

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“ALTERACIONES DEL GEN CAPN10 EN DIABÉTICOS TIPO II  
ATENDIDOS EN UNIDADES MÉDICAS DE LA SECRETARÍA  
DE SALUD DEL ESTADO DE QUERÉTARO”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

**JUAN MANUEL MURILLO MALDONADO**

DIRIGIDA POR

**Dra. ROSALIA REYNOSO CAMACHO**

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2004.

**BIBLIOTECA CENTRAL**  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

No. Adq. 1169322

No. Título \_\_\_\_\_

Clas TS

616.46207

M977a

\_\_\_\_\_



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“ALTERACIONES DEL GEN CAPN10 EN DIABÉTICOS TIPO II  
ATENDIDOS EN UNIDADES MÉDICAS DE LA SECRETARÍA  
DE SALUD DEL ESTADO DE QUERÉTARO”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**JUAN MANUEL MURILLO MALDONADO**

**DIRIGIDA POR**

**Dra. ROSALIA REYNOSO CAMACHO**

**SINODALES**

Dra. ROSALIA REYNOSO CAMACHO  
DIRECTOR

Dr. LUIS MIGUEL SALGADO RODRÍGUEZ  
SINODAL

Dra. GUADALUPE GARCÍA ALCOCER  
SINODAL

Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA  
SINODAL

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A Dios:**

Por darme la oportunidad de cumplir una de mis principales metas.

### **A mis padres:**

Por brindarme todo su amor, cariño, comprensión, paciencia, apoyo incondicional, confianza y todo lo que me ha llevado a ser lo que soy.

### **A mis hermanos:**

Por darme tanto cariño, apoyo y consejos.

### **A Mireya:**

Por todo su amor, apoyo, confianza y por su gran ayuda en la realización de este trabajo. Por estar siempre a mi lado.

### **A mis maestros:**

Dra. Rosalia Reynoso por la dirección de esta tesis, por su apoyo, paciencia y consejos.

Dra. Guadalupe García por su amistad, consejos y su apoyo.

Dr. Luis Miguel Salgado por su apoyo en la realización de este trabajo, su paciencia y amistad.

### **A mis amigos:**

Germán, Alma, Alberto, Anabel, Laura, Salvador, Alejandro, Leticia, David, Andrés, Jaime, Cuahutemoc, Hugo y todos aquellos de quien siempre recibí todo su apoyo.

A todos ustedes

**GRACIAS**

## ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
I. Diabetes mellitus	3
I. 1 Insulina	4
I. 2 Diabetes mellitus tipo I y II	8
II. Determinantes genéticos de la diabetes tipo II	11
III. Calpaína 10	14
IV. Prevención de diabetes tipo II	16
HIPÓTESIS	17
OBJETIVOS	18
I. General	18
II. Específicos	18
METODOLOGÍA	19
I. Población	19
II. Colección de la muestra	19
III. Materiales	19
IV. Métodos	20
IV. 1 Extracción de DNA	20
IV. 2 Cuantificación de DNA	21
IV. 3 Evaluación de los polimorfismos	22

IV. 3.1 Reacción en cadena de la polimerasa	22
IV. 3.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida	23
V. Diseño experimental	25
RESULTADOS	26
I. Polimorfismo SNP-19	26
II. Polimorfismo SNP-43	33
III. Polimorfismo SNP-63	37
IV. Combinación de haplotipos	43
DISCUSIÓN	45
CONCLUSIONES	49
BIBLIOGRAFÍA	50

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Clasificación actual de la diabetes mellitus.	8
2. Resultados de tipificación genómica relacionados con diabetes tipo II.	12
3. Resultados del análisis del polimorfismo SNP-19 para el grupo de personas clínicamente sanas.	29
4. Resultados del análisis del polimorfismo SNP-19 para el grupo de pacientes diagnosticados para diabetes mellitus tipo II.	31
5. Frecuencias de los alelos estudiados del polimorfismo SNP-19 en personas sanas y diabéticas.	32
6. Resultados del análisis del polimorfismo SNP-43 para el grupo de personas clínicamente sanas.	34
7. Resultados del análisis del polimorfismo SNP-43 para el grupo de pacientes diagnosticados para diabetes mellitus tipo II.	36
8. Frecuencias de los alelos estudiados del polimorfismo SNP-43 en personas sanas y diabéticas.	37
9. Resultados del análisis del polimorfismo SNP-63 para el grupo de personas clínicamente sanas.	39
10. Resultados del análisis del polimorfismo SNP-63 para el grupo de pacientes diagnosticados para diabetes mellitus tipo II.	41
11. Frecuencias de los alelos estudiados del polimorfismo SNP-63 en personas sanas y diabéticas.	42

12. Frecuencias de combinaciones de haplotipo para los polimorfismos SNP-19, 43 y 63 en personas sanas y diabéticas.

43



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Organización del receptor de insulina (IR).	6
2. Ruta de señalización de insulina sobre su receptor.	7
3. Ubicación de polimorfismos más comunes en la organización exón-intrón de CAPN10.	13
4. Inmunofluorescencia utilizando rodamina unida a anticuerpos contra GLUT4.	15
5. Estándar de DNA de escalera de 100bp junto a muestras heterocigotas para cada uno de los polimorfismos.	27
6. Análisis del polimorfismo SNP-19 para una serie de muestras de personas clínicamente sanas.	28
7. Análisis del polimorfismo SNP-19 para una serie de muestras de pacientes diabéticos tipo II.	30
8. Análisis del polimorfismo SNP-43 para una serie de muestras de personas clínicamente sanas.	33
9. Análisis del polimorfismo SNP-43 para una serie de muestras de pacientes diabéticos tipo II.	35
10. Análisis del polimorfismo SNP-63 para una serie de muestras de personas clínicamente sanas.	38
11. Análisis del polimorfismo SNP-63 para una serie de muestras de pacientes diabéticos tipo II.	40

## RESUMEN

La diabetes mellitus tipo II o diabetes no dependiente de insulina es el tipo de diabetes más común en el mundo, aproximadamente 4% de la población adulta del mundo la padece. En México la diabetes es la tercera causa principal de muerte, misma situación que se presenta en el Estado de Querétaro donde del 3 al 5% de la población padece de diabetes. De los diabéticos diagnosticados en el país del 90 al 95% presentan la diabetes tipo II. Su origen es multifactorial con factores tanto genéticos como ambientales. La búsqueda de determinantes genéticos para diabetes tipo II es complicada por el papel que juega la dieta, la actividad física y la obesidad. Un rastreo genómico para diabetes tipo II en México-americanos llevó a la localización de un gen de susceptibilidad en el cromosoma 2 (CAPN10). En este estudio se demostró que la combinación de un haplotipo específico definido por tres polimorfismos de nucleótidos SNP-19, -43 y -63 está asociada con un incremento de tres veces el riesgo de padecer esta enfermedad. En estudios posteriores se encontró que el polimorfismo SNP-43 altera la regulación transcripcional de calpaína 10. En el presente trabajo se evaluó la posible asociación de los polimorfismos SNP-19, -43 y -63 del gen CAPN10 con diabetes tipo II en pacientes atendidos en unidades médicas de la Secretaría de Salud del Estado de Querétaro. Se evaluaron muestras de sangre de 79 personas clínicamente sanas y sin antecedentes de diabetes y para las muestras problema se seleccionaron 72 personas diagnosticadas con esta enfermedad. En los resultados obtenidos se encontró que no existe una asociación significativa entre la enfermedad y los polimorfismos SNP-19 y -63. En el caso de SNP-43, uno de los alelos mostró una asociación significativa con la diabetes tipo II. En la combinación de haplotipos para los tres polimorfismos la 211/112 se encontró significativamente incrementada en los pacientes diabéticos, lo que indica asociación con la enfermedad. Estos resultados sugieren que algunas variaciones en CAPN10 pueden afectar la predisposición a la diabetes tipo II en la población queretana.

## INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus es un padecimiento crónico que se caracteriza por una alteración en el metabolismo de proteínas, grasas y carbohidratos. Se manifiesta principalmente por la presencia de niveles elevados de glucosa en sangre, también llamado hiperglucemia, aunque puede coexistir con hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia. Esta alteración metabólica puede estar producida por una secreción deficiente de insulina, una resistencia a la acción de la misma, o una combinación de ambas.

México cuenta con aproximadamente 8 millones de adultos con diabetes mellitus y ocupa el noveno lugar entre los diez países con mayor número de diabéticos en el mundo. Constituye uno de los problemas más importantes de salud pública en México con características de epidemia, siendo esta patología la tercera causa principal de muerte en México, así como en el Estado de Querétaro.

En clínica, la diabetes se clasifica básicamente como diabetes tipo I o tipo II. La diabetes mellitus tipo I se caracteriza por la destrucción de las células  $\beta$  del páncreas, que suele llevar a pérdida de producción de insulina. En México del 5 al 10% de los diabéticos pertenecen a este grupo.

La diabetes tipo II se presenta en individuos que tienen resistencia a la insulina y en forma concomitante una deficiencia en su producción que puede ser absoluta o relativa. En esta categoría se incluyen del 90 al 95% de los casos de diabetes mellitus en México. La aparición de diabetes tipo II está influenciada por factores genéticos y ambientales por lo que se le considera de origen multifactorial. El factor genético provee susceptibilidad a dicha enfermedad. La búsqueda de determinantes genéticos implicados en esta susceptibilidad es de gran importancia para desarrollar métodos de diagnóstico temprano que permitan, a las personas

susceptibles, tomar medidas preventivas para eliminar o disminuir el factor ambiental favorable para la enfermedad.

Numerosas investigaciones han resultado en la identificación de varios genes con posibles implicaciones en la susceptibilidad a la diabetes tipo II. Entre éstos se encuentra el gen CAPN10. El cual presenta ciertos polimorfismos (SNP-19, -43 y -63), que están asociados con la diabetes tipo II en una población de México-Americanos. Debido a la diversidad genética poblacional, es importante la búsqueda de determinantes genéticos en diferentes poblaciones.

En el presente trabajo se evaluó la asociación entre los polimorfismos SNP-19, -43 y -63 del gen CAPN10 con la diabetes tipo II en la población queretana.

El futuro desarrollo de métodos de diagnóstico de predisposición a diabetes mellitus tipo II para la población queretana, junto con la prevención, permitirá disminuir las complicaciones de la diabetes tipo II como pueden ser lesiones en los vasos sanguíneos del cerebro, corazón y riñones, extremidades y ojos, problemas circulatorios, insuficiencia renal, ceguera, amputaciones y condiciones agudas que pueden conducir a la muerte, como la cetoacidosis diabética y el hiperosmolar no cetónico. El disminuir estas complicaciones traerá como consecuencia una mejor calidad de vida del paciente.

## **ANTECEDENTES**

### **I. Diabetes mellitus**

La diabetes mellitus es una enfermedad crónico-degenerativa caracterizada por desórdenes metabólicos de los carbohidratos, las grasas y las proteínas. Reflejados, principalmente, en altas concentraciones de glucosa en la sangre. Dichos desórdenes son provocados por una alteración en la utilización de la glucosa como resultado de una respuesta defectuosa o deficiente de la secreción de insulina y/o una resistencia de sus tejidos blanco (Becker, 2001).

Actualmente, México se encuentra en un proceso de transición en salud, ya que se ha observado una disminución en la prevalencia y mortalidad debida a enfermedades infectocontagiosas y un aumento en las crónico-degenerativas, como es el caso de la diabetes mellitus. La causa de esta transición está dada por un incremento en la población, pero principalmente por un proceso social y crisis económicas, hábitos y costumbres, déficit de conocimientos que denotan desviaciones en la salud, etc. La pobreza también es un factor de predisposición, que puede favorecer el desarrollo de este tipo de enfermedades; a menor nivel adquisitivo, se consumen alimentos de baja calidad, aumentando el riesgo de desarrollar diabetes mellitus (Landeros, 2000).

El último censo realizado por la Organización Mundial de la Salud revela que en el año 2002 existían cerca de 175 millones de adultos diabéticos en el mundo. De los cuales, dos terceras partes viven en países en vías de desarrollo. La diabetes representa uno de los principales problemas de salud pública en México. Nuestro país se ubica en el noveno lugar dentro de los diez países con mayor número de casos de diabetes registrados (Barquera y col., 2003).

En los últimos 7 años la cifra de diabéticos se duplicó en nuestro país y los expertos calculan, que de no prever y controlar los nuevos casos, para el 2025 el

20% de los mexicanos de todas las edades la padecerán. Actualmente el porcentaje de diabéticos es del 8-9% del total de la población de nuestro país, lo que equivale a aproximadamente 8 millones de habitantes.

En el Estado de Querétaro del 3-5% de la población padece de diabetes. El último censo de población y vivienda indica que la diabetes es la tercera causa de muerte en nuestro país después de las afecciones cardiacas y el cáncer, misma situación que se presenta en el Estado de Querétaro (INEGI, 2002).

### **1.1 Insulina**

Como se mencionó anteriormente, la diabetes puede ser consecuencia de un defecto en la producción o acción de la insulina. Este hecho sugiere que la insulina juega un papel importante en la homeostasis de carbohidratos, grasas y proteínas.

La insulina es una hormona peptídica sintetizada en las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans del páncreas. Es la principal hormona responsable del metabolismo de la glucosa y dirige el almacenamiento y uso de muchos nutrientes básicos. La insulina actúa como una hormona anabólica, activando sistemas de transporte y enzimas involucradas en la utilización y almacenamiento intracelular de glucosa, aminoácidos y ácidos grasos. Es también un potente inhibidor de los procesos catabólicos estimulados por hormonas con efectos contrarios, como la degradación de glucógeno, grasa y proteína. Aunque los tejidos blanco fisiológicamente importantes para la insulina, con respecto a la homeostasis de la glucosa, son hígado, músculo y tejido adiposo, la insulina tiene efectos sobre el crecimiento y metabolismo celular en muchos tejidos.

La homeostasis de glucosa depende del balance entre la producción de glucosa por el hígado y la utilización de glucosa por los tejidos dependientes de insulina, como músculo y tejido adiposo, y los tejidos independientes de insulina, como el

cerebro y riñón. En individuos normales, este balance permite que se tenga una concentración de glucosa sanguínea entre 70 y 120 mg/dl. El patrón de utilización de glucosa está altamente regulado por las hormonas pancreáticas insulina y glucagon (Becker, 2001).

La concentración de glucosa en el torrente sanguíneo está, en parte, regulada por la acción de la insulina. Esta función la realiza a través del transporte de glucosa hacia sus diferentes tejidos blanco. En las células blanco, este proceso inicia con la unión de la insulina a su receptor (IR), el cual está compuesto por dos subunidades  $\alpha$  y dos  $\beta$ . Las subunidades  $\alpha$  localizadas fuera de la célula contienen los sitios de unión a la insulina, cada subunidad  $\alpha$  está unida a una subunidad  $\beta$  por medio de enlaces disulfuro. Las subunidades  $\beta$ , localizadas dentro de la célula, contienen actividad cinasa de tirosina regulada por la unión de la insulina a la subunidad  $\alpha$  (Figura 1) (Cooper, 2000).

Cuando la insulina se une a las subunidades  $\alpha$  del receptor de insulina, se produce un cambio conformacional del receptor que induce la activación del dominio de cinasa de tirosina de cada una de las subunidades  $\beta$ . Las cinasas activadas de esta forma, fosforilan residuos de tirosina de la subunidad  $\beta$  adyacente. Así se autofosforila el receptor en dichos residuos y se activa su capacidad de cinasa de tirosina hacia otros sustratos citoplasmáticos entre los que se encuentra el sustrato de receptor de insulina (IRS-1).

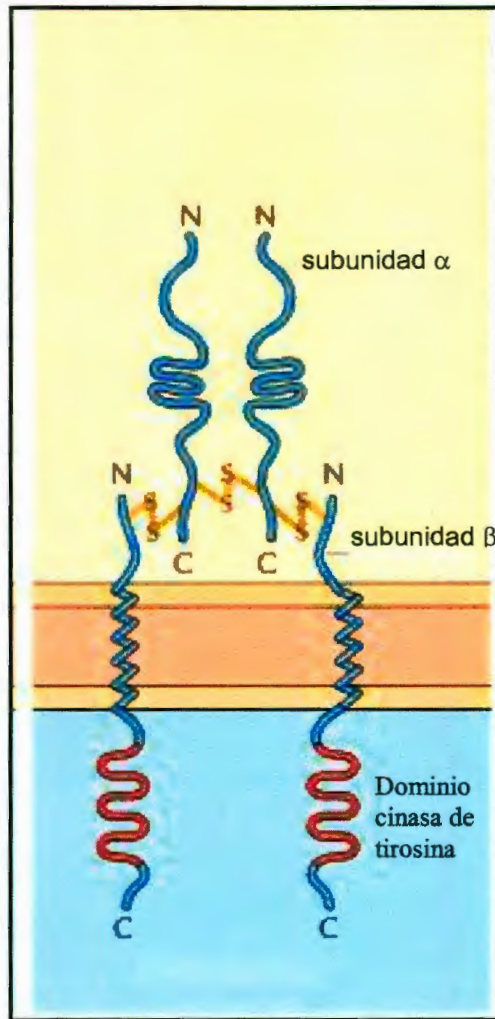


Figura 1. Organización del receptor de insulina (IR). El receptor consiste de dos subunidades  $\alpha$  y dos  $\beta$  unidas mediante enlaces disulfuro. Las subunidades  $\alpha$  contienen el sitio de unión a la insulina mientras que las subunidades  $\beta$  el dominio cinasa de tirosina (Cooper, 2000).

Al IRS-1 fosforilado se une la cinasa de PI-3 por medio de su subunidad P85. La cinasa de PI-3 activada de esta forma, cataliza la fosforilación de fosfatidilinositol en la posición 3 del anillo de inositol. Los productos, a su vez, activan a la cinasa PKD que fosforila a la cinasa PKB en residuos de treonina/serina y a través de una serie de reacciones todavía no conocidas se lleva a cabo la translocación de los transportadores de glucosa (GLUT4) de vesículas intracelulares a la superficie celular (figura 2) (Kido y col., 2001).



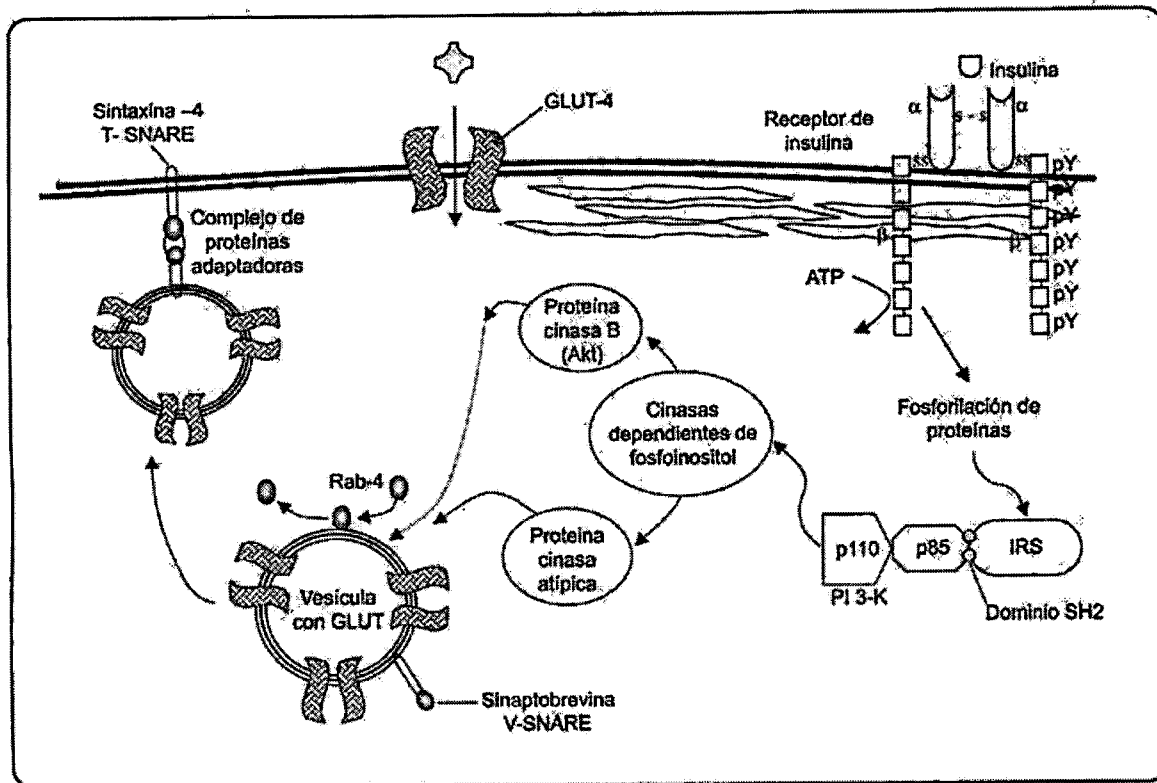


Figura 2. Ruta de señalización de la insulina sobre su receptor. Paso 1: unión de una molécula de insulina a su receptor provocando su autofosforilación. Paso 2: unión de IRS-1 al receptor fosforilado, activándose y activando a su vez a la cinasa de PI-3. La activación de la cinasa PI-3 provoca la fosforilación de fosfatidilinositol en la posición 3 del anillo de inositol. Paso 3: los productos de esta última fosforilación activan a PKD que fosforila a PKB. Paso 4: PKB activada, mediante mecanismos aún no conocidos, permite la translocación de GLUT-4 y el posterior transporte de glucosa (Cruz y col., 2001).

La translocación de vesículas de GLUT-4 está, entonces, claramente estimulada por la insulina (Figura 2). Aunque este mecanismo es poco conocido. Sin embargo, algunas investigaciones han reportado que varias proteínas intervienen en este proceso, específicamente complejos de SNAREs participan en la fusión de las vesículas con la membrana plasmática (Watson y Pessin, 2001). Los microtúbulos del citoesqueleto parecen estar implicados en el transporte de las vesículas hacia la membrana plasmática (Olson y col., 2001).

## I.2 Diabetes mellitus tipo I y II

Las alteraciones en la secreción de insulina o defectos a cualquier nivel en su mecanismo de acción, sobre la homeostasis de la glucosa, provocan diabetes mellitus (Becker, 2001).

En clínica, la diabetes se puede clasificar básicamente como diabetes tipo I o tipo II. La clasificación actual de la diabetes mellitus, aprobada por la Asociación Americana de Diabetes y avalada por la Organización Mundial de la Salud, se muestra en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Clasificación actual de la diabetes mellitus.

Clases clínicas
Diabetes mellitus tipo I o diabetes dependiente de insulina
Diabetes mellitus tipo II o diabetes no dependiente de insulina
Otros tipos específicos de diabetes
Diabetes mellitus gestacional (DMG)

American Diabetes Association, 2000

La diabetes tipo I constituye entre el 5 al 10% de todos los casos diagnosticados de diabetes en México. La presencia de este tipo de diabetes se debe principalmente a factores de autoinmunidad y genéticos.

Por otro lado, la diabetes tipo II abarca del 90 al 95% del total de diabéticos en nuestro país, siendo la población más vulnerable los mayores de 30 años. Esta enfermedad acelera su presencia por los malos hábitos de alimentación, la falta de ejercicio y la obesidad. Otros factores importantes son la etnicidad dentro de un país, componentes genéticos, ambientales, hipertensión, hiperlipidemia, entre

otros, de este modo la diabetes no dependiente de insulina se considera como una enfermedad multifactorial (Landeros, 2000).

En la Encuesta Nacional de Salud (ENSA) realizada en el año 2000 se encontró que el 10.8% de las personas entre 20 y 69 años de edad padecían de diabetes mellitus tipo II, en México. La prevalencia de este tipo de diabetes varía en los diferentes estados de la república mexicana. Según esta encuesta, el 7.6% de la población queretana entre 20 y 69 años la padecen (Velásquez y col., 2003).

En la diabetes tipo I existe una pérdida extensa y selectiva de las células  $\beta$  pancreáticas y un estado de deficiencia absoluta de insulina. Se caracteriza por una tendencia a la cetoacidosis y a una dependencia absoluta de la insulina para la sobrevivencia.

En la diabetes tipo II las personas son menos propensas a presentar cetoacidosis y no dependen de insulina. Se asocia con la obesidad. Este tipo de diabetes se caracteriza por dos defectos metabólicos.

1.- Una alteración en la secreción de insulina por las células  $\beta$  pancreáticas. En la fase temprana de la enfermedad parece que la secreción de la hormona es normal, sin disminución en sus niveles plasmáticos, sin embargo se pierde el patrón normal de secreción. Esto último nos indica una alteración de la respuesta de las células  $\beta$  a la hiperglucemia. En las fases posteriores aparece un déficit, leve o moderado, aunque menos intenso que en la diabetes tipo I. Esto puede ser explicado por el agotamiento de la capacidad de las células  $\beta$  para ejercer su función en hiperglucemia crónica, un fenómeno denominado toxicidad de la glucosa.

2.- Resistencia a la insulina. Aunque en las fases avanzadas de la diabetes tipo II se encuentra un déficit de insulina, esto no explica completamente los trastornos metabólicos de la enfermedad. Existe, además, una disminución en la capacidad de

respuesta de los tejidos periféricos a la insulina (resistencia a la insulina), que constituye un factor importante en el desarrollo de la enfermedad. No se conocen con precisión las bases moleculares de la resistencia a la insulina. Es posible que exista una disminución en el número de receptores de la hormona que puede sumarse a una alteración de la señalización posterior a la activación del receptor de la insulina.

Las complicaciones a largo plazo en los vasos sanguíneos, los riñones, los ojos y los nervios constituyen las causas más importantes de morbilidad y mortalidad asociadas con la diabetes tipo II.

La enfermedad cardiovascular es la principal causa de mortalidad en personas con diabetes tipo II. Hipertensión arterial y arterosclerosis se presenta más frecuentemente en diabéticos que en personas no diabéticas. La nefropatía diabética se presenta en el 20 al 40% de las personas diabéticas. La neuropatía diabética es una causa importante de morbilidad, pero es rara como causa directa de muerte. La nefropatía es la principal causa de incapacidad de pacientes diabéticos (Hernández, 2003).

## **II. Determinantes genéticos de la diabetes tipo II**

La diabetes mellitus tipo II ha sido ampliamente estudiada desde hace muchos años. La mayoría de estas investigaciones tuvieron como objetivo aclarar los mecanismos moleculares involucrados en dicha enfermedad. Algunas observaciones tales como una mayor incidencia de la enfermedad en algunas familias, mayor prevalencia en diversos grupos étnicos y alta concordancia en gemelos monocigotos llevaron a pensar que este padecimiento era heredable, aunque no como un factor determinante.

Además, se observó que la dieta, la actividad física y la obesidad estaban relacionadas con este tipo de diabetes. En la actualidad se sabe que la diabetes tipo II es consecuencia de las acciones e interacciones de varios factores tanto genéticos como ambientales (Cox, 2001).

La búsqueda de determinantes genéticos para la diabetes tipo II es complicada debido a que además de intervenir diversos factores ambientales (dieta, actividad física y obesidad, principalmente) existe heterogeneidad genética e interacciones entre genes (Busch y Hegele, 2001).

Los genes candidatos propuestos inicialmente incluían aquellos que codifican para proteínas con participación conocida en la incorporación y el metabolismo de la glucosa. Por lo que muchas investigaciones se enfocaron a evaluar la asociación de variaciones en estos genes con la diabetes en diferentes poblaciones. Los resultados descartaron un gran número de genes. Sin embargo, algunos otros siguen siendo candidatos como genes involucrados en la susceptibilidad a la enfermedad (Busch y Hegele, 2001). Entre estos últimos se encuentran los genes que codifican para IRS-1 y IRS-2, polimorfismos de este último gen se han encontrado asociados a diabetes mellitus tipo II en una población italiana (Mammarella y col., 2000). Debido a la fuerte asociación de la obesidad con la

diabetes tipo II, los genes involucrados en el metabolismo de los adipocitos son candidatos importantes (Busch y Hegele, 2001).

Para la búsqueda de determinantes genéticos se han utilizado técnicas de tipificación genómica con las cuales ha sido posible localizar la susceptibilidad para la diabetes tipo II en diferentes poblaciones del mundo (Cuadro 2).

Cuadro 2. Resultados de tipificación genómica relacionados con la diabetes tipo II (Busch y Hegele, 2001).

Estudio	Locus relacionados	Población
Hanis y col., 1996	2q37.3	México-americanos
Matan y col., 1996	12q24.3	Finlandia
Hanson y col., 1998	11q, 1q, 7q	Indios pima
Elbein y col., 1999	1q21-23	Caucásicos
Hegele y col., 1999	6q, 8p, 16q, 22q	Canadienses
Permutt y col., 2001	4q, 8p, 16q, 20q	Judíos
Parker y col., 2001	18p11	Sur de Suecia
Luo y col., 2001	9q13-21, 9q21, 20q13.2	Chinos

En un estudio reciente, en el cual se utilizó el método tradicional de búsqueda de genes conocido como clonación posicional, se reportó que la variación de CAPN10, el gen que codifica para la calpaína 10, afecta la susceptibilidad a la diabetes mellitus tipo II en México-Americanos y en dos poblaciones europeas, de Finlandia y de Alemania. En esta investigación se evaluó la asociación de un gran número de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) encontrados en el gen CAPN10 con la susceptibilidad a la diabetes mellitus tipo II. Algunos de estos polimorfismos están indicados en la Figura 3.

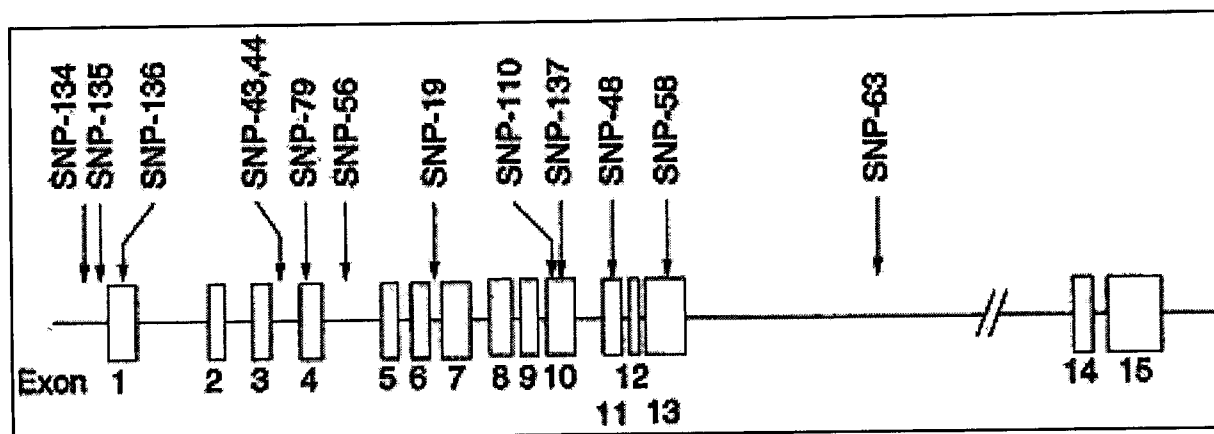


Figura 3. Ubicación de los polimorfismos más comunes en la organización exón-intrón de CAPN10 (Evans y col., 2001).

La frecuencia del alelo 1(G) del polimorfismo SNP-43 (ubicado en el intrón 3 del gen CAPN10) mostró un incremento, estadísticamente significativo, en personas diabéticas en comparación con un grupo control de personas clínicamente sanas. La combinación de los haplotipos 211/112 definido por tres polimorfismos de nucleótidos, SNP-19, 43 y 63 respectivamente, está asociada con un incremento de tres veces en el riesgo de esta enfermedad en dichas poblaciones (Horikawa y col., 2000).

En investigaciones posteriores se reportó que el polimorfismo de SNP-43, que se encuentra en una región no codificante del gen CAPN10, altera la regulación transcripcional de la calpaína 10. Observándose, en personas homocigotas para el alelo G de este polimorfismo, una reducción en los niveles de mRNA de calpaína 10 y resistencia a insulina en músculo esquelético (Baier y col., 2000).

Los indios pima, una población de alto riesgo de contraer diabetes, también tienen polimorfismos en el gen de la calpaína 10. Este grupo presenta resistencia a la insulina y niveles reducidos de expresión génica de calpaína 10, demostrando que el polimorfismo se relaciona con la enfermedad (Baier y col., 2000).

### III. Calpaína 10

La calpaína 10 pertenece a una familia de proteasas de cisteína no lisosomales. Las calpaínas, también conocidas como proteasas neutras, son activadas por el calcio y su expresión es ubicua (se presenta en todos los tejidos). Se sabe que hidroliza, en ciertos sitios, a algunas proteínas ya sea para activarlas o inactivarlas. Sin embargo, su función principal todavía no está clara. Aunque la expresión de calpaína 10 es ubicua, la actividad transcripcional es más elevada en los islotes pancreáticos, el músculo y el hígado. Lo cual sugiere que probablemente participa en la secreción y acción de la insulina y en la producción de glucosa hepática (Cruz y col., 2002).

El análisis del cDNA humano de la calpaína 10 reveló un patrón complejo de procesamiento alternativo, generando proteínas de 672, 544, 517, 513, 444, 274, 139 y 138 aminoácidos. Estas isoformas de la calpaína 10 se denotan 10a, 10b, 10c, 10d, 10e, 10f, 10g y 10h, respectivamente. Los análisis, por RT-PCR, indicaron que la calpaína 10a fue la isoforma más abundante en la mayoría de los tejidos estudiados. Las isoformas 10c y 10g fueron detectadas fácilmente en muchos tejidos, incluyendo el músculo esquelético y los islotes pancreáticos. La isoforma 10h estuvo presente, en niveles moderados, en los islotes pero no en los otros tejidos estudiados. Las otras isoformas parecen ser mucho menos abundantes (Horikawa y col., 2000).

Existen algunos resultados que indican que la calpaína 10 cumple una función, aún no conocida, en la secreción y en la acción de la insulina. En presencia de inhibidores de la calpaína 10 se ha observado un incremento en la secreción de insulina estimulada por glucosa, acelerando la exocitosis de los gránulos de esta hormona. Se observó también una disminución en la incorporación de glucosa dentro de glucógeno, así como en el transporte de glucosa en el músculo y en los adipocitos (Sreenan y col., 2001)



El efecto observado, por inmunofluorescencia, de inhibidores de la calpaína 10 sobre la localización intracelular de vesículas GLUT4 antes y durante el transporte de glucosa estimulado por insulina, ha revelado que en una condición basal de transporte, las vesículas se encuentran en el citoplasma. Cuando se estimula el transporte de glucosa por la insulina, los GLUT4 se localizan en la membrana celular. Pero en presencia de un inhibidor de la calpaína 10, los niveles de GLUT4 en la membrana disminuyen considerablemente (Figura 4). Estos resultados sugieren que la calpaína 10 puede tener un papel importante en la translocación de GLUT4 y por ende en la homeostasis de glucosa (Paul y col., 2003).

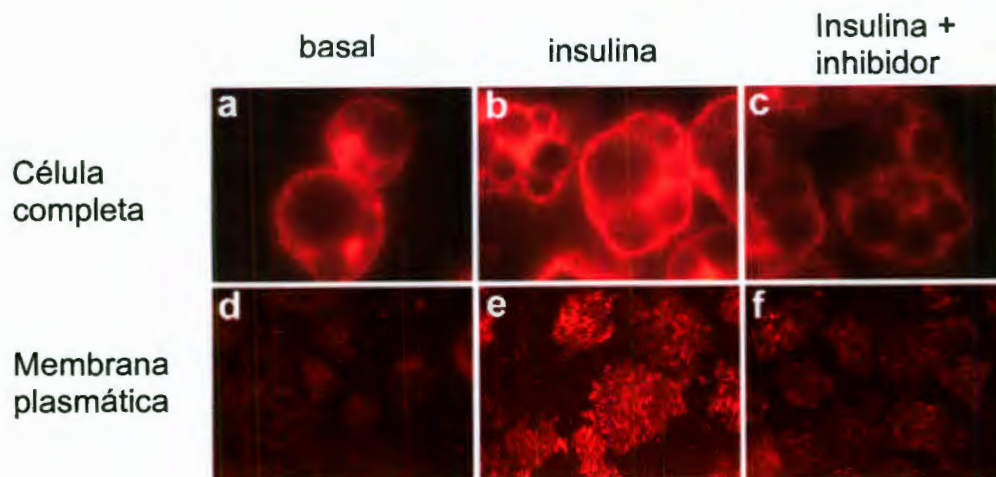


Figura 4. Inmunofluorescencia, utilizando rodamina unida a anticuerpos contra GLUT4. Para determinar el efecto de inhibidores de calpaína 10 sobre la localización intracelular de GLUT4 en adipocitos 3T3-L1 (Paul y col., 2003).

#### **IV. Prevención de diabetes tipo II**

Al igual que el entendimiento de los mecanismos moleculares implicados en la diabetes tipo II, el conocimiento sobre su tratamiento y las estrategias para su prevención avanzan día a día. El tratamiento busca mantener los niveles de glucosa en la sangre cerca de lo normal todo el tiempo posible para disminuir complicaciones. Por lo tanto, es necesaria la detección sistemática de los casos de diabetes en la población mayor de 25 años para un tratamiento oportuno. En la intervención se deben abarcar cambios en el estilo de vida, fomento de una cultura de ejercicio e introducción de hábitos de alimentación saludables (Boule y col., 2001 y Norris y col., 2002).

La diabetes tipo II puede manejarse, a menudo, satisfactoriamente con ejercicio y terapia nutricional o con medicamentos orales. Sin embargo, algunos de estos pacientes presentan acciones adversas a los medicamentos. Además, el tratamiento de la diabetes constituye una condición permanente, lo cual trae como consecuencia un costo económico considerable, limitando la atención al paciente (Reddy, 2000).

La Federación Mexicana de Diabetes ha formulado programas educativos y de adiestramiento que permiten orientar a la población para prevenir y mejorar la calidad de vida del diabético, modificando los malos hábitos alimentarios y el sedentarismo. La búsqueda de determinantes genéticos que nos permitan establecer una predisposición a la enfermedad permitirá mejores medidas de prevención de esta patología.

Los expertos señalan que es muy difícil que la diabetes desaparezca. No obstante, las personas predispuestas pueden retardar la aparición de la enfermedad e impedir las complicaciones que genera, lo cual será un valioso logro para el futuro (Burciaga y col., 1999).

## **HIPÓTESIS**

- Los polimorfismos SNP-19, -43 y -63 del gen CAPN10 se encuentran asociados con la diabetes mellitus tipo II en diabéticos atendidos en unidades médicas de la Secretaría de Salud del Estado de Querétaro.

## OBJETIVOS

### GENERAL

- Evaluar la asociación de tres polimorfismos del gen CAPN10 (SNP-19, 43 y 63) con la diabetes mellitus tipo II en pacientes diabéticos atendidos en unidades médicas de la Secretaría de Salud del Estado de Querétaro.

### ESPECÍFICOS

- Amplificar, por la técnica de PCR, tres regiones que presentan polimorfismo del gen que codifica para calpaína 10 (CAPN10) en muestras de sangre de personas clínicamente sanas y pacientes diabéticos tipo II.
- Evaluar la presencia de los polimorfismos SNP-19 y SNP-43 por medio de su amplificación por PCR y su identificación por electroforesis en geles de poliacrilamida en las poblaciones mencionadas.
- Evaluar la presencia del polimorfismo SNP-63 mediante su amplificación por PCR y su identificación utilizando la enzima de restricción *HhaI* (la cual actúa únicamente en presencia de determinado alelo) y su análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida.

## **METODOLOGÍA**

### **I. Población.**

Los individuos que participaron en el estudio son habitantes de los diferentes municipios del Estado de Querétaro seleccionados a partir de un muestreo aleatorio y restringido de la base de datos de pacientes atendidos en unidades médicas de la Secretaría de Salud del Estado de Querétaro. Las cuales cumplieron las siguientes características: tener de 30 a 45 años, con padres diabéticos, dichos pacientes deberán haber sido previamente diagnosticados para diabetes tipo II mediante determinaciones de glucosa en ayuno, curva de tolerancia a glucosa y/o hemoglobina glicosilada, y bajo constante monitoreo por la Secretaría de Salud. El número de pacientes analizados fue de 72. Para fines comparativos se tomó un grupo control de 79 personas sanas sin antecedentes de diabetes. A ambos grupos se les tomó una muestra de sangre.

### **II. Colección de la muestra.**

Se colectaron 2 ml de sangre total en un tubo que contenía 2 gotas de EDTA al 10%. Las muestras así colectadas fueron almacenadas a 4° C por un periodo menor a 5 días.

### **III. Materiales**

Tubos para microcentrifuga Eppendorf de 1.5 ml y 200  $\mu$ l

Microcentrifuga Eppendorf 5415D

Micropipetas automáticas de 1000, 100, 10 y 2  $\mu$ l

Incubadora

Papel absorbente

Espectrofotómetro

Termociclador (RoboCycler, gradient 96, Stratagene)

Cámara de electroforesis vertical (Hoefer SE 80, 8x11cm)

#### **IV. Métodos**

##### **IV.1 Extracción de DNA.**

1. Se agregaron 300µl de sangre total a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml que contenía 900µl de solución de lisis RBC. Se invirtió el tubo para mezclar y posteriormente se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. Se invirtió nuevamente el tubo al menos una vez durante la incubación.
2. Se centrifugó por 20 segundos a 15,000 X g (microcentrífuga Eppendorf 5415D). Se quitó el sobrenadante con una micropipeta dejando en el tubo la capa de células blancas y cerca de 10-20 µl del líquido residual.
3. Se agitó el tubo vigorosamente hasta resuspender las células en el líquido residual; esto facilitó mucho la lisis celular en los siguientes pasos.
4. Se agregaron 300µl de solución de lisis genómica a las células resuspendidas y se pipeteó arriba y abajo varias veces hasta homogeneizar, logrando con ello la lisis celular.
5. Se agregaron 1.5 µl de solución de RNAsa A al lisado celular. Se mezcló invirtiendo el tubo 25 veces y se incubó a 37° C por 30 minutos.
6. Se dejó enfriar la muestra a temperatura ambiente.
7. Se agregaron 100 µl de solución precipitante proteica a las células previamente lisadas.
8. Se agitó por 20 segundos para mezclar uniformemente la solución precipitante proteica con el lisado celular.
9. Se centrifugó a 15,000 X g por 3 minutos (microcentrífuga Eppendorf 5415D). Las proteínas precipitadas formaron una masa apretada en el fondo del tubo. Cuando la masa no estuvo lo suficientemente apretada se repitió el

paso 8 seguido por incubación en hielo por 5 minutos y se volvió a centrifugar.

10. Se retiró el sobrenadante que contenía el DNA y se colocó en un tubo de 1.5 ml que contenía 300  $\mu$ l de isopropanol al 100%. Se mezcló por inversión suave hasta observar el DNA precipitado.
11. Se centrifugó a 15,000 X g por 1 minuto (microcentrífuga Eppendorf 5415D). Se retiró el sobrenadante con una pipeta y se drenó el tubo sobre papel absorbente cuidando no perder el DNA precipitado.
12. Se agregaron 300  $\mu$ l de etanol al 70% y se invirtió el tubo varias veces para lavar el DNA.
13. Se centrifugó a 15,000 X g por un minuto (microcentrífuga Eppendorf 5415D). Se retiró el etanol con una pipeta, se invirtió y drenó el tubo sobre un papel absorbente. Se dejó secar el tubo a temperatura ambiente por 15 minutos.
14. Se agregaron 100  $\mu$ l de solución amortiguadora hidratante de DNA. Se incubó la muestra toda una noche a temperatura ambiente.

#### **IV.2 Cuantificación de DNA.**

1. Se colocaron 10  $\mu$ l de muestra de DNA extraído en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y se le agregaron 990  $\mu$ l de agua. Teniendo una dilución 1:100 de la muestra de DNA.
2. Se preparó el espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm.
3. Se colocaron los 1000  $\mu$ l de la dilución de DNA en una celda de cuarzo del espectrofotómetro y se realizó la medición de la absorbancia.
4. Se calculó la concentración de DNA de la dilución por medio de la siguiente fórmula:

$$[\text{DNA}]_{\mu\text{g/ml}} = (50_{\mu\text{g/ml}}) (\text{UA})$$

5. Se calculó la concentración de DNA en la muestra concentrada multiplicando la concentración de la muestra diluida por 100.

### **IV.3 Evaluación de los polimorfismos.**

Del DNA genómico extraído de los linfocitos de sangre periférica se evaluaron los polimorfismos SNP-19, SNP-43 y SNP-63 (Evans y col., 2001).

#### **IV.3.1 Reacción en cadena de la polimerasa.**

La reacción de amplificación para cada uno de los tres polimorfismos a analizar se llevó a cabo en un volumen de 50  $\mu$ l, el cual contenía solución amortiguadora para PCR 1X (concentración final de 20 mM de Tris-HCl pH 8.4 y 50 mM de KCl), una concentración final de 100  $\mu$ M de cada dNTP,  $MgCl_2$  concentración final de 1.5 mM, 1 U de *Taq* DNA Polimerasa (Invitrogen) y 100 ng de DNA genómico.

**SNP-19** (CAPN10-g.7920indel32pb). Para la reacción de amplificación del polimorfismo con inserción/delección SNP-19 se utilizó el siguiente oligonucleótido sentido 5'-GTTTGGTTCTCTTCAGCGTGGAG-3' y el oligonucleótido antisentido 5'-CATGAACCCTGGCAGGGTCTAAG-3'. La concentración final de cada uno de los oligonucleótidos en la reacción de 50  $\mu$ l fue de 2  $\mu$ M. Las condiciones de la reacción fueron 95 °C por 3 minutos; 40 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 60 °C por 1 minuto y 72 °C por 1 minuto; y 72 °C por 5 minutos (Termociclador RoboCycler, gradient 96, Stratagene). Los fragmentos amplificados de esta forma fueron: alelo 1 (dos repeticiones de una secuencia de 32 pb) de 155 pb y alelo 2 (tres repeticiones de esta misma secuencia) de 187 pb.

**SNP-43** (CAPN10-g.4852G/A). Para la reacción de amplificación de este polimorfismo se utilizó el siguiente oligonucleótido sentido 5'-CATCCATAGCTTCCACGCCTC-3', un oligonucleótido antisentido para el alelo 1



5'-GCTTAGCCTCACCTTCAATC-3' y un oligonucleótido antisentido para el alelo 2 5'-ATCCTCACCAAGTCAAGCGTTAGCCTCACCTTCAAGT-3'. La concentración final de cada uno de los oligonucleótidos en los 50 µl de la reacción fue de 2.4 µM. Las condiciones de la reacción fueron 95 °C por 3 minutos; 40 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 54 °C por 1 minuto y 72 °C por 1 minuto; y 72 °C por 5 minutos (Termociclador RoboCycler, gradient 96, Stratagene). Los fragmentos amplificados de esta forma fueron: alelo 1 (G) de 134 pb y alelo 2 (A) de 152 pb.

**SNP-63** (CAPN10-g.16378C/T). Para la reacción de amplificación de este polimorfismo se utilizó el oligonucleótido sentido 5'-AAGGGGGGGCCAGGGCCTGACGGGGTGGCG-3' y el oligonucleótido antisentido 5'-AGCACTCCCAGCTCCTGATC-3'. La concentración final de cada uno de los oligonucleótidos en la reacción de 50 µl fue de 2.6 µM. Las condiciones de la reacción fueron 95 °C por 3 minutos; 40 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 66 °C por 1 minuto y 72 °C por 1 minuto; y 72 °C por 5 minutos (Termociclador RoboCycler, gradient 96, Stratagene). Se tomaron 9 µl del producto que se obtuvo de la reacción de amplificación y se digirió con dos unidades de la enzima de restricción *HhaI* durante 2 h a 37 °C. Los fragmentos amplificados y digeridos de esta forma fueron: alelo 1 (C) de 162 pb y alelo 2 (T) de 192 pb.

### **IV.3.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida**

#### Preparación de geles de poliacrilamida

1. El análisis electroforético de los productos de PCR obtenidos en los pasos anteriores se llevó a cabo en geles de poliacrilamida al 10% para SNP-19 y SNP-63, en el caso de SNP-43 se utilizaron geles al 15% de poliacrilamida.
2. Para la preparación de cada gel de poliacrilamida al 10% se utilizaron las siguientes soluciones: 3.33 ml (5 ml para el gel al 15%) de acrilamida al 30% con 0.8% de bis(N, N'-metilen-bis-acrilamida), 4.6 ml (2.93 ml para el gel al 15%) de agua, 2 ml de solución amortiguadora TBE 5X (0.445 M de Tris-

borato y 0.01 M de EDTA), 70  $\mu$ l de persulfato de amonio al 10% y 3.5  $\mu$ l de TEMED. El volumen total de cada gel fue 10 ml.

3. El persulfato de amonio y el TEMED se añadieron a la solución de los geles inmediatamente antes de vaciarla al molde.

#### Electroforesis en geles de poliacrilamida

Se utilizó una cámara de electroforesis vertical Hoefer SE 280 para un gel de 8 x 11 cm. Después de preparado el gel, se colocó en el molde formado por dos placas de vidrio, dos separadores y un peine para 10 pozos. Se dejó en reposo hasta la polimerización del gel. El molde se colocó en la cámara de electroforesis vertical. Se lavaron los pozos con solución amortiguadora TBE 1X( 0.089 M de Tris-borato y 0.002 M de EDTA) y posteriormente se llenó la cámara con la misma solución amortiguadora. Se realizó una pre-corrida por 5 minutos a 400V.

Para el análisis del producto de PCR de cada muestra se realizó la siguiente mezcla: 5  $\mu$ l del producto de PCR, 4  $\mu$ l de solución amortiguadora TBE 1X y 1  $\mu$ l de solución amortiguadora de carga (0.25% de azul de bromofenol, 0.25% de xilencianol FF y 15% de ficol tipo 400 en agua) . Esta mezcla se colocó en un pozo del gel. Los geles se corrieron a 400V por 75 minutos.

#### Tinción de geles de poliacrilamida con nitrato de plata

El gel se agitó por 20 minutos en solución A (etanol al 50% y ácido acético al 7% en agua desionizada) contenida en un recipiente de vidrio. Después se agitó dos veces en una solución B (etanol al 10% y ácido acético al 1% en agua desionizada) por 10 minutos cada una. Posteriormente, el gel se agitó en la solución C (nitrato de plata 12 mM en agua desionizada) por 40 minutos y se lavó con agua desionizada por 15 segundos. Finalmente el gel se agitó vigorosamente en 20 ml de solución D (hidróxido de potasio al 0.75% y formaldehído al 0.2% en agua desionizada) por 20

segundos, se desechó esta solución y se añadieron 30 ml de la solución D, agitándose suavemente hasta la visualización de las bandas de DNA. En ese momento se paró la reacción lavándose con agua corriente.

## **V. Diseño experimental**

Se utilizó  $\chi^2$  como método estadístico para el análisis comparativo de las frecuencias de los alelos en pacientes diabéticos con el grupo de personas sanas.

## RESULTADOS

Con base en la asociación reportada de los polimorfismo SNP-19, -43 y -63 del gen CAPN10 con la diabetes mellitus tipo II en población México-Americana (Horikawa y *col.*, 2000), en este trabajo, se investigó la presencia o no de dicha asociación en una muestra de población queretana. El primer paso para ello fue la amplificación, mediante la técnica de PCR, de los fragmentos de DNA correspondientes a los tres polimorfismos.

Después de la amplificación de los fragmentos, para algunas muestras estudiadas, se seleccionaron muestras heterocigotas de cada polimorfismo y se compararon con un estándar de DNA de escalera de 100 pb para verificar que los fragmentos amplificados correspondieran con los reportados (Figura 5).

### I. Polimorfismo SNP-19

El polimorfismo SNP-19 se trata de una inserción/delección por lo que fue fácil diferenciar a los dos alelos. El alelo 1 (dos repeticiones de una secuencia de 32 pb) de 155 pb y alelo 2 (tres repeticiones de esta misma secuencia) de 187 pb.

En la Figura 6 se observa una serie de muestras analizadas del polimorfismo SNP-19 para individuos clínicamente sanos. Se pueden observar homocigotos para cada uno de los alelos, con la presencia de una sola banda de 155 pb (homocigotos para el alelo 1, denotados 11) o 187 pb (homocigotos para el alelo 2, denotados 22) y heterocigotos con la presencia de dos bandas una de 155 pb y la otra de 187 pb (denotados 12). Las muestras analizadas en un gel de poliacrilamida al 10% se compararon con un estándar de DNA de escalera de 50 pb.

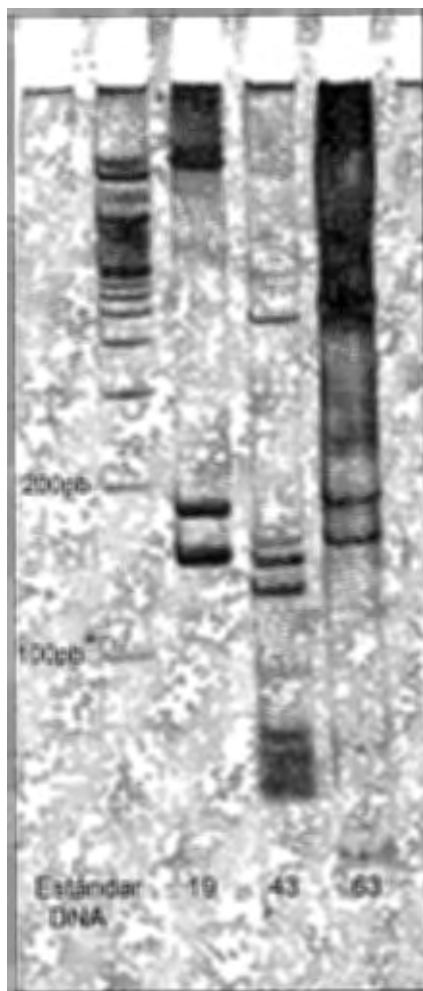


Figura 5. Estándar de DNA de escalera de 100 pb junto a muestras heterocigotas para cada uno de los polimorfismos SNP-19 (155 y 187 pb) , -43 (134 y 152 pb) y -63 (162 y 192 pb) en gel de poliacrilamida al 15% teñido con nitrato de plata.

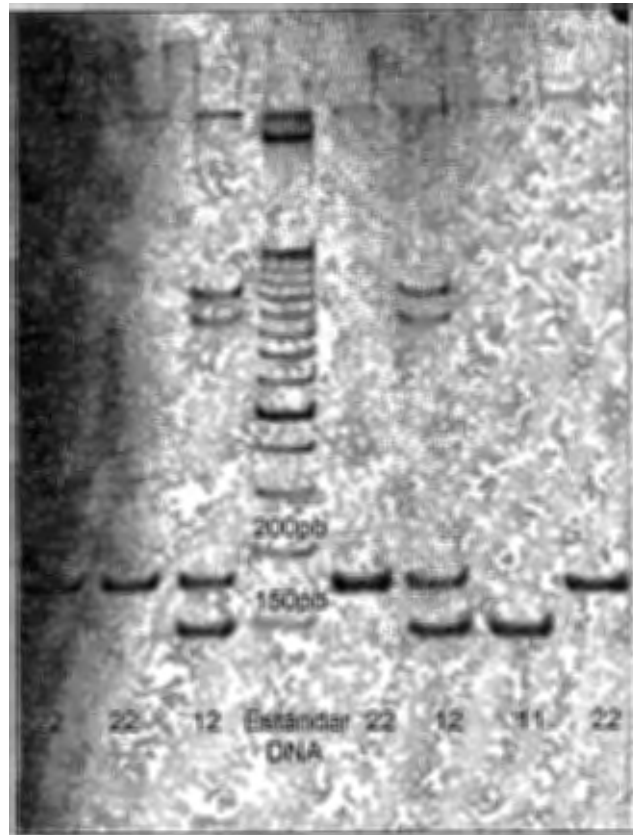


Figura 6. Análisis del polimorfismo SNP-19 para una serie de muestras de personas clínicamente sanas junto a un estándar de DNA de escalera de 50 pb en gel de poliacrilamida al 10% teñido con nitrato de plata.

Como se mencionó anteriormente, para fines de comparación, se tomó un grupo de muestras de personas clínicamente sanas. Los resultados del análisis del polimorfismo SNP-19 para todas las muestras de este grupo, obtenidos como se ilustró en las fotografías anteriores, se presentan en el siguiente Cuadro.

H69322

Cuadro 3. Resultados del análisis del polimorfismo SNP-19 para el grupo de personas clínicamente sanas.

Número de muestra	Genotipo
1	12
2	22
3	12
4	12
5	12
6	12
7	11
8	22
9	12
10	22
11	22
12	12
13	22
14	12
15	11
16	22
17	22
18	22
19	22
20	12
21	12
22	11
23	22
24	12
25	22
26	12
27	12
28	12
29	12
30	12
31	12
32	12
33	12
34	12
35	22
36	22
37	12
38	11
39	22

40	12
41	12
42	12
43	12
44	22
45	22
46	22
47	12
48	22
49	22
50	12
51	22
52	22
53	12
54	12
55	22
56	12
57	12
58	12
59	22
60	22
61	12
62	22
63	12
64	12
65	12
66	12
67	12
68	22
69	12
70	12
71	12
72	12
73	12
74	12
75	12
76	22
77	22
78	12
79	12

11 homocigotos para el alelo 1 (155 pb)  
22 homocigotos para el alelo 2 (187 pb)  
12 heterocigotos

Para el análisis del polimorfismo SNP-19 de las muestras de pacientes diagnosticados para diabetes tipo II se repitió el procedimiento anterior. Las bandas a observar fueron las mismas: alelo 1 de 155 pb y alelo 2 de 187 pb. En la Figura 7 se observa la presencia tanto de homocigotos para cada uno de los alelos de este polimorfismo como de heterocigotos. Para este gel de poliacrilamida, al igual que los siguientes, no fue necesaria la utilización de estándar de DNA ya que con base en la figura 5 se sabe a que altura se presentan las bandas esperadas.

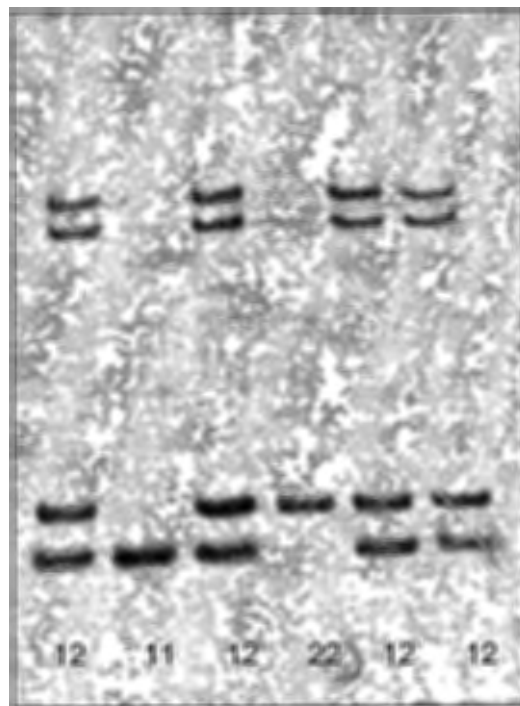


Figura 7. Análisis del polimorfismo SNP-19 para una serie de muestras de pacientes diabéticos tipo II en gel de poliacrilamida al 10% teñido con nitrato de plata.

Los resultados del análisis del polimorfismo SNP-19 para todas las muestras del grupo estudiado de personas diagnosticadas para diabetes mellitus tipo II del Estado de Querétaro se muestran en el siguiente Cuadro.



Cuadro 4. Resultados del análisis del polimorfismo SNP-19 para el grupo de pacientes diagnosticados para diabetes mellitus tipo II.

Número de muestra	Genotipo
1	12
2	22
3	12
4	11
5	12
6	22
7	22
8	12
9	22
10	12
11	12
12	22
13	12
14	22
15	12
16	12
17	22
18	12
19	12
20	12
21	22
22	22
23	12
24	11
25	22
26	22
27	22
28	22
29	12
30	12
31	12
32	12
33	12
34	12
35	11

36	12
37	22
38	12
39	12
40	12
41	22
42	12
43	11
44	12
45	12
46	22
47	12
48	12
49	12
50	12
51	12
52	12
53	12
54	12
55	22
56	12
57	22
58	12
59	12
60	22
61	12
62	12
63	22
64	11
65	11
66	12
67	12
68	11
69	12
70	12
71	22
72	22

11 homocigotos para el alelo 1 (155 pb)

22 homocigotos para el alelo 2 (187 pb)

12 heterocigotos

La información obtenida del análisis del polimorfismo SNP-19 tanto del grupo de personas clínicamente sanas como de pacientes diagnosticados para diabetes tipo II se puede resumir en la Cuadro 5. Ahí se muestran los resultados de la frecuencia de homocigotos y heterocigotos del polimorfismo SNP-19 en los dos grupos estudiados. Para evaluar el ligamiento del polimorfismo SNP-19 con la diabetes mellitus tipo II se realizó el cálculo de la frecuencia de los alelos "p" (1) y "q" (2). Se asume que los alelos analizados se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg, tanto en población clínicamente sana como en el grupo de pacientes diabéticos.

Cuadro 5. Frecuencias de los alelos estudiados del polimorfismo SNP-19 en personas sanas y diabéticas.

	No diabéticos	Diabéticos
Muestras analizadas	79	72
Homocigotos alelo 1(p)	4	7
Homocigotos alelo 2(q)	28	22
Heterocigotos (pq)	47	43
p	0.348	0.369
q	0.652	0.604

Para evaluar si las diferencias en las frecuencias de los alelos encontradas en las dos poblaciones era significativa, se tomó la frecuencia del alelo "q" y se hizo la comparación entre el grupo de diabéticos y el de personas sanas mediante un análisis estadístico de  $\chi^2$ . Los resultados obtenidos fueron  $\chi^2 = 0.0957$  y  $P = 0.83$ , lo que indica que no existe diferencia significativa en la frecuencia de este alelo entre las dos poblaciones comparadas.

## II. Polimorfismo SNP-43

En el caso del polimorfismo SNP-43, la utilización de oligonucleótidos antisentido específicos para cada alelo nos permitió diferenciar al alelo 1(G) de 134 pb del alelo 2(A) de 152 pb. En la Figura 8 se presentan los resultados obtenidos para el polimorfismo SNP-43 de una serie de muestras de personas clínicamente sanas. Para fines comparativos se corrió sobre el mismo gel una muestra heterocigota de SNP-19 previamente analizada.

Los resultados del análisis del polimorfismo SNP-43 para todas las muestras del grupo de individuos clínicamente sanos se presentan en el Cuadro 6.

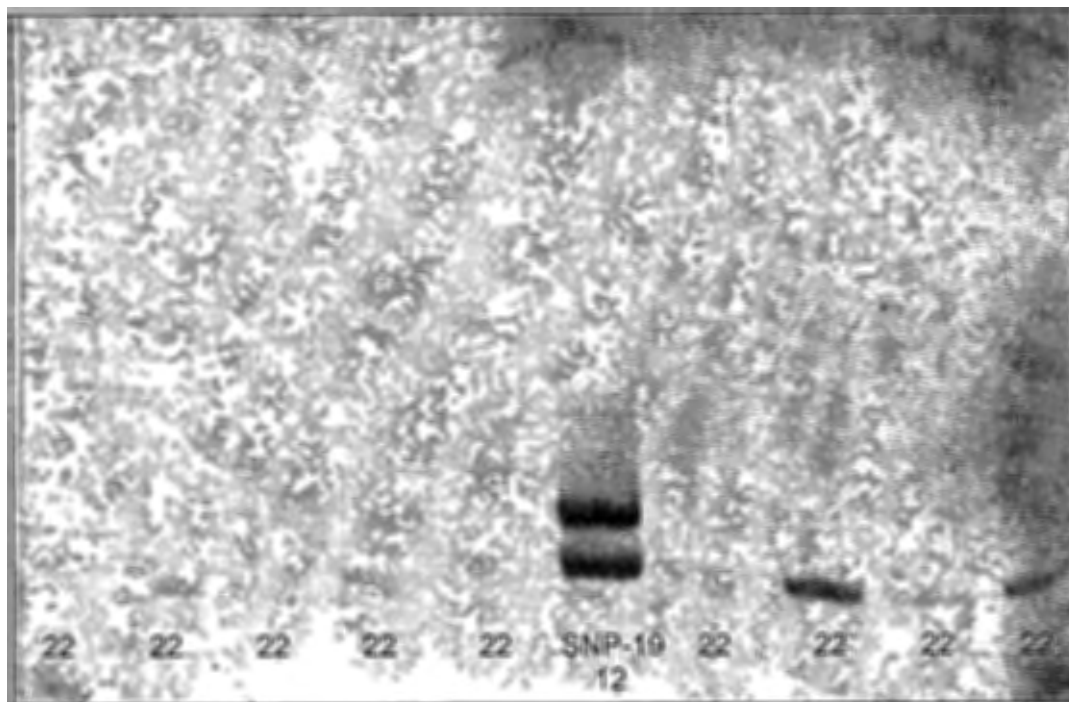


Figura 8. Análisis del polimorfismo SNP-43 para una serie de muestras de personas clínicamente sanas en gel de poliacrilamida al 15% teñido con nitrato de plata.

Cuadro 6. Resultados del análisis del polimorfismo SNP-43 para el grupo de personas clínicamente sanas.

Número de muestra	Genotipo
1	12
2	12
3	22
4	22
5	12
6	22
7	22
8	12
9	22
10	22
11	22
12	22
13	22
14	22
15	12
16	22
17	22
18	22
19	22
20	22
21	22
22	22
23	22
24	22
25	22
26	22
27	22
28	22
29	22
30	22
31	22
32	12
33	22
34	22
35	22
36	22
37	22
38	22
39	22

40	22
41	22
42	22
43	22
44	22
45	22
46	22
47	22
48	22
49	22
50	22
51	22
52	12
53	22
54	22
55	22
56	22
57	12
58	12
59	11
60	11
61	22
62	22
63	22
64	22
65	22
66	22
67	22
68	22
69	22
70	22
71	22
72	22
73	22
74	22
75	22
76	22
77	22
78	22
79	11

11 homocigotos para el alelo 1(G) (134 pb)

22 homocigotos para el alelo 2(A) (152 pb)

12 heterocigotos

De la misma forma que para el análisis del polimorfismo SNP-43 de las muestras de personas clínicamente sanas, se realizó el análisis de este polimorfismo para el grupo de pacientes diagnosticados para diabetes tipo II. En la Figura 9 se muestran algunos resultados de este análisis para el grupo de diabéticos estudiados junto con una muestra heterocigota del polimorfismo SNP-19.

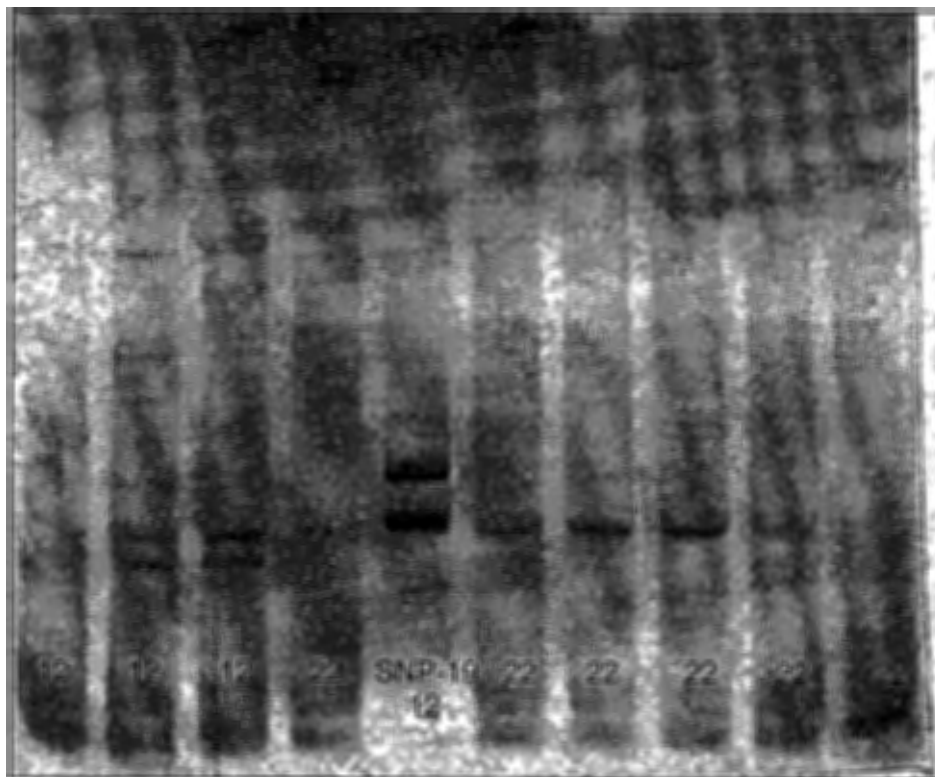


Figura 9. Análisis del polimorfismo SNP-43 para una serie de muestras de pacientes diabéticos tipo II en gel de poliacrilamida al 15% teñido con nitrato de plata.

Cuadro 7. Resultados del análisis del polimorfismo SNP-43 para el grupo de pacientes diagnosticados para diabetes mellitus tipo II.

Número de muestra	Genotipo
1	22
2	22
3	22
4	22
5	22
6	22
7	22
8	12
9	22
10	22
11	22
12	22
13	22
14	22
15	22
16	22
17	22
18	22
19	22
20	22
21	22
22	22
23	22
24	22
25	22
26	22
27	22
28	22
29	22
30	22
31	22
32	22
33	22
34	12
35	12

36	12
37	22
38	12
39	22
40	22
41	22
42	22
43	22
44	22
45	22
46	11
47	22
48	22
49	22
50	22
51	11
52	11
53	11
54	11
55	22
56	22
57	22
58	22
59	11
60	22
61	22
62	22
63	11
64	11
65	11
66	11
67	11
68	11
69	11
70	11
71	11
72	11

11 homocigotos para el alelo 1(G) (134 pb)

22 homocigotos para el alelo 2(A) (152 pb)

12 heterocigotos

Los resultados del análisis del polimorfismo SNP-43 para todas las muestras del grupo estudiado de personas diabéticas tipo II del Estado de Querétaro se muestran en el Cuadro 7. En el Cuadro 8 se muestran los resultados de la frecuencia de homocigotos para cada uno de los alelos estudiados del polimorfismo SNP-43 así como de heterocigotos. Para evaluar el posible ligamiento del polimorfismo SNP-43 con la diabetes mellitus tipo II en población queretana se calculó la frecuencia de los alelos "p" (1) y "q" (2). Se asume que dichos alelos se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg, tanto en personas clínicamente sanas como en el grupo estudiado de individuos enfermos.

Cuadro 8. Frecuencias de los alelos estudiados del polimorfismo SNP-43 en personas sanas y diabéticas.

	NO DIABÉTICOS	DIABÉTICOS
Muestras analizadas	79	72
Homocigotos alelo 1(p)	3	16
Homocigotos alelo 2(q)	67	51
Heterocigotos (pq)	9	5
p	0.095	0.257
q	0.905	0.743

Para evaluar si la frecuencia del alelo "q" entre el grupo de diabéticos y el de personas sanas difiere significativamente se realizó un análisis estadístico  $\chi^2$ . Los resultados obtenidos fueron  $\chi^2 = 20.86$  y  $P < 0.005$ , lo que indica que existe diferencia significativa en la frecuencia de este alelo.

### III. Polimorfismo SNP-63

Para la identificación de los alelos del polimorfismo SNP-63 se amplificó un fragmento de 192 pb donde se encontraba dicho polimorfismo y posteriormente se trató con la enzima de restricción *HhaI* específica para la secuencia 5'-GCG↓C-3' que digirió solo al fragmento con el alelo 1(C) mientras que el fragmento con el

alelo 2(T) no presentó el sitio de corte. Así se pudo observar al alelo 1(C) con la presencia de una banda de 162 pb y al alelo 2(T) con una banda de 192 pb. La presencia de las dos bandas indicó heterocigoto para dicho polimorfismo.

La Figura 10 muestra el análisis de este polimorfismo para una serie de personas clínicamente sanas. Se puede observar homocigotos para el alelo 1 (C) (denotados 11) así como heterocigotos del polimorfismo (denotados 12). Para verificar que se trata de las bandas esperadas, las muestras se corrieron junto a una muestra heterocigota del polimorfismo SNP-19 previamente analizada.

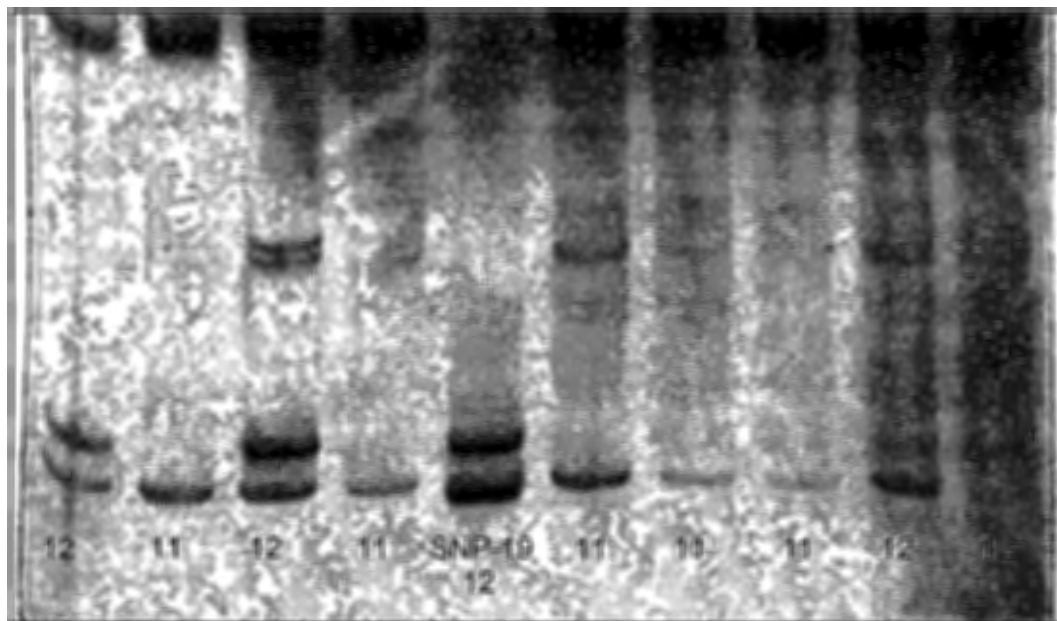


Figura 10. Análisis del polimorfismo SNP-63 para una serie de muestras de personas clínicamente sanas en gel de poliacrilamida al 10% teñido con nitrato de plata.

Los resultados del análisis del polimorfismo SNP-63 para todas las muestras del grupo de individuos clínicamente sanos se presentan en el siguiente Cuadro.



Cuadro 9. Resultados del análisis del polimorfismo SNP-63 para el grupo de personas clínicamente sanas.

Número de muestra	Genotipo
1	11
2	11
3	11
4	11
5	12
6	-
7	12
8	11
9	11
10	-
11	-
12	12
13	11
14	12
15	11
16	11
17	11
18	11
19	11
20	12
21	11
22	12
23	11
24	-
25	11
26	12
27	11
28	11
29	12
30	11
31	12
32	12
33	11
34	11
35	22
36	12
37	11
38	11
39	11

40	12
41	22
42	12
43	11
44	11
45	12
46	11
47	22
48	11
49	11
50	12
51	11
52	22
53	22
54	12
55	11
56	12
57	12
58	22
59	12
60	12
61	12
62	-
63	12
64	22
65	22
66	-
67	22
68	22
69	12
70	12
71	22
72	22
73	12
74	22
75	12
76	11
77	11
78	12
79	22

- 11 homocigotos para el alelo 1(C) (162 pb)
- 22 homocigotos para el alelo 2 (T) (192 pb)
- 12 heterocigotos
- no determinado

El análisis del polimorfismo SNP-63 para el grupo de pacientes diagnosticados para diabetes tipo II del Estado de Querétaro se realizó de la misma manera que para el grupo de individuos clínicamente sanos. La Figura 11 muestra una serie de resultados de este análisis para este grupo de diabéticos.

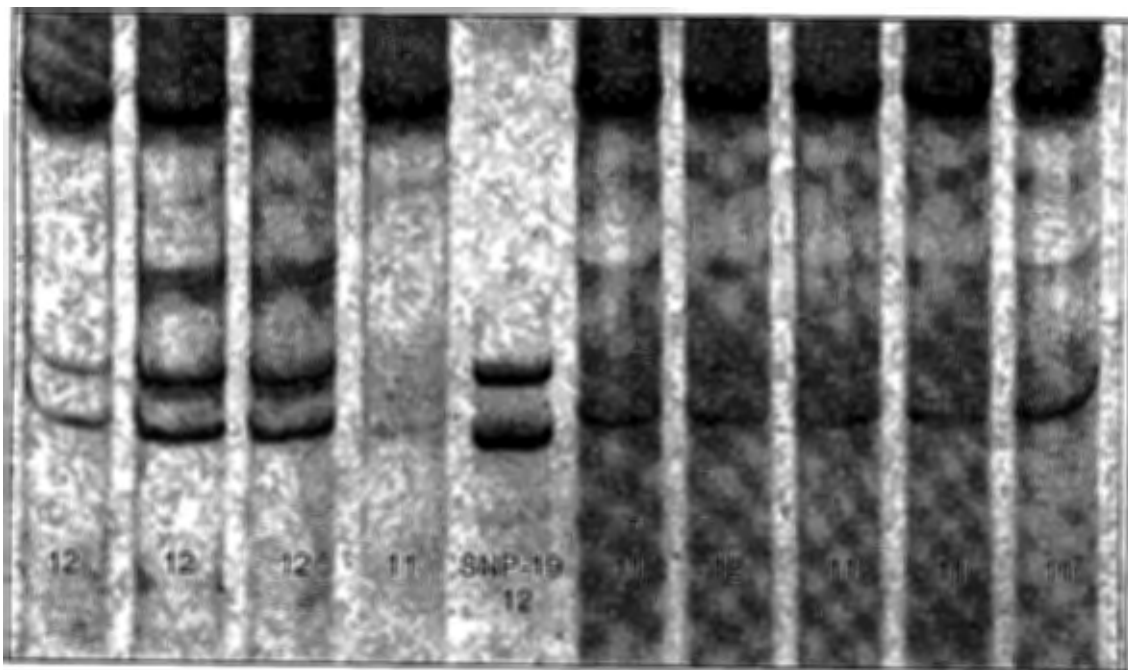


Figura 11. Análisis del polimorfismo SNP-63 para una serie de muestras de pacientes diabéticos tipo II en gel de poliacrilamida al 10% teñido con nitrato de plata.

Los resultados del análisis del polimorfismo SNP-63 para todas las muestras del grupo de personas diagnosticadas para diabetes mellitus tipo II del Estado de Querétaro analizadas como se mencionó anteriormente se muestran en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Resultados del análisis del polimorfismo SNP-63 para el grupo de pacientes diagnosticados para diabetes mellitus tipo II.

Número de muestra	Genotipo
1	12
2	-
3	12
4	12
5	12
6	11
7	11
8	11
9	11
10	12
11	12
12	11
13	-
14	11
15	12
16	12
17	11
18	12
19	11
20	11
21	11
22	11
23	11
24	12
25	11
26	11
27	-
28	11
29	11
30	11
31	11
32	11
33	11
34	12
35	12
36	12
37	11
38	12

39	12
40	12
41	11
42	12
43	12
44	12
45	12
46	11
47	11
48	11
49	11
50	11
51	12
52	12
53	12
54	11
55	11
56	12
57	11
58	-
59	12
60	11
61	12
62	12
63	22
64	22
65	22
66	12
67	12
68	22
69	12
70	12
71	11
72	11

- 11 homocigotos para el alelo 1(C) (162 pb)
- 22 homocigotos para el alelo 2 (T) (192 pb)
- 12 heterocigotos
  - no determinado

En el Cuadro 11 se presentan los resultados de la frecuencia de homocigotos para cada uno de los alelos estudiados del polimorfismo SNP-63 así como de heterocigotos. Para realizar el análisis de posible ligamiento de este polimorfismo con la diabetes mellitus tipo II en población queretana se calculó la frecuencia de los alelos "p" (1) y "q" (2). Se asume que los alelos analizados se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg, tanto en población clínicamente sana como en el grupo de individuos diabéticos.

Cuadro 11. Frecuencias de los alelos estudiados para el polimorfismo SNP-63 en personas sanas y diabéticas.

	No diabéticos	Diabéticos
Muestras analizadas	73	68
Homocigotos alelo 1(p)	32	33
Homocigotos alelo 2(q)	14	4
Heterocigotos (pq)	27	31
p	0.623	0.713
q	0.377	0.287

Para evaluar si las frecuencias alélicas de las dos poblaciones difieren significativamente, se comparó la frecuencia del alelo "q" entre el grupo de diabéticos y el de personas sanas y se realizó un análisis estadístico de  $\chi^2$ . Los resultados obtenidos fueron  $\chi^2 = 0.917$  y  $P = 0.41$ , lo que indica que no existe diferencia significativa en la frecuencia de este alelo.

#### IV. Combinación de haplotipos

Además del análisis de ligamiento de cada uno de los polimorfismos SNP-19, 43 y 63 a la diabetes mellitus tipo II en población queretana, se realizó un análisis de asociación de las combinaciones de haplotipos presentes en las muestras con diabetes.

Cuadro 12. Frecuencias de combinaciones de haplotipos para los polimorfismos SNP-19, 43 y 63 en personas clínicamente sanas y en pacientes diagnosticados para diabetes tipo II.

Haplotipos	No diabéticos frecuencia	Diabéticos frecuencia
112/112	0	0.044
121/112	0	0.015
121/111	0.014	0
121/121	0.014	0
211/111	0	0.015
211/112	0	0.118
211/121	0.014	0.015
211/211	0	0.044
212/112	0.014	0
212/121	0.041	0.044
212/211	0.027	0
212/212	0	0.015
221/121	0.151	0.176
221/211	0.027	0
221/221	0.220	0.235
122/121	0.027	0.044
122/212	0.014	0
122/221	0.247	0.235
222/212	0.014	0
222/221	0.027	0
222/122	0.123	0
222/222	0.027	0

En las muestras analizadas se encontraron 22 combinaciones de las 27 combinaciones posibles de haplotipos para los tres polimorfismos en el siguiente orden SNP-19, 43 y 63. En el Cuadro 12 se muestran las frecuencias de cada una de las combinaciones de haplotipos encontradas en cada grupo estudiado.

## DISCUSIÓN

En un estudio realizado a una población México-Americana se reportó que variaciones en las regiones no codificantes del gen CAPN10 están asociadas con la predisposición a la diabetes mellitus tipo II (Horikawa y col., 2000). Con base en esa evidencia de asociación de los polimorfismos SNP-19, -43 y -63 del gen CAPN10 con la diabetes mellitus tipo II en una población estrechamente relacionada con la mexicana, se decidió evaluar dicha asociación en una muestra de la población queretana.

En el presente estudio se encontró que, para el polimorfismo SNP-19, los valores de "p" (alelo 1) y "q" (alelo 2) entre el grupo de personas clínicamente sanas y el grupo de diabéticos tipo II son bastante similares. Los resultados obtenidos del análisis estadístico de  $\chi^2$  nos indican que los dos grupos no difieren significativamente y por lo tanto pueden considerarse como pertenecientes a la misma población. Con ello se puede afirmar que no existe ligamiento de ninguno de los dos alelos de SNP-19 analizados con la diabetes mellitus tipo II en la población estudiada.

En estudios anteriores, el polimorfismo SNP-19 fue asociado con diabetes mellitus tipo II en México-Americanos. Sin embargo, en la población queretana estudiada no encontramos dicha asociación. Esto nos indica la existencia de variación genética en las poblaciones, incluso en aquellas con orígenes comunes. Y, por lo tanto, la necesidad de una búsqueda de determinantes genéticos específicos de la población de interés.

Además del polimorfismo SNP-19 se decidió analizar el polimorfismo SNP-43 del mismo gen. Para este análisis se compararon los valores de "p" y "q" del grupo de personas sanas con el grupo de pacientes diabéticos. Se pudo notar que parecía existir una diferencia significativa entre los valores de "p" y "q" entre los dos grupos

estudiados. Los resultados del análisis estadístico de  $\chi^2$  nos confirmaron que existe una diferencia significativa entre los dos grupos. Por ello, podemos decir que existe ligamiento del alelo 1(G) del polimorfismo SNP-43 a la diabetes mellitus tipo II en esta población.

Se ha reportado que existe asociación del polimorfismo SNP-43 con la diabetes mellitus tipo II en una población México-Americana. Además que, en estudios *in vitro*, el alelo 1(G) de este polimorfismo tiene mayor actividad transcripcional que el alelo 2(A) (Horikawa y col., 2000). En otros estudios se reporta que en personas homocigotas para el alelo G de este polimorfismo existe una reducción en los niveles de mRNA de calpaína 10 y resistencia a insulina en músculo esquelético (Baier y col., 2000).

Interesantemente, la diferencia entre las dos principales isoformas de mRNA de CAPN10 esta determinada por sitios de procesamiento en el intrón 3, intrón en el cual se encuentra el polimorfismo SNP-43 (Yang y col., 2001). Estos resultados en conjunto sugieren que el sitio afectado por SNP-43 pudiera jugar un papel importante en la regulación transcripcional o en la desestabilización del transcrito primario. Nosotros encontramos resultados similares a los reportados sobre la asociación de este polimorfismo a la diabetes tipo II. Por ello podemos sugerir que, en la población estudiada, este polimorfismo pudiera alterar la regulación transcripcional de calpaína 10 o generar transcritos inestables.

Por otra parte, los resultados del análisis estadístico de  $\chi^2$  indican que en el polimorfismo SNP-63 la frecuencia tanto del alelo "p" como del "q" del grupo de personas sanas no es significativamente diferente que la frecuencia de estos mismos alelos en el grupo de diabéticos. Esto sugiere que no existe ligamiento de ninguno de los alelos estudiados del polimorfismo SNP-63 a la diabetes mellitus tipo II en la población queretana estudiada.



De los tres polimorfismos estudiados, solo el alelo 1 (G) del polimorfismo SNP-43 presentó ligamiento a la diabetes mellitus tipo II en la población estudiada. En investigaciones previas se reportaron resultados similares: fuerte ligamiento del polimorfismo SNP-43 a la diabetes tipo II en México-Americanos y en dos poblaciones europeas de Finlandia y Alemania. En este mismo estudio se encontró que la combinación de haplotipos 211/112 (definido por SNP-19, -43 y -63, respectivamente) esta asociada con un incremento de tres veces el riesgo de esta enfermedad en dichas poblaciones (Horikawa y col., 2000).

Para analizar la asociación de combinaciones de haplotipos de los polimorfismos SNP-19, 43 y 63 a la enfermedad, se calcularon las frecuencias de las combinaciones de haplotipos presentes en las muestras estudiadas tanto del grupo de personas clínicamente sanas como del grupo de pacientes diabéticos. Haciendo la comparación de las frecuencias de dichas combinaciones de haplotipos para cada uno de los grupos estudiados podemos observar que sólo existe diferencia significativa en las combinaciones de haplotipos 211/112 y 222/122 (en el orden SNP-19, 43 y 63).

La combinación de haplotipos 222/122 está significativamente aumentada en el grupo de personas clínicamente sanas en comparación con el grupo de diabéticos. Lo que nos sugiere que, de alguna manera, la presencia de esta combinación de haplotipos pudiera "proteger" de la susceptibilidad a la diabetes tipo II, al menos en la población estudiada. Por otro lado la combinación de haplotipos 211/112 esta significativamente aumentada en el grupo de pacientes diabéticos. Por lo anterior podemos sugerir que, en la población estudiada, existe asociación de la combinación de haplotipos 211/112 a la diabetes mellitus tipo II. Resultado que concuerda con lo reportado previamente (Horikawa y col., 2000).

Esta última combinación de haplotipos contiene el homocigoto del alelo 1(G) del polimorfismo SNP-43. Alelo que, con base en nuestros resultados, está asociado con la enfermedad en la población estudiada. Por lo anterior, no es de sorprender

la asociación de esta combinación con la enfermedad. Sin embargo, otras combinaciones en las cuales se encuentra el homocigoto del alelo 1(G) de SNP-43 no presentaron asociación, con lo que podemos sugerir que existen complejas interacciones entre los alelos de los polimorfismos estudiados y tal vez otras regiones del gen CAPN10 u otros genes.

## CONCLUSIONES

No existe asociación de los polimorfismos SNP-19 y SNP-63 con la presencia de diabetes tipo II, en el grupo de pacientes estudiado y atendidos en unidades médicas de la Secretaría de Salud del Estado de Querétaro.

Existe una asociación estadísticamente significativa entre la presencia del alelo 1(G) del polimorfismo SNP-43 y la presencia de diabetes mellitus tipo II. Esto sugiere que dicha variación del gen CAPN10 pudiera estar involucrada en la susceptibilidad a la enfermedad en la población estudiada.

La combinación de haplotipos 211/112 (en orden SNP-19, -43 y -63) tiene una asociación significativa con la enfermedad en la población estudiada.

El polimorfismo SNP-43 y la combinación de haplotipo 211/112 del gen CAPN10 pueden ser utilizados, junto con otras variaciones en el mismo o en otros genes, como marcadores genéticos para predisposición para esta enfermedad.

## BIBLIOGRAFÍA

**American Diabetes Association. 2000.** Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes mellitus. *Diabetes Care*: Vol. 23 suppl 1:S4-19.

**Baier, Leslie J., Paskasari A. Permana, Xiaolin Y., Richard E. Pratley, Robert L. Hanson, Gong-Qing S., Mott D., William C. Knowler, Cox N., Horikawa Y., Oda N., Bell G., y Bogardus C. 2000.** A calpain-10 gene polymorphism is associated with reduced muscle mRNA levels and insulin resistance. *J Clin Invest.*: Vol. 106: 69-73.

**Barquera, S., Tovar-Guzmán V., Campos-Nonato I., González-Villalpando C. y Rivera-Dommarco J. 2003.** Geography of diabetes mellitus mortality in Mexico: An epidemiologic transition analysis. *Arch Med Res.*: Vol. 34 (5): 407-414.

**Becker, K. L. 2001.** Principles and practice of endocrinology and metabolism. 3ª edición. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia: 1303-1306.

**Boule, N. G., Haddad, E. Kenny, G. P., Wells, G. A. y Sigal, R. J. 2001.** Effects of exercise on glycemic control and body mass in type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of controlled clinical trials. *JAMA*: Vol. 286 (10): 1218-1227.

**Burciaga, G. L., Morán M. R., Romero F. G. 1999.** Eficacia de la educación en el control de la glucemia de pacientes con diabetes tipo 2. *Rev. Med. IMSS*: Vol. 37 (1): 39-44.

**Busch, C. P. y Hegele, R. A. 2001.** Genetic determinants of type 2 diabetes mellitus. *Clin Genet.*: Vol. 60:243-254.

**Cooper, G. M. 2000.** The cell - a molecular approach. 2ª edición. Senauer Associates, Inc., Publishers. Sunderland, Washington: 535-538.

**Cox, N. J. 2001.** Challenges in identifying genetic variation affecting susceptibility to type 2 diabetes: examples from studies of the calpain-10 gene. *Hum Mol Genet.*: Vol. 10 (20): 2301-2305.

**Cruz, M., Montoya C., Gutiérrez M., Wachter N. H. y Kumate J. 2002.** Polimorfismo de genes relacionados con diabetes tipo 2. *Rev Med IMSS*: Vol. 40 (2): 113-125.

**Cruz, M., Velasco E., Kumate J. 2001.** Señales intracelulares que intervienen en el control de la glucosa. *Gac Méd Méx*: Vol. 137 (2): 135-146.

**Evans, J. C., Frayling T. N., Casell P. G., Saker P. J., Timan G. A., Walker M., Levy J. C., O'Rahilly S., Subba P. V., Bennett A. J., Jones E. C., Menzel S., Prestwich P., Simecek N., Wishart M., Dhillon R., Fletcher C., Millward A., Demaine A., Wilkin T., Horikawa Y., Cox N. J., Bell G. I., Ellard S., McCarthy M. I. y Hattersley A. T. 2001.** Studies of association between the gene for calpain-10 and type 2 diabetes mellitus in the United Kingdom. *Am. J. Hum. Genet.*: Vol. 69 (3): 544-552.

**Hernández, M. I. 2003.** Diabetes mellitus: complicaciones. *Diabetes Hoy.*: Vol. 4(4): 1073-1075.

**Horikawa, Y., Oda N., Cox N., Li X., Orho-Melander, Hara M, Hinokio Y., Lindner, Mashima H., Schwarz P. E., del Bosque-Plata L., Horikawa Y., Oda Y., Yoshiuchi I., Colilla S., Polonsky K. S., Wei S., Concannon P., Iwasaki N., Schulze J., Leslie J. Baier, Clifton Bogardus, Leif Groop, Boerwinkle E., Craig L. Hanis y Bell G. 2000.** Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet.*: Vol. 26:163-175.

**INEGI.** Estadísticas demográficas. Cuaderno número 14. 2002. [http://www.inegi.gob.mx/prod\\_serv/contenidos/espanol/biblioteca/default.asp?accion=12&tema=108060000&numero=1.8.6](http://www.inegi.gob.mx/prod_serv/contenidos/espanol/biblioteca/default.asp?accion=12&tema=108060000&numero=1.8.6)

**Kido, Y, Nakae J, Accili D. 2001.** Clinical review 125: The insulin receptor and its cellular targets. *J Clin Endocrinol Metab.*: Vol. 86(3):972-279.

**Landeros, O. E. 2000.** El panorama epidemiológico de la diabetes mellitus. *Rev. Mex. Enfer. Card.*: Vol. 8(1-4): 56-59.

**Mammarella, S., Romano F., Di Valerio A., Creati B., Esposito D. L., Palmirota R., Capani F., Vitullo P., Volpe G., Battista P., Della L. F., Mariani-Costantini R. y Cama A. 2000.** Interaction between the G1057D variant of IRS-2 and overweight in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Hum Mol Genet.* : Vol 9 (17): 2517-2521.

**Norris, S. L., Nichols P. J., Caspersen C. J., Glasgow R. E., Engelgau M. M., Jack L., Snyder S. R., Carande-Kulis V. G., Ishan G., Garfield S., Briss P. y McCulloch D. 2002.** Increasing diabetes self-management education in community settings. A systematic review. *Am J Prev Med.*: Vol. 22 (4 suppl) 1: 39-66.

**Olson, A. L., Trumby A. R. y Gibson G. V. 2001.** Insulin-mediated GLUT4 translocation is dependent on the microtubule network. *J. Biol. Chem.*: Vol 276 (14): 10706-10714.

**Paul, D. S., Harmon A. W., Winston C. P. y Patel Y. M. 2003.** Calpain facilitates GLUT4 vesicle translocation during insulin-stimulated glucose uptake in adipocytes. *Biochem J.*: Vol. 376: 625-632.

**Reddy, S. S. 2000.** Health outcomes in type 2 diabetes. *Int J Clin Pract. Suppl.*: Vol. 113: 46-53.

**Sreenan, S. K., Zhou Y. P., Otani K., Hansen P. A., Curie K. P., Pan C. Y., Lee J. P., Ostrega D. M., Pugh W., Horikawa Y., Cox N. J., Hanis C. L., Burant C. F., Fox**

A. P., Bell G. I. y Polonsky K. S. **2001**. Calpains play a role in insulin secretion and action. *Diabetes.*: Vol. 50: 2013-2020.

**Velásquez**, M. O., Rosas P. M., Lara E. A., Hernández P. G., Castillo S. C., Attie F. y Tapia R. **2003**. Prevalencia e interrelación de enfermedades crónicas no transmisibles y factores de riesgo cardiovascular en México: Resultados finales de la Encuesta Nacional de Salud (ENSA) 2000. *Arch Card Mex.*: Vol. 73 (1): 62-77.

**Watson**, R. T. y Pessin J. E. **2001**. Intracellular Organization of insulin signaling and GLUT4 translocation. *Recent Prog Horm Res.*: Vol. 56: 175-193.

**Yang**, X., Pratley R. E., Baier L. J., Horikawa Y., Bell G. I., Bogardus C. y Permana P. A. **2001**. Reduced skeletal muscle calpain-10 transcript level is due to a cumulative decrease in major isoforms. *Mol Genet Metab.*: Vol. 73: 111-112.