull DM, Horikawa Y, Cox NJ, Bell GI, Walker M. Variation in the calpain-10 gene affects blood glucose levels in the British population. *Diabetes* 2002;51:247-250.
28. Goll D, Thompson V, Li H, Wei W, Cong J. The Calpain System. *Physiol Rev* 2003;83:732-759.
29. Suzuki K, Hata S, Sorimachi H. Structure, activation, and biology of calpain. *Diabetes* 2004;53 Suppl 1:S12-8.
30. Evans JC, Frayling TM, Cassell PG, Saker PJ, Hitman GA, Walker M, Levy JC, O'Rahilly S, Rao PV, Bennett AJ, Jones EC, Menzel S, Prestwich P, Simecek N, Wishart M, Dhillon R, Fletcher C, Millward A, Demaine A, Wilkin T, Horikawa Y, Cox NJ, Bell GI, Ellard S, McCarthy MI, Hattersley AT. Studies of association between the gene for calpain-10 and type 2 diabetes mellitus in the United Kingdom. *Am J Hum Genet* 2001;69:544-552.
31. Patel YM, Lane MD. Role of calpain in adipocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci* 1999;96:1279-1284.
32. Horikawa Y, Oda N, Cox NJ, Li X, Orho-Melander M, Hara M, Hinokio Y, Lindner TH, Mashima H, Schwarz PE, del Bosque-Plata L, Horikawa Y, Oda Y, Yoshiuchi I, Colilla S, Polonsky KS, Wei S, Concannon P, Iwasaki N, Schulze J, Baier LJ, Bogardus C, Groop L, Boerwinkle E, Hanis CL, Bell GI. Genetic variation in the gene

- encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet* 2000;26:163-175.
33. Rasmussen SK, Urhammer SA, Berglund L, Jensen JN, Hansen L, Echwald SM, Borch-Johnsen K, Horikawa Y, Mashima H, Lithell H, Cox NJ, Hansen T, Bell GI, Pedersen O. Variants within the calpain-10 gene on chromosome 2q37 (NIDDM1) and relationships to type 2 diabetes, insulin resistance, and impaired acute insulin secretion among Scandinavian Caucasians. *Diabetes* 2002;51:3561-3567.
 34. Garant MJ, Kao WH, Brancati F, Coresh J, Rami TM, Hanis CL, Boerwinkle E, Shuldiner AR. SNP43 of CAPN10 and the risk of type 2 Diabetes in African-Americans: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Diabetes* 2002;51:231-237.
 35. Horikawa Y, Oda N, Yu L, Imamura S, Fujiwara K, Makino M, Seino Y, Itoh M, Takeda J. Genetic variations in calpain-10 gene are not a major factor in the occurrence of type 2 diabetes in Japanese. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:244-247.
 36. Bodhini D, Radha V, Ghoshb S, Sanapalab K, Partha P, Majumder P, Satyanarayana Raoc M, Mohan V. Association of calpain 10 gene polymorphisms with type 2 diabetes mellitus in Southern Indians. *Metabolism Clinical and Experimental* 2011;60:681-688.
 37. Marshall C, Hitman GA, Partridge CJ, Clark A, Ma H, Shearer TR, Turner MD. Evidence that an isoform of calpain-10 is a regulator of exocytosis in pancreatic beta-cells. *Mol Endocrinol* 2005;19:213-24.
 38. Gorgens H, Schwartz P, Schulze J, Schackert HK. LightCycler assay in the analysis of haplotypes of the type 2 diabetes susceptibility gene CAPN10. *Clin Chem* 2003;49:1405-1408.
 39. Tsai HJ, Sun G, Weeks DE, Kaushal R, Wolujewicz M, McGarvey ST, Tufa J, Viali S, Deka R. Type 2 diabetes and three calpain-10 gene polymorphisms in Samoans: no evidence of association. *Am J Hum Genet* 2001;69:1236-1244.
 40. Paredes M, Lizaraso F, Lissón R, Rodríguez E, Calderón J, Huapaya J. Association of SNP19 in the "calpain 10" gene to type 2 diabetes

- mellitus and risk factors in Peruvian population. *Av Diabetol* 2010;26:184-188.
41. Fingerlin TE, Erdos MR, Watanabe RM, Wiles KR, Stringham HM, Mohlke KL, Silander K, Valle TT, Buchanan TA, Tuomilehto J, Bergman RN, Boehnke M, Collins FS. Variation in three single nucleotide polymorphisms in the calpain-10 gene not associated with type 2 diabetes in a large Finnish cohort. *Diabetes* 2002;51:1644-1648.
 42. Haddad L, Evans JC, Gharani N, Robertson C, Rush K, Wiltshire S, Frayling TM, Wilkin TJ, Demaine A, Millward A, Hattersley AT, Conway G, Cox NJ, Bell GI, Franks S, McCarthy MI. Variation within the type 2 diabetes susceptibility gene calpain-10 and polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:2606-2610.
 43. Casamitjana R, Oriola J. Exploración clínica, funcional y molecular de la diabetes tipo MODY en la práctica clínica. *Endocrinol Nutr* 2004;51(Supl 2):16-21.
 44. Colunga-Rodríguez C, García de Alba J, Salazar-Estrada J, González M. Type 2 diabetes and depression in Guadalajara, México, 2005. *Rev. Salud pública (Bogotá)* 2008;10:137-149.
 45. Stumvoll M, Fritsche A, Madaus A, Stefan N, Weisser M, Machicao F, Häring. Functional significance of the UCSNP-43 polymorphism of the CAPN10 Gene for Proinsulin Processing and Insulin Secretion in nondiabetic Germans. *Diabetes* 2001;50:2161-2163
 46. Chen SF, Lu XF, Yan WL, Huang JF, Gu DF. Variations in the calpain-10 gene are associated with the risk of type 2 diabetes and hypertension in northern Han Chinese population. *Chin Med J* 2007;120:2218-2223.
 47. Goodarzi MO, Taylor KD, Guo X, Quiñones MJ, Cui J, Li Y, Saad MF, Yang H, Hsueh WA, Hodis HN, Rotter JL. Association of the diabetes gene calpain-10 with subclinical atherosclerosis: the Mexican-American Coronary Artery Disease Study. *Diabetes* 2005;54:1228-1232.
 48. Chen Y, Kittles R, Zhou J, Chen G, Adeyemo A, Panguluri RK, Chen W, Amoah A, Opoku V, Acheampong J, Agyenim-Boateng K, Eghan BA Jr, Nyantaki A, Oli J, Okafor G, Ofoegbu E, Osotimehin B, Abbiyesuku F, Johnson T, Fasanmade O, Rufus T, Furbert-Harris P, Daniel HI, Berg

- KA, Collins FS, Dunston GM, Rotimi CN. Calpain-10 gene polymorphisms and type 2 diabetes in West Africans: the Africa America Diabetes Mellitus (AADM) Study. *Ann Epidemiol* 2005;15:153-159.
49. Kang ES, Kim HJ, Nam M, Nam CM, Ahn CW, Cha BS, Lee HC. A novel 111/121 diplotype in the Calpain-10 gene is associated with type 2 diabetes. *J Hum Genet* 2006;51:629-633.
50. Kang ES, Nam M, Kim HJ, Kim HJ, Myoung SM, Rhee Y, Ahn CW, Cha BS, Lee HC. Haplotype combination of Calpain-10 gene polymorphism is associated with metabolic syndrome in type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2006;73:268-275.
51. Pihlajamäki J, Salmenniemi U, Vanttinen M, Ruotsalainen E, Kuusisto J, Vauhkonen I, Kainulainen S, Ng MC, Cox NJ, Bell GI, Laakso M. Common polymorphisms of calpain-10 are associated with abdominal obesity in subjects at high risk of type 2 diabetes. *Diabetologia* 2006;49:1560-1566.
52. Tsuchiya T, Schwarz PE, Bosque-Plata LD, Geoffrey Hayes M, Dina C, Froguel P, Wayne Towers G, Fischer S, Temelkova-Kurktschiev T, Rietzsch H, Graessler J, Vcelák J, Palyzová D, Selisko T, Bendlová B, Schulze J, Julius U, Hanefeld M, Weedon MN, Evans JC, Frayling TM, Hattersley AT, Orho-Melander M, Groop L, Malecki MT, Hansen T, Pedersen O, Fingerlin TE, Boehnke M, Hanis CL, Cox NJ, Bell GI. Association of the calpain-10 gene with type 2 diabetes in Europeans: results of pooled and meta-analyses. *Mol Genet Metab* 2006;89:174-184.
53. Yiqing S, Nai-chieh Y, Yi-Hsiang H, James Su, Lin W, Lesley T, Charles B. Eaton and Simin L. Common genetic variation in calpain-10 gene (CAPN10) and diabetes risk in a multi-ethnic cohort of American postmenopausal women. *Human Mol Genet* 2007;16:2960-2971.
54. Jensen DP, Urhammer SA, Eiberg H, Borch-Johnsen K, Jørgensen T, Hansen T, Pedersen O. Variation in CAPN10 in relation to type 2 diabetes, obesity and quantitative metabolic traits: studies in 6018 whites. *Mol Genet Metab* 2006;89:360-367.
55. Shima Y, Nakanishi K, Odawara M, Kobayashi T, Ohta H. Association of

- the SNP-19 genotype 22 in the calpain-10 gene with elevated body mass index and hemoglobin A1c levels in Japanese. *Clin Chim Acta* 2003;336:89-96.
56. Song Y, You NC, Hsu YH, Sul J, Wang L, Tinker L, Eaton CB, Liu S. Common genetic variation in calpain-10 gene (CAPN10) and diabetes risk in a multi-ethnic cohort of American postmenopausal women. *Hum Mol Genet* 2007;16:2960-2971.
 57. Wiltgen D, Furtado L, Kohek MB, Spritzer PM. CAPN10 UCSNP-43, UCSNP-19 and UCSNP-63 polymorphisms and metabolic syndrome in polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol* 2007;23:173-178.
 58. Malecky M, Moczulski D, Klupa T, Wanic K, Cyganek K, Frey J, Sieradzki J. Homozygous combination of calpain 10 gene haplotypes is associated with type 2 diabetes mellitus in a Polish population. *Eur J Endocrinol* 2002;146:695-699.
 59. Del Bosque-Plata L, Aguilar-Salinas CA, Tusié-Luna MT, Ramírez-Jiménez S, Rodríguez-Torres M, Aurón-Gómez M, Ramírez E, Velasco-Pérez ML, Ramírez-Silva A, Gómez-Pérez F, Hanis CL, Tsuchiya T, Yoshiuchi I, Cox NJ, Bell GI. Association of the calpain-10 gene with type 2 diabetes mellitus in a Mexican population. *Mol Genet Metab* 2004;81:122-6.
 60. Sáez M, González-Sánchez J, Ramírez-Lorca R, Martínez-Larrad, Zabena C, González, Morón F, Ruiz A, Serrano-Ríos M. The CAPN10 Gene is Associated with insulin resistance phenotypes in the Spanish population, *PLoS ONE* 2008;3:e2953.
 61. Song Y, You N, Hsu H, Sul J, Wang L, Tinker L, Eaton C, Lui S. Common genetic variation in calpain-10 gene (CAPN10) and diabetes risk in a multi-ethnic cohort of American postmenopausal women. *Hum Mol Genet* 2007;16:2960-2971.
 62. Shu-Feng C, Xiang-feng L, Wei-li Y, Dong-feng G. Variations in the calpain-10 gene are associated with the risk of type 2 diabetes and hypertension in northern Han Chinese population. *Chin Med J* 2007;120:2218-2223.
 63. Elbein SC, Chu W, Ren Q, Hemphill C, Schay J, Cox NJ, Hanis CL,

- Hasstedt SJ. Role of calpain-10 gene variants in familial type 2 diabetes in Caucasians. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:650-654.
- 64.Ezzidi I, Turki A, Messaoudi S, Chaieb M, Kacem M, Al-Khateeb G, Mahjoub T, Almawi W, Mtiraoui N. Common polymorphism of calpain-10 and the risk of Type 2 Diabetes in a Tunisian Arab population: a case-control study. *BMC Med Genet* 2010;11:75-82.
- 65.McphersonMJ, Quirke P, Taylor GR. *Polymerase Chain Reaction: A Practical Approach*, Ed. 1 Oxford University Press, NY, US. 1991: 21-22, 29-30, 46-48.
- 66.Rodríguez-Sánchez IP, Barrera-Saldaña HA. La Reacción en Cadena de la Polimerasa a Dos Décadas de su Invención. *Ciencia UANL*. 2004; 3:323-335.
- 67.Gustinicich S, Manfioletti G, Del Sal G, Schneider C, Carninci P. A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. *Biotechniques* 1991;11:298-300,302.
- 68.Sambrock J, Russell DW. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* (Third Edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.
- 69.Vinueza-Burgos. PCR en Tiempo Real: la nueva era de la información genética celular. *REDVET*.2009;10:1695-1704.

ANEXO 1

(Consentimiento informado)

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA TOMA DE MUESTRA DE SANGRE PERIFÉRICA PARA EXTRACCIÓN DE ADN

NOMBRE DEL PACIENTE _____

FECHA DE NACIMIENTO _____ SEXO: M ☐ F ☐

REGISTRO DE LABORATORIO _____

Por medio de la presente autorizo a la Dra. Verónica Judith Picos Cárdenas encargada del Laboratorio de Genética y Metabolismo del Hospital General de Culiacán para realizar la toma de muestra periférica, con el fin de realizar extracción de ADN de mi muestra para participar en el proyecto de Investigación **“ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS SNP-43, SNP-19 Y SNP-63 DEL GEN DE LA CALPAÍNA 10 CON DIABETES MELLITUS TIPO 2 EN POBLACIÓN DE SINALOA”**.

Los resultados de dicho estudio podrán ser utilizados para los fines necesarios del proyecto de investigación, tales como la presentación de estos en eventos académicos y de difusión científica, siempre y cuando se mantenga mi privacidad. Es importante señalar que la participación en dicho proyecto es de forma voluntaria, libre y gratuita, y estoy consciente que los resultados serán manejados en una base de datos para fines de investigación no lucrativos.

Por lo tanto, mi firma a continuación constituye el conocimiento de los principios, beneficios y riesgos de este tipo de análisis y ha sido explicado para mi satisfacción por el investigador responsable del proyecto y/o el médico Endocrinólogo. Así también, se ha comprometido a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee con respecto a los resultados obtenidos.

Lugar y fecha _____

Nombre y firma del paciente _____

(Hoja de captación de datos Casos)

“Asociación de los polimorfismos SNP-43, SNP-19 y SNP-63 del gen de la Calpaína 10 con diabetes mellitus tipo 2 en población de Sinaloa”.

ANEXO 3
(Hoja de captación de datos Controles)

“Asociación de los polimorfismos SNP-43, SNP-19 y SNP-63 del gen de la Calpaína 10 con diabetes mellitus tipo 2 en población de Sinaloa”.

CONTROLES

Fecha:		No de Registro:	
Nombre:		Sexo:	
Lugar de nacimiento:			
Edad actual:			
	Glicemia actual:		
Otros medicamentos (prescritos o no):			
Antecedentes familiares de la enfermedad: Sí: ____ No: ____			
Peso:	Talla:	Índice de masa corporal:	
Clasificación de acuerdo al IMC:	Cadera:	Cintura:	
Actividad física:	Alcoholismo:	Tabaquismo:	
Diabetes gestacional:			
TA sistólica:		TA diastólica:	
Hipertensión arterial:			
Colesterol:	Hipercolesterolemia:		
Triglicéridos:	Hipertrigliceridemia:		

COMENTARIOS:

ANEXO 4

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) SIMPLE

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica enzimática para la amplificación *in vitro* de secuencias específicas de ADN por la extensión simultánea de iniciadores de hebras complementarias. Esta técnica fue desarrollada por Kary B. Mullis, por lo que fue galardonado con el Premio Nobel de Química en 1993⁶⁴.

La ADN polimerasa lleva a cabo la síntesis de hebras complementarias de ADN en dirección 5' a 3' empleando un molde de hebra sencilla pero iniciando desde una región de doble hebra. La PCR se realiza en un Termociclador (Figura 17) el cual utiliza este mismo principio, por lo que emplea dos iniciadores sintéticos, cada uno complementario a las hebras opuestas de una región de ADN, previamente desnaturalizada por calor. Los iniciadores hibridan de tal forma que cada reacción de extensión dirige la síntesis de ADN hacia la otra. Esto resulta en la síntesis *denovo* de la región de ADN flanqueada por los iniciadores. Su copiado se logra en forma exponencial a través de repetidos ciclos de diferentes períodos y temperaturas de incubación en presencia de una enzima ADN polimerasa termoestable⁶⁵.



Figura 17. Termociclador marca Eppendorf. Equipo utilizado para la amplificación de secuencias de ADN.

La reacción consta, por lo general, de treinta a cuarenta ciclos repetitivos conformados cada uno de tres pasos; el primero consiste en la ruptura de los puentes de hidrógeno del ADN para desnaturalizarlo, para lo cual se incubaba a una temperatura superior a los 90°C. En el segundo paso ocurre la hibridación de las cadenas desnaturalizadas de ADN con los iniciadores (ADN sintéticos de hebra sencilla), a una temperatura que facilita el apareamiento de las bases nitrogenadas, la que generalmente oscila entre 50°C y 62°C. El tercer paso se efectúa a 72°C, temperatura a la que la ADN polimerasa extiende la longitud de los iniciadores, añadiendo los diferentes deoxinucleótidos trifosfatados libres en el orden que le va dictando la secuencia de nucleótidos de la cadena que actúa como molde⁶⁵.

Antes de iniciar con los ciclos repetitivos se recomienda aplicar una etapa previa de desnaturalización entre 94°C-96°C con el fin de relajar las posibles estructuras secundarias en la cadena de ADN molde. De igual manera, al terminar los ciclos se le da una etapa extra de extensión para que termine de polimerizar los productos incompletos. Cabe señalar que los tiempos y temperaturas óptimas de los ciclos de la reacción deben ser ajustados para cada experimento, de acuerdo con las características del ADN molde, de los iniciadores, del tamaño y tipo de secuencia a amplificar, entre otras.

La PCR requiere de siete componentes esenciales, que deben ser agregados sin omisión, ya que la falta de alguno de ellos impide que la reacción se lleve a cabo. A continuación se describen cada uno de ellos^{64,65}.

a). Solución amortiguadora de PCR

Esta solución generalmente se provee concentrada 10 veces (10X) y comúnmente contiene Tris-HCl (pH 8.4), KCl, MgCl₂, gelatina y detergentes no iónicos como Tween 20 o, en menor cantidad, Tritón X-100. Generalmente la reacción se lleva a cabo a 1X. También se puede hacer uso de algunos adyuvantes como el dimetilsulfóxido (DMS) o albúmina sérica bovina (BSA), los cuales contribuyen a la especificidad de la reacción.

b). Cloruro de Magnesio (MgCl_2)

La función del ión magnesio es muy importante debido a que funciona como cofactor de la ADN polimerasa. Se requiere a una concentración que oscila regularmente entre 1.5 y 2.5 mM. En general, concentraciones insuficientes de Mg^{2+} dan lugar a un bajo rendimiento de la PCR; mientras que en exceso se obtienen amplificaciones inespecíficas.

c). Deoxi-ribonucleótidos trifosfatados (dNTPS)

Los dNTPs (dATP, dTTP, dCTP y dGTP) son los ladrillos con los que se construyen nuevas cadenas de ADN. La concentración de cada uno debe estar balanceada, en la mayoría de los casos oscila entre 0.2 y 1 mM. Concentraciones altas de estos pueden afectar el desempeño de la enzima o incluso inhibir su actividad. Además, los dNTPs pueden captar iones Mg^{2+} por lo que las concentraciones de ambos componentes deben guardar siempre la misma relación de Mg^{2+} ; 0.5 a 1 mM superior a la concentración de los dNTPs.

d). Iniciadores

También llamados cebadores u oligonucleótidos, constituyen el componente más sensible que determina el éxito de un ensayo de PCR. Su longitud varía de 18-30 bases. Se recomienda que su secuencia tenga un contenido similar de G + C, un mínimo de estructura secundaria (es decir, complementariedad así mismo) y una baja complementariedad uno con el otro, particularmente en la región 3'. La concentración a la que suelen emplearse en una PCR está entre 5 a 10 pM. Con el fin de optimizar la reacción, es necesaria una temperatura óptima para el alineamiento de los iniciadores.

e). Enzima ADN polimerasa

Sólo pueden utilizarse polimerasas capaces de actuar a altas temperaturas. La Taq polimerasa es la más usada. Es aislada de la arqueobacteria termofílica *Thermus aquaticus*; trabaja a 72°C e incorpora cerca de 100 nucleótidos/s, es estable aún por encima de los 92°C. Existen otras como Vent (*Thermococcus litorales*), la Pfu (*Pyrococcus furiosus*) o la rTth

(*Thermus thermophilus*).

f). ADN molde

La cantidad de ADN molde puede variar de 1 ng, en el caso del material genético clonado (a partir de virus o plásmidos), hasta un mínimo de 20 ng, cuando se utiliza el ADN genómico de células eucariotas. No es necesario purificar el ADN molde para una amplificación exitosa, pero es importante asegurarse de que no se encuentren presentes inhibidores de la reacción como lo son los detergentes, el EDTA o rastros del fenol.

g). Agua

El agua se use como un solvente de los componentes necesarios para la amplificación de ADN por PCR que se mencionaron anteriormente. El agua debe estar destilada y estéril.

ANEXO 5

MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE ADN (Micrometodo-Macrometodo)

El procedimiento consistió en tomar una muestra de sangre periférica en individuos sinaloenses, previo consentimiento informado, en tubo de 5 ml con anticoagulante EDTA. Se procedió a extraer ADN genómico con este método, el cual utiliza un par de detergentes catiónicos (DTAB y CTAB), para el aislamiento del ADN a partir de tejidos o células cuyo contenido de proteínas, lípidos y polisacáridos es elevado, por ejemplo: sangre, tejidos vegetales o incluso bacterias Gram-negativas⁶⁶.

En este método se incubaba la sangre directamente con el detergente DTAB, este actúa sobre la sangre formando complejos con las proteínas y demás componentes celulares, con excepción de los ácidos nucleicos. Los complejos formados con el DTAB Y CTAB precipitan formando una fase sólida la cual es desechada. Los ácidos nucleicos son fijados con el cloroformo, lo que permite que puedan ser retenidos en la fase acuosa, a ésta se le adiciona NaCl para la precipitación del ADN.

PROCEDIMIENTO

1. Tomar de 5-10 ml de sangre periférica en un tubo con EDTA.
2. Transferir la sangre a un tubo de 15 ml, agregar 10 ml de solución de lisis de eritrocitos fría y llevar al congelador durante 15 min. Centrifugar a 4,000 rpm durante 15 min. Descartar el sobrenadante. Tener cuidado de no desechar el botón de leucocitos.
3. Agregar de nuevo 10 ml de solución de lisis de eritrocitos fría. Centrifugar a 4,000 rpm durante 15 min. Descartar el sobrenadante. Este paso se realiza hasta que el botón de leucocitos esté libre de eritrocitos (3-4 veces). Cada vez que se descarta el sobrenadante se debe tener la precaución de no desechar el botón celular.
4. Transferir el botón de leucocitos a un tubo de 2 ml.
5. Agregar 600 µl de buffer DTAB al 8% y llevar a 65-68⁰C durante 5 min.
6. Agregar 900 µl de cloroformo al 100%, agitar vigorosamente y

- centrifugar a 12,000 rpm durante 7 min.
7. Después de la centrifugación se forman dos fases; la que importa es la fase superior. Obtener esta fase y transferirla a otro tubo de 2 ml. Tener cuidado de no tomar de la fase de abajo. Desechar el tubo con la fase de abajo.
 8. Al sobrenadante rescatado se le agregan 100 µl de buffer CTAB al 5% y se agita suavemente por inversión (8-10 veces), posteriormente se agregan 900 µl de agua inyectable y se agita suavemente (aquí se observa el ADN).
 9. Centrifugar a 10,000 rpm durante 5 min.
 10. Descartar el sobrenadante y agregar 150 µl de NaCl 1.2 M y 750 µl de etanol al 100% frío y se mezcla suavemente por inversión.
 11. Centrifugar a 10,000 rpm durante 5 min.
 12. Descartar el sobrenadante y agregar 1 ml de etanol al 70%. Centrifugar a 10,000 rpm durante 5 min (este paso se realiza tres veces).
 13. Descartar el sobrenadante y dejar evaporar el exceso de etanol a temperatura ambiente hasta que el botón de ADN quede completamente seco.
 14. Disolver el ADN en 100-300 µl de agua inyectable e incubar a 65°C durante 1 h. El volumen de agua dependerá del tamaño del botón de ADN.
 15. Determinar la concentración y la calidad del ADN por espectrofotometría.
 16. Almacenar el ADN a -20°C

CUANTIFICACIÓN DEL ADN Y DETERMINACION DE LA PUREZA

Debido a que la cantidad de ADN es esencial para el análisis exitoso de las muestras, se debe cuantificar por espectrofotometría, la cual se fundamenta en la capacidad de los ácidos nucleicos de absorber luz ultravioleta (UV) a una longitud de onda de 260 nm, lo que permite calcular la concentración de éstos en la muestra⁶⁷. Una densidad óptica (DO) de 1 corresponde a aproximadamente 50 µg/ml para ADN de doble cadena, 40 µg/ml para ADN de cadena sencilla o ARN y aproximadamente 33 µg/ml de oligonucleótidos de hebra sencilla⁶⁷. La pureza del ADN en solución se determina calculando la tasa DO 260/DO 280 nm. Para considerar un ADN de buena calidad la tasa debe fluctuar entre el 1.6 a 1.8. Los valores mayores a 1.8 pueden ser causadas por contaminación por ARN y las inferiores a 1.6 nos indican la presencia de sales o proteínas⁶⁷.

PROCEDIMIENTO (Modificado de Eppendorf, 2000)

1. En el menú principal seleccionar el rango de lectura.
2. Introducir datos de dilución al espectrofotómetro (5 µl de la muestra + 50 µl de diluyente).
3. Primero agregar 50 µl de agua estéril a la cubeta de plástico para usarse como blanco.
4. Colocar el blanco en la celdilla de cuantificación de manera que el haz de luz atraviese a lo largo de la cubeta. La lectura debe ser de 0.00 de Absorbancia.
5. Preparar la muestra a cuantificar agregando a la cubeta de medición 50 µl de agua estéril y agregar 5 µl de muestra previamente homogenizada a la cubeta de cuantificación con el agua (diluyente) y homogenizar a lo largo de la cubeta con la ayuda de la puntilla colocada en la micropipeta tipo Eppendorf.
6. Colocar la cubeta en la celdilla de espectrofotómetro de manera que el haz de luz atraviese toda la dilución.
7. Toma tres lecturas a la muestra y obtener la medida de concentración y pureza. La concentración está dada en µg/µl.

ANEXO 6

ELECTROFORESIS

La electroforesis describe la migración de una partícula bajo la influencia de un campo eléctrico. Los ácidos nucleicos con carga parcial negativa permiten que estos migren hacia el polo positivo al aplicar un campo eléctrico. Para lo cual se utiliza un medio de soporte. En este caso se trata de una matriz gelatinosa que puede ser agarosa o poliacrilamida y una solución que conduce la electricidad en el medio conocida como amortiguador de electroforesis⁶⁷.

Amortiguador de electroforesis

Los amortiguadores de electroforesis tienen la capacidad de conducir la electricidad debido a su contenido de iones. Los más utilizados contienen Tris-acetato y EDTA (PH 8.0; TAE), Tris-borato (TBE) o Tris-fosfato (TPE) en una concentración aproximada de 50 mM. El TAE es el que tiene la capacidad amortiguadora más baja de los tres, y su potencia se agota si la electroforesis se realiza por periodos prolongados. Tanto el TBE como el TPE son ligeramente más caros que el TAE, pero poseen una capacidad de amortiguamiento significativamente mayor. Sin embargo la resolución del TAE es ligeramente mejor que la del TBE y TPE para fragmentos de alto tamaño molecular, no así para fragmentos de bajo tamaño molecular⁶⁷.

Amortiguador de carga

El amortiguador de carga se mezcla con las muestras antes de depositarlas en los pocillos del gel. Estos amortiguadores sirven para tres propósitos: 1). Incrementar la densidad de la muestra, asegurándose que esta se hunda dentro del pozo y permanezca en el fondo; 2). Darle color a la muestra, lo que simplifica el proceso; 3). Y además contiene colorantes que, en un campo eléctrico, migran al ánodo a velocidades predecibles. Estos amortiguadores contienen, por lo general, azul de bromofenol y xilencianol como colorantes; y glicerol o sacarosa, que le dan densidad⁶⁷.

ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

Lapoliacrilamida es un soporte empleado frecuentemente en geles para electroforesis. Es químicamente inerte, de propiedades uniformes, puede ser preparado de forma rápida y reproducible. Además forma geles transparentes con estabilidad mecánica, insolubles en agua, relativamente no iónicos y permiten buena visualización de las bandas durante un tiempo prolongado. Además, tienen la ventaja que al variar la concentración de polímeros, se puede modificar de manera controlada el tamaño de los poros⁶⁷. Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización vinílica del monómero acrilamida ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) y de monómero entrecruzador N,N'-metilen-bis-acrilamida ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$). Dicha polimerización se inicia con la formación de radicales libres de oxígeno del monómero, debido a la acción de iones persulfato. Las aminas terciarias como la N,N,N,N'-tetrametilen-diamina (TEMED) se emplean como catalizadores de esta reacción, porque causan la formación de radicales libres de persulfato. Los geles de poliacrilamida tienen 3 grandes ventajas sobre los geles de agarosa⁶⁷.

- 1) Su gran poder de resolución permite separar moléculas de ADN que difieran en longitud en tan solo 1 pb.
- 2) Pueden soportar cantidades mucho más grandes de ADN que los geles de agarosa. Hasta 10 µg de ADN pueden aplicarse a cada pocillo (1 cm x 1 mm) sin pérdida significativa de resolución.
- 3) El ADN recuperado de estos geles es extremadamente puro y puede usarse para otros propósitos (ej. secuenciación).

Se utilizan dos tipos de geles de poliacrilamida⁶⁷.

- ***Geles desnaturalizantes.** Loscuales son utilizados para separación y purificación de fragmentos de ADN de hebra sencilla. Estos geles son polimerizados en presencia de agentes que suprimen el apareamiento de bases en ácidos nucleicos (urea y/o, menos frecuentemente, formamida).

- ***Geles no desnaturalizantes.** Que son utilizados para la separación y purificación de fragmentos de ADN de doble hebra.

PREPARACIÓN DEL GEL Y CORRIMIENTO ELECTROFORÉTICO

ELECTROFORESIS

- 1 Preparar el molde de vidrio.
- 2 Preparar un gel de poliacrilamida (29:1) al 6%.
- 3 Verter la solución de poliacrilamida en el molde y colocar el peine.
- 4 Esperar a que solidifique y quitar el peine.
- 5 Colocar el molde sobre un soporte vertical bien nivelado.
- 6 Agregar suficiente buffer de corrimiento (TBE 1X) hasta cubrir los extremos del gel.
- 7 Aplicar precorrimento de 10 minutos a 200 voltios, con el fin de homogenizar las cargas eléctricas.
- 8 Mezclar 5 μ l del producto amplificado con 3 μ l de buffer cargador y aplicar sobre el gel.
- 9 Realizar el corrimiento a 200 voltios durante 2.5 horas.

TINCIÓN DEL GEL

- 1 Colocar el gel en 150 ml de solución fijadora durante 10 min.
- 2 Sacarlo y colocarlo en 150 ml de solución de AgNO_3 .
- 3 Enjuagar en agua destilada 3 veces.
- 4 Agregar 150 ml de solución reveladora y esperar a que se observen las bandas.
- 5 Escurrir la solución reveladora. Colocar el gel en solución fijadora.
- 6 Por último, enjuagar con agua destilada y escurrir.

ANEXO 7
(Preparación de reactivos)

PARA EXTRACCIÓN DE ADN

Solución de cloruro de amonio 0.144 M

Reactivos	Cantidad
NH ₄ Cl	7.702
H ₂ O destilada cbp	1000 ml

Disolver y esterilizar.

Solución de bicarbonato de amonio 0.01 M

Reactivos	Cantidad
NH ₄ HCO ₃	0.079 g
H ₂ O destilada cbp	100 ml

Disolver y esterilizar.

Amortiguador de lisis de eritrocitos (10:1)

Tomar de referencia las soluciones preparadas anteriormente y mezclar 500 ml de solución de NH₄Cl 0.144 M con 50 ml de solución de NH₄HCO₃ 0.01 M. Almacenar la solución a 4°C en el frasco ámbar.

Amortiguador de lisis de eritrocitos (9:1)

Mezclar 450 ml de solución NH₄Cl 0.144 M con 50 ml de solución NH₄HCO₃ 0.01 M. Almacenar la solución a 4°C en frasco ámbar.

Amortiguador DTAB

Reactivos	Cantidad
DTAB 8%	8 g
Tris-HCl 100 mM	1.21 g
NaCl 1.2 M	7 g
EDTA 50 mM	1.86 g

H₂O destilada cbp 100 ml

Disolver el Tris-HCl y ajustar el pH 8.6 en tres cuartos del volumen final, adicionar el DTAB, el NaCl y el EDTA, aforar el volumen final y esterilizar.

Amortiguador CTAB

Reactivos	Cantidad
CTAB 5%	5 g
NaCl 400 mM	2.34 g
H ₂ O destilada cbp	100 ml

Disolver y esterilizar.

Solución de cloruro de sodio 1.2 M

Reactivos	Cantidad
NaCl	7.01 g
H ₂ O destilada cbp	100 ml

Disolver y esterilizar.

REACTIVOS USADOS EN LA ELECTROFORESIS Y TINCIÓN DEL GEL

Solución patrón de acrilamida-bisacrilamida (29:1) al 40%

Reactivos	Cantidad
Acrilamida	38.67 g
Bisacrilamida	1.33 g
H ₂ O destilada cbp	100 ml

Solución fijadora

Reactivos	Volumen
Etanol	100 ml
Ácido acético	5 ml
H ₂ O destilada cbp	1000 ml

Solución de tinción

Reactivos	Cantidad
AgNO ₃	0.5 g
Solución Fijadora	250 ml

Solución reveladora

Reactivos	Cantidad
NaOH	15 g
Formaldehído	2.5 ml
H ₂ O destilada cbp	500 ml

Buffer TBE (tris-boratos- EDTA) al 10X

Reactivos	Cantidad
Tris base	108 g
Acido bórico	55 g
EDTA	5.8 g
H ₂ O destilada cbp	1000 ml

La solución de trabajo fue de 1X.

Buffer cargador 10X

Reactivos	Cantidad
Azul de Xilencianol	25 mg
Azul de Bromofenol	25 mg
Glicerol	3 ml
H ₂ O destilada cbp	10 ml

Dilución del marcador de peso molecular (0.1 µg/µl).

Reactivos	Cantidad
Escalera de 100 pb	10 µl
Buffer cargador	30 µl
H ₂ O destilada cbp	100 µl

Persulfato de amonio al 10%

Reactivos	Cantidad
PSA	0.5 g
H ₂ O destilada	5 ml

ANEXO 8

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL

La identificación de la expresión genética y de secuencias específicas de ADN o ARN es un factor crucial cuando se trabaja con técnicas de biología molecular. Para obtener esta información han sido desarrolladas algunas pruebas. La PCR en tiempo real (PCR-TR) una de las más usadas. Esta técnica brinda una gran cantidad de datos con una alta sensibilidad y especificidad al usar plataformas modernas que evitan la contaminación. Está basada en la reacción en cadena de polimerasa (PCR) descrita ampliamente en páginas anteriores, y se usa para detección de la amplificación por medio de fluorescencia⁶⁸. El sistema incluye dos componentes indispensables para su adecuado funcionamiento: incorpora elementos ópticos integrados al termociclador (Figura 18) y marcadores fluorescentes.



Figura 18. Termociclador LigthCycler 1.5 de Roche. A. Capilares de 20 µL y tapa. B. LigthCycler abierto y carrusel con capilares.

La detección de la fluorescencia a diferentes longitudes de onda se consigue por la combinación de varias características de la técnica y el equipo. El uso de sondas marcadas con fluorocromos (FRET, TaqMan, Molecular Beacon) y el uso de agentes intercalantes fluorescentes como el SYBR Green,

pueden ser medidos gracias a que el equipo cuenta con una unidad óptica que contiene un diodo LED (Light emitting diode), que emite luz azul (470 nm) que excita los fluorocromos amarillos, fluoresceína y SYBR Green a tres canales que detectan la luz emitida por los fluorocromos o el SYBR Green en tres diferentes longitudes de onda: luz verde (530 nm, fluoresceína y SYBRGreen), luz roja (640 nm, LightCycler-Red 640) y cerca del infrarrojo (710 nm, LC Red 700).

La lectura de la fluorescencia se efectúa en cada ciclo y en cada muestra de manera rápida y precisa en aproximadamente uno 20 milisegundos y el sistema de medición por fluorescencia permite observar la evolución de la PCR-TR en la pantalla del ordenador, además cuenta con la ventaja que estos se llevan a cabo de manera simultánea y en el mismo reservorio llamado Capilar (Figura 12), por lo que se evita la contaminación y así podemos obtener datos fiables y precisos⁶⁸. El sistema Lightcycler permite el uso de distintos protocolos para la incorporación y detección de la fluorescencia. Las dos técnicas más comunes son:

Mediante agentes que se intercalan en la molécula de ADN: Son fluorocromos que aumentan la emisión de la fluorescencia al unirse al ADN de doble hélice. El más empleado es SYBR Green I, pero tienen la desventaja de tener baja especificidad, ya que se unen de forma indistinta a productos generados inespecíficamente o a dímeros de los cebadores. Su uso tiene la ventaja de que la optimización de las condiciones de reacción es muy fácil y económico en comparación con las sondas específicas. El análisis con sondas específicas marcadas con dos tipos de fluorocromos, un donador y un aceptor se basan en el principio de que el fluoróforo donador, excitado por una fuente luz, emite una luz con longitud de onda que se solapa con la excitación del segundo fluoróforo próximo a él llamado aceptor. Las más utilizadas son las sondas de hidrólisis (Taqman), las sondas *molecular beacons* y las sondas basadas en la transferencia de energía resonante fluorescente (FRET)⁶⁸.

ANEXO 9

(Cuadro de frecuencias de genotipos del gen CAPN10 Controles)

Controles	Status (Controles)	SNP-43	SNP-19	SNP-63
1	2	1	2	2
2	2	2	1	2
3	2	1	1	2
4	2	2	0	2
5	2	1	1	1
6	2	0	2	2
7	2	1	2	2
8	2	1	1	1
9	2	2	1	2
10	2	2	2	2
11	2	1	2	2
12	2	1	2	2
13	2	2	2	2
14	2	1	2	1
15	2	0	2	2
16	2			
17	2	0	2	2
18	2	2	2	2
19	2			
20	2	1	1	1
21	2			
22	2			
23	2			
24	2	2	1	2
25	2	2	2	2
26	2	1	2	2
27	2	1	2	2
28	2	1	2	2

29	2			
30	2	2	2	2
31	2	0	2	2
32	2	2	1	1
33	2	2	1	1
34	2	2	1	1
35	2	1	1	2
36	2	0	2	2
37	2	1	2	2
38	2	2	1	1
39	2	0	2	2
40	2	2	1	2
41	2	1	1	2
42	2	1	1	1
43	2	1	2	1
44	2	1	2	2
45	2	1	1	2
46	2	1	1	1
47	2	1	2	2
48	2	2	1	2
49	2	2	1	1
50	2	2	0	2
51	2	1	1	2
52	2	2	1	1
53	2	2	2	2
54	2	2	1	2
55	2	2	2	2
56	2	0	2	2
57	2	1	2	2
58	2	2	0	2
59	2	2	1	2

60	2			
61	2	0	2	2
62	2	2	2	2
63	2	2	2	2
64	2	1	1	2
65	2	2	2	2
66	2	2	1	2
67	2		1	
68	2	2	2	2
69	2	2	1	2
70	2	2	0	1
71	2	2	1	2
72	2	1	2	2
73	2	1	2	2
74	2	1	2	2
75	2	1	2	2
76	2	2	1	2
77	2		1	
78	2	2	1	2
79	2	1	2	
80	2	0	1	2
81	2	2	0	2
82	2	1	1	1
83	2	1	2	2
84	2	1	1	2
85	2	2	1	2
86	2	2	2	1
87	2	1	1	2
88	2	2	1	2
89	2		2	1
90	2	2	1	1

91	2	1	1	1
92	2	2	0	2
93	2	1	2	2
94	2	1	1	2
95	2	0	2	2
96	2	2	1	
97	2	2	2	
98	2	2	1	2
99	2	1	2	2
100	2	1	2	2
101	2	2	0	2
102	2	2	0	2
103	2	1		2
104	2	2		2
105	2	0		2
106	2	2		2
107	2	2		1
108	2	1		1
109	2	1		2
110	2	2		2
111	2	1		2
112	2	2		2
113	2	2		2
114	2	2		1
115	2	2		
116	2	1		2
117	2			
118	2			
119	2	1		2
120	2	1		1
121	2	1		2

122	2	2	0	2
123	2		1	
124	2		2	2
125	2	1	1	2
126	2	2	2	2
127	2		2	
128	2	2	1	1
129	2	2	1	2
130	2	1	1	
131	2		2	2
132	2	1	2	2
133	2	1	1	1
134	2		1	
135	2	1	1	
136	2	2	0	
137	2	1	2	
138	2	2	2	2
139	2		0	
140	2	2	1	2
141	2	2	1	2
142	2	1	2	2
143	2	1	1	2
144	2		0	0
145	2	2	1	1
146	2	2	1	
147	2	1	2	2
148	2	2	0	0
149	2	2	0	
150	2	1	2	2
151	2	2	1	1
152	2		1	1

153	2	1	1	1
154	2	1	1	1
155	2	1	2	1
156	2			
157	2			
158	2			
159	2			
160	2	1	1	2
161	2			
162	2	1	2	2
163	2			
164	2	2	2	2
165	2			
166	2			
167	2	0	2	2
168	2			
169	2			
170	2			
171	2			
172	2			
173	2			
174	2			
175	2	2	2	2
176	2			2
177	2	2	1	2
		HH: 68	HH: 62	HH: 105
		Hh: 60	Hh: 58	Hh: 32
		hh: 12	hh: 14	hh: 2
		n = 140	n = 134	n = 137

El número 2 corresponde al homocigoto silvestre.

El número 1 corresponde al heterocigoto.

El número 0 corresponde al homocigoto variante.

ANEXO 10

(Cuadro de frecuencias de genotipos del gen CAPN10 Casos)

Casos	Status (Pacientes)	SNP-43	SNP-19	SNP-63
1	1	1	1	1
2	1	2	0	1
3	1	1	1	2
4	1	1	1	1
5	1	0	2	2
6	1	2	0	2
7	1			
8	1			
9	1	1	1	2
10	1	0	2	2
11	1	2	0	2
12	1	1	2	1
13	1	2	0	1
14	1	2	1	2
15	1	2	2	2
16	1	2	2	2
17	1	2	1	1
18	1	1	2	2
19	1	1	1	1
20	1	1	1	2
21	1	2	1	2
22	1	1	1	1
23	1	2	1	1

24	1	2		2
25	1	2	1	2
26	1	1	1	1
27	1	0	2	2
28	1	1	1	1
29	1	2	0	1
30	1	1	1	2
31	1	1	1	2
32	1	2	2	2
33	1	0	2	2
34	1	2	1	2
35	1	1	0	2
36	1	1	1	
37	1	2	1	1
38	1	2	0	2
39	1	2	1	2
40	1	0	2	2
41	1	2	1	1
42	1	2	1	1
43	1	1	1	
44	1	1	2	2
45	1	1	1	1
46	1	1	1	2
47	1	2	1	
48	1	2	1	2
49	1	2	2	2
50	1	2	2	2
51	1	2	0	2
52	1			
53	1	1	2	2
54	1	2	1	1

55	1	1	1	1
56	1	2	1	2
57	1	1	2	2
58	1	2	1	1
59	1	1	2	2
60	1	1	2	2
61	1	2	1	2
62	1	2	2	2
63	1	2	0	0
64	1	0	2	2
65	1	2	0	1
66	1	1	1	1
67	1	1	1	1
68	1	1	2	2
69	1	0	2	2
70	1	2	1	2
71	1	2	0	2
72	1	2	2	2
73	1	2	2	2
74	1	1	2	2
75	1	1	2	1
76	1	2	0	2
77	1	0	2	2
78	1	1	1	1
79	1	2	0	0
80	1	2	2	2
81	1	2	0	1
82	1	1	2	2
83	1	2	1	1
84	1	1	1	1
85	1	1	2	2

86	1	2	2	2
87	1	1	1	2
88	1	2	1	2
89	1	1	2	2
90	1	2	1	1
91	1	2	2	2
92	1	2	1	2
93	1	2	0	0
94	1	1	2	2
95	1	2	1	2
96	1	2	0	0
97	1	1	2	2
98	1	1	2	2
99	1	1	1	2
100	1	1	2	2
101	1	1	1	1
102	1	0	2	2
103	1	2	1	2
104	1	2	2	2
105	1	0	2	2
106	1	2	0	1
107	1	1	2	2
108	1	2	1	2
109	1	2	2	2
110	1	0	2	2
111	1	2	1	1
112	1	2	2	2
113	1	1	2	2
114	1	2	2	2
115	1	1	2	2
116	1	1	1	2

117	1	1	2	2
118	1	1	2	2
119	1	2	2	2
120	1	2	1	2
121	1	2	2	2
122	1	2	1	1
123	1	2	1	2
124	1	2	2	2
125	1	1	2	2
126	1	1	1	1
127	1	1	1	2
128	1	2	1	1
129	1	1	1	1
130	1	2	1	2
131	1	1	1	2
132	1	2	1	2
133	1	2	1	2
134	1	0	2	2
135	1	1	1	2
136	1	2	1	2
137	1	1	2	2
138	1	1	2	2
139	1	2	1	1
140	1	2	1	2
141	1	2	1	2
142	1	1	1	1
143	1	2	0	1
144	1	1	1	1
145	1	1	1	1
146	1	0	2	2
147	1	2	1	2

148	1	1	1	2
149	1	1	0	2
150	1	2	1	2
151	1	2	2	2
152	1	2	0	1
153	1	2	0	0
154	1	1	1	1
155	1	1	1	2
156	1	2	2	2
157	1	2	2	2
158	1	2	1	1
159	1	2	2	2
160	1	2	1	2
161	1	2	1	2
162	1	2	2	2
163	1	1	1	2
164	1	2	0	1
165	1	1	2	2
166	1	1	1	1
167	1	2	1	2
168	1	2	1	2
169	1		0	
170	1	1	1	2
171	1	2	2	2
172	1		2	
173	1		1	
174	1		2	
175	1		2	
176	1	1	0	1
177	1	2	1	2
178	1	2	1	2

179	1	1	1	2
180	1	1	1	1
181	1	1	2	2
182	1	2	1	2
183	1	1	1	2
184	1	0	2	2
185	1	2	1	2
186	1		1	
187	1			
188	1	2	2	2
189	1	1	1	2
190	1	2	2	2
191	1	2	1	2
192	1	2	1	2
193	1			
194	1	1	2	2
195	1	1	2	2
196	1	1	2	2
197	1	2	0	1
198	1			
199	1	1	1	2
200	1		2	
201	1	2	1	1
202	1	1	1	2
203	1	1	1	2
204	1			
205	1			
206	1		2	
207	1	1	1	1
208	1	1	2	2
209	1	2	1	1

210	1	2	1	1
211	1		1	
212	1		1	
213	1		0	
214	1	1	1	2
215	1	1	1	2
216	1	2	1	1
217	1	1	1	1
218	1			
219	1	2	2	2
220	1	2	0	0
		HH: 102	HH: 76	HH: 137
		Hh: 84	Hh: 106	Hh: 53
		Hh: 14	Hh: 28	Hh: 6
		n =200	n = 210	n =196

NOTA: La base de datos está diseñada para el análisis de haplotipos.

El número 2 corresponde al homocigoto silvestre.

El número 1 corresponde al heterocigoto.

El número 0 corresponde al homocigoto variante.

ANEXO 11
CÁLCULOS ESTADÍSTICOS PARASNP-43, SNP-19 Y SNP-63
(Análisis del Equilibrio de Hardy-Weinberg)

Para este análisis y el de OR se utilizó la página Web <http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/ihg/snps.html> del Institute of Human Genetics de Helmholtz Center Munich

SNP	Tests for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium		Tests for association (C.I.: 95% confidence interval)				
	Controls	Cases	allele freq. difference	heterozygous	homozygous	allele positivity	Armitage's trend test
SNP-43	n11=68 (68.60) n12=60 (58.80) n22=12 (12.60) f _a 1=0.70 +/- 0.027 F=-0.02041 p=0.809189 (Pearson) p=0.808684 (Llr) p=1.000000 (Exact)	n11=102 (103.68) n12=84 (80.64) n22=14 (15.68) f _a 1=0.72 +/- 0.022 F=-0.04167 p=0.555690 (Pearson) p=0.552835 (Llr) p=0.725328 (Exact)	Risk allele 2				
			[1]<->[2]	[11]<->[12]	[11+]<->[22]	[11]<->[12+22]	common odds ratio
			Odds_ratio=0.907 C.I.=[0.648-1.270] chi2=0.32 p=0.57093 (P)	Odds_ratio=0.933 C.I.=[0.594-1.466] chi2=0.09 p=0.76458	Odds_ratio=0.778 C.I.=[0.339-1.783] chi2=0.35 p=0.55212	Odds_ratio=0.907 C.I.=[0.589-1.398] chi2=0.19 p=0.65937	Odds_ratio=0.897 chi2=0.33 p=0.56459
			Risk allele 1				
			[2]<->[1]	[22]<->[12]	[22]<->[11]	[11+12]<->[22]	common odds ratio
			Odds_ratio=1.102 C.I.=[0.787-1.542] chi2=0.32 p=0.57093 (P)	Odds_ratio=1.200 C.I.=[0.518-2.777] chi2=0.18 p=0.66998	Odds_ratio=1.286 C.I.=[0.561-2.948] chi2=0.35 p=0.55212	Odds_ratio=1.246 C.I.=[0.558-2.781] chi2=0.29 p=0.59153	Odds_ratio=1.116 chi2=0.33 p=0.56459
SNP-19	n11=14 (13.80) n12=58 (58.40) n22=62 (61.80)	n11=28 (31.24) n12=106 (99.51) n22=76 (79.24)	Risk allele 2				
			[1]<->[2]	[11]<->[12]	[11+]<->[22]	[11]<->[12+22]	common odds ratio

	f_a1=0.32 +/- 0.029 F=0.00690 p=0.936337 (Pearson) p=0.936380 (Llr) p=1.000000 (Exact)	f_a1=0.39 +/- 0.023 F=-0.06517 p=0.344936 (Pearson) p=0.343522 (Llr) p=0.384790 (Exact)	Odds_ratio=0.753 C.I.=[0.545-1.040] chi2=2.98 p=0.08421 (P)	Odds_ratio=0.914 C.I.=[0.446-1.872] chi2=0.06 p=0.80530	Odds_ratio=0.613 C.I.=[0.297-1.264] chi2=1.77 p=0.18285	Odds_ratio=0.758 C.I.=[0.384- 1.499] chi2=0.64 p=0.42536	Odds_ratio=0.759 chi2=3.09 p=0.07893
			Risk allele 1				
			[2]<->[1]	[22]<->[12]	[22]<->[11]	[11+12]<->[22]	common odds ratio
			Odds_ratio=1.329 C.I.=[0.962-1.836] chi2=2.98 p=0.08421 (P)	Odds_ratio=1.491 C.I.=[0.938- 2.370] chi2=2.86 p=0.09074	Odds_ratio=1.632 C.I.=[0.791-3.365] chi2=1.77 p=0.18285	Odds_ratio=1.518 C.I.=[0.977- 2.360] chi2=3.46 p=0.06292	Odds_ratio=1.312 chi2=3.09 p=0.07893
			Risk allele 2				
			[1]<->[2]	[11]<->[12]	[11+]<->[22]	[11]<->[12+22]	common odds ratio
	n11=105 (105.33) n12=32 (31.34) n22=2 (2.33) f_a1=0.87 +/- 0.020 F=-0.02112 p=0.803357 (Pearson) p=0.799819 (Llr) p=1.000000 (Exact)	n11=137 (136.39) n12=53 (54.22) n22=6 (5.39) f_a1=0.83 +/- 0.019 F=0.02254 p=0.752380 (Pearson) p=0.755133 (Llr) p=0.795171 (Exact)	Odds_ratio=1.336 C.I.=[0.861-2.074] chi2=1.68 p=0.19546 (P)	Odds_ratio=1.269 C.I.=[0.764- 2.108] chi2=0.85 p=0.35604	Odds_ratio=2.299 C.I.=[0.455- 11.623] chi2=1.07 p=0.30104	Odds_ratio=1.330 C.I.=[0.813- 2.177] chi2=1.29 p=0.25592	Odds_ratio=1.376 chi2=1.66 p=0.19747
			Risk allele 1				
			[2]<->[1]	[22]<->[12]	[22]<->[11]	[11+12]<->[22]	common odds ratio
			Odds_ratio=0.748 C.I.=[0.482-1.162] chi2=1.68 p=0.19546 (P)	Odds_ratio=0.552 C.I.=[0.105-2.902] chi2=0.50 p=0.47764	Odds_ratio=0.435 C.I.=[0.086-2.199] chi2=1.07 p=0.30104	Odds_ratio=0.462 C.I.=[0.092- 2.325] chi2=0.92 p=0.33792	Odds_ratio=0.736 chi2=1.66 p=0.19747

[SNP-
63](#)

ANEXO 12

COMPARACIÓN ENTRE VARONES Y MUJERES DEL GRUPO DE PACIENTES

SNP	Tests for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium		Tests for association (C.I.: 95% confidence interval)				
	Varones	Mujeres	allele freq. Difference	heterozygous	homozygous	allele positivity	Armitage's trend test
SNP-43V-F	n11=35 (35.06) n12=24 (23.87) n22=4 (4.06) f_a1=0.75 +/- 0.039 F=-0.00532 p=0.966324 (Pearson) p=0.966285 (Llr) p=1.000000 (Exact)	n11=67 (68.68) n12=60 (56.64) n22=10 (11.68) f_a1=0.71 +/- 0.027 F=-0.05928 p=0.487785 (Pearson) p=0.483749 (Llr) p=0.678688 (Exact)	Risk allele 2				
			[1]<->[2]	[11]<->[12]	[11+]<->[22]	[11]<->[12+22]	common odds ratio
			Odds_ratio=1.211 C.I.=[0.751-1.954] chi2=0.62 p=0.43168 (P)	Odds_ratio=1.306 C.I.=[0.699-2.441] chi2=0.70 p=0.40234	Odds_ratio=1.306 C.I.=[0.382-4.466] chi2=0.18 p=0.66976	Odds_ratio=1.306 C.I.=[0.717-2.378] chi2=0.76 p=0.38215	Odds_ratio=1.192 chi2=0.65 p=0.42184
			Risk allele 1				
			[2]<->[1]	[22]<->[12]	[22]<->[11]	[11+12]<->[22]	common odds ratio
			Odds_ratio=0.826 C.I.=[0.512-1.332] chi2=0.62 p=0.43168 (P)	Odds_ratio=1.000 C.I.=[0.286-3.499] chi2=0.00 p=1.00000	Odds_ratio=0.766 C.I.=[0.224-2.618] chi2=0.18 p=0.66976	Odds_ratio=0.861 C.I.=[0.259-2.859] chi2=0.06 p=0.80676	Odds_ratio=0.837 chi2=0.65 p=0.42184
SNP-19V-F	n11=25 (25.94) n12=34 (32.12) n22=9 (9.94) f_a1=0.62 +/- 0.040 F=-0.05861 p=0.628887	n11=51 (53.30) n12=72 (67.39) n22=19 (21.30) f_a1=0.61 +/- 0.028 F=-0.06834 p=0.415446	Risk allele 2				
			[1]<->[2]	[11]<->[12]	[11+]<->[22]	[11]<->[12+22]	common odds ratio
			Odds_ratio=1.021 C.I.=[0.671-1.555] chi2=0.01 p=0.92199 (P)	Odds_ratio=1.038 C.I.=[0.554-1.947] chi2=0.01 p=0.90730	Odds_ratio=1.035 C.I.=[0.410-2.613] chi2=0.01 p=0.94220	Odds_ratio=1.037 C.I.=[0.569-1.891] chi2=0.01	Odds_ratio=1.020 chi2=0.01 p=0.91932

	(Pearson) p=0.627948 (Llr) p=0.797917 (Exact)	(Pearson) p=0.414036 (Llr) p=0.481774 (Exact)				p=0.90462	
			Risk allele 1				
			[2]<->[1]	[22]<->[12]	[22]<->[11]	[11+12]<->[22]	common odds ratio
			Odds_ratio=0.979 C.I.=[0.643-1.491] chi2=0.01 p=0.92199 (P)	Odds_ratio=1.003 C.I.=[0.411-2.447] chi2=0.00 p=0.99458	Odds_ratio=0.966 C.I.=[0.383-2.440] chi2=0.01 p=0.94220	Odds_ratio=0.988 C.I.=[0.421-2.314] chi2=0.00 p=0.97693	Odds_ratio=0.980 chi2=0.01 p=0.91932
			Risk allele 2				
			[1]<->[2]	[11]<->[12]	[11+]<->[22]	[11]<->[12+22]	common odds ratio
	n11=40 (41.67) n12=20 (16.67) n22=0 (1.67) f_a1=0.83 +/- 0.030 F=-0.20000 p=0.121335 (Pearson) p=0.044775 (Llr) p=0.339497 (Exact)	n11=97 (94.72) n12=33 (37.56) n22=6 (3.72) f_a1=0.83 +/- 0.024 F=0.12129 p=0.157216 (Pearson) p=0.179219 (Llr) p=0.205644 (Exact)	Odds_ratio=0.991 C.I.=[0.557-1.765] chi2=0.00 p=0.97601 (P)	Odds_ratio=0.680 C.I.=[0.349-1.325] chi2=1.29 p=0.25613	Odds_ratio=5.400 C.I.=[0.297-98.109] chi2=2.43 p=0.11887	Odds_ratio=0.804 C.I.=[0.419-1.545] chi2=0.43 p=0.51243	Odds_ratio=1.537 chi2=0.00 p=0.97628
			Risk allele 1				
			[2]<->[1]	[22]<->[12]	[22]<->[11]	[11+12]<->[22]	common odds ratio
			Odds_ratio=1.009 C.I.=[0.567-1.796] chi2=0.00 p=0.97601 (P)	Odds_ratio=0.126 C.I.=[0.007-2.351] chi2=3.43 p=0.06421	Odds_ratio=0.185 C.I.=[0.010-3.365] chi2=2.43 p=0.11887	Odds_ratio=0.166 C.I.=[0.009-2.993] chi2=2.73 p=0.09844	Odds_ratio=0.972 chi2=0.00 p=0.97628

SNP-
63V-F

ANEXO 13

COMPARACIÓN ENTRE MUJERES DEL GRUPO CONTROL Y MUJERES PACIENTES

SNP	Tests for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium		Tests for association (C.I.: 95% convidence interval)				
	Controls	Cases	allele freq. Difference	heterozygous	homozygous	allele positivity	Armitage's trend test
SNP-43Mujeres	n11=44 (43.79) n12=41 (41.42) n22=10 (9.79) f_a1=0.68 +/-0.034 F=0.01004 p=0.922050 (Pearson) p=0.922125 (Llr) p=1.000000 (Exact)	n11=67 (68.68) n12=60 n22=10 (11.68) f_a1=0.71 +/-0.027 F=-0.05928 p=0.487785 (Pearson) p=0.483749 (Llr) p=0.678688 (Exact)	Risk allele 2				
			[1]<->[2]	[11]<->[12]	[11+]<->[22]	[11]<->[12+22]	common odds ratio
			Odds_ratio=0.872 C.I.=[0.584-1.302] chi2=0.45 p=0.50301 (P)	Odds_ratio=0.961 C.I.=[0.555-1.666] chi2=0.02 p=0.88738	Odds_ratio=0.657 C.I.=[0.253-1.707] chi2=0.75 p=0.38624	Odds_ratio=0.901 C.I.=[0.534-1.523] chi2=0.15 p=0.69784	Odds_ratio=0.849 chi2=0.46 p=0.49670
			Risk allele 1				
			[2]<->[1]	[22]<->[12]	[22]<->[11]	[11+12]<->[22]	common odds ratio
			Odds_ratio=1.147 C.I.=[0.768-1.712] chi2=0.45 p=0.50301 (P)	Odds_ratio=1.463 C.I.=[0.559-3.831] chi2=0.61 p=0.43640	Odds_ratio=1.523 C.I.=[0.586-3.959] chi2=0.75 p=0.38624	Odds_ratio=1.494 C.I.=[0.596-3.744] chi2=0.74 p=0.38915	Odds_ratio=1.184 chi2=0.46 p=0.49670
SNP	Tests for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium		Tests for association (C.I.: 95% convidence interval)				
	Controls	Cases	allele freq. difference	heterozygous	homozygous	allele positivity	Armitage's trend test
SNP-19-	n11=8	n11=19	Risk allele 2				

Mujeres	(7.92) n12=38 (38.15) n22=46 (45.92) f_a1=0.29 +/-0.034 F=0.00399 p=0.969482 (Pearson) p=0.969499 (Llr) p=1.000000 (Exact)	(21.30) n12=72 (67.39) n22=51 (53.30) f_a1=0.39 +/- 0.028 F=-0.06834 p=0.415446 (Pearson) p=0.414036 (Llr) p=0.481774 (Exact)					
			[1]<->[2]	[11]<->[12]	[11+]<->[22]	[11]<->[12+22]	common odds ratio
			Odds_ratio=0.657 C.I.=[0.442-0.977] chi2=4.32 p=0.03766 (P)	Odds_ratio=0.798 C.I.=[0.320-1.991] chi2=0.23 p=0.62792	Odds_ratio=0.467 C.I.=[0.187-1.168] chi2=2.72 p=0.09910	Odds_ratio=0.617 C.I.=[0.258-1.474] chi2=1.20 p=0.27325	Odds_ratio=0.659 chi2=4.47 p=0.03458
			Risk allele 1				
SNP-63Mujeres	n11=74 (73.72) n12=22 (22.55) n22=2 (1.72) f_a1=0.87 +/- 0.025 F=0.02443 p=0.808867 (Pearson) p=0.812203 (Llr) p=0.671458 (Exact)	n11=97 (94.72) n12=33 (37.56) n22=6 (3.72) f_a1=0.83 +/- 0.024 F=0.12129 p=0.157216 (Pearson) p=0.179219 (Llr) p=0.205644 (Exact)	[2]<->[1]	[22]<->[12]	[22]<->[11]	[11+12]<->[22]	common odds ratio
			Odds_ratio=1.522 C.I.=[1.023-2.264] chi2=4.32 p=0.03766 (P)	Odds_ratio=1.709 C.I.=[0.976-2.991] chi2=3.54 p=0.05973	Odds_ratio=2.142 C.I.=[0.856-5.360] chi2=2.72 p=0.09910	Odds_ratio=1.784 C.I.=[1.047-3.042] chi2=4.56 p=0.03266	Odds_ratio=1.507 chi2=4.47 p=0.03458
			Risk allele 2				
			[1]<->[2]	[11]<->[12]	[11+]<->[22]	[11]<->[12+22]	common odds ratio
SNP-63Mujeres	n11=74 (73.72) n12=22 (22.55) n22=2 (1.72) f_a1=0.87 +/- 0.025 F=0.02443 p=0.808867 (Pearson) p=0.812203 (Llr) p=0.671458 (Exact)	n11=97 (94.72) n12=33 (37.56) n22=6 (3.72) f_a1=0.83 +/- 0.024 F=0.12129 p=0.157216 (Pearson) p=0.179219 (Llr) p=0.205644 (Exact)	Odds_ratio=1.296 C.I.=[0.769-2.185] chi2=0.95 p=0.32931 (P)	Odds_ratio=1.144 C.I.=[0.617-2.124] chi2=0.18 p=0.66910	Odds_ratio=2.289 C.I.=[0.449-11.665] chi2=1.04 p=0.30673	Odds_ratio=1.240 C.I.=[0.686-2.240] chi2=0.51 p=0.47625	Odds_ratio=1.339 chi2=0.88 p=0.34941
			Risk allele 1				
			[2]<->[1]	[22]<->[12]	[22]<->[11]	[11+12]<->[22]	common odds ratio
			Odds_ratio=0.772 C.I.=[0.458-1.300] chi2=0.95 p=0.32931 (P)	Odds_ratio=0.500 C.I.=[0.092-2.706] chi2=0.67 p=0.41433	Odds_ratio=0.437 C.I.=[0.086-2.227] chi2=1.04 p=0.30673	Odds_ratio=0.451 C.I.=[0.089-2.285] chi2=0.97 p=0.32476	Odds_ratio=0.762 chi2=0.88 p=0.34941

ANEXO 14

COMPARACIÓN ENTRE PACIENTES, CLASIFICADOS DE ACUERDO EL IMC

SNP-43	Tests for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium		Tests for association (C.I.: 95% convidence interval)				
	<30	≥30	allele freq. difference	heterozygous	homozygous	allele positivity	Armitage's trend test
SNP43-IMC	n11=46 (47.55) n12=41 (37.90) n22=6 (7.55) f_a1=0.72 +/- 0.032 F=-0.08186 p=0.429886 (Pearson) p=0.423201 (Llr) p=0.610326 (Exact)	n11=55 (54.81) n12=41 (41.38) n22=8 (7.81) f_a1=0.73 +/- 0.031 F=0.00918 p=0.925424 (Pearson) p=0.925539 (Llr) p=1.000000 (Exact)	Risk allele 2				
			[1]<->[2]	[11]<->[12]	[11+]<->[22]	[11]<->[12+22]	common odds ratio
			Odds_ratio=0.947 C.I.=[0.610-1.472] chi2=0.06 p=0.80960 (P)	Odds_ratio=0.836 C.I.=[0.467-1.499] chi2=0.36 p=0.54838	Odds_ratio=1.115 C.I.=[0.361-3.447] chi2=0.04 p=0.84983	Odds_ratio=0.872 C.I.=[0.498-1.526] chi2=0.23 p=0.63141	Odds_ratio=0.982 chi2=0.06 p=0.80632
			Risk allele 1				
			[2]<->[1]	[22]<->[12]	[22]<->[11]	[11+12]<->[22]	common odds ratio
			Odds_ratio=1.056 C.I.=[0.679-1.640] chi2=0.06 p=0.80960 (P)	Odds_ratio=0.750 C.I.=[0.239-2.354] chi2=0.24 p=0.62122	Odds_ratio=0.897 C.I.=[0.290-2.772] chi2=0.04 p=0.84983	Odds_ratio=0.828 C.I.=[0.276-2.480] chi2=0.11 p=0.73510	Odds_ratio=1.020 chi2=0.06 p=0.80632
SNP-19	Tests for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium		Tests for association (C.I.: 95% convidence interval)				
	<30	≥30	allele freq. difference	heterozygous	homozygous	allele positivity	Armitage's trend test
SNP19-	n11=13	n11=15	Risk allele 2				

IMC	(15.92) n12=53 (47.16) n22=32 (34.92) f_a1=0.40 +/-0.033 F=-0.12388 p=0.220076 (Pearson) p=0.217774 (Llr) p=0.294350 (Exact)	(15.38) n12=53 (52.25) n22=44 (44.38) f_a1=0.37 +/-0.032 F=-0.01444 p=0.878535 (Pearson) p=0.878448 (Llr) p=1.000000 (Exact)	[1]<->[2]	[11]<->[12]	[11+]<->[22]	[11]<->[12+22]	common odds ratio
			Odds_ratio=1.147 C.I.=[0.774-1.700] chi2=0.47 p=0.49449 (P)	Odds_ratio=0.867 C.I.=[0.376-1.997] chi2=0.11 p=0.73672	Odds_ratio=1.192 C.I.=[0.499-2.848] chi2=0.16 p=0.69305	Odds_ratio=0.989 C.I.=[0.445-2.196] chi2=0.00 p=0.97836	Odds_ratio=1.129 chi2=0.50 p=0.47982
			Risk allele 1				
			[2]<->[1]	[22]<->[12]	[22]<->[11]	[11+12]<->[22]	common odds ratio
			Odds_ratio=0.872 C.I.=[0.588-1.292] chi2=0.47 p=0.49449 (P)	Odds_ratio=0.727 C.I.=[0.402-1.317] chi2=1.11 p=0.29244	Odds_ratio=0.839 C.I.=[0.351-2.005] chi2=0.16 p=0.69305	Odds_ratio=0.749 C.I.=[0.425-1.322] chi2=1.00 p=0.31836	Odds_ratio=0.885 chi2=0.50 p=0.47982
SNP-63	Tests for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium		Tests for association (C.I.: 95% confidence interval)				
	<30	≥30	allele freq. difference	heterozygous	homozygous	allele positivity	Armitage's trend test
SNP63-IMC	n11=66 (66.98) n12=25 (23.04) n22=1 (1.98) f_a1=0.85 +/- 0.025 F=-0.08516 p=0.414019 (Pearson) p=0.379678 (Llr) p=0.682856 (Exact)	n11=71 (69.47) n12=28 (31.06) n22=5 (3.47) f_a1=0.82 +/- 0.028 F=0.09845 p=0.315370 (Pearson) p=0.333141 (Llr) p=0.323727 (Exact)	Risk allele 2				
			[1]<->[2]	[11]<->[12]	[11+]<->[22]	[11]<->[12+22]	common odds ratio
			Odds_ratio=1.300 C.I.=[0.758-2.228] chi2=0.91 p=0.33948 (P)	Odds_ratio=1.041 C.I.=[0.552-1.965] chi2=0.02 p=0.90099	Odds_ratio=4.648 C.I.=[0.529-40.831] chi2=2.29 p=0.13006	Odds_ratio=1.180 C.I.=[0.639-2.179] chi2=0.28 p=0.59713	Odds_ratio=1.495 chi2=0.89 p=0.34486
			Risk allele 1				
			[2]<->[1]	[22]<->[12]	[22]<->[11]	[11+12]<->[22]	common odds ratio

			Odds_ratio=0.769 C.I.=[0.449-1.319] chi2=0.91 p=0.33948 (P)	Odds_ratio=0.224 C.I.=[0.024-2.050] chi2=2.03 p=0.15375	Odds_ratio=0.215 C.I.=[0.024-1.890] chi2=2.29 p=0.13006	Odds_ratio=0.218 C.I.=[0.025-1.898] chi2=2.28 p=0.13128	Odds_ratio=0.732 chi2=0.89 p=0.34486
--	--	--	--	--	--	--	--