



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ESCUELA DE BIOQUIMICA Y FARMACIA

**“Determinación del polimorfismo Indel 19,
en el gen de Calpaína -10 en diabéticos y
no diabéticos”**

Previo a la obtención del título
Bioquímica Farmacéutica

Autoras:

Diana Gisella Loaiza Piedra
Celia Verónica Morocho Mejía

Directora:

Dra. Paula Torres Bailón

Loja – Ecuador
2010



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

CERTIFICACIÓN

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 las alumnas Diana Gisella Loaiza Piedra y Celia Verónica Morocho Mejía, previo a la obtención del título de **BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**, se autoriza su presentación final para la evaluación correspondiente.

Loja, 14 de Septiembre del 2010

Dra. Paula Torres Bailón
DIRECTORA DE TESIS





UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

AUTORÍA

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

Diana Gisella Loaiza Piedra

Celia Verónica Morocho Mejía





DEDICATORIA

Mi trabajo de tesis le dedico principalmente a mis Padres, quienes durante todos estos años confiaron en mí; me apoyaron en cada uno de mis triunfos, y estuvieron ahí para cualquier problema que se presentó en el transcurso de mi vida, también le agradezco a mi esposo y hermanos por su apoyo incondicional, al igual que a toda mi familia que siempre ha estado pendiente de mis estudios.

Diana Loaiza

Quiero dedicar este trabajo investigativo a Dios, a mis padres y abuelitos por ser los pilares fundamentales de mi vida ya que supieron despertar en mí el interés por culminar mis estudios universitarios e iniciar una nueva etapa en mi vida profesional; también a mis hermanos y a todos mis familiares por el apoyo brindado.

Verónica Morocho



AGRADECIMIENTO

Agradecemos especialmente a nuestras familias por el apoyo brindado, a las personas que laboran en el CBCM en especial al Área Biomédica. A la Dra. Paula Torres por permitirnos formar parte de su proyecto y por colaborarnos con la dirección de nuestra tesis; a la Bq. Ana Belén Córdova, Bq. Paulina Arévalo, María Isabel Vivanco, Sofía Ochoa y Andrés Samaniego por su valiosa cooperación.

También al personal que labora en el laboratorio del Dispensario Ambulatorio de IESS de Loja, en especial al Dr. Oswaldo Aguirre y al Dr. Servio Romero por su valiosa colaboración desinteresada en este proyecto.

De una manera particular queremos agradecer a nuestras compañeras de la carrera de Bioquímica y Farmacia de la promoción 2009, por su apoyo incondicional; en especial a nuestras amigas (os): Daniela Castillo, Gabriela Ordóñez, Jennifer Ordóñez, María Isabel Vivanco y Luis Guamán (Gremio) por compartir, apoyarnos y por todas las experiencias buenas y malas que tuvimos durante nuestra vida universitaria. Además a nuestros amigos que de manera directa e indirecta estuvieron ahí de forma incondicional para apoyarnos.

Gracias a Todos.....

Diana L., Verónica M.





UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

CESIÓN DE DERECHOS

Nosotras, Diana Gisella Loaiza Piedra y Celia Verónica Morocho Mejía, declaramos 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, 14 de Septiembre del 2010

Diana Gisella Loaiza Piedra
AUTORA

Celia Verónica Morocho Mejía
AUTORA

Dra. Paula Torres Bailón
DIRECTORA DE TESIS



TABLA DE CONTENIDOS

CERTIFICADO	II
AUTORÍA	III
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTO	V
CESIÓN DE DERECHOS	VI
TABLA DE CONTENIDOS	VII
ÍNDICE DE TABLAS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
RESUMEN	X
ABSTRACT	XI
OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS	XII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. DIABETES	1
1.1.1. Clasificación de la diabetes	1
1.1.1.1. Diabetes tipo 1 (DT1)	1
1.1.1.2. Diabetes tipo 2 (DT2)	2
1.1.1.3. Otros tipos de diabetes	2
1.1.1.4. Diabetes Gestacional (DG)	2
1.1.2. Factores de riesgo de la diabetes tipo 2	2



1.1.3. Genética de la diabetes tipo 2	3
1.2. CALPAÍNAS	4
1.2.1. Estructura y función de las calpaínas	4
1.2.2. Calpaína 10	6
1.3. CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS Y CLÍNICAS RELACIONADAS CON DIABETES TIPO 2	7
2. MATERIALES Y MÉTODOS	9
2.1. ESQUEMA DE PROCEDIMIENTO	12
3. RESULTADOS	13
4. DISCUSIÓN	22
5. CONCLUSIONES	26
6. RECOMENDACIONES	27
7. BIBLIOGRAFÍA	28
8. ANEXOS	34
8.1. FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO	34
8.2. FORMATO DE ENCUESTA	36



ÍNDICES DE TABLAS

Tabla 1. Calpaínas y su distribución.	5
Tabla 2. Frecuencia genotípica y alélica del Indel 19 en diabéticos y no diabéticos.	13
Tabla 3. Características antropométricas y clínicas de diabéticos y no diabéticos.	15
Tabla 4. Relación de los genotipos 3R/3R, 2R/3R y los datos antropométricos y clínicos en diabéticos y no diabéticos.	17
Tabla 5. Relación de los genotipos 3R/3R, 2R/3R por sexo con datos antropométricos y clínicos entre diabéticos y no diabéticos.	18
Tabla 6. Relación de los alelos 2R y 3R y los datos antropométricos y clínicos en diabéticos y no diabéticos.	20
Tabla 7. Relación de los alelos 2R y 3R por sexo con datos antropométricos y clínicos entre diabéticos y no diabéticos.	21

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Isoformas de la calpaína 10.	6
---	---



RESUMEN

La diabetes tipo 2 (DT2) es un desorden metabólico, caracterizado por hiperglicemia como resultado de defectos en la secreción y/o acción de la insulina. Se ha demostrado que existen varios genes involucrados con la DT2, uno de ellos es el gen CAPN10, que mediante estudios de posicionamiento clonal en población México-americana demostraron que polimorfismos en dicho gen confieren riesgo a desarrollar DT2. Frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo Indel 19 en un estudio piloto en mujeres ecuatorianas diabéticas y no diabéticas no mostrarán diferencias significativas al ser comparados. Por ello se amplió el tamaño de muestra para corroborar los resultados obtenidos del polimorfismo Indel 19 y su relación con características antropométricas y clínicas.

Se analizaron 370 individuos diabéticos y no diabéticos del IESS Loja, para la determinación del Indel 19 y sus correspondientes determinaciones antropométricas y clínicas, obteniéndose una frecuencia genotípica en diabéticos para el 3R/3R del 38.4%, 2R/2R del 14.1% y 2R/3R del 47.6% con resultados similares para los no diabéticos y sin diferencia significativa ($p= 0.35$). En tanto que la frecuencia alélica para los sujetos diabéticos fue para el alelo 2R del 37.8% y 3R del 62.2%, resultados semejantes para los no diabéticos y con diferencias no significativas ($p= 0.94$).

Los resultados de genotipos y alelos con los datos antropométricos y clínicos de diabéticos y no diabéticos mostrarán diferencias significativas ($p < 0.05$) para glucosa en ayuno, índice de masa corporal, perímetro abdominal, presión sistólica/diastólica, colesterol total, colesterol LDL y creatinina.

Palabras Claves: Diabetes tipo 2, CAPN10, Polimorfismo.



ABSTRACT

Type 2 diabetes (T2D) is a metabolic disorder characterized by hyperglycemia resulting from defects in secretion and / or insulin action. It has been shown that several genes involved in T2D, one of them is the CAPN10 gene that by positioning studies clonal in Mexico-American population showed that polymorphisms in this gene confer risk to develop T2D. Allele frequencies and genotype 19 Indel polymorphism in a pilot study in women with diabetics and nondiabetics Ecuadorians showed no significant differences when compared. Therefore expanded the sample size to confirm the results obtained Indel 19 polymorphism and its relationship with anthropometric and clinical characteristics.

Have been analyzed 370 diabetics and nondiabetics individuals IESS Loja, for determining the Indel 19 and their anthropometric and clinical measurements, giving a genotype frequency in diabetics for 3R/3R 38.4%, 2R/2R 14.1% and 2R/3R of 47.6% with similar results for non-diabetics and showed no significant difference ($p= 0.35$). While the allele frequency in diabetics for the 2R allele was 37.8% and 3R was 62.2% with similar results for nondiabetics with significant difference ($p= 0.94$).

The results of genotypes and alleles with anthropometric and clinical characteristics of diabetics and nondiabetics patients showed significant differences ($p< 0.05$) for fasting glucose, body mass index, waist circumference, systolic/diastolic blood pressure, total cholesterol, LDL cholesterol and creatinina.

Keywords: Type 2 Diabetes, CAPN10, Polymorphism.



OBJETIVOS GENERALES

- Determinar la presencia del polimorfismo Indel 19 en el gen de calpaína10 en un grupo de individuos y evaluar su relación a diabetes tipo 2.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo Indel19, en individuos diabéticos y no diabéticos.
- Determinar diferencias significativas entre las características antropométricas y clínicas, y las frecuencias alélicas o genotípicas, de los individuos a estudiar.



1. INTRODUCCIÓN

1.1 DIABETES

La diabetes es un desorden metabólico crónico de múltiples etiologías, caracterizado por hiperglicemia crónica con disturbios en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas; que resulta de los defectos en la secreción y/o acción de la insulina. Se asocia con daño a largo plazo, disfunción y falla en varios órganos, especialmente en los ojos, riñones, nervios, corazón, vasos sanguíneos y cerebro (ADA, 2010).

La diabetes alrededor del mundo ha afectado aproximadamente a 246 millones de personas hasta el 2007, de las cuales 3,8 millones de personas murieron a causa de esta patología. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el año 2025 esta cifra se incrementará a 300 millones (Barroso *et al.*, 2003).

El Ministerio de Salud Pública del Ecuador en el 2007, menciona que la diabetes está entre las diez principales causas de morbilidad ocupando el quinto lugar; registrándose 25.824 casos. En la ciudad de Loja se reportó en el mismo año 933 casos de personas con esta patología (MPS, 2007).

1.1.1 Clasificación de la diabetes

Según la Asociación Americana de Diabetes (ADA) esta enfermedad se clasifica en:

1.1.1.1 Diabetes tipo 1

La Diabetes tipo 1 (**DT1**) se caracteriza por la destrucción autoinmune de las células β pancreáticas; con deficiencia absoluta de insulina, lo que lleva al individuo a depender de la administración de esta hormona.

Este tipo de diabetes afecta del 5-10% de toda la población diabética (Harris *et al.*, 2004, ADA, 2010).



1.1.1.2 Diabetes tipo 2

La diabetes tipo 2 (**DT2**), se considera una enfermedad compleja, caracterizada por un desorden en el metabolismo de los carbohidratos, grasas y proteínas, debido a una mala secreción y/o acción de la insulina; lo que produce hiperglicemia, que inicialmente es asintomática y que con el tiempo puede producir una serie de complicaciones como: retinopatía, nefropatía y neuropatía periférica. La DT2 incrementa el riesgo de presentar enfermedades cardiovasculares, ateroscleróticas, arteriales y cerebrovasculares (ADA, 2010) y en los últimos años está adquiriendo proporciones de una auténtica epidemia. La DT2 representa del 90-95% de las personas con diabetes, afectando en mayor proporción a personas mayores de 45 años (González *et al.*, 2005, ADA, 2010, Horikawa *et al.*, 2000).

1.1.1.3 Otros tipos de diabetes

Dentro de esta categoría se agrupan a aquellos causados por defectos monogénicos, que afectan el funcionamiento de las células β pancreáticas o la acción de la insulina, así como también por enfermedades del páncreas o la administración de algunos medicamentos (ADA, 2010).

1.1.1.4. Diabetes gestacional

La Diabetes Gestacional (**DG**) se define como una intolerancia a la glucosa, que comienza o se diagnostica por primera vez durante el embarazo (ADA, 2010).

1.1.2. Factores de riesgo a diabetes tipo 2

Según Zimmet *et al.*, 2001, los factores de riesgo a DT2 son:

- Factores Genéticos: antecedentes familiares, marcadores genéticos y genes de tipo ahorrador.
- Características Demográficas: sexo, edad y etnia.



- Comportamiento y Estilo de Vida: obesidad, inactividad física, dieta y estrés.
- Factores Metabólicos y Determinantes de Categorías Intermedias de Riesgo a DT2: intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina, diabetes gestacional.

1.1.3 Genética de la diabetes tipo 2

La DT2 es una enfermedad hereditaria y multigénica, es decir es el producto de múltiples mutaciones en distintos genes, provocando un conjunto de alteraciones y por ello se la considera de etiología compleja (Cruz *et al.*, 2005).

Por lo anteriormente citado, diversos genes participan en la DT2, los cuales se encuentran distribuidos en distintos cromosomas y regiones cromosómicas (1q25.3, 2q37.3, 3p24.1, 3q28, 10q26.13, 12q24.31 y 18p11.22), con una asociación significativa para la enfermedad (Cruz *et al.*, 2005).

De los genes asociados con el desarrollo de DT2 se encuentran principalmente aquellos relacionados con el metabolismo de la glucosa e incluyen a los genes implicados en la señalización de la insulina, transporte de glucosa, síntesis de glucógeno; así como aquellos que participan en la síntesis y absorción de ácidos grasos, diferenciación adipocítica entre otros (Cruz *et al.*, 2005).

Uno de los genes más promisorios y cuestionados de asociación con susceptibilidad a DT2 es el gen de la calpaína 10 (CAPN 10); el cual mediante ensayos de posicionamiento clonal, demostró conferir mayor susceptibilidad a DT2 en población México-americana (Horikawa *et al.*, 2000, Del Bosque-Plata *et al.*, 2004).

Esta susceptibilidad fue atribuida a polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) SNP-43, SNP- 63 y la inserción/delección de 32pb (Indel 19) y su correspondiente haplotipo 112/121 (SNP43*G, Indel 19* 2 repeticiones de 32pb, SNP63*T)/ (SNP43*G, Indel 19* 3 repeticiones de 32pb, SNP63*C).



Dicho haplotipo confiere un triple riesgo a la enfermedad en población México Americana, aunque también se encontró un alto riesgo en poblaciones Europeas (Alemana y la Finlandesa) (Horikawa *et al.*, 2000, Evans *et al.*, 2001, López-Orduña *et al.*, 2007, Hanis *et al.*, 1996).

1.2. CALPAÍNAS

La calpaína pertenece a la familia no lisosomal de enzimas proteolíticas dependientes de Ca_2 , encargadas de catalizar la ruptura endoproteolítica de substratos específicos (Sreenan *et al.*, 2001).

1.2.1. Estructura y función de las calpaínas

La superfamilia de calpaínas son proteínas que presentan estructuras bastante divergentes, probablemente debido a sus funciones fisiológicas; las cuales se han adaptado y especializado de acuerdo al tipo de célula (Suzuki *et al.*, 2001), estas funciones son: división, diferenciación y regularización celular, apoptosis, necrosis, reorganización del citoesqueleto, señales de adherencia y transducción de señales intracelulares (Díaz-Villaseñor *et al.*, 2007, Sreenan *et al.*, 2001).

Al momento se conocen 15 calpaínas, algunas de ellas presentan una distribución ubicua y otras son órgano específicas, las cuales están codificadas por 16 genes localizados en distintos cromosomas (Tabla. 1).



Tabla 1. Calpaínas y su distribución

PROTEÍNA	OTRO NOMBRE	DISTRIBUCIÓN	NUMERO DE CROMOSOMA
Calpaína 1	μ -Calpain	Ubicua	11q13, 19
Calpaína 2	m-Calpain	Ubicua	1q41-q42
Calpaína 3	nCL-1,p94, Lp82,Lp85, Rt88	Musculo esquelético, retina,	15q15, 2
Calpaína 4		Ubicua	19q13
Calpaína 5	htra3, nCL-3	Ubicua (mucosa estomacal)	11q14, 7
Calpaína 6	CAPNX, Calpamodulina	Placenta	10q23
Calpaína 7	palBH	Ubicua	3p24
Calpaína 8	nCL-2	Mucosa estomacal	1q41
Calpaína 9	nCL-4	Tracto digestivo	1q42.11
Calpaína 10	CAPN10, CAPN8b	Ubicua	2q37
Calpaína 11		Testiculos	6p12
Calpaína 12		Ubicua	19p13.2
Calpaína 13		Ubicua	16p13
Calpaína14		NA	2p23.1-p21
Calpaína 15		Ubicua	16p13.3

Modificado de Evans *et al.*, 2007

Los miembros más caracterizados de esta superfamilia, son micromolar-calpaína (μ -CAPN) y milimolar-calpaína (m-CAPN), las cuales han recibido estos nombres por los requerimientos de calcio libre para cumplir con su función (Schad *et al.*, 2002, Suzuki *et al.*, 2001).

Estructuralmente las calpaínas constan de una unidad catalítica y una unidad reguladora, las cuales están constituidas de cuatro y dos dominios respectivamente (Goll *et al.*, 2003).

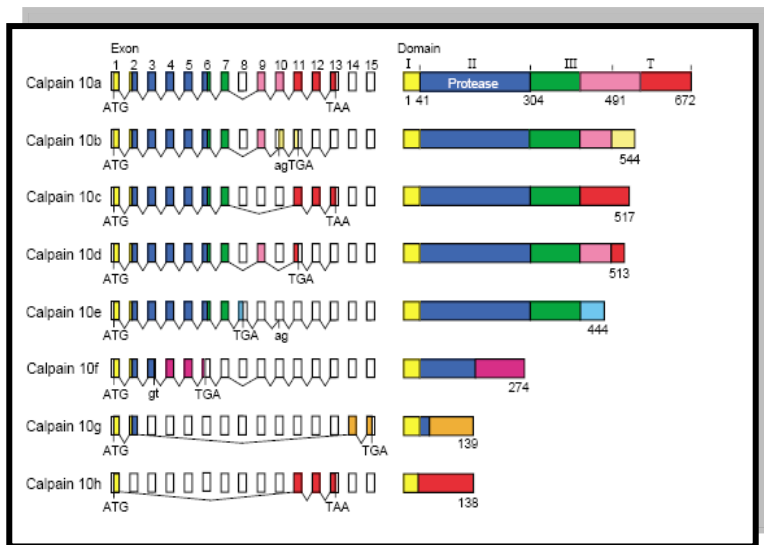


1.2.2. Calpaína 10

El gen de CAPN10 se ubica en la región NIDDM1 en el cromosoma 2q37.3, está formado por 15 exones que abarcan 31 kb de la secuencia genómica y codifica una proteína de 672 aminoácidos (Hanis *et al.*, 1996, Srenan *et al.*, 2001, Song *et al.*, 2004 y Salamanca-Gómez, 2001).

Aunque este gen se expresa en forma ubicua, presenta un procesamiento alternativo que genera 8 formas diferentes de Calpaína 10 (a-h), como se muestra en la Figura 1.

Figura 1. Isoformas de calpaína 10



Fuente: Horikawa *et al.*, 2000



Se menciona que la calpaína-10a es la mayor isoforma presente en varios tejidos. Transcritos de calpaína-10 c y g han sido detectados en muchos tejidos, incluyendo músculo esquelético e islotes pancreáticos; mientras que el RNA mensajero de calpaína- 10h está presente en niveles moderados en los islotes pancreáticos, pero no ha sido encontrado en otros tejidos. Las isoformas b, d, e y f al parecer son menos abundantes (Horikawa *et al.*, 2000).

La calpaína10 juega un papel importante en la homeostasis de la glucosa; varios estudios han demostrado que esta proteasa puede tener efectos específicos en tejido blanco para insulina, además, se ha propuesto su papel como regulador de la exocitosis de dicha hormona. También se ha identificado su importancia en la supervivencia de las células β pancreáticas (Díaz-Villaseñor *et al.*, 2007, Lynn *et al.*, 2002).

1.3 CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS Y CLÍNICAS RELACIONADAS CON DIABETES TIPO 2

Debido a la complejidad de la DT2 mencionada anteriormente, es muy importante analizar los cambios metabólicos que se presentan a causa de esta enfermedad, ya que la diabetes se la considera como el fenotipo final de problemas metabólicos crónicos asintomáticos que pueden iniciar desde las primeras etapas de la vida y que en la mayoría de los casos se puede evitar modificando el factor ambiental (Cruz *et al.*, 2005 y Cruz *et al.*, 2002).

El fallo en la homeostasis de la glucosa está relacionado con una serie de complicaciones en el transporte de la misma, secreción y/o acción de la insulina y es por ello importante monitorear los niveles de glucosa; así como la presión arterial, perfil lipídico e índice de masa corporal, ya que estos están fuertemente asociados con DT2.

En diversas investigaciones sobre diabetes tipo 2 se han asociado los polimorfismos del gen CAPN-10 con distintos fenotipos.



El Indel 19 es uno de los polimorfismos estudiado en varias poblaciones, el cual se ha relacionado con algunas características clínicas y antropométricas en individuos diabéticos y no diabéticos.

En una población de 100 mujeres ecuatorianas diabéticas y no diabéticas analizaron este polimorfismo, obteniendo diferencias significativas en los valores de glucosa en ayuno al comparar ambos grupos (Córdova y Torres, 2009).

En población española se ha observado que este polimorfismo se encuentra relacionado con resistencia a insulina, presión sistólica/diastólica, colesterol LDL y con niveles de glucosa en ayuno (Sáez *et al.*, 2008), mientras que en población caucásica se ha observado una relación con insulina en ayuno y resistencia a insulina (Elbein *et al.*, 2002).

Por otra parte polimorfismos como el SNP 43, se ha asociado con niveles elevados de glucosa en ayuno, glucosa postprandial, porcentaje de grasa corporal y la respuesta aguda a la insulina en la población de indios Pima (Horikawa, 2006, Carrillo y Panduro, 2001).

En población sueca el SNP 43 se ha relacionado con el índice de masa corporal, índice cintura cadera y concentración de triglicéridos (Carlsson *et al.*, 2004); en tanto que en población finlandesa con concentración de insulina en ayuno y niveles elevados de ácidos grasos libres (Orho-Melander *et al.*, 2002).

El SNP 63 en población caucásica ha sido relacionado con el área bajo la curva de la insulina y con los niveles de insulina luego de dos horas de una carga de la misma (Elbein *et al.*, 2002). Sin embargo en población de indios de Sur se ha encontrado relación con el incremento de los niveles de la glucosa en ayuno y la tolerancia a la glucosa (Cassell *et al.*, 2002).



2. MATERIALES Y METODOS

RECOLECCION DE MUESTRAS

Se recolectaron 185 muestras de sangre de individuos con diagnóstico de DT2, y 185 de individuos no diabéticos; los cuales son pacientes del Dispensario Ambulatorio y del “Hospital Manuel Ignacio Montero”, del Instituto Ecuatoriano de Seguridad Social de Loja.

Ambos grupos de individuos llenaron un cuestionario y firmaron el debido consentimiento informado.

Además se aplicaron los siguientes criterios de inclusión para los dos grupos:

Diabéticos:

- Hombres / Mujeres (>40años).
- Diagnóstico de DT2.
- Individuos ecuatorianos (basado en su propio reporte por 3 generaciones).

No diabéticos:

- Hombres / Mujeres (> 60 años sin antecedentes de DT2 línea directa).
- Diagnostico negativo de DT2 e hipertensión.
- Glucosa en ayunas < 110 mg/dl
- Individuos ecuatorianos (basado en su propio reporte por 3 generaciones).

PRUEBAS DE LABORATORIO CLÍNICO

Obtenidas las muestras de sangre de individuos diabéticos y no diabéticos en condiciones de ayuno, se realizaron pruebas de laboratorio clínico para la determinación de glucosa, colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, triglicéridos, creatinina. Todas estas determinaciones se llevaron a cabo en el Laboratorio Clínico del Dispensario Ambulatorio del IESS Loja.

EXTRACCIÓN DE ADN



Antes de llevar a cabo la extracción del ADN se aislaron linfocitos mediante Histopaque 1077 (Sigma), y luego se siguieron las instrucciones del AxyPrep Blood Genomic DNA Miniprep Kit (Axigen), para la obtención del ADN.

La extracción del DNA se constató mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8%, y luego se cuantificó por fluorometría usando el kit Quant-iT Picogreen dsDNA Reagent (Invitrogen) por medio del equipo Fluroeskan Ascent FL.

DETERMINACIÓN DEL INDEL 19

La determinación del Indel 19 se realizó mediante PCR, empleando el kit Go Taq Green Master Mix (Promega) (Buffer 5x green Go Taq, BSA al 1 %, primer sentido y antisentido 10 uM, dNTP 10 mM, Taq Polimerasa 5 U/ul).

Usando los primers previamente reportados por Orho-Melnader, *et al.*, 2002 (sentido 5`GTTTGGTTCTCTTCAGCGTGGAG3` y antisentido 5`CATGAACCCTGGCAGGGTCTAAG3`), bajo las condiciones de: desnaturalización inicial a 94°C por 12 minutos, 40 ciclos a 94°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos y 72°C por 80 segundos; con una extensión final de 72°C por 5 minutos, en el equipo Viteri 96 Well Thermal Cycler.

Identificándose productos de PCR de 187 y 155 pb que corresponde a la inserción y delección de 32 pb, respectivamente, los cuales fueron visualizadas en geles de agarosa al 2% y teñidos con bromuro de etidio.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos del Indel 19 obtenidos se analizaron por medio de la prueba de chi-cuadrado con el programa Epidat 3.1 (aprobado por la Asociación Panamericana de la salud y Xunta de Galicia). El nivel de significancia empleado fue del 5%, considerándose una diferencia significativa si el *p*-value es menor al 0.05.



Para determinar si la población se encuentra en el equilibrio de Hardy Weinberg se uso el recurso online del Instituto para Genómica Humana (<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.p>).

Los datos antropométricos y clínicos entre diabéticos y no diabéticos se analizaron mediante un test llamado, “t test” con un post test Mann Whitney, con un nivel de significancia de $p < 0.05$. Mientras que para determinar las relaciones de las frecuencias genotípicas y alélicas con los datos antropométricos y clínicos se utilizo ANOVA con un nivel de significancia de $p < 0.05$ (GraphPad Prisma 5.0).



2.1. ESQUEMA DE PROCEDIMIENTO

Aplicación de Cuestionario y Firma de Consentimiento Informado
(Diabéticos y No Diabéticos)



Toma de Muestras de sangre en ayuno



Pruebas de Laboratorio Clínico



- Glucosa
- Colesterol Total
- Colesterol HDL
- Colesterol LDL
- Triglicéridos
- Creatinina

Separación de Linfocitos y

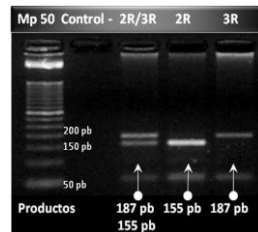
Extracción de ADN



PCR



Gel de Agarosa al 2%



Análisis Estadístico



3. RESULTADOS

Al genotipar los dos grupos de estudio para la determinación del Indel 19, no se encontró diferencia significativa entre los genotipos.

Las frecuencias genotípicas para los sujetos diabéticos, en el genotipo 3R/3R fue del 38.4%, 2R/2R del 14.1% y para el 2R/3R del 47.6%; mientras que para los sujetos no diabéticos el 3R/3R fue del 40.5%, 2R/2R del 16.8% y para el 2R/3R del 42.7%; como se indica en la tabla 2.

Las frecuencias alélicas para los sujetos diabéticos, en el alelo 2R fue del 37.8% y para el 3R del 62.2%; mientras que para los sujetos no diabéticos el 2R fue del 38.1% y para el 3R del 61.9%. (Tabla. 2).

Tabla 2. Frecuencias genotípicas y alélicas del Indel 19 en diabéticos y no diabéticos.

	Diabéticos (185)	No Diabéticos (185)	<i>p</i> value
Frecuencia Genotípica (Número)	3R/3R: 0.384 (71)	3R/3R: 0.405 (75)	0.67
	2R/2R: 0.141 (26)	2R/2R: 0.168 (31)	0.47
	2R/3R: 0.476 (88)	2R/3R: 0.427 (79)	0.35
Frecuencia Alélica (Número)	2R: 0.378 (140)	2R: 0.381 (141)	0.94
	3R: 0.622 (230)	3R: 0.619 (229)	

Prueba de chi-cuadrado, *p*-value < 0,05.

La población estudiada es genéticamente homogénea tanto para sujetos diabéticos como no diabéticos, con un *p*-value de 0.87 y 0.19 respectivamente, mediante el equilibrio de Hardy-Weinberg (*p*-value > 0.05 población en equilibrio).



Características antropométricas y clínicas de los sujetos diabéticos y no diabéticos

Los resultados obtenidos de las características antropométricas y clínicas para diabéticos y no diabéticos se detallan en la Tabla. 3; en donde se puede observar que existieron diferencias significativas (p -value <0.05) para el peso, talla, Índice de Masa Corporal (IMC), Perímetro Abdominal (PA), Presión Sistólica (PS), colesterol total, triglicéridos, colesterol LDL, glucosa en ayuno, creatinina y depuración de creatinina.

Los resultados analizados por sexo, para diabéticos y no diabéticos; en los que se considera la presencia de diferencias anatómicas y fisiológicas con relación a la masa muscular y al contenido graso; se observó que existieron diferencias significativas para las mujeres en cuanto al IMC ($p= 0.0009$), PA ($p= 0.04$), colesterol HDL ($p= 0.0013$) y colesterol LDL ($p= 0.0001$). En tanto que para los hombres en el IMC ($p< 0.0001$), PA ($p< 0.0001$) y creatinina ($p= 0.0039$).

**Tabla 3.** Características antropométricas y clínicas de diabéticos y no diabéticos.

Características Antropométricas y Clínicas	Diabéticos (185)				No Diabéticos (185)				p value	Valores de Referencia
	Media	DE	P25	P75	Media	DE	P25	P75		
Edad (años)	65.26	10.98	57.00	73.00	69.61	7.784	63.00	75.50		
Peso (kg)	69.07	12.64	60.00	78.00	64.52	9.768	58.00	71.50	0.0003	
Talla (m)	1.539	0.0806	1.490	1.600	1.574	0.0891	1.520	1.640	< 0.0001	
ÍMC (Kg/m ²)	29.14	4.835	26.20	31.50	26.19	4.110	23.00	29.00	< 0.0001	19 - 25 (Kg/m ²)
PA (cm)	101.7	10.46	95.00	109.0	96.74	12.58	89.00	103.0	< 0.0001	M (88 cm) , H (102cm)
FC (seg)	75.08	11.05	68.00	80.00	72.77	11.36	65.00	81.00	0.0639	
PS (mmHg)	137.2	20.93	120.0	150.0	121.8	13.99	111.5	130.0	< 0.0001	120 mmHg
PD (mmHg)	77.82	9.574	70.00	80.00	76.63	11.43	70.00	82.50	0.3755	80 mmHg
Colesterol Total (mg/dl)	209.9	43.15	179.0	240.0	193.1	43.56	167.0	223.5	0.0003	200 - 239 mg/dl
Colesterol HDL (mg/dl)	47.94	14.72	40.00	53.00	49.78	13.40	40.75	56.05	0.1619	M (40 mg/dl) H (35 mg/dl)
Triglicéridos (mg/dl)	190.2	92.01	127.0	234.0	167.3	69.92	121.0	192.6	0.0234	200 - 300 mg/dl
Colesterol LDL (mg/dl)	124.1	45.54	94.80	152.4	109.9	38.14	87.20	131.5	0.0003	100 - 129 mg/dl
Glucosa en Ayuno (mg/dl)	147.0	55.60	110.0	169.5	92.85	10.11	87.45	100.0	< 0,0001	75 - 115 mg/dl
Creatinina (mg/dl)	0.8049	0.3404	0.6000	0.9000	0.9470	0.4983	0.7000	1.050	0.0001	0.8 - 1.5 mg/dl
Depuración de Creatinina (ml/min)	93.05	65.94	64.10	107.0	75.74	48.23	53.43	87.54	< 0.0001	M (88 - 126 ml/min) H (97-137ml/min)

ÍMC: Índice de Masa corporal, PA: Perímetro Abdominal, FC: Frecuencia Cardíaca, PS: Presión Sistólica, PD: Presión Diastólica, M: Mujeres, H: Hombres. El análisis estadístico de las variables se obtuvo mediante la prueba de t test mediante un post test Mann Whitney (GraphPad Prism 5.0); con un valor de p -value < 0,05.



Relación de genotipos con datos antropométricos y clínicos entre diabéticos y no diabéticos

Al relacionar los resultados de datos antropométricos y clínicos con los genotipos entre el grupo diabético y no diabético se observó que:

Para el 2R/2R, únicamente la característica clínica que presentó diferencia significativa fue la glucosa en ayuno ($p < 0.0001$).

Para el 3R/3R presentó una diferencia significativa en PS, PD, colesterol total y glucosa en ayuno; mientras que para el genotipo 2R/3R en creatinina, glucosa en ayuno y PS como se detalla en la tabla.4.

EL genotipo 3R/3R mostró una mayor diferencia significativa en hombres para el IMC, mientras que para mujeres fue el colesterol LDL. El genotipo 2R/3R presentó una mayor diferencia significativa en hombres para el IMC y PA, como se observa en la tabla.5.



Tabla 4. Relación de los genotipos 3R/3R, 2R/3R y los datos antropométricos y clínicos en diabéticos y no diabéticos.

Características Antropométricas y Clínicas	3R/3R			2R/3R		
	Diabéticos (71)	No Diabéticos (75)	p value	Diabéticos (88)	No Diabéticos (79)	p value
	Media ± DE	Media ± DE		Media ± DE	Media ± DE	
PS (mmHg)	135 ± 19.4	121 ± 11.7	<0.001	138 ± 22.1	121 ± 15.7	<0.001
PD (mmHg)	80 ± 10.5	76 ± 11.9	<0.05	77 ± 9.1	77 ± 10.6	NS
Colesterol Total (mg/dl)	216 ± 44.6	189.6 ± 40.14	<0.001	204.3 ± 39.7	195.1 ± 44.3	NS
Glucosa en Ayuno (mg/dl)	135 ± 58.4	93.9 ± 9.82	<0.001	146.7 ± 57.8	91.98 ± 10.5	<0.05
Creatinina (mg/dl)	0.78 ± 0.27	0.93 ± 0.48	NS	0.81 ± 0.39	0.98 ± 0.53	<0.001

PS: Presión Sistólica, PD: Presión Diastólica. NS: No Significativo. El análisis estadístico de las variables se obtuvo mediante la prueba de ANOVA (GraphPad Prism 5.0); con un valor de p -value < 0.05.



Tabla 5. Relación de los genotipos 3R/3R, 2R/3R por sexo con datos antropométricos y clínicos entre diabéticos y no diabéticos.

Características Antropométricas	3R/3R			2R/3R		
	Diabéticos (22)	No Diabéticos (37)	<i>p</i> value	Diabéticos (24)	No Diabéticos (41)	<i>p</i> value
IMC (Kg/m ²)	28.69 ± 3.35	25.30 ± 2.82	<0.001	28.20 ± 3.21	24.59 ± 3.85	<0.001
PA (cm)	102.3 ± 8.82	96 ± 9.58	NS	101.5 ± 8.66	91.9 ± 12.26	<0.001
MUJERES						
Características Clínicas	Diabéticas (49)	No Diabéticas (38)	<i>p</i> value	Diabéticas (64)	No Diabéticas (38)	<i>p</i> value
Colesterol LDL (mg/dl)	137.2 ± 45.3	103.7 ± 4.18	<0.001	122.8 ± 44.67	113.9 ± 38.53	NS

IMC: Índice de Masa corporal, PA: Perímetro Abdominal. NS: No Significativo. El análisis estadístico de las variables se obtuvo mediante la prueba de ANOVA (GraphPad Prism 5.0); con un valor de *p*-value < 0.05.



Relación de alelos con datos antropométricos y clínicos entre diabéticos y no diabéticos

El alelo 2R presentó una diferencia significativa para con glucosa en ayuno, PS y creatinina; el alelo 3R mostró diferencias con colesterol total, glucosa en ayuno, creatinina y PS; como se visualiza en la tabla.6.

Los alelos 2R y 3R en hombres mostraron diferencias significativas en el IMC y PA, en tanto que en mujeres el alelo 3R mostró significancia en el Colesterol LDL; como se detalla en la tabla. 7.



Tabla 6. Relación de los alelos 2R y 3R y los datos antropométricos y clínicos en diabéticos y no diabéticos.

Características Antropométricas y Clínicas	2R		p value	3R		p value
	Diabéticos (140)	No Diabéticos (141)		Diabéticos (230)	No Diabéticos (229)	
	Media ± DE	Media ± DE		Media ± DE	Media ± DE	
PS (mmHg)	138 ± 21.9	123 ± 16.3	< 0.001	137 ± 20	121 ± 13.9	< 0.001
Colesterol Total (mg/dl)	206.8 ± 42.17	195.6 ± 45.77	NS	209 ± 42.1	192.4 ± 42.19	< 0.01
Glucosa en Ayuno (mg/dl)	144.7 ± 53.92	92.13 ± 10.28	< 0.001	148.5 ± 57.89	92.92 ± 10.7	< 0.001
Creatinina (mg/dl)	0.82 ± 0.38	0.96 ± 0.51	< 0.05	0.80 ± 0.34	0.95 ± 0.51	< 0.01

PS: Presión Sistólica. NS: No Significativo. El análisis estadístico de las variables se obtuvo mediante la prueba de ANOVA (GraphPad Prism 5.0); con un valor de p -value < 0.05.



Tabla 7. Relación entre el alelo 2r, 3r por sexo con los datos antropométricos y clínicos entre diabéticos y no diabéticos.

	2R		p value	3R		p value
	Diabéticos (50)	No Diabéticos (77)		Diabéticos (68)	No Diabéticos (115)	
Características Antropométricas	Media ± DE	Media ± DE		Media ± DE	Media ± DE	
IMC (Kg/m ²)	28.34 ± 2.99	25.03 ± 3.87	<0.001	28.44 ± 3.25	24.92 ± 3.40	<0.001
PA (cm)	101.50 ± 8.23	93.43 ± 11.51	<0.001	101.9 ± 8.65	93.87 ± 11.17	<0.001
MUJERES						
Características Clínicas	Diabéticas (90)	No Diabéticas (64)	p value	Diabéticas (162)	No Diabéticas (114)	p value
	Media ± DE	Media ± DE		Media ± DE	Media ± DE	
Colesterol LDL (mg/dl)	127.1 ± 44.17	113.9 ± 40.01	NS	128.9 ± 45.3	108.9 ± 36.54	< 0.01

IMC: Índice de Masa corporal, PA: Perímetro Abdominal. NS: No Significativo. El análisis estadístico de las variables se obtuvo mediante la prueba de ANOVA (GraphPad Prism 5.0); con un valor de p-value < 0.05.



4. DISCUSIÓN

El gen CAPN10 fue identificado por posicionamiento clonal y sus variantes tienen una asociación del doble o triple riesgo a DT2 en diferentes poblaciones. Sin embargo, los polimorfismos y haplotipos asociados a DT2, así como sus frecuencias, difieren notablemente entre los estudios y las poblaciones (Orho-Melander *et al.*, 2002).

En esta investigación de 370 sujetos diabéticos y no diabéticos, el polimorfismo Indel 19 no presentó diferencias entre los grupos ($p=0.35$); lo que permite corroborar el estudio piloto realizado por Córdova y Torres en el 2009; en el que analizaron dicho polimorfismo en un grupo pequeño de mujeres ecuatorianas diabéticas y no diabéticas, y cuya diferencia no fue significativa ($p=0.33$).

Los resultados de frecuencias alélicas obtenidas para el alelo 2R y 3R en la población diabética, fue del 37,8% y 62,2% respectivamente; en tanto que para los no diabéticos las frecuencias fueron prácticamente similares.

Estos datos no difieren del trabajo piloto llevado a cabo por Córdova y Torres en el 2009, en el cual las frecuencias alélicas en el grupo diabético fue del 34% y 66% para los alelos 2R y 3R respectivamente y para el grupo no diabético fueron del 36% para el 2R y del 64% para el 3R.

Además estudios realizados en población mestiza mexicana, reportan frecuencias alélicas del 39% para el alelo 2R y 61% para el alelo 3R en individuos diabéticos; los cuales no fueron diferentes en los no diabéticos. Por otra parte se han reportado frecuencias alélicas de 43.1% para el alelo 2R y 56.9% para el 3R en población no diabética Peruana; con lo que se puede observar que no existen diferencias marcadas de frecuencias alélicas entre estos tres grupos poblacionales. (Del Bosque-plata *et al.*, 2004).



El polimorfismo Indel 19 ha sido estudiado en algunas poblaciones como: Británica ($p= 0.54$) (Evans *et al.*, 2001); Mexicana ($p = 0.835$) (Del Bosque-Plata *et al.*, 2004); Española ($p= 0.51$) (Saéz *et al.*, 2008) y Finlandesa ($p= 0.47$) (Orho-Melander M *et al.*, 2002), encontrando que por sí solo este polimorfismo no confiere riesgo a DT2, pero si al formar parte del haplotipo. (Horikawa *et al.*, 2000, Sáez *et al.*, 2008, Song *et al.*, 2007).

Algunas características antropométricas y clínicas de los sujetos diabéticos y no diabéticos, presentaron diferencias significativas para el IMC, PA, PS, colesterol total, triglicéridos, colesterol LDL, glucosa en ayuno, creatinina y depuración de creatinina. Resultados parecidos, en especial para el IMC y la glucosa han sido reportados por Carlsson *et al.*, en el 2004; mientras que en otros trabajos solo se han reportado diferencias significativas para la glucosa en ayuno (Norton *et al.*, 2010, Orho-Melander *et al.*, 2002, Díaz-Villaseñor *et al.*, 2007).

También se ha encontrado que el IMC, hipertensión arterial, la concentración de triglicéridos, porcentaje de grasa corporal, índice cintura cadera son factores de riesgo en diversas poblaciones. Con estos datos se puede afirmar que la diabetes es un importante factor de riesgo para la enfermedad cardiaca, la cual es causa de más de un tercio de todas las muertes observadas en diabéticos mayores de 40 años (Carrasco *et al.*, 2004, Carrillo y Panduro, 2001, Orho-Melander *et al.*, 2002, Carlsson *et al.*, 2004).

Un aumento de la acumulación de los lípidos en las células es significativo e inversamente correlacionado con la sensibilidad de la insulina, es por ello que la obesidad se asocia directamente con la DT2 (Carlsson *et al.*, 2004). Dicha asociación es un hallazgo constante en todos los estudios epidemiológicos, y el presente trabajo no escapa de la realidad mundial, ya que los datos que fueron significativos son característicos de la obesidad.



Todos los datos antropométricos y clínicos que resultaron tener una diferencia significativa entre diabéticos y no diabéticos, mantienen dichas diferencias al ser comparados con las frecuencias alélicas y genotípicas en ambos grupos; como es el caso de la glucosa en ayuno, PS, PD, creatinina y colesterol total.

Algunas características antropométricas y clínicas fueron necesarias analizarlas por sexo ya que cada género presenta diferente anatomía, metabolismo y fisiología; en relación a su masa muscular y tejido graso. Tanto para los hombres como para las mujeres se encontró una marcada diferencia en el IMC, PA, los cuales tienen mucha relación con obesidad, como se muestran en estudios realizados en personas obesas; lo cual permite aclarar que es un factor primordial y alterado en este tipo de individuos (Carlsson *et al.*, 2004).

En hombres se observó una diferencia significativa en la creatinina, debido a que poseen una mayor masa muscular que las mujeres y por tanto marca diferencia entre géneros (Ruiz, 2004).

En el caso de las mujeres resultó significativo el colesterol HDL y LDL. Estas lipoproteínas son las encargadas del transporte del colesterol, el cual se involucra en la formación de las hormonas sexuales femeninas como progesterona y estrógenos, esto se podría deber a que las mujeres están sometidas a cambios hormonales principalmente en la menopausia (Ruiz, 2004, Murray *et al.*, 2001).

Los hombres por lo general suelen tener un nivel inferior de HDL que las mujeres, es por ello que este género tiene un riesgo superior de padecer enfermedades coronarias (González *et al.*, 2005).

En la relación del genotipo con los datos antropométricos y clínicos en diabéticos y no diabéticos se puede observar que para el genotipo 2R/2R, solamente resultó significativa el valor de la glucosa, para el 3R/3R fue la PS, PD, colesterol total y glucosa en ayuno y para el 2R/3R fueron la PS, creatinina y glucosa en ayuno. Estos datos se los puede comparar con un estudio realizado por



Sáez *et al.*, en el 2008, donde se observa una diferencia significativa para el genotipo 2R/3R en la PS, PD y colesterol LDL.

En la relación genotípica al compararse con sexos, se encontró una diferencia significativa para los hombres en el IMC en los genotipos 3R/3R y 2R/3R y el PA para el 2R/3R. Es importante destacar que el exceso de grasa presente en el área abdominal y de grasa en la sangre son perjudiciales, ya que estas son las principales causas de la arteriosclerosis la cual se puede presentar en mayor porcentaje en los hombres ya que ellos almacenan mayor cantidad de grasa en el abdomen (Carrasco *et al.*, 2004).

Para las mujeres el colesterol LDL se sigue manteniendo con una diferencia significativa al ser comparado con las frecuencias alélicas y genotípicas, lo cual se podría pensar que el genotipo 3R/3R podría intervenir en el transporte de colesterol (Carrasco *et al.*, 2004).

Los niveles de glucosa al ser comparados con los genotipos y alelos del Indel 19, mostraron una gran diferencia significativa esto nos permite corroborar que este polimorfismo tiene relación con la diabetes tipo 2, porque la hiperglucemia, es el más claro desorden de esta patología.



5. CONCLUSIONES

- En los 370 individuos estudiados para la determinación del polimorfismo Indel 19, no existieron diferencias significativas entre diabéticos y no diabéticos en cuanto a frecuencias genotípicas y alélicas.
- Los datos obtenidos de las frecuencias alélicas y genotípicas, en el que se incluye un grupo mayor de individuos diabéticos y no diabéticos, corroboraron con los resultados del estudio piloto realizado por Córdova y Torres en el 2009, y además con los reportados con la población mestiza-mexicana.
- Los genotipos del Indel 19 relacionados con los datos antropométricos y clínicos, mostraron diferencias significativas para 2R/2R en glucosa en ayuno; para el 3R/3R en PS, PD, colesterol total y glucosa en ayuno; mientras que para el genotipo 2R/3R en creatinina, glucosa en ayuno y PS
- Los alelos frente a los datos antropométricos y clínicos se encontró significancia para 2R en glucosa en ayuno, PS y creatinina mientras que para el 3R en colesterol total, glucosa en ayuno, creatinina y PS.



6. RECOMENDACIONES

- Dados los resultados encontrados para el polimorfismo Indel 19 en individuos ecuatorianos diabéticos y no diabéticos, sería necesario realizar la determinación de los polimorfismos de un solo nucleótido (43, 44 y 63); los cuales han sido relacionados con riesgo a DT2 en varias poblaciones.
- Evaluar determinaciones de resistencia a la insulina así como de hemoglobina glicosilada; las cuales son interesantes en el estudio de DT2 ya que en el primer caso permiten evaluar al paciente de manera previa a la manifestación de la enfermedad y en el segundo caso por la importancia que actualmente tiene esta prueba en el diagnóstico de DT2.



7. BIBLIOGRAFIA

American Diabetes Association, "Standards of Medical Care in Diabetes-2010", Diabetes Care, Vol 33, Supplement 1, Págs. S11-S61.

Barceló A., and Rajpathak S., 2001 Incidence and prevalence of diabetes mellitus in the Americas, Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health 10(5).

Barroso I., Luan J., Middelberg R., Harding A., Franks P., Jakes R., Clayton D., Schafer A., Rahilly S., Wareham N., 2003., Candidate Gene Association Study in Type 2 Diabetes Indicates a Role for Genes Involved in β -Cell Function as Well as Insulin Action., PLoS Biology, Vol 1, Issue 1, Pag 041-055.

Bennett Peter, 2007, Nuevos Datos, Perspectivas Renovadas Diabetes Atlas, Tercera Edición, Vol. 52.

Bosques J., 2007., Segregación de Polimorfismos identificados en los genes de μ -calpaína y calpastatina y su relación con 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.

Carlsson E., Fredriksson J., Groop L., Ridderstrale M., 2004., Variation in the Calpain-10 Gene is Associated with Elevated Triglyceride Levels and Reduced Adipose Tissue Messenger Ribonucleic Acid Expression in Obese Swedish Subjects. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 89(7): 3601 – 3605.



Carrasco E., Pérez F., Angel B., Albala C., Santos L., Larenas G., Moltalvo D., 2004., Prevalencia de Diabetes Tipo 2 y Obesidad en dos Poblaciones Aborígenes de Chile en Ambiente Urbano., *Rev Med Chile*, 132:1189 / 1197.

Carrillo C. y Panduro A., 2001., Genética de la Diabetes Mellitus tipo II., *Investigación en salud, Universidad de Guadalajara Mexico.*, Vol III pag: 27-34.

Córdova A. y Torres P., 2009., Determinación del polimorfismo Indel-19 en personas Diabéticas y no Diabéticas de la Ciudad de Loja., *Tesis Previo la Obtención del Título de Bioquímico Farmacéutico, Universidad Técnica Particular de Loja.*

Cox N., Bell G., 2004, Association of the calpain-10 gene with type 2 diabetes mellitus in Mexican population, *Molecular Genetics and Metabolism*, 81, 122-126.

Cruz M., García J., López E., Valladares A., Sánchez R., Wachter N., Aguilar R., Kumate J., 2005, Genes candidatos como posibles marcadores de susceptibilidad a diabetes tipo 2, *Revista de Educación Bioquímica* 24(3,4):81-86.

Cruz M., Montoya C., Gutierrez M., Wachter N., Kumate J., 2002., Polimorfismos de Genes Relacionados con Diabetes Tipo 2., *Rev Med IMSS* 40 (2): 113 – 125.

Del Bosque - Plata I., Aguilar C., Tusié M., Ramírez S., Rodríguez M., Aurón M., Ramírez E., Velasco M., Ramírez A., Gómez F., Hanis C., Tsuchiya T., Yoshiuchi I., Cox N., and Bell G., 2004., Association of the calpain-10 gene with type 2 diabetes mellitus in a Mexican population., *Molecular Genetics and Metabolism* 81:122–126.

Díaz-Villaseñor A., Hiriart M., Cebrián M., Zacarías-Castillo R., Ostrosky-Wegman P., 2007, The Activity of Calpains in Lymphocytes is Glucose-Dependent and is Decreased in Diabetic Patients., *Blood Cells, Molecules and Diseases*.



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., Frayling T., Cassell P., Saker P., Hitman G., Walker M., Levy J., O'Rahilly S., Subba Rao P., Bennett A., Jones E., Menzel S., Prestwich P., 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.

Fullerton S., Bartoszewicz A., Ybazeta G., Horikawa Y., Bell G., Kidd K., Cox N., Hudson R. Di Rienzo A., 2002, Geographic and Haplotype Structure of Candidate Type 2 Diabetes Susceptibility Variants at the calpain-10 Locus, *Am J Hum. Genet*. 70: 1096-1106.

Goll D., Thompson V., Li H., Wei W., Cong I., 2003., The Calpains System., *Physiol Rev.*, 83, 731-801.

González S. Enrique, Pacual C. Isaac, Laclaustra G. Martín, Casasnovas L. José, 2005, Síndrome Metabólico y Diabetes Mellitus, *Rev Esp Cardiol Supl.*;5:30D-7D.

Hanis C.L., Boerwinkle E., Chakraborty R., Ellsworth D.L., Concannon P., Stirling B., Morrison V.A., Wapelhorst B., Spielman R.S., Gogolin-Ewens K.J., Shepard J.M., Williams S.R., Risch N., Hinds D., Iwasaki N., Ogata M., Omori Y., Petzold C., Rietzch H., Schroder H.E., Schulze J., Cox N.J., Menzel S., Boriraj V.V., Chen X., Lim L.R., Lindner T., Mereu L.E., Wang Y.Q., Xiang K., Yamagata K., Yang Y., Bell G.I., 1996, A genome-wide search for human non-insulindependent (type 2) diabetes genes reveals a major susceptibility locus on chromosome 2, *Nat. Genet*. 13:161-166.



Harris F., Chatfield L., Singh J., Phoenix D., 2004, Role of calpains in diabetes mellitus, *Molecular and Cellular Biochemistry* 11:2.

Hoffstedt J., Rydén M., Löfgren P., Orho-Melander M., Groop L., Arner P., 2002., Polymorphism in the Calpain 10 Gene Influences Glucose Metabolism in Human Fat Cells., *Diabetologia* 45: 276-282.

Horikawa Y., Oda N., Cox N J., Li X., Ortho-Melander M., Hara M., Hinokio Y., Lindner T H., 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., Baier L J., Bogardus C., Groop L., Boerwinkle E., Hanis CL y Bell G I., 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 y takeda J., 2003, Genetic variations in Calpain-10 gene are not a major factor in the occurrence of type 2 diabetes in Japanese, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88:224 – 247.

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

Huang Yuanhui and Wang Kevin., 2001., The Calpain Family and Human Disease., *TRENDS in Molecular Medicine* Vol.7 No.8.

Ling C., Groop L., Del Guerra S., Lupi R., 2009, Calpain-10 Expression is elevated in Pancreatic Islets from Patients with type 2 diabetes., *Plos one*, Vol. 4.

Lynn S., Evans J., White C., Frayling T., Hattersley A., Turnbull D., Horikawa Y., Cox N., Bell G., Walker M., 2002., *Diabetes.*, Vol 51.



López-Orduña E., García-Mena J., García-Macedo R., Stumvoll M., Cruz M., 2007., CAPN10 mRNA Splicing and Decay is not Affected by a SNP Associated with Susceptibility to Type 2 Diabetes., *Biochemical and Biophysical Research Communications* 358, 831–836.

Murray R., Mayes P., Granner D., Rodwell V., 2001., *Bioquímica de Harper.*, Editorial El manual moderno, S.A de C.V., 15a. Edición México D.F.

Norton L., Parr., Chokkalingam K., Bardsley R., Ye H., Bell G., Pelsers M., van Loon L., Tsintzas K., 2008., Calpain-10 Gene and Protein Expression in human Skeletal Muscle: Effect of Acute Lipid-Induced Insulin Resistance and Type 2 Diabetes., *J Clin Endocrinol Metab*, 93(3). 992-998.

Orho-Melander M., Klannemark M., Svensson M., Ridderstrale M., Lindgren C and Groop L., 2002., Variants in the calpain-10 gene predispose to insulin resistance and elevated free fatty acid levels. *Diabetes*, Vol. 51.

Paredes M., Lizaraso F., Rodríguez E., Lissón R., Rodríguez E., Calderón J., Fujita R., 2005., Determinación de la Frecuencia Alélica del SNP-19 del Gen Calpaína 10 (CAPN10) y Factores de Riesgo de Diabetes 2 en Población Peruana. *Revista Horizonte Médico* 5: 13-16.

Ruiz Reyes G., 2004., *Fundamentos de Interpretación Clínica de los Exámenes de Laboratorio.*, Editorial Medica Panamericana., Primera Edición. Impreso en Mexico., pag: 37-46, 221-239

Saéz M., González-Sánchez J., Ramírez-Lorca R., Martínez-Larrad M., Zabena C., González A., Morón F., Ruiz A., Serrano-Ríos M., 2008., The CAPN10 Gene Is Associated with Insulin Resistance Phenotypes in the Spanish Population., *PLoS ONE*, 3,8, e2953-e2954.



Salamanca-Gómez Fabio, 2001., Un nuevo gen de predisposición a la diabetes tipo 2., *Gac Méd Méx* Vol. 137 No. 1.

Schád É., Farkas a., Jékely G., Tompa P., Friedrich P., 2002., A Novel Human Small subunit of Calpains., *Biochemical Society Biochem. J.* pag: 362, 383±388.

Song Y, You N, Hsu Y, 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

Srrenan S., Zhou Y., Otani K., Hansen P., Currie H., Pan C., Lee J., Ostrega D., Pugh W., Horikawa Y., Cox N., Hanis C., Burant C., Fox A., Bell G and Polonsky K., 2001, Calpains Play a Rol in Insulin Secretion an Action., *Diabetes*, Vol.50.

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

Tsuchiya T., Schwarz P., del Bosque-Plata L., Geoffrey M., Dina C., Froguel P., Wayne G., Fischer S., Temelkova-Kurktschiev T., Rietzsch H., Graessler J., Vcelák J., Palyzová D., Selisko T., Bendlová B., Schulze J., Julius U., Hanefeld M., Weedon M., Evans j., Frayling T., Hattersley A., Orho-Melander M., Groop L., Malecki M., Hansen T., Pedersen O., Fingerlin T., Boehnke M., Hanis C., Cox N., Bell G., 2006., Association of the Calpain-10 Gene with Type 2 Diabetes in Europeans: Results of Pooled and Meta-analyses., *Molecular Genetics and Metabolism* 89, 174-184.

Zimmet P., Alberti K., Shaw J., 2001., Global and Societal Implications of the Diabetes Epidemic., *Nature*, VOL 414.



8. ANEXOS

8.1 FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO



CENTRO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE PARTICIPACIÓN

FECHA: _____ FOLIO: _ | _ | _ | _ | _ | _ |

HOSPITAL: _____

El Centro de Biología Celular y Molecular de la Universidad Técnica Particular de Loja está realizando parte de un proyecto, titulado **“El Linfocito como modelo para el estudio de calpaínas en individuos diabéticos y no diabéticos”**.

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, hábitos de fumar, entre otros. Esta información será estrictamente confidencial y de suma importancia para el logro de los objetivos de este estudio.

Asimismo quisiéramos que nos donara tres muestras de sangre en ayuno, las mismas que nos permitirán obtener información sobre su estado de salud y propensión al desarrollo de diabetes. La toma de sangre será realizada con material nuevo y estéril, puede ser un poco dolorosa y en ocasiones dejar un moretón alrededor del sitio de la misma; sin embargo, la persona encargada de realizarla (bioquímica/o farmacéutica/o, enfermera, tecnóloga/o médica/o o encuestador/a capacitado/a) cuenta con experiencia para ello y tratará de que esto no ocurra.



De sus muestras de sangre se aislarán ácidos nucleicos (ADN y ARN) y proteínas, con los cuales determinaremos 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 la Dra. Paula Torres Bailón y/o Ana Belén Córdova, al teléfono 2570275 ext 2107

AUTORIZACIÓN

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

Nombre: _____ Firma: _____

Encuestado: _____ Firma: _____

Testigo 1: _____ Testigo2: _____
Nombre y Firma Nombre y Firma



8.2 FORMATO DE ENCUESTA

**UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA UTPL
 CENTRO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR CBCM
 UNIDAD DE MEDICINA FAMILIAR / DISPENSARIO MÉDICO DEL
 SEGURO SOCIAL IESS LOJA**

“El linfocito como modelo para el estudio de calpaínas en individuos diabéticos y no diabéticos.”

Fecha: _____

1.- FICHA DE IDENTIFICACIÓN PARA

1.- CASO.....

2.- CONTROL.....

1.- Nombre _____ # Historia Clínica _____

2.- Lugar y fecha de nacimiento _____ # Cédula _____

3.- Dirección: _____

4.- Teléfono: _____

5.- Género: 1. Masculino _____ 2. Femenino _____

2.- HISTORIA DE PROCEDENCIA FAMILIAR.

Procedencia	2.1 Abuelos		2.2 Abuelas		2.3 Padre	2.4 Madre
	1.- Paterno	2.- Materno	1.- Paterno	2.- Materno		
1.- Ecuatoriano						
2.- Extranjero						
3.- No Sabe						

3.- ANTECEDENTES

3.1.- DIABETES MELLITUS

1.- ¿Algún médico le ha dicho que padece de azúcar en la sangre?

1.- Si () 2.- No ()

Si la respuesta es SI continúe con las preguntas de este apartado

1.- ¿A qué edad le diagnosticaron la Diabetes? _____ Años

2.- ¿Cuánto hace que le realizaron el último control para

Diabetes? **Escoja solo una elección**

1. -Semanas 2.- Meses 3.- Años 4.- No Sabe



- 3.- ¿Cuál fue el resultado del último estudio de azúcar en la sangre? 1.- __mg/dl 2.- No Sabe
- 4.- ¿Toma algún medicamento para su diabetes?
1.- Si () 2.-No ()
- 5.- ¿Cual medicamento utiliza actualmente?
1.-Glibenclamida () 2.-Tolbutamida () 3.-Insulina () 4.- Metformina 5.-Otro 6.-No recuerda Cuál_____
- 6.- ¿Desde cuándo toma éste o estos medicamentos? **Escoja solo una elección**
1. – Semanas () 2. – Meses () 3.- Años ()

3.2.- FAMILIARES CON DIABETES MELLITUS

- 1.- ¿Tiene algún familiar que tenga o haya tenido Diabetes Mellitus?
1.- Si () 2. –No ()

Si su respuesta es no, pase a la pregunta 2

- 1.- Si su respuesta es afirmativa, ¿Qué parentesco tiene o tenía con Ud?

Antecedentes	1 Padre	2 Madre	3 Hermano(s)	4 Hermana(s)	5 Abuelos		6 Abuelas	
					5.1 Paterno	5.2 Materno	6.1 Paterno	6.2 Materno
Diabetes								
No sabe								
Tipo 1								
Tipo 2								
No sabe								

3.3 - HIPERTENSIÓN ARTERIAL

- 1.- ¿Padece de presión alta (hipertensión)? 1. Si () 2. No ()
1.- ¿Cuántos años tenía cuando le diagnosticaron Hipertensión? __Años

3.4.- CONSUMO DE ALCOHOL	Si	No	3.5.- CONSUMO DE TABACO	Si	No
1.- Consume bebidas alcohólicas			1.- Fuma		
2.- Frecuencia			2.- Frecuencia		
1.- Todos los días			1.- Todos los días		
2.- Cada semana			2.- Cada semana		
3.- Cada mes			3.- Cada mes		
4.- Rara vez			4.- Rara vez		



4.- COMORBILIDAD

4.1.- ¿Padece alguna de las siguientes enfermedades?

- 1.- Cáncer ()
2.- Enfermedad Cardíaca ()
3.- Enfermedad Vascul ar Periférica ()
4.- Otra () Cual
5.- Ninguna ()

4.2.- ¿Alguna vez un médico, enfermera u otro profesional de salud, le ha dicho que está pasado de peso, que esta obeso o que tienen sobrepeso o que pesa más de lo debería?

- 1. Si () 2. No ()

4.3 ¿Está en estos momentos tratando de bajar de peso?

- 1. Si () 2. No ()

5.- ACTIVIDAD FISICA

1.- ¿Acostumbra realizar algún tipo de ejercicio?

- 1. Si () 2. No ()

Si la respuesta es "No" pase a la pregunta

Table with columns: TIPO DE ACTIVIDAD, 1.- FRECUENCIA (VECES A LA SEMANA), 2.- TIEMPO (MINUTOS). Rows include Caminata, Trotar, Correr, Bicicleta, Aeróbicos, Natación, Football, Voleyball, and Otra actividad.

2.- ¿Acostumbra ver programas de televisión?

- 1.- Si () 2.- No ()

1.- ¿Con qué frecuencia lo hace? _____

2.- ¿Cuánto tiempo dedica a dicha actividad? _____

3.- ¿Su trabajo es de oficina?

- 1.- Si () 2.- No ()

1.- Cuanto tiempo permanece sentado Hrs / día