



UNIVERSIDAD TECNICA PARTICULAR DE LOJA

ESCUELA DE BIOQUIMICA Y FARMACIA

Determinación del polimorfismo Indel-19, en el gen de calpaina-10 en individuos diabéticos y no diabéticos de la ciudad de Loja

Previo a la obtención del título
Bioquímica Farmacéutica

Autora:

Ana Belén Córdova Rodríguez

Directora:

Dra. Paula Torres Bailón

Loja-Ecuador

2009

Dra.

Paula Torres Bailón

DIRECTORA DE TESIS

C E R T I F I C A:

Una vez revisado el trabajo de investigación realizado por la alumna Ana Belén Córdova Rodríguez, previo a la obtención del título de BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO, se autoriza su presentación final para la evaluación correspondiente.
Loja, 29 de mayo del 200

Dra. Paula Torres Bailón
DIRECTORA DE TESIS

AUTORÍA

Los conceptos, ideas y resultados vertidos en el desarrollo del presente trabajo de investigación son de absoluta responsabilidad de su autora.

Ana Belén Córdova Rodríguez

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a Dios y a mi familia, por ser las personas que siempre han estado presentes con su paciencia y apoyo en estos años de estudio.

Ana

AGRADECIMIENTO

Quisiera agradecer a todas las personas que de una forma directa o indirecta han permitido el desarrollo de este trabajo: a mi familia y amigas, a las personas que laboran en el CBCM especialmente a la Dra. Paula Torres, Dra. Natalia Bailón, Bq. Paulina Arevalo, Diana Loaiza, Verónica Morocho y María Isabel Vivanco, al Dr. Servio Romero y al personal del laboratorio del dispensario del IESS, por su valiosa colaboración.

CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Ana Belén Córdova Rodríguez, declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 67 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

Loja, 29 de mayo del 2009

Ana Belén Córdova Rodríguez

TESISTA

Dra. Paula Torres Bailón

DIRECTORA DE TESIS

Índice de contenido

| | PAG |
|---|-----------|
| Certificado..... | i |
| Autoría | ii |
| Dedicatoria | iii |
| Agradecimiento..... | iv |
| Cesión de derechos | v |
| Índice de contenido | vi |
| Índice de tablas | viii |
| Índice de figuras | viii |
| Abstract..... | ix |
| Resumen | x |
| Objetivos generales | xi |
| Objetivos específicos..... | xi |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1. Panorama actual | 1 |
| 1.2. Clasificación de la Diabetes Mellitus | 1 |
| 1.2.1. Diabetes tipo 1..... | 2 |
| 1.2.2. Diabetes tipo 2..... | 2 |
| 1.2.3. Otros tipos específicos de diabetes | 2 |
| 1.2.4. Diabetes Mellitus Gestacional | 3 |
| 1.3. Genética de la Diabetes Mellitus tipo 2 | 5 |
| 1.3.1. La CAPN10 en relación con la diabetes tipo 2..... | 7 |
| 1.4. Las calpainas..... | 11 |
| 1.4.1. La familia proteica de las calpainas | 11 |

| | |
|---|-----------|
| 1.4.2. Estructura de las calpains | 15 |
| 1.4.2.1. Las unidades | 15 |
| 1.4.2.1.1. Unidad catalítica o grande..... | 15 |
| 1.4.2.1.2. Unidad reguladora o pequeña..... | 16 |
| 1.2.2.2. Clasificación de las calpains según su estructura..... | 17 |
| 1.4.2.2.1. Típicas | 17 |
| 1.4.2.2.2. Atípicas | 17 |
| 1.4.3. Activación de la CAPN 10 | 18 |
| 1.4.3. Inactivación de la CAPN 10..... | 18 |
| 1.5. La calpaina 10 | 19 |
| 1.6. Parámetros para la detección y monitores de diabetes mellitus..... | 19 |
| 2. MATERIALES Y METODOS | 23 |
| 2.1 Diagrama del proceso | 26 |
| 3. RESULTADOS..... | 27 |
| 4. DISCUSIONES Y CONCLUSIONES..... | 30 |
| 5. RECOMENDACIONES | 34 |
| 6. BIBLIOGRAFÍA..... | 35 |
| 7. ANEXOS | 41 |
| 7.1. Formato del consentimiento informado..... | 42 |

Índice de tablas

| | PAG |
|---|-----|
| Tabla 1.- Clasificación etiológica de diabetes mellitus | 3 |
| Tabla 2.- Estudios poblacionales de CANP 10 en relación a diabetes tipo 2 | 9 |
| Tabla 3.- Tipos de calpains en relación con diversas patologías | 12 |
| Tabla 4.- Categorías según los valores de glicemia en ayunas | 20 |
| Tabla 5.- Criterios de diagnóstico de diabetes..... | 20 |
| Tabla 6.- Pruebas comunes realizadas en laboratorio clínico para la detección de diabetes y seguimiento de tratamiento | 21 |
| Tabla 7.- Valores de la HAb1 en relación a la glicemia que representan en los últimos meses..... | 22 |
| Tabla 8.- Posibles variables del Indel 19 | 25 |
| Tabla 9.- Valores para casos y controles de características antropológicas y clínicas | 27 |
| Tabla 10.- Polimorfismo del Indel 19 en la población estudiada | 28 |
| Tabla 11.- Glicemia en ayunas en relación con el Indel 19 | 28 |

Índice de figuras

| | PAG |
|--|-----|
| Figura 1.- Estructura cristalina de la m-calpaina | 16 |
| Figura 2.- Dominios que forman la calpaina 5, 6 y 10..... | 18 |
| Figura 3.- Diagrama de Finetti..... | 29 |

Objetivos Generales

- Determinar la presencia del polimorfismo Indel-19 en el gen de calpaina-10 en individuos diabéticos y no diabéticos.

Objetivos Específicos

- Determinar la frecuencia alélica del polimorfismo Indel-19, en los individuos en estudio.
- Determinar si existe una diferencia significativa entre la presencia del polimorfismo Indel-19 entre individuos diabéticos y no diabéticos.

ABSTRACT

Type 2 Diabetes is characterized for the resistance of insulin and/or failure in the secretion of this hormone, which affects the life expectancy. It is a multifactorial disease by genetic and lifestyle influences.

Variations in the calpain-10 gene have been reported to be associated with type 2 diabetes in some population.

In this work, the polymorphism Indel 19 of CAPN 10 was genotyped in 59 women with type 2 diabetes and 49 women with normal fasting blood glucose levels (<110mg/dl) in Loja city.

Being found that the alleles frequencies are similar in both groups, for the allele 2R in the cases with a 33.8% and a 35.7% for controls, while for the allele 3R with a 66.1% and 64.2% for the diabetic and controls, respectively. Furthermore not found a significant difference among both groups ($p=0,78$) in relation of alleles frequencies, as well as was not a relationship with a increase risk to type 2 diabetes between the cases and controls. (OR=0,55, CI=0,16-1,87, $p=0,33$).

Keywords: Type 2 diabetes, insulin, calpain 10 and polymorphism Indel-19

RESUMEN

La diabetes tipo 2 es una enfermedad caracterizada por la resistencia a la insulina y/o fallo en la secreción de dicha hormona; lo cual lleva a una reducción de la expectativa de vida. Es una enfermedad multifactorial, donde el factor genético como el estilo de vida influyen.

En algunas poblaciones se ha demostrado una relación entre algunos polimorfismos del gen de la calpaina 10 con un mayor riesgo a padecer diabetes tipo 2.

En este trabajo se genotipificó al gen de calpaina 10 para el Indel-19 en 59 mujeres diabéticas y 49 mujeres sanas (glicemia en ayunas <110mg/dl) de nuestra ciudad.

Encontrándose que las frecuencias alélicas son similares en ambos grupos, para el alelo 2R en los casos con un 33,8% y un 35,7% para controles, mientras que para el alelo 3R con un 66,1% y 64,2% para los diabéticos y controles, respectivamente. Además no se halló una diferencia significativa entre ambos grupos ($p=0,78$) en relación a las frecuencias alélicas, así como no existió una relación en el riesgo a padecer diabetes tipo 2 entre casos y controles. (OR=0,55, CI=0,16-1,87, $p=0,33$).

Palabras claves: diabetes tipo 2, insulina, calpaina 10, y polimorfismo Indel-19.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Panorama actual

La diabetes mellitus es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglicemia, resultante de defectos en la acción y/o secreción de la insulina. La hiperglicemia crónica está asociada con daño a largo término, disfunción y fallo de varios órganos especialmente los ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos. (ADA, 2008)

La Organización Mundial de la Salud (OMS) calcula 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. Se determinó que en el año 2005 hubo 1,1 millones de muertes debidas a la diabetes. (www.oms.int)

Aproximadamente un (80%) de las muertes por diabetes se registran en países de ingresos bajos o medios y casi la mitad ocurren en pacientes de menos de 70 años.

La OMS calcula que la mortalidad por diabetes aumentará en más de un (50%) en los próximos 10 años, si no se toman medidas urgentes. Es más, se prevé que entre el 2006 y 2015 aumenten en más de un (80%) en los países de ingresos medios altos. (www.oms.int)

Según el Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC) de nuestro país reporta que la diabetes fue la principal causa de muerte en mujeres en el año 2007 con el (7,1%).

La Dirección Provincial de Salud de nuestra provincia, durante el año 2007 identificó a la diabetes en el segundo lugar con un (22%), dentro del grupo de enfermedades crónicas, reportadas a nivel de hospitales.

1.2. Clasificación de la Diabetes Mellitus

La asignación de un tipo de diabetes para un individuo, a menudo depende de las características que presente al momento del

diagnóstico y a la vez muchos de los individuos no se ajustan dentro de una clase en particular. Sin embargo para el médico y el paciente es más importante entender la patogénesis de la hiperglucemia y tratarla de manera efectiva.

La Asociación Americana de Diabetes (ADA) establece una clasificación etiológica de la diabetes mellitus y la agrupa en cuatro tipos:

1.2.1. Diabetes Tipo 1.- Se presenta del (5) al (10%) de los casos. Generalmente ocurre en niños y jóvenes, pero puede desarrollarse a cualquier edad, aunque no se ha observado en mayores de 80 años. (ADA, 2008)

La diabetes tipo 1 es el resultado de la destrucción autoinmune de las células β pancreáticas lo que conlleva a ausencia de la secreción de insulina. Este tipo de diabetes tiene fuerte asociación con el antígeno leucocitario humano (HLA) con ligamiento a los genes DQA y DQB e influenciado por los genes DRB. (ADA, 2008)

1.2.2. Diabetes Tipo 2 (DMT2).- Es el tipo más común, afecta de un (90) a (95%) de los individuos que padecen diabetes, en los que se presenta resistencia y/o deficiencia de insulina, producto de alguna falla en la producción, secreción y/o acción de esta hormona.

Individuos mayores de 40 años, son los principalmente afectados, especialmente aquellos con un índice de masa corporal (IMC) $> 25\text{kg/m}^2$. (ADA, 2007 y 2008, WHO, 2008)

Este tipo de diabetes por muchos años puede pasar sin ser diagnosticada, puesto que la hiperglicemia se desarrolla gradualmente y el estado inicial a menudo no es suficientemente severo para que en el paciente, se noten los síntomas clásicos de la diabetes. (ADA, 2008)

1.2.3. Otros tipos específicos de diabetes.- Se subdividen en 8 categorías que incluyen: a) defectos monogénicos 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 (referirse a la tabla 1).(ADA, 2008, tesis)

1.2.4. Diabetes Mellitus Gestacional (GDM).- Se produce cuando la intolerancia a la glucosa es detectada durante el embarazo. Su prevalencia a nivel mundial varía del 1 al 14% dependiendo de la raza, predisposición genética, edad y sobrepeso. (Islas, 2005).

Tabla 1.- Clasificación etiológica de diabetes mellitus

| |
|---|
| <p>I. Diabetes tipo 1 (destrucción de células β, usualmente conduce a la ausencia absoluta de insulina)</p> <ul style="list-style-type: none"> A. Imune B. Idiopático |
| <p>II. Diabetes tipo 2 (rangos que podrían ir desde una predominante resistencia a la insulina con relativa deficiencia de insulina a un predominante defecto secretorio con resistencia a la insulina)</p> |
| <p>III. Otros tipos específicos</p> <ul style="list-style-type: none"> A. Defectos genéticos en la función de las células β <ul style="list-style-type: none"> 1. Cromosoma 12, HNF-1α (MODY3) 2. Cromosoma 7, glucoquinasa (MODY2) 3. Cromosoma 20, HNF-4α (MODY1) 4. Cromosoma 13, factor promotor de insulina factor -1 (IPF-1; MODY4) 5. Cromosoma 17, HNF-1β (MODY5) 6. Cromosoma 2, <i>NeuroD1</i> (MODY6) 7. ADN mitocondrial 8. Otros B. Defectos genéticos en la acción de insulina <ul style="list-style-type: none"> 1. Insulino resistente tipo A 2. Leprechaunismo 3. Síndrome Rabson-Mendenhall 4. Diabetes lipoatropica 5. Otros C. Enfermedades del páncreas exocrino |

1. Pancreatitis
 2. Trauma/pancreatectomía
 3. Neoplasia
 4. Fibrosis Quística
 5. Hemocromatosis
 6. Pancreatopática fibrocalcular
 7. Otros
- D. Endocrinopatías**
1. Acromegalia
 2. Síndrome de Cushing
 3. Glucagonoma
 4. Feocromocitoma
 5. Hipertiroidismo
 6. Somatostatina
 7. Aldosteronoma
 8. Otros
- E. Inducida por medicamentos o químicos**
1. Vacor
 2. Pentamidina
 3. Ácido nicótico
 4. Glucocorticoides
 5. Hormonas tiroideas
 6. Diazoxide
 7. Agonista β - adenergico
 8. Tiazidas
 9. Dilantina
 10. α - Interferon
 11. Otros
- F. Infecciones**
1. Rubiola congénita
 2. Citomegalovirus
 3. Otros
- G. Formas no conocidas de diabetes mediada por el sistema inmune**
1. Síndrome de "Stiff-man"
 2. Anticuerpos receptores para anti insulina
 3. Otros
- H. Otros síndromes genéticos a veces asociados con diabetes**
1. Síndrome de Down

2. Síndrome de Klinefelter
3. Síndrome de Turner
4. Síndrome de Wolfram
5. Ataxia de Friedreich
6. Corea de Huntington
7. Síndrome de Laurence-Moon-Biedl
8. Distrofia miotónica
9. Porphyria
10. Síndrome de Prader-Willi
11. Otros

IV. Diabetes mellitus gestacional (DMG)

Fuente: ADA, 2008

1.3. Genética de la Diabetes Mellitus Tipo 2 (DMT2)

La DMT2 tiene un innegable componente genético, el cual ha sido observado en diferentes instancias, como en los casos de familias con el tipo raro de diabetes monogenética, prevalencia alta en determinados grupos étnicos y sus modificaciones por mezclas genéticas, diferencias en las tasas de concordancia entre gemelos monocigóticos y dicigóticos y a través de los numerosos estudios de ligamiento.

A la vez múltiples genes y el ambiente influyen sobre la predisposición y progresión a la DMT2; esto ha llevado a realizar estudios de tipo genome scans así como de genome-wide-association. Hanis *et al.* en 1996 realiza el primero de ellos emplea marcadores que abarcan el genoma por completo y han sido aplicados para estudios de ligamiento en una gran variedad de poblaciones.

Bajo este tipo de estudios el único gen de susceptibilidad identificado es el gen en la región NIDDM1, calpaína 10 (CAPN10); cuya susceptibilidad ha sido replicada en algunas, pero no en todas las poblaciones.

Además del gen de CAPN10 otros genes como HNF4 α A y TCF7L2 se han identificado originalmente a través de estudios de ligamiento y han sido confirmados usando la asociación del gen candidato (Freeman *et al.* 2006)

Los estudios de asociación en los que se utilizan genes candidatos o polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) distribuidos a lo largo del genoma, permiten investigar la relación entre el estado de la enfermedad y alelos en particular, genotipos o haplotipos de un marcador genético o de un grupo de marcadores. Además comparan la prevalencia de un marcador de la enfermedad entre individuos afectados y no afectados a manera de casos y controles.

Varios estudios han asociado de manera reproducible a la DMT2 con un número de genes y polimorfismos, como el gen PPAR α y KCNJ11N considerados como los genes candidatos más prometedores.

También, los factores ambientales influyen de manera crucial a la DMT2, resultando en una alteración en la expresión genética; confundiendo los diseños experimentales simples en la identificación de genes, nutrientes o interacciones gene-nutriente. Sin embargo estudios de asociación como el análisis de características de locus cuantitativo (Quantitative trait locus analysis QTL) pueden identificar regiones de cromosomas que contribuye a una característica compleja y son localizados por análisis estadísticos, de cuan frecuentemente una región de un cromosoma está asociada con un fenotipo medible. (Kaput y Dawson, 2007)

Siete QTLs (1q25.3, 2q37.3, 3p24.2, 3q28, 10q26.13, 12q24.31 y 18p11.22) contribuyen a DMT2 con un LOD (medida de significancia) mayor a 3,6. (Kaput y Dawson, 2007).

En los estudios de asociación se han identificado más de 50 genes relacionados con DMT2 en algunas poblaciones, sin embargo muchos de esos genes fallan al ser asociados en otras poblaciones, llevando a la pregunta si aquellos genes causan DMT2 o son simplemente afectados por el proceso de la enfermedad.

La falta de asociación de genes entre poblaciones, podría ser debido a enfermedades crónicas que son causadas por la contribución de varios genes que podrían diferir entre individuos de diferentes grupos ancestrales, individuos que podrían tener

uno o más complicaciones tales como dislipidemias, resistencia a la insulina u obesidad; lo cual confunde los análisis estadísticos.

Muchos estudios de casos y controles son molecularmente heterogéneos, pues el mismo fenotipo puede resultar de alteraciones en diferentes genes y vías, en los cuales las variables ambientales como la dieta y la actividad física no son analizadas.

Interacciones gen-gen conocida como epistasis podrían también afectar los estudios de asociación gen-enfermedad. Además las interacciones epistáticas también pueden ocurrir a través de proteína-proteína, proteína-gen, RNA-proteína o silenciamiento de RNA.

La epistasis ocurre porque los genes, RNA, proteínas, y las enzimas son usualmente parte de una vía o de varias vías, muchas de las cuales están interconectadas. (Kaput y Dawson, 2007)

1.3.1. La CAPN10 en relación con la diabetes tipo 2

La calpaina 10 es considerada un gen de susceptibilidad para diabetes tipo 2, ha sido asociada con la capacidad de sobrevivir a periodos largos de hambruna, llamándolo por ello: genotipo económico; al parecer afecta de forma selectiva el metabolismo incrementándolo dependiendo de los recursos metabólicos. (Fullerton *et al.* 2002)

Se han identificado 108 polimorfismos de tipo SNP, 10 de ellos se han relacionado con diabetes tipo 2: 19, 30, 44, 43, 48, 59, 63, 65, 93 y 110. (Horikawa *et al.* 2000, Fullerton *et al.* 2002)

De estos tenemos el SNP-19 o indel-19, producto de una inserción/delección, donde el alelo 1 es de 155bp y el alelo 2 de 187bp, ambos son el resultado de repeticiones de 32bp, dos y tres respectivamente. (Lynn *et al.*, 2002; Passarge, 2001)

La calpaina 10 se ha identificado como el gen de susceptibilidad en población mexicana, y en menor grado en europeos (Alemanes, Franceses, Británicos, Finlandeses, e Italianos),

asiáticos (Japoneses) y americanos nativos (Indios Pima). El haplotipo de riesgo 112/121 (SNP43*G, Indel 19* 2 repeticiones de 32 pb, SNP 63*T) / (SNP 43*G, Indel 19*3 repeticiones de 32pb, SNP63*C) confiere riesgo a la población México-americana y europea en porcentaje del (14%) y (4%) respectivamente. (Horikawa *et al*, 2000).

Sin embargo este haplotipo no confiere riesgo a la población mestiza mexicana (OR=1,15, 95% IC= 0.57-2.34), más bien el riesgo a DMT2 en esta población está dado por el alelo raro en el SNP 44 C/C (OR= 2.72, 95% IC= 1.16-6.35, $P= 0.017$), situación similarmente se observa en británicos (OR= 1.25, 95% IC= 1.01-1.56, $P= 0.041$) (Del Bosque-Plata *et al*, 2004).

Además el SNP 44 está en perfecto desequilibrio de ligamiento con la mutación sin sentido en el SNP 110 (T504A), así como con dos polimorfismos en la región cinco prima no traducida del RNA mensajero de CAPN10, lo que ha llevado a dudar cual es el verdadero responsable del mayor riesgo a DMT2. (Bosque-Plata *et al*. 2004)

En indios Pima, varones no diabéticos, el polimorfismo del intron 3 (SNP-43) de CAPN 10 afecta la expresión del mRNA de la misma proteína, en músculo esquelético; cuando el genotipo es G/G, representado por niveles del mRNA menores. (Baier *et al*. 2000). El mismo genotipo en cambio incrementa la lipogénesis basal estimulada por insulina en adipocitos humanos. (Hoffstedt *et al*. 2002).

El SNP 19 se ha visto que produce una disminución de la actividad lipolítica del receptor- $\beta 3$ adrenérgico en individuos obesos. (Díaz-Villaseñor, 2008)

En relación a lo anteriormente citado se puede decir que variaciones del gen de CANP10 se han asociado con diversos fenotipos en distintas poblaciones, como se puede observar en la tabla 2. (Suzuki *et al*. 2004)

Otros estudios explican que la exposición a inhibidores para calpaina en islotes pancreáticos de ratón, aumentan la secreción

Tabla 2. Estudios poblacionales de CANP 10 en relación a la diabetes tipo 2

| Población | Genotipo | Fenotipo | Referencia |
|---------------------------------|-------------------------------|--|--|
| Indios Pima | SNP 43 (G/G) | Elevada glicemia en ayunas y después de 2 horas de administrar 75g de glucosa. Disminución de la utilización de glucosa. | Bair <i>et al.</i> 2000 Horikawa <i>et al.</i> 2006 |
| Blancos Británicos e Israelitas | SNP 43 (G/G) 112/121 | Elevada glicemia en ayunas y concentración de insulina después de 2 horas de administrar 75g de glucosa. Disminución de la respuesta secretora de insulina, ajustado por el nivel de resistencia a la insulina (HOMA-R) | Lynn <i>et al.</i> 2002 |
| Caucásicos de Utah | 111/221 SNP-19-63 | Aumento del área bajo la curva de insulina. Elevación de HOMA-R. | Elbein <i>et al.</i> 2002 |
| Indios del Sur | 1112/1121 | Incremento a la tolerancia a la glucosa y de la glicemia en ayunas. | Cassell <i>et al.</i> 2002 |
| Española | SNP 44 (T/T) y SNP 19 (3R/3R) | Elevación de HOMA y de los niveles de la glicemia post-pandreal. | Sáez <i>et al.</i> 2008 |

| | | | |
|-------------|---------------------------|--|------------------------------|
| | SNP 44 (C/C) | Incremento en la tolerancia a la glucosa | |
| Finlandeses | 121/121 con el SNP 56 (G) | Elevada insulina a las 2 horas después de administrada 75g de glucosa | Fengerlin <i>et al.</i> 2002 |
| Japoneses | 112/121 | Elevación de ácidos grasos libres y del área bajo la curva de la insulina | Horikawa <i>et al.</i> 2003 |
| Alemanes | SNP 43 (G/G) | Elevada secreción de insulina y mayor eficiencia en el paso de proinsulina a insulina. | Stumvoll <i>et al.</i> 2001 |

Abreviaturas: HOMA-R: Modelo de ensayo de resistencia de homeostasis donde se relaciona la glicemia en ayunas con la insulina en ayunas. Los haplotipos (combinaciones de polimorfismos heredables en conjunto) se encuentran en el siguiente orden:

| Alelo | SNP 44 | SNP 43 | SNP 19 | SNP 63 |
|-------|--------|--------|-----------------------------|--------|
| 1 | T(1) | G(1) | 2 repeticiones de 32 pb (1) | C(1) |
| 2 | C(2) | A(2) | 3 repeticiones de 32 pb (1) | T(1) |

de insulina en presencia de glucosa, pero sin embargo se reduce el estímulo de dicha hormona para captar la glucosa en adipocitos y en el músculo esquelético, así como la síntesis de glucógeno en el músculo. (Suzuki *et al.* 2004).

EL estudio realizado por Horikawa, revela una interacción de una región del cromosoma 15 (CYP19) con el gen de la CANP 10, incrementando la susceptibilidad a DMT2. (Horikawa *et al.* 2000). En dicha región también se ha identificado a la calpaina 3, que ha sido asociada con oxidación de carbohidratos y niveles elevados de glucosa e insulina (Díaz-Villaseñor, 2008)

1.4. Las calpainas

1.4.1. La familia proteica de las Calpainas

Las calpainas (CAPN) son proteasas de cisteína dependientes de calcio, de tipo no lisosomales. (Bosques, 2007)

Estas enzimas son péptidasas que modulan la acción de proteínas estructurales por medio de hidrólisis, y al ser activadas cumplen con diferentes funciones. (McIntyre, 2002)

Son 15 enzimas de esta familia (tabla 4) codificadas a partir de 16 genes.

Inicialmente se identificaron 2 calpainas que fueron denominadas según el requerimiento de Ca^{+} : la micromolar-calpaina (u-CAPN) y milimolar-calpaina (m-CAPN). La primera actualmente se la conoce como CAPN 1 y necesita 35uM de Ca^{+} , mientras la otra es la CAPN 2 y requiere 325uM (Bosque, 2007, Lynch, 2007, Pal *et al.* 2003)

Las calpaínas participan en diferentes funciones como la división, diferenciación y regularización celular, apoptosis (en respuesta a p53), necrosis, reorganización del citoesqueleto, señales de adherencia, transducción de señales intracelulares. (Díaz-Villaseñor *et al.* 2007, Zatz, 2005)

Las calpaínas, se expresan en múltiples órganos (tabla 3) incluyendo aquellos que se ven afectados por la DMT2

Tabla 3. Tipos de calpainas en relación con diversas patologías.

| Proteína | Gen | Distribución | Presencia de EF-hand | Número de cromosoma en el humano | Enfermedad relacionada |
|-------------------|---------------|-----------------------------|-----------------------------|---|--|
| Calpaina 1 | capn 1 | Ubicua | Si | 11q13 | Alzheimer, Huntington, Lou Gehring, esclerosis multiple, cáncer, cataratas, osteopenia |
| Calpaina 2 | capn 2 | Ubicua | Si | 1q41-q42 | Alzheimer, Parkinson´s, Lou Gehring, esclerosis multiple, cáncer, cataratas, psoriasis |
| Calpaina 3 | capn 3 | Musculo esquelético, retina | Si | 15q15 | Cataratas, distrofia muscular |
| Calpaina 8 | capn 8, ncl-2 | Mucosa estomacal | Si | 1q41 | |
| Calpaina 9 | capn 9 | Tracto digestivo | Si | 1q42.11 | Cáncer gástrico |

| | | | | | |
|--------------------|---------|--|----|------------|---|
| Calpaina 11 | capn 11 | Testículos | Si | 6p12 | |
| Calpaina 12 | capn 12 | Ubicua | Si | 19p13.2 | |
| Calpaina 14 | capn 14 | ND | Si | 2p23.1-p21 | |
| Calpaina 4 | capn 4 | Ubicua | Si | 19q13 | |
| Calpaina 5 | | Ubicua (alto en colon, intestino delgado y testículos) | No | 11q14 | Síndrome de Huntington, síndrome de ovario poliquístico |
| Calpaina 6 | | Placenta | No | Xq23 | |
| Calpaina 7 | | Ubicua | No | 3p24 | Síndrome de Huntington |
| Calpaina 10 | capn 10 | Ubicua | No | 2q37.3 | Diabetes tipo 2 y fenotipos relacionados |

| | | |
|------------------------|----|---------|
| Calpaina 13 | No | 16p13 |
| Calpaina 15 | No | 16p13.3 |

Fuente: Evans *et al.* 2007, Huang y Wang, 2001, Zatz, 2005

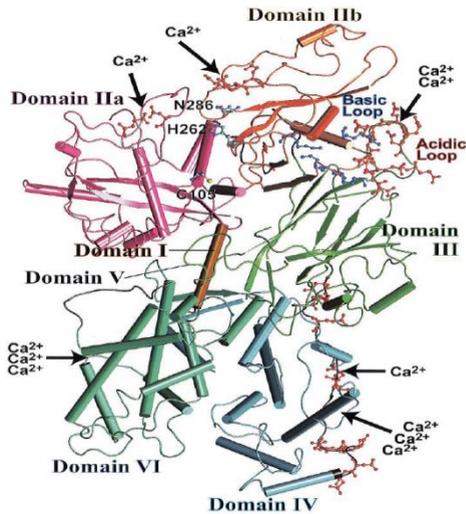
como islotes pancreáticos, adipocitos, músculo, linfocitos entre otros. (Díaz-Villaseñor *et al.* 2007)

1.4.2. Estructura de las calpains

Los estudios realizados para conocer la estructura de las calpains están dados en relación a la m-calpaina y u-calpaina, y en función de ellas se han encontrado que estructuralmente presentarán 2 unidades.

1.4.2.1. Las unidades

Consta de una unidad catalítica y una reguladora (figura 1). Adicional a estas unidades en la m-calpaina se expresa una región extra, formada por 248 residuos de 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 reguladora. (Goll *et al.* 2003)



Fuente: Suzuki *et al.* 2004

Figura 1. Estructura cristalina de la m-calpaina

1.4.2.1.1. Unidad catalítica o grande.- Tiene un peso molecular de alrededor de 80 kDa. Los genes que codifican a esta unidad

se encuentra ubicados en el cromosoma 11 para la u-calpaina y en el cromosoma 1 para la m-calpaina (Goll *et al.* 2003) Está constituida por 4 dominios:

Dominio I.- es el N-terminal. (Goll *et al.* 2003)

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-calpaina) o 115 (u-calpaina), y en el dominio IIb la His en la posición 262 (m-calpaina) o 272 (u-calpaina), y la Asn en la 272 (u-calpaina) o 286 (m-calpaina); estos aminoácidos forman una triada característica de las proteasas de cisteína, y son los que cumplen con la función catalítica. (Bosque, 2007, Goll *et al.* 2003, Suzuki *et al.* 2004)

Dominio III.- Probablemente se relaciona con la regulación de la actividad de la calpaina 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 Ca^{+} , 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 Ca^{+} en algunas calpainas. (Goll *et al.* 2003, Suzuki *et al.* 2004)

Dominio IV.- Es el ligando con la unidad pequeña por medio de una dimerización que se da con las 5 secuencias EF-hand de unión a Ca^{+} . (Goll *et al.* 2003)

La m-calpaina 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 unión. (Goll *et al.* 2003)

1.4.2.1.2. Unidad regulatoria o pequeña.- Tiene un peso molecular de 28 kDa; y cumple con función de chaperona. Está constituida 2 dominios:

Dominio V.- Tiene una porción hidrofílica y una pequeña hidrofóbica que es rica en Gly (39,6%) cerca de la región N-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 moléculas (Goll *et al.* 2003)

Dominio VI.- Presenta 4 EF-hands que se unen a Ca⁺ para formar un complejo que permite la unión con la membrana celular. (Goll *et al.* 2003)

1.4.2.2 Clasificación de las calpainas según su estructura

Las calpainas se clasifican dependiendo de las unidades que las constituyen:

1.4.2.2.1 Típicas.- Están formadas por los dominios identificados para *u* y *m* - calpainas, se parecen a la calmodulina en el COOH terminal, incluyen las CAPNs 1, 2 3, 8, 9, 11, 12 y 13. (Goll *et al.* 2003) Las calpainas 1, 2 y 9 se asocian con la unidad pequeña, siendo la unidad grande propia de cada CAPN (codificada por el gen que le corresponde, véase tabla 3) y la unidad pequeña (30kDa codificada por CAPN4) que es común. Mientras las calpainas 3, 8, 11, 12 y 13 aparentemente no interacción con dicha unidad pequeña. (Suzuki *et al.* 2004)

1.4.2.2.2 Atípicas.- Se caracterizan porque algún dominio se ha perdido o reemplazado. Están formadas por la unidad grande que carecen del dominio IV, cumpliendo esta sola con la actividad proteolítica y no se une a la unidad pequeña. Aunque algunas necesitan unirse a otros polipéptidos que van a cumplir la función de la subunidad pequeña. (Suzuki *et al.* 2004) Las calpainas que pertenecen a este grupo son la 5, 6, 7, 10 y 15. La CANP 5, 6 y 10 tienen el dominio T en el extremo COOH terminal (Fig. 2). (Goll *et al.* 2003)

La CANP 10 no presenta las uniones para Ca²⁺ típicas en el dominio II, pero si es una proteasa dependiente de este ion aunque no se conoce el proceso. El dominio III se caracteriza por la ausencia de las uniones para los fosfolípidos. (Evans, 2007, Goll *et al.* 2003, Suzuki *et al.* 2004)

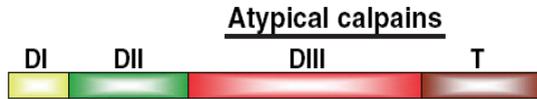


Figura 2. Dominios que forman la Calpaina 5, 6 y 10

Fuente: Evans, 2007

1.4.3. Activación de las CAPNs

Se encuentran inactivadas en el citosol, al incrementar la cantidad de Ca^{+} las CAPNs van hacia la membrana, y se unen a una molécula de Ca^{+} en el dominio IIa y dos en el IIb haciendo que estas dos subunidades se unan. Otra molécula de este ion 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 se sigue dando de una forma auto catalítica. (Suzuki et al. 2004)

1.4.3. Inactivación de las CAPNs

La actividad de las CAPNs cesa cuando disminuye la concentración intracelular de Ca^{2+} , pues las subunidades IIa y IIb se separan, inactivándose la enzima. (Suzuki et al. 2004)

La proteína quinasa A es capaz de mantener las CAPNs en un estado inactivo por medio de una fosforilación en la Ser-369 del dominio III (Suzuki et al. 2004)

El único inhibidor intracelularmente específico de las calpainas es la calpastatina (CAST), que se ubica en el citosol y está formada por 3 regiones conservadas: A, B y C; las dos primeras se unen con los dominios IV y VI de las calpainas para inactivarlas, y la tercera se encarga de la auto-regulación. De acuerdo a estas características la calpastatina solo inactiva a aquellas calpainas de tipo diméricas (CAPNs: 1, 2 y 9) (Suzuki et al. 2004) La CAST pertenece a la familia de las calpainas, por lo que requiere calcio para cumplir su función. (Goll et al. 2003).

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-norleucinal. (Suzuki et al. 2004)

1.5. La Calpaina 10

El gen de esta proteína se ubica en la región D2S125-D2S140 en el cromosoma 2q37.3 y, consta de 15 exones. (Díaz-Villaseñor, 2008)

Se han observado ocho isoformas de esta calpaina generadas por splicing 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, 10d, 10e y 10f son menos abundantes. (Horikawa et al. 2006, Suzuki et al. 2004)

Los estudios llevados a cabo para CAPN 10 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 calcio intracelular, proteolisa parcialmente a la proteína SNAP-25, hecho que produce la fusión del granulo de insulina con la membrana celular, para dar lugar a la exocitosis de la insulina. (Díaz-Villaseñor, 2008)

Otra de las funciones observadas en las células β pancreática para la CAPN10, es la reorganización de la actina durante la secreción de insulina estimulada por glucosa. (Díaz-Villaseñor, 2008)

1.6. Parámetros para la detección y monitoreo de Diabéticos Mellitus

Por ser la DMT2 al inicio de la enfermedad una patología asintomática la ADA (2008) sugiere que se realice un control en individuos que se consideren de alto riesgo. Siendo aquellos con sobrepeso (Índice de Masa Corporal $> 25\text{kg/m}^2$), poca actividad

física, familiares de primer grado con DMT2, hipertensos, sobrepeso al nacer (>9lb) o/y historial de enfermedades cardiovasculares.

Los criterios que la ADA recomienda para diagnosticar o evaluar un individuo en relación a esta patología se encuentran en la tabla 4, 5 y 6.

Tabla 4.- Categorías según los valores de glicemia en ayunas

| Individuo | Normal | Pre diabético | Diabético |
|---------------------------|--------------------------|-----------------------------------|---------------------------|
| Glicemia en ayunas | <100mg/dl (5,6mmol/l) | 100-125mg/dl (5,6-6,9mmol/l) | >126mg/dl (7,0mmol/l) |
| 2-h post pandreal | <140mg/dl (7,8mmol/l) | 140-199 mg/dl (7,8-11,1mmol/l) | ≥200mg/dl (11.1mmol/l) |

Fuente: ADA, 2008

Tabla 5. Criterios de diagnostico de diabetes

| |
|--|
| <p>1 Glicemia en ayunas alterada ≥ 126mg/dl. En ayunas es definido que no ha consumo de calorías por al menos 8h</p> <p style="text-align: center;">OR</p> |
| <p>2 Síntomas de hiperglicemia y glucosa plasmática casual ≥ 200mg/dl. Casual significa que se ha medido a en cualquier momento del día sin considerarse el último consumo de alimentos. Los síntomas clásicos son poliuria, polidipsia y una perdida inexplicable de peso</p> <p style="text-align: center;">OR</p> |
| <p>3 Prueba de tolerancia a la glucosa ≥ 200mg/dl. El test comprende en medir la glicemia 2 horas después del consumo de una carga de glucosa de 75g de glucosa disuelta en agua.</p> |

Fuente: ADA, 2008

Tabla 6. Pruebas comunes realizadas en laboratorio clínico para la detección de diabetes, y seguimiento de tratamiento.

| Prueba | Valores normales | Valores en diabéticos (no controlados) |
|--|--|---|
| Glucosa basal | 70-110mg/dl | >110mg/dl |
| Prueba de tolerancia a la glucosa | En Ayunas: <110mg/dl A las 2 horas: <140mg/dl | En Ayunas: >110mg/dl A las 2 horas: >140mg/dl |
| Hemoglobina glicosilada (HAb1) | <7% | Un aumento del 1% representa un incremento de 30 mg/dl en los últimos 2 meses |
| Cetonuria | Negativo | Positivo |
| Microalbuminuria | <30mg/24h | 30-299mg/24h |
| Glicosuria | Negativo | Positivo |
| Triglicéridos | <150mg/dl | |
| HDL | >40mg/dl | |
| LDL | <100mg/dl | |

Fuente: Rojas, 2006, ADA, 2007

La prueba recomendada para monitoriar a un individuo con diabetes tipo 2 es la HAb1. Esta prueba nos indica un promedio de la glicemia en los últimos 2 a 3 meses. Si la diabetes está controlada se recomienda realizarla 2 veces por año, o 4 veces al año si se ha cambiado la medicación o si se está ajustando. (ADA, 2007)

Los resultados se interpretan según tabla 7.

Tabla 7. Valores de la HAb1 en relación a la glicemia que representa en los últimos meses

| HAb1 | Medida de glucosa plasmática | |
|-------------|-------------------------------------|---------------|
| | mg/dl | mmol/l |
| 6 | 135 | 7,5 |
| 7 | 170 | 9,5 |
| 8 | 205 | 11,5 |
| 9 | 240 | 13,5 |
| 10 | 275 | 15,5 |
| 11 | 310 | 17,5 |
| 12 | 345 | 19,5 |

Fuente: ADA, 2007

2. MATERIALES Y METODOS

Para la determinación del polimorfismo se trabajó con 59 mujeres mestizas ecuatorianas mayores de 40 años, con diagnóstico positivo para diabetes tipo 2, y con 49 mujeres sanas sin antecedentes de DMT2 y glicemia en ayunas < 110mg/dl.

Estas mujeres llenaron un cuestionario y firmaron el correspondiente consentimiento informado.

Las muestras de los casos fueron tomadas en el dispensario médico del IESS-Loja y los controles incluyeron a individuos voluntarios.

Para el estudio del Indel-19 se realizó la extracción del DNA de las muestras de sangre, usando el kit de la casa Promega Wizard Genomic DNA purification kit, siguiendo el protocolo establecido por el fabricante.

Se tomó 300ul de sangre y se añadieron 900ul de la solución de lisis celular, se incubó por 10min a 37°C. Luego se centrifugó y descartó el sobrenadante, repitiendo la incubación con 500ul de dicha solución; y adicionando 300ul de la solución de lisis nuclear e incubando por 1 hora a 37°C y agregando 100ul de la misma solución e incubación durante el mismo tiempo y temperatura.

Luego se adicionó 130ul de la solución de precipitación de proteínas, se centrifugó y transfirió el sobrenadante a un tubo con isopropanol, se homogenizó hasta observar la formación de una hebra blanquecina.

Simultaneo a ello se centrifugó y se eliminó el sobrenadante, luego se adicionaron 200 ul de etanol al 70%, nuevamente se centrifugó y se eliminó el sobrenadante, hasta evaporar el etanol por completo; por último se re-hidrató con solución de rehidratación de DNA.

El PCR fue llevado a cabo con reactivos de la casa Promega: Green Buffer 1mM, Mg Cl₂ 1,5mM, dNTP 0,1mM, Go Taq polimerasa 0,05 U/ul. Del DNA se tomó aproximadamente 4ul dependiendo de su concentración.

Los primers utilizados fueron:

PTF 5'GTTTGGTTCTCTTCAGCGTGGAG

PTR 5'CATGAACCCTG GCAGGGTCTAAG.

Cada PCR fue llevada a cabo usando un control negativo y tres positivos para cada posible variante del polimorfismo.

El programa que se utilizó para la PCR fue:

| Temperatura desnaturalización | Ciclos (40) | Temperatura Extensión |
|--------------------------------------|--|------------------------------|
| 94°C por 12 min | 94°C por 30 seg 58°C por 30 seg 72°C por 80seg | 72°C por 5 min |

Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 2% en una solución de TBE1X a 90V, 300mA por 45min.

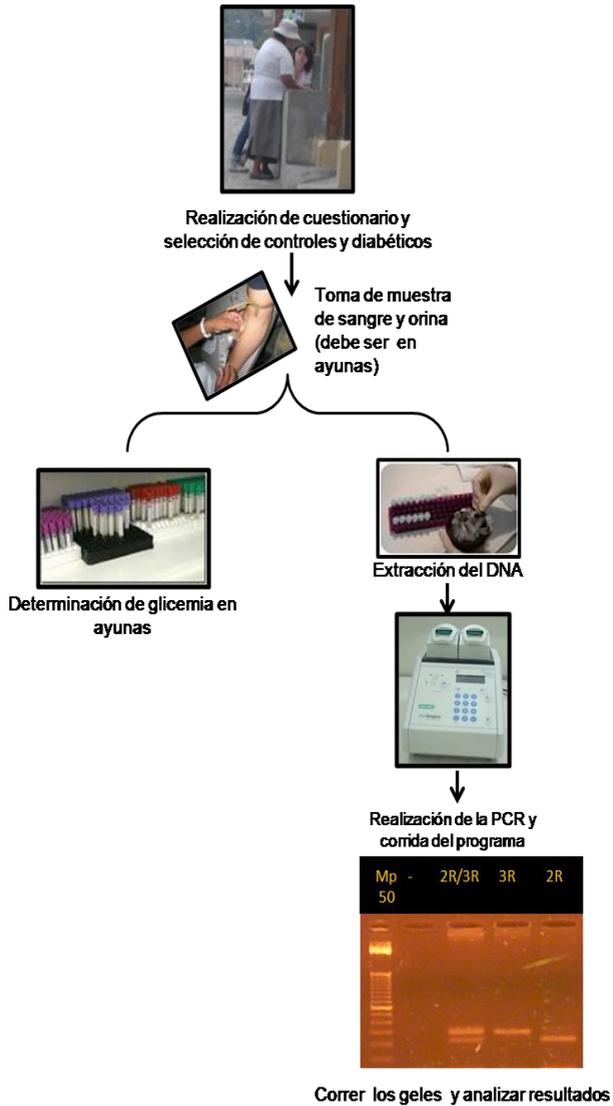
Los geles fueron teñidos con bromuro de ethidium, revelando las posibles variantes del polimorfismo, identificándose según como se indica en la tabla 8.

Los datos obtenidos para el polimorfismo se analizaron por medio de χ^2 y Odds ration (OR) con el programa Epidat 3.1 (aprobado por la Asociación Panamericana de la salud y Xunta de Galicia), y los datos clínicos por medio de desviación estándar y χ^2 . Se trabajó con un nivel de significancia del 5%, considerándose una diferencia significativa si el p-value < 0,05. Y para determinar si la población se encuentra en el equilibrio de Hardy Weinberg se usó el recurso online del Instituto para Genómica Humana (<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.p>)

Tabla 8. Posibles variables del Indel 19

| Genotipo | Peso de banda | Gel |
|----------|----------------|---|
| 2R/3R | 187pb 155pb | <p>The gel image shows five lanes. The first lane is a DNA ladder with markers at 50, 150, 200, and 350 pb. The second lane is a control. The third lane (2R/3R) shows two bands at approximately 155 pb and 187 pb. The fourth lane (3R/3R) shows a single band at approximately 187 pb. The fifth lane (2R/2R) shows a single band at approximately 155 pb.</p> |
| 2R/2R | 155pb | |
| 3R/3R | 187pb | |

2.1. Diagrama del proceso



3. RESULTADOS

Las características físicas y clínicas de los sujetos que formaron parte del estudio se encuentran en la tabla 9. El resultado que fue estadísticamente significativa es la glicemia en ayunas ($P=0.0009$) con un 5% de nivel de significancia entre el grupo de casos y controles.

Por medio de las características antropométricas se pudo determinar el índice de masa corporal ($IMC=\text{peso}/\text{talla}^2$), obteniéndose en casos y controles un valor mayor a $25 \text{ kg}/\text{m}^2$, siendo esto un factor de riesgo, pues ya se consideran individuos con sobrepeso.

Tabla 9.- Valores para casos y controles de características antropométricas y clínicas de los sujetos en estudio.

| Características antropométricas y clínicas | Controles | Diabéticos |
|--|---------------------------|--------------------|
| Edad (años) | 58±8.1 | 66.3±9.5 |
| Peso (kg) | 64.34±9.71 | 69±12 |
| Talla (m) | 1.55±0.07 | 1.5±0.1 |
| IMC (kg/m^2) | 26.8±3.98 | 30.9±4.85 |
| FC | 65.37±8.59 | 74.2±9.81 |
| PA(cm) | 97.4±9.52 | 100±10.6 |
| Presión sistólica/diastólica | 118.2±21.31/ 71.1±7.77 | 135±21/75.02±11.57 |
| Glicemia en ayunas* (mg/dl) ($p=0,0009$) | 95.46±10.56 | 153.5±58.56 |

Abreviaturas: *: estadísticamente significativo, PA: perímetro abdominal, IMC: índice de masa corporal, FC: Frecuencia cardiaca

Se genotificaron ambos grupos para el Indel 19 en los que no se observó una diferencia significativa del polimorfismo en el grupo de casos y controles, refiérase a la tabla 10.

En relación a las frecuencias alélicas se encontró al alelo 2R en un 33,8% y 35,7% y al alelo 3R en un 66,1% y 64,2%, en el

grupo de casos y controles respectivamente para cada alelo (Tabla 10)

Tabla 10. Polimorfismo del Indel 19 en la población estudiada

| Genotipo | Casos (n) | Controles (n) | OR (95%, IC) | p-value |
|-------------------------------|------------------|------------------|---------------------|---------|
| 3R/3R | 24 | 21 | 0,91 (0,42-1,97) | 0,82 |
| 2R/2R | 5 | 7 | 0,55 (0,16-1,87) | 0,33 |
| 3R/2R | 30 | 21 | 1,37 (0,64-2,95) | 0,407 |
| Frecuencia de alelos (Número) | 2R:0,338 (40) | 2R:0,357 (35) | 0,92 (0,52-1,61) | 0,78 |
| | 3R:0,661 (78) | 3R:0,642 (63) | 1,08 (0,61-1,90) | |

Abreviatura: * es significativo según χ^2 , cuando p-value < 0,05.

All relacionar los genotipos del grupo de diabéticos con la glicemia en ayunas no se encontró una diferencia significativa ($p=0,94$). (Tabla 11)

Tabla 11. Glicemia en ayuna en relación con el Indel 19

| Genotipo | Glicemia en ayunas (mg/dl) |
|----------|----------------------------|
| 2R | 154.75±48,66 |
| 2R/3R | 155.77±57,74 |
| 3R | 150.4±61,18 |

Se encontraron en equilibrio de Hardy Weinberg (EHW) tanto el grupo de controles como el de diabéticos, con un $p=0,64$ y $p=0,29$, respectivamente (existe un desequilibrio cuando el p-value < 0,05, según χ^2). Como se puede observa en la figura 3 con el diagrama de Finetti, donde la parábola indica las frecuencias esperadas en relación al EHW y las líneas entrecortadas las frecuencias obtenidas.

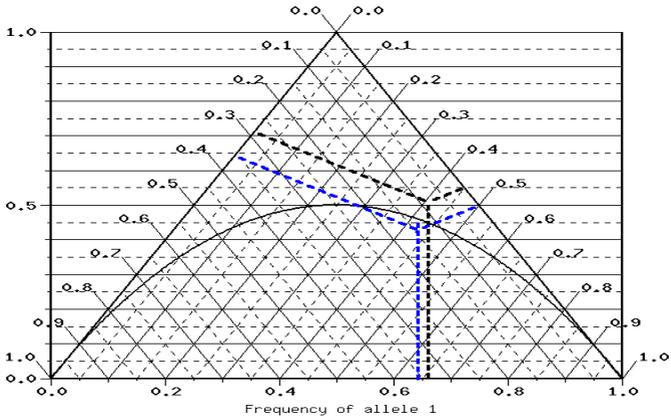


Figura. 3 Diagrama de Finetti.- Parábola de Hardy Weinberg de los genotipos esperados. Línea azul casos y negra controles de los genotipos obtenidos.

4. DISCUSIONES Y CONCLUSIONES

La variación genética de CAPN 10 se ha relacionado con un mayor riesgo a padecer diabetes tipo 2 en algunas poblaciones. Por lo que se estudio el Indel-19 en un grupo de mujeres de nuestra ciudad, sin encontrarse relación con un mayor riesgo a padecer diabetes tipo 2 ($p=0,33$). Resultado similar se ha observado en una población de 428 mexicanos nativos ($p=0,835$) (Bosque-plata *et al.* 2004), en otra de 899 españoles ($p=0,511$) (Sáez *et al.* 2008) y un grupo de 3675 mujeres americanas (>50 años) procedentes de varias etnias ($p=0,57$) (Song *et al.* 2007). Como se puede ver el resultado final es similar, aunque el número de individuos a los cuales se analizo en este trabajo fue muy inferior.

En relación a las frecuencias alélicas no existió una diferencia significativa entre casos y controles, similar a lo observado en otras poblaciones. En este trabajo la frecuencia del alelo 2R en los casos fue de (33,8%), valor similar a lo reportado en 177 japoneses (38%) (Horikawa *et al.* 2003), en 222 británicos (38%) (Evans *et al.* 2001) en 553 chinos (34,27%) (Shu-feng *et al.* 2007) y en 395 finlandeses (43,5%) (Orho-Melander *et al.* 2002).

En el grupo control se encontró una frecuencia de (35,7%) para el alelo 2R que al relacionarlo con otras poblaciones podemos ver valores semejantes: como 172 japoneses con una frecuencia de (37%) (Horikawa *et al.* 2003) al igual que en un grupo de 285 británicos (Lynn *et al.* 2002) en 493 chinos (32,55%) (Shu-feng *et al.* 2007) y en 298 finlandeses (41,6%) (Orho-Melander *et al.* 2002).

En relación al estudio de Song *et al.* (2007) la frecuencia alélica (2R) en mujeres de 50 a 79 años (post-menopáusicas) varía significativamente ($p=0,0001$) según el origen: hispánico (45,9%), asiático (49,9%), africano (66,2%) y caucásico (39,6%).

Si comparamos con el resultado obtenido en este estudio (33,8%), vemos que es menor en relación al grupo de hispánicos anteriormente citado.

Esto lo podríamos analizar considerando que en el trabajo de Song *et al.* se incluyen 154 mujeres hispánicas, mientras que nuestro trabajo contó con 59. Así mismo existe una variación según la ubicación geográfica y étnica, pues esta tesis se realizó solo con aquellas pacientes que tenían una descendencia mestiza ecuatoriana. Por último, al comparar con la población africana presentan una gran diferencia, esto se puede relacionar con el trabajo de Fullerton *et al.*, donde nos habla de una diferencia significativa entre población africana y no-africana, sugiriendo un impacto de la selección natural en el gen de la CANP10.

Al relacionar las variaciones del polimorfismo con la glicemia en ayunas en el grupo de diabéticos ($p=0,94$) no se observó una diferencia significativa. En relación con otros estudios tenemos que: Sáez *et al.* (2008) en una población de 988 españoles, muestra una influencia del alelo 3R del Indel 19 con una elevada glicemia post-pandreal ($p=0,011$), el alelo 2R con bajos niveles de glicemia y LDL; y a los heterocigotos con niveles altos de LDL y colesterol. Similar resultado obtuvo Elbein *et al.* (2002) en 700 británicos (pertenecientes a 73 grupos familiares) donde este SNP muestra un efecto significativo en la insulina en ayunas ($p=0,04$), en la glicemia medida a los 30 y 60 minutos después de administrarse una carga de glucosa ($p=0,045$ y $0,013$, respectivamente) y en la resistencia a la insulina ($p=0,035$).

Cassell *et al.* (2002) en 468 individuos de 95 familias del Sur de la India (de 23 a 72 años) no encontró una relación. Si tomamos en cuenta que ese estudio fue en grupos familiares se consideraría pequeño el número de individuos. Por lo que en esta tesis como en el trabajo citado no existió una diferencia significativa, y ambos son con un número bajo de sujetos. Y se debe considerar que el tamaño de la población es un factor importante, según los criterios recomendados para asociar una variación genética con una patología que es poligénica. (Song *et al.* 2004)

Se ha relacionado este polimorfismo con un mayor riesgo a diabetes tipo 2, cuando se encuentran formando haplotipos, como el 112/121 (SNP 43,19 y 63) en México – americanos (OR=3,02) y en germánicos-finlandeses (OR= 3,17) (Horikawa *et*

al. 2000). Sin embargo, en mujeres americanas mayores de 50 años este haplotipo no fue un factor de riesgo ($p=0,44$), en el mismo estudio se analizaron las diversas combinaciones de estos tres SNPs y en ninguno caso se encontró una relación (Song *et al.* 2007), igualmente sucedió en españoles (Sáez *et al.* 2008), japoneses (Horikawa *et al.*, 2003), británicos (Evans *et al.*, 2001) y finlandeses (Orho-Melander *et al.* 2002).

Aunque en otro estudio en una población británica el haplotipo 111/221 fue el único que presentó un mayor riesgo (OR= 1.48; $\chi^2=4.38$, $p=0.036$) y el 112/121 se relacionó con una marcada disminución de la respuesta a la secreción de la insulina ($p=0,005$), con una respuesta temprana a la insulina ($p=0,05$) y una post-pandreal elevada ($p=0,01$) (Lynn *et al.*, 2002) (Elbein *et al.* 2002)

Por medio de un meta-análisis realizado por Song *et al.* (2004) en 21 estudios de diversas poblaciones se observa un efecto modesto del haplotipo 112/121 para un riesgo a diabetes tipo 2, y nos habla de una sobre estimación en el estudio de Horikawa *et al.* (2000) anteriormente citado.

Otro haplotipo donde encontramos el Indel 19 es el 2111 (alelo C del SNP44, G del SNP43, 2 repeticiones de SNP19 y C del SNP63) que tuvo una relación con una glicemia baja en la post-pandreal ($p=0,002$) en españoles (Sáez *et al.* 2008), y en británicos se lo relacionó a este haplotipo con la DMT2 (OR 2,52, $p=0,047$); esto puede deberse a la presencia del SNP 44 (C) que en la misma población mostró una gran relación con la diabetes tipo 2 ($p=0,03$) (Evans *et al.* 2001)

En cambio en un estudio al Sur de la India el haplotipo 1112 y los heterocigotos 1112/1121 se encontraron con mayor frecuencia en individuos con disminuida glicemia en ayunas y una alterada tolerancia a la glucosa ($p= 0,001$). Este último haplotipo se lo puede considerar como un equivalente al 112/121 señalado anteriormente donde también se relaciona con una mayor riesgo de padecer DMT2. (Cassell *et al.* 2002) Y el 1112/1221 solo se encontró en los individuos diabéticos (Cassell *et al.* 2002); en cambio en dos grupos de finlandeses el haplotipo 1121/1121 fue

asociado con un incremento en el riesgo a diabetes tipo 2 (OR de 1,93, $p= 0,028$) (Orho-Melander *et al.* 2002).

Finalmente, se puede reportar que no existe una asociación del Indel 19 de la calpaina 10 con un riesgo incrementado a diabetes tipo 2 en la población de mujeres estudiada en la ciudad de Loja de origen mestizo ecuatoriano.

5. RECOMENDACIONES

Como cada polimorfismo y haplotipos de la CANP 10 tiene un efecto pequeño en el fenotipo relacionado a la DMT2, sería necesario analizar este polimorfismo y otros, en un número mayor de individuos, para obtener un resultado más representativo y a partir de los polimorfismos armar los haplotipos, especialmente el de alto riesgo 112/121.

Así como relacionar los diferentes genotipos con las pruebas clínicas utilizadas para el diagnóstico y monitoreo de un diabético tipo 2, para identificar si existe alguna influencia del polimorfismo con algún determinado fenotipo característicos de la enfermedad.

Investigar los otros genes que se han relacionado con la diabetes tipo 2 en otras poblaciones para conocer su efecto en individuos de descendencia ecuatoriana.

6. BIBLIOGRAFIA

American Diabetes Association, 2007, "Standards of medical Care in Diabetes-2007", Diabetes Care, 3, S4-S38

American Diabetes Association, 2008, "Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus-2008", Diabetes Care, 31, 1, S55-S60

American Diabetes Association, 2008, "Standards of medical Care in Diabetes-2008", Diabetes Care, 31, 1, S17, S13-14

Baier L, Permana P, Yang X, Pratley R, Hanson R, Shen G, Mott D, Knowler W, Cox N, Horikawa Y, Oda N, Bell G, Bogardus C, 2000, A calpain 10 gene polymorphism is associated with reduced muscle mRNA levels and insulin resistance, The journal of clinical investigation, 106, R69-R73

Bosques J, 2007, Segregación de polimorfismos identificados en los genes de u-calpaina 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 Mayaguez, 7-10

Cassell P, Jackson A, North B, Evans J, Ramachandran A, Snehalatha C, Gelding S, Vijayaravaghan S, Curtis D, Hitman G, 2002, Haplotype Combination of Calpain 10 Gene Polymorphisms associate with increased risk of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes in South Indians, 52, 1622-1628

Cordero P, Verdugo L, 2006, Apuntes de Bioquímica humana, Universidad de Cuenca, Facultad de ciencias Médicas, 97-101

Center for disease Control and prevention de Estados Unidos, <http://www.cdc.gov/>

Cruz M, Montoya C, Gutiérrez M, Wachter N, Kumate J, 2002, Polimorfismo de genes relacionados con diabetes tipo 2, Rev Med IMSS, 40, 113-125

Díaz-Villaseñor A, 2008, El arsénico como factor de riesgo en la inducción de diabetes tipo 2, tesis-UMAN, 19, 20-26

Díaz-Villaseñor A, Burns A, Hiriart M, Cebrián M, Ostrosky-Wegman, 2007, The activity of calpains in lymphocytes is glucose-dependent and is decreased in diabetic patients, Blood Cells, Molecules and Diseases

Del Bosque-Plata et al, 2004, Association of the calpain-10 gene with type 2 diabetes mellitus in Mexican population, Molecular Genetics and Metabolism, 81, 122-126

Elbein S, Chu W, Ren Q, Hemphill C, Schay J, Cox N, Hanis C, Hasstedt S, 2002, Role of Calpain 10 gene variants in familial type 2 diabetes in Caucasians, The Journal of Endocrinology & Metabolism, 87, 2, 650-654

Evans J, Tuner M, 2007, Emerging functions of the calpain superfamily of cysteine proteases in neuroendocrine secretory pathways, Journal of Neurochemistry, 103, 849-859

Evans J, Frayling T, Cassell P, Saker P, Hitman G, Walter M, Levy J, O'Rahilly S, Subba P, Bennett A, Jones E, Meizel S, Prestwich, Simecek N, Wishart M, Dhillon R, Fletcher C, Millward A, Demaine A, Wilkin T, Horikawa Y, Cox N, Bell G, Ellard S, McCarthy M, Hattersley A, 2001, Studies of Association between the gene for calpain-10 and types 2 Diabetes Mellitus in the United Kingdom, Am J Hum. Genet, 69, 544-552

Fingerlin TE, Erdos MR, Watanabe RM, Wiles KR, Stringham HM, Mohlke KL, Silander K, Valle TT, Buchanan TA, Toumilehto J, Bergman RN, Boehnke M, Collins FS, 2002, Variation in three single nucleotide polymorphisms in the calpain-10 gene not associated with type 2 diabetes in a large Finnish cohort. Diabetes, 51, 1644-1648

Freeman H, Cox R, Type-2diabetes: a cocktail of genetic discovery, Human Molecular Genetics, 2006, 15, 2, R202-R209

Fullerton S, Bartoszewicz A, Ybazeta G, Horikawa Y, Bell G, Kidd K, Cox N, Hudson R, 2002, Geographic and Haplotype

Structure of Candidate Type 2 Diabetes Susceptibility Variants at the calpain-10 locus, *Am J Hum. Genet.* 70, 1096-1106

Huang Y, Wang K, 2001, The calpains family and human disease, *Trends in Molecular Medicine*, 7, 8, 355-362

Hayes G, Del Bosque-Plata L, Tsuchiya T, Hanis C, Bell G, Cox N, 2005, Patterns of linkage disequilibrium in the type 2 diabetes Gene Calpain-10, *Diabetes*, 54, 3573-3576.

Hayes et al, 2007, Identification of type 2 diabetes genes in Mexican Americans through Genome- Wide Association Studies, *American Diabetes Association*, 56, 3033-3044

Harris F, Biswas S, Singh J, Dennison S, Phoenix D, 2006, Calpain and Their Multiple Roles in Diabetes Mellitus, *Ann NY Academy of Sciences*, 1084, 352-480

Hitman G, Sudagani J, 2004, Searching for genes in diabetes mellitus and metabolic syndrome, *Blackwell Publishing Ltd Int J Clin Pract*, 58, 3-8

Hoffstedt J, Rydén M, Löfgren, Orho.Melander M, Groop I, Arener P, 2002, Polymorphism in the Calpain 10 gene influences glucose metabolism in human fat cells, *Diabetologia*, 45, 276-282

Horikawa Y, 2006, Calpain 10 (NIDDM1) as a Susceptibility gene for common Type 2 Diabetes, *Endocrine Journal*, 53 (5), 567-576.

Horikawa Y, Oda N, Cox N, Li X, Orho-Melander M, Hara M, Hinokio Y, Jindner T, Mashima H, Schwarz P, Del Bosque-Plata L, Horikawa Y, Oda Y, Yoshiuchi I, Colilla S, Polonsky K, Wei S, Concannon P, Iwasaki N, Schulze J, Baier L, Bogardus C, Groop I, Boerwinkle E, Hanis G, Bell G, 2000, Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus, *Nature genetic*, 26, 163-175

Horikawa Y, Oda N, Yu L, Imamura S, Fujiwara K, Makino M, Seino Y, Itoh M, Takeda J, 2003, Genetic variations in calpain-10 are not a Major factor in the occurrence of with type 2 diabetes in

Japanese, Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 88, 244-247

Goll D, Thompson V, Li H, Wei W, Cong J, 2003, The Calpain System, Physiol Rev, 83, 732, 740, 753, 759

Instituto Nacional de estadísticas y Censos, www.inec.gov.ec

Islas, S, 2005, Diabetes Mellitus, editorial Mc Graw Hill, tercera edición, 138, 141

Kaput J y Dawson K, 2007, Complexity of type 2 diabetes mellitus data sets emerging from nutrigenomic research: A case for dimensionality reduction? Mutation Research, 622, 19-32

Klug W, Chummings M, Spencer C, 2006, Conceptos de genética, Editorial Pearson, octava edición, 704

Lowe, 2001, Genetic of Diabetes Mellitus, editorial Kluwer Academic Publishers, primera edición, 2, 123

Lynn S, Evans J, White C, Franyling T, Hattersley A, Turnbull D, Horikawa Y, Cox N, Bell G, Walker M, 2002, Variation in the Capain-10 gene affects blood glucose levels in the British Population, Diabetes, 51, 247-250

Lynch, Gleichman, 2007, Picking Up the Pieces: The Role of functional Remants of Calpain-Mediated Proteolysis, Neuron, Elseiver in, 53, 317-319

McIntyre y Walter, 2002, Genetics of type 2 diabetes and insulin resistance: knowledge from human studies, Clinical Endocrinology, 57,303-311

Orho-Melander M, Klannemark M, Svensson MK, Ridderstrole M, Lindgren CM, Groop L, 2002, Variants in the Calpain-10 Gene Predispose to Insulin resistance and elevated free fatty acid leves, Diabetes, 51, 2658-2664

Passarge, 2001, Genética Texto y Altas, Editorial medica panamericana, segunda edición 24, 362, 432

Pal G, Veyra T, Elce J, 2003, "Crystal Structure of a u-like Calpain Reveals a Partially activated conformation with Low Ca²⁺ Requirement" *Structure*, 11, 1521-1526

Rojas P, 2006, Evaluación de Pacientes con diabetes mellitus tipo II, medicamente el laboratorio clínico y su correlación con el tratamiento, en el centro de atención ambulatoria central del IEESS Loja, Noviembre 2005-julio 2006, Tesis-UTPL, 21-28, 31

Sáez M, González-Sánchez J, Ramírez-Lorca R, Martínez-Larrad, Zabena C, González, Morón F, Ruiz A, Serrano-Ríos M, La CANP10 Gene is Associated with insulin resistance phenotypes in the Spanish population, *Plos ONE*, 3,8, e 2953-e2954

Shu-feng C, Xiang-feng L, Wei-li Y, Dong-feng G, 2007, 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*, 120, 24, 2218-2223

Song Y, Niu Y, Manson J, Kwiatkowski D, Liu S, 2004, Are Variants in the CAPN10 gene related to risk of type 2 diabetes? A quantitative assessment of population and family-based association studies, *Am J Hum Genet*, 74, 208-222

Song Y, You N, Hsu H, Sul J, Wang L, Tinker L, Eaton C, Lui S, 2007, Common genetic variation in calpain-10 gene (CAPN10) and diabetes risk in a multi-ethnic cohort of American postmenopausal women, *Human Molecular Genetics*, 16,23, 2960-2971

Suzuki K, Hata S, Kawabata Y, Sorimachi H, 2004, Structure, Activation and Biology of Calpain, *Diabetes*, 53, S12-S18

Stumvoll M, Fritsche A, Madaus A, Stefan N, Weisser M, Machicao F, Häring, 2001, Functional significance of the UCSNP-43 polymorphism of the CAPN10 Gene for Proinsulin Processing and Insulina Secretion in nondiabetic Germans, *Diabetes*, 50, 2161-2163

Stumvoll M, Golstein B y Haeften T, 2005, Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. Lancet, 365, 1333-1346

Tierney L, McPhee S, Papadakis M, 2001, Diagnostico clínico y tratamiento, tercera edición, editorial Manual moderno, Págs. 1149

Tusié M, 2005, Genes and Type 2 Diabetes Mellitus, Archives of Medical Research, 36, 210-222

Instituto nacional de estadísticas y censos, actualizada marzo del 2008, http://www.inec.gov.ec/web/guest/ecu_est/reg_adm/est_vit/not_vit3

Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H, 2005, Global prevalence of Diabetes, Diabetes Care, 27, 5, 1047- 1053

World health organization salud 2008, <http://www.who.int/diabetes/en/>

Zatz, M, Starling A, 2005, Calpains and Disease, The New England journal of medicine, 352, 2413-2423

7. ANEXOS

7.1. Formato del consentimiento informado



CENTRO DE BIOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR
UNIDAD DE MEDICIAN FAMILIAR/DISPENSARIO MÉDICO DEL SEGURO
SOCIAL LOJA

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE PARTICIPACIÓN

FECHA: _____ FOLIO: _____

HOSPITAL: _____

El centro de Biología Celular y Molecular de la Universidad Técnica Particular de Loja está realizando un estudio relacionado con el Polimorfismo del gen Calpaína -10 y su asociación con Diabetes tipo II en Población Ecuatoriana.

Se le invita a participar en este proyecto y le solicitamos su consentimiento para llevar a cabo una entrevista en donde le pedirán información de su peso, talla, costumbres alimenticias, hábitos de fumar, entre otros. Esta información será estrictamente confidencial y de suma importancia para el logro de los objetivos de este estudio.

Así mismo quisiéramos que nos donará tres muestras de sangre en ayuno, que nos permitirá obtener información sobre su estado de salud, su propensión al desarrollo de diabetes y características familiares que se encuentren en su sangre. La toma de sangre será realizada con material nuevo y estéril, puede ser un poco doloroso y en ocasiones dejar un moretón alrededor del sitio de la misma; sin embargo, la persona encargada de realizarla (bioquímica/o, farmacéutica/o, enfermera/o, tecnóloga/o, médica/o, o encuestadora/or capacitada/o) cuenta con experiencia para ello y tratará de que esto no ocurra.

De sus muestras de sangre se aislarán ácidos nucleicos (ADN, ARN) y proteínas con las cuales determinaremos los factores involucrados en la inducción en diabetes. También le solicitamos su colaboración para

en el futuro realizar una nueva toma de muestra que nos permitirá completar las pruebas para con este proyecto. Así mismo pedimos su autorización para utilizar dicho material biológico en el estudio de otras enfermedades. Los resultados que se obtengan serán codificados y no podrán ser relacionados con usted o su familia.

Su participación es voluntaria y anónima, y por lo tanto puede dejar de contestar alguna pregunta o suspender la entrevista en cualquier momento, así como aclarar cualquier duda o información específica acerca de su participación y/o del proyecto.

Le agradecemos de antemano su valiosa colaboración.

Para cualquier aclaración o duda respecto a este estudio por favor comunicarse con Dra. Paula Torres Bailón y/o Ana Belén Córdova R. al teléfono 2570275 ext 2107.

AUTORIZACIÓN

Leído lo anterior, acepto participar en el estudio descrito ya que los propósitos de este han sido explicado a mi satisfacción. Recibo copia de esta forma de consentimiento.

Nombre _____ Firma _____

Encuestador: _____ Firma _____

Testigo1 _____ Testigo2: _____

Nombre y firma

Nombre y firma