



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

TITULACIÓN DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

Determinación del polimorfismo SNP-63, en el gen de Calpaína 10 en individuos diabéticos y no diabéticos de la ciudad de Loja

Trabajo de Fin de Titulación

AUTORA:

Ochoa Astudillo Sofía Genoveva

DIRECTORA:

Córdova Rodríguez Ana Belén Bq.

LOJA-ECUADOR

2013

CERTIFICACIÓN DE CESIÓN DE DERECHOS

Yo, **SOFÍA GENOVEVA OCHOA ASTUDILLO**, declaro ser autora del presente trabajo y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja, y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

Adicionalmente, 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 de tesis de grado que se realicen a través o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

.....

SOFÍA GENOVEVA OCHOA ASTUDILLO

AUTORA

C.I.: 110409166-3

CERTIFICACIÓN DE REVISIÓN DEL TUTOR

Bioquímica Farmacéutica

Ana Belén Córdova Rodríguez

DIRECTORA DE TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

C E R T I F I C A:

Una vez revisado el trabajo de investigación realizado por la alumna Sofía Genoveva Ochoa Astudillo, previo a la obtención del título de **BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**, se autoriza su presentación final para la evaluación correspondiente.

Loja, Abril de 2013

.....
Bq. Ana Belén Córdova Rodríguez

**DIRECTORA DE TRABAJO
DE FIN DE TITULACIÓN**

CERTIFICACIÓN DE AUTORÍA

“Las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo, son de exclusiva responsabilidad de su autora”.

Sofía Genoveva Ochoa Astudillo.

AGRADECIMIENTOS

“El agradecimiento es la memoria del corazón”

J. B. Massieu

Agradezco en primer lugar a Dios quien me dio la vida y la ha llenado de bendiciones en todo este largo tiempo recorrido, a él que con su infinito amor me ha dado la sabiduría suficiente para culminar mi carrera universitaria.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento, reconocimiento y cariño a mis padres por todo el esfuerzo que hicieron para darme una profesión y hacer de mí una persona de bien, gracias por los sacrificios y la paciencia que demostraron todos estos años; gracias a ustedes he llegado a donde estoy.

Gracias a mi hermano quien ha sido mi amigo fiel y sincero, en el que he podido confiar y apoyarme para seguir adelante.

Gracias a todas aquellas personas, familiares y amigas que de una u otra forma me ayudaron a crecer como persona y como profesional. Por su apoyo incondicional, procurando siempre mi bienestar, por estar a mi lado en cada momento y por todo el derroche de confianza, paciencia y amor.

Agradezco también de manera especial a mi directora de tesis Bq. Ana Belén Córdova, quién con sus conocimientos y apoyo supo guiar el desarrollo de la presente tesis desde el inicio hasta su culminación.

“Ahora puedo decir que todo lo que soy es gracias a todos ustedes”

DEDICATORIA

*“Agradece a la llama su luz, pero no olvides el pie del candil que,
constante y paciente, la sostiene en la sombra”*

Rabindranath Tagore

Este trabajo de tesis se lo dedico a mi Dios quién supo guiarme por el buen camino, darme fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se presentaban, enseñándome a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento.

A mi familia, ya que por ellos soy lo que soy. Por enseñarme a volar, y dejarme volar por mí mismo; por enseñarme a soñar, y dejarme soñar a mí sola; y por enseñarme a vivir, y dejarme vivir. Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi carácter, mi empeño, mi perseverancia, mi coraje para conseguir mis objetivos.

A mi mamita querida, Genoveva, la mujer que aun en su ausencia me llena de fuerza para seguir adelante, por su amor incondicional, por esas manos de consuelo, por ese abrazo protector y sobre todo por su amor incondicional que me acompañan en cada día de mi vida.

A mi papito querido, José, el hombre más importante de mi vida, quien ha sabido apoyarme, comprenderme, y ayudarme en los momentos difíciles. Sobre todo muchas gracias por ser como el amigo y confidente que refleja tu ternura, tu bondad y el amor que sientes por mí.

A mi hermano, José Israel, por ser mi amigo y defensor, por estar siempre presente, acompañándome y apoyándome para poderme realizar.

A mis amigas y confidentes: Kathe, Sole, Alis, Gaby, Karito, Pame, Tania, Mabe; por su apoyo, por su compañía, por sus buenos consejos y por estar siempre ahí con una palabra de aliento cuando más lo he necesitado.

*“La dicha de la vida consiste en tener siempre algo que hacer,
alguien a quien amar y alguna cosa que esperar”.*

Thomas Chalmers

ÍNDICE DE CONTENIDOS

PORTADA Y CONTRAPORTADA	i
CERTIFICACIÓN DE SECCIÓN DE DERECHOS	ii
CERTIFICACIÓN DE REVISIÓN DEL TUTOR	iii
CERTIFICACIÓN DE AUTORÍA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
DEDICATORIA	vi
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS	xiii
ARTÍCULO	xiv
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1. DIABETES	2
2.1.1. Clasificación de la diabetes	3
2.1.1.1. Diabetes tipo 1	3
2.1.1.2. Diabetes tipo 2	3
2.1.1.3. Otros tipos de diabetes	4
2.1.1.4. Diabetes gestacional	5
2.1.2. Factores de riesgo de la diabetes tipo 2	6
2.1.2.1. Factores genéticos	6
2.1.2.2. Características demográficas	6
2.1.2.2.1. Sexo y edad	6
2.1.2.2.2. Etnia	6
2.1.2.3. Comportamiento y estilo de vida	6
2.1.2.3.1. Obesidad	6
2.1.2.3.2. Inactividad física	6
2.1.2.3.3. Dieta	7
2.1.2.3.4. Tabaco	7

2.1.2.4. Factores metabólicos y determinantes de categorías intermedias de riesgo a DT2	7
2.1.2.4.1. Intolerancia a la glucosa	7
2.1.2.4.2. Resistencia a la insulina	7
2.1.2.4.3. Diabetes gestacional	7
2.1.3. Genética diabetes tipo 2	8
2.2. CALPAÍNAS	9
2.2.1. Estructura de las Calpaínas	10
2.2.2. Unidades de las calpaínas	10
2.2.2.1. Unidad catalítica o mayor	11
2.2.2.2. Unidad reguladora o menor	11
2.2.3. Activación de las calpaínas	12
2.2.4. Inactivación de las calpaínas	12
2.2.5. Calpaína y secreción de insulina	13
2.2.6. Calpaína 10	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1. Determinación del SNP-63	16
3.2. Secuenciación	16
3.3. Análisis estadístico	16
3.4. Esquema de procedimiento	17
4. RESULTADOS	18
4.1. Análisis de características antropométricas y clínicas	18
4.2. Análisis del polimorfismo SNP-63	19
4.3. Análisis entre sexos	19
4.4. Análisis entre mujeres	20
4.5. Relación entre el IMC y el polimorfismo snp-63	20
5. DISCUSIÓN	21
6. CONCLUSIONES	23
7. RECOMENDACIONES	23
8. ANEXOS	24

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características clínicas de diabéticos y no diabéticos.	18
Tabla 2. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo SNP 63 en el gen de calpaína-10.	19
Tabla 3. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo SNP-63 en hombres y mujeres del grupo diabético.	19
Tabla 4. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo SNP-63 entre mujeres diabética y no diabéticas.	20
Tabla 5. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo SNP-63 distribuido de acuerdo al IMC.	20

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Prevalencia estimada de Diabetes Mellitus para el año 2025.	3
Figura 2. Subunidad mayor y menor de las Calpaínas.	10
Figura 3. Activación de las calpaínas.	12
Figura 4. Interacción propuesta entre CAPN-10 y las proteínas SNARE durante la exocitosis.	14
Figura 5. Isoformas de la Calpaína 10.	15

RESUMEN

Este trabajo de investigación está enfocado en la obtención de resultados que nos permitan determinar la presencia del polimorfismo SNP63 tanto en individuos diabéticos como no diabéticos, y establecer si este está o no relacionado con el desarrollo de esta patología.

Se analizaron un total de 380 muestras mediante secuenciación y los resultados obtenidos se introdujeron en los programas: SNPstats para determinación de frecuencias genóticas y alélicas en relación a la incidencia de la patología, SPSS versión 19.0 programa para Windows con la prueba de Mann Whitney para el análisis de datos antropométricos en relación con el polimorfismo, y MedCalc para determinar el OR.

Obteniéndose una frecuencia genotípica en diabéticos para T/T del 36% y para el C/T del 4%; con resultados similares para los no diabéticos. Las frecuencias alélicas tanto para diabéticos como no diabéticos fueron semejantes (22% y 25%, respectivamente). Se encontró diferencias significativas entre los dos grupos en la glucosa en ayunas, además de una diferencia en el índice de masa corporal, colesterol, HDL y triglicéridos. Este polimorfismo se encontró en equilibrio Hardy Weinberg, y no confiere ningún riesgo para la DT2.

ABSTRACT

This research is focused on delivering results that allow us to determine the presence of polymorphism in both diabetic and non-diabetic individuals, and whether this is related or not to the development of this pathology.

The 380 samples were analyzed by sequencing and the results were introduced in: SNPstats for determination of genotype and allele frequencies in relation to the incidence of the disease. SPSS v. 19.0 for Windows was employed and Mann Whitney test was run for analysis of anthropometric data in relation with the polymorphism, and MedCalc for determination of the odds ratio.

Obtaining a genotype frequency in diabetics of T/T 36% and the C/T 4%, with similar results for non-diabetics. Allele frequencies for both diabetic and non-diabetic patients were similar (T 22% and T 25%, respectively). We found significant differences between the two groups in fasting glucose, and a difference in body mass index, cholesterol, HDL and triglycerides. This polymorphism was found in Hardy Weinberg equilibrium, and confers no risk to DT2.

OBJETIVOS GENERALES

- Determinar la presencia del SNP-63 en el gen de calpaína 10 en individuos diabéticos y no diabéticos de la ciudad de Loja.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo SNP-63, en los individuos en estudio.
- Determinar si el polimorfismo SNP-63 confiere riesgo a padecer DT2, y si guarda alguna relación significativa con las características antropométricas y clínicas propias de la enfermedad.

“Determination of SNP-63 polymorphism in the Calpain 10 gene in Diabetic and Non diabetic in Loja-Ecuador”

Ochoa S.^{1*}, Córdova A.¹, Torres P.¹

¹Departamento de Ciencias de la Salud, sección de Biología Molecular, Microbiología y Bioquímica Clínica, Universidad Técnica Particular de Loja, San Cayetano s/n P.O. Box 11 01 608, Loja, Ecuador

Corresponding author: *sofis8aa@utpl.edu.ec

ABSTRACT

Type 2 diabetes (T2D) is a metabolic disorder of multiple etiologies in which there is a decreased pancreatic insulin secretion and / or a decrease in its biological action (insulin resistance) in the target tissues. It has been shown that several genes and polymorphisms thereof are involved in the development of T2D, which are related to glucose metabolism, including calpain 10 gene (CAPN10), which is also implicated in exocytosis of insulin. SNP-63 is one of the polymorphisms of this gene, which is part of the risk haplotype to develop the disease. Thus, this research is focused on delivering results that allow us to determine the presence of polymorphism in both diabetic and non-diabetic individuals, and whether this is related to the development of this pathology.

All samples were analyzed by sequencing and the results were introduced in: SNPstats for determination of genotype and allele frequencies in relation to the incidence of the disease. SPSS v. 19.0 for Windows was employed and Mann Whitney test was run for analysis of anthropometric data in relation with the polymorphism, and MedCalc for determination of the odds ratio (OR).

A total of 197 diabetic and 183 non diabetic were analyzed obtaining a genotype frequency in diabetics for T/T 36% and the C/T 4%, with similar results for non-diabetics. Allele frequencies for both diabetic and non-diabetic patients were similar (T 22% and T 25%, respectively). We found significant differences between the two groups in fasting glucose (p-value <0,001), and a difference in body mass index (BMI), cholesterol, HDL and triglycerides. This polymorphism was found in Hardy Weinberg equilibrium (p-value 0.88), and confers no risk to DT2 (OR = 0,48 CI (0,16-1,48) *p* 0,19).

Keywords: Type 2 Diabetes, calpain 10, SNP-63

INTRODUCTION

Type 2 diabetes (T2D) is a multifactorial polygenic disease characterized by a disorder in the metabolism of carbohydrates, fats and

proteins, from defects in secretion and insulin action in target tissues (muscle, fat, and liver) that produce hyperglycemia and many complications in long term, which produce damage and

dysfunction especially in eyes, kidneys, nerves, heart and blood vessels^{1, 2, 12}. Genetic and environmental factors as diet, physical activity, sex and age predispose to T2D. More than 250 genes are involved in the development of this pathology. In general these genes are responsible in coding proteins, insulin signaling, glucose transport, glycogen synthesis, absorption, fatty acids synthesis, adipocyte differentiation, among others^{4, 16}. One of the questioned genes with association susceptibility to Type 2 diabetes is the calpain 10 (CAPN10) located in the NIDDM1 region on chromosome 2q37.3 has been strongly related with susceptibility to T2D. This gene susceptibility was demonstrated in Mexico-American population, and was conferred by SNP-43, SNP-63 and SNP19 (insertion/deletion of 32pb, 3R/2R, respectively) and its corresponding haplotype 112/121 (SNP43 * G * SNP19* 2R, SNP63 * T) / (SNP43 * G * SNP19*3R, SNP63 * C). This haplotype confers a threefold risk of disease in Mexico-American population and high risk in European population (German and Finnish)^{7, 9, 10}.

SNP-63 studies have been conducted in various populations including: Mexico-American (p 0,447)⁵, Sinaloense (México DF) (p 0,30)¹⁴ and in a group of American women (p 0,21)¹⁵; in which the results were not statistically significant for allelic and genotypic frequencies. For this reason the aim of this study is to determine the presence of SNP-63 polymorphism in the gene CAPN10 and its relation with the development of T2D in Loja population.

MATERIALS AND METHODS

Genotyping

Samples analyzed for SNP-63 were taken from DNA bank of Biología Molecular, Microbiología y Bioquímica clínica section. A total of 380 samples (197 diabetic and 183 non-diabetics) were examined of which was known anthropometric data and other clinical features associated with the disease. The samples were sequencing in Applied Biosystems ABI 3500, and analysis with Applied Biosystems DNA Sequencing Analysis Software version 5.1.

Statistical Analysis

The data were analyzed using the resource online SNPstat

(<http://bioinfo.iconcologia.net/snpstats/start.htm>)

for the determination of genotype and allele frequencies, and the test of Hardy–Weinberg equilibrium. SPSS version 19.0 program for Windows with the Mann Whitney test (difference considered significant if the p is $< 0,05$), for analysis of anthropometric data in relation with the polymorphism. MedCalc program (http://www.medcalc.org/calc/odds_ratio.php) was used to determinate the odds ratio (OR) with a confidence interval (IC) of 95%.

RESULTS

Diabetics and controls were matched for age, with a means between both groups was 65,57 (35 to 92) years. As expected, a difference was found between groups in relationship with fasting glucose ($p < 0,001$), further had a different BMI, cholesterol, HDL and triglycerides (Table 1).

The genotype and allele frequencies for polymorphism SNP-63 are shown in Table 2.

Allele frequencies for both diabetic subjects (C= 0,78 and T= 0,22) and for non-diabetic (C= 0,75 and T= 0,25) showed no significant values (p 0,157). With respect to the genotypic frequencies found in diabetic subjects, the genotype C/C was 60%, T/T 4% for C/T 36%, while for non-diabetic subjects the C/C was 58% T/T 8% and the C/T of 34%. This polymorphism was found in Hardy Weinberg (p 0,88), and confers no T2D risk (OR= 0,48 CI (0,16 to 1,48), p 0,19).

We analyzed indistinctly men and women in the diabetic group to determine if sex has any influence on the development of the disease when it is carrying a particular genotype, and the results showed that there was no significant difference in the genotypic distribution, however, the analysis of the allelic frequency distribution revealed a significant difference for the T allele (OR= 0,42 CI (0,24 to 0,64), p 0,0001) (Table 3).

Women in both groups were analyzed, and no significant difference was found for SNP-63 polymorphism (Table 4). We also performed the relationship between BMI and the polymorphism; to execute this analysis diabetics were divided into two groups: the first group included individuals with BMI ≤ 24.99 kg/m², and second individuals with BMI ≥ 25 kg/m². No statistically significant differences were found for the SNP-63 between the groups.

DISCUSSION

As mentioned above several genes have been implicated in the development of T2D, including CAPN10 gene. This gene was identified by clonal positioning and association of polymorphisms has

a double or triple risk of developing T2D in different populations. These polymorphisms and haplotypes associated with the disease and their frequencies differ from one study to another and in different populations¹³.

In this study 380 subjects (197 diabetic and 183 non-diabetic) were analyzed, and found that the SNP-63 polymorphism has no significant difference between the study groups (p 0,25). Similar results were found in other populations such as: Mexico-American (p 0,447)⁵, Sinaloense (Mexico DF) (p 0,30)¹⁴, and in a group of American women (p 0,21)¹⁵.

In relation to the results obtained for the allelic frequencies, no significant difference was found for the T allele 22% and for the C allele 78% in diabetics, while for non-diabetics were similar frequencies. Similar results were reported in studies of other populations: Mexico-American 23% for the T allele and 77% for the C allele⁵, Sinaloense 17% for the T allele and 83% for allele C¹⁴, Japanese 26% for the T allele and 74% for the C allele¹⁰, Finnish 11.1% for the T allele and 89.9% for the C allele¹³, thus we can say that there are no significant differences of allele frequencies in these populations.

The SNP-63 polymorphism has been studied in different populations, as part of the risk haplotype that favors the development of the disease, among these are: Mexico-American (p 0,447)⁵, Sinaloense (Mexico DF) (p 0,30)¹⁴, American (p 0,21)¹⁵, in which the polymorphism alone does not confer T2D risk, but it does when this is associated with the risk haplotype (SNPs 43, 19 and 63)^{5,9}.

In addition to the genetic factor, T2D is also conditioned by other factors such as sex, age, race and environmental factors such as obesity and physical inactivity, which are associated with an increased risk of disease development. In terms of age, disease occurs most often in adults over age 40, both men and women, and is followed by the elderly people¹¹. According to the above, in the diabetic group was obtained a mean of 64.93 ± 11.00 years and 66.26 ± 9.5 years for the group of non-diabetics. Regarding sex, this research analyzed individuals mestizos of Loja city, and found a higher prevalence of the disease in women (56.9%) than in men (43.9%), consistent with reported by the INEC in 2011.

Comparing fasting glucose between the two groups, we found a statistically significant difference as expected, with means of 146.48 ± 55.78 mg/dl for the diabetic group and 89.27 ± 8.58 mg/dl for non-diabetics ($p < 0,001$) (Table 1). In this sense, the TT genotype of SNP-63 has been associated with increased concentrations of FFA (free fatty acids)¹³. Comparing means between cholesterol and triglycerides, significant results were obtained for both variables ($p 0,012$ and $p 0,011$, respectively) (Table 1), similar results were found in Tunisian Arabic and Chinese population^{3, 8}.

In conducting men and women analysis, statistically significant differences was found for the T allele (OR = 0,42 CI (0,24 to 0,64), $p 0,0001$), but when women from the diabetic group was compared with women from the non-diabetic group, no significant differences was found for any of the alleles. So this leads us to consider that

there must be the presence of other factors that favor disease development.

Because obesity is the risk factor most important in the development of T2D, the individuals of both groups were compared according to the BMI and there was obtained statistically significant results ($p < 0,001$, Table 1). Similar results were found by Chen SF *et al.* 2007, in the diabetic population of China, but when BMI was related with the polymorphism no significant difference was found ($p 0,10$). The positive association between obesity and risk of T2D is a constant finding in all epidemiological studies in different populations. The increase in obesity predisposition that begins in childhood and adolescent implies that diabetes will begin to affect more and younger groups, hurting people during their economically active life (15-64 years)¹¹. According to the above, the polymorphism analyzed in this research presents no influence on the development of obesity, which was tested by comparing individuals with BMI $\leq 24,99$ kg/m² against individuals of BMI ≥ 25 kg/m².

CONCLUSION

In conclusion, the SNP-63 polymorphism frequency found in Loja population does not confer any risk to develop the disease by itself but it is present in both groups, wich make us to consider that other factors different than this polymorphism could be favoring T2D development. SNP polymorphisms 43 and 44 have been also associated with T2D development and can also be another genetic cause, for that reason, a new research have to be conducted due to

evaluate the influence of gene variants CAPN-10 (SNP-43, Indel 19, SNP-63) and its population haplotype.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the people who work in the department of Ciencias de la Salud, section of Biología Molecular, Microbiología y Bioquímica clínica: Bq. Paulina Arévalo for her help with the management of statistical programs, Pamela Sarango and Andrés Samaniego for their collaboration.

REFERENCES

1. American Diabetes Association. (2011). "Standards of medical Care in Diabetes", *Diabetes Care*, Vol. 34, 2011, Págs.S11-S48.
2. American Diabetes Association. (2011). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*, 34 sup. 1, S62–9. doi:10.2337/dc11-S062
3. Chen SF, Lu XF, Yan WL, Huang JF, Gu DF. (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*; 120:2218-2223.
4. 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.
5. Del Bosque-Plata, L., Aguilar-Salinas, C. a, Tusié-Luna, M. T., Ramírez-Jiménez, S., Rodríguez-Torres, M., Aurón-Gómez, M., Ramírez, E., *et al.* (2004). Association of the calpain-10 gene with type 2 diabetes mellitus in a Mexican population. *Molecular Genetics and Metabolism*, 81(2), 122–126. doi:10.1016/j.ymgme.2003.10.005
6. Díaz-Villaseñor *et al.* (2007). The Activity of Calpains in Lymphocytes is Glucose-Dependent and is decreased in Diabetic Patients., *Blood Cells, Molecules and Diseases*.
7. 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, 544-55
8. Ezzidi, I., Turki, A., Messaoudi, S., Chaieb, M., Kacem, M., Al-khateeb, G. M., Mahjoub, T., *et al.* (2010). Common polymorphisms of calpain-10 and the risk of Type 2 Diabetes in a Tunisian Arab population: a case-control study, 8–10.
9. 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
10. Horikawa Y *et al.* (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
11. Instituto Nacional de estadísticas y Censos, 2011.
12. International Diabetes Federation (IDF), 2011.
13. Orho-Melander, M., Klannemark, M., Svensson, M. K., Ridderstråle, M., Lindgren, C. M., & Groop, L. (2002). Variants in the calpain-10 gene predispose to insulin resistance and elevated free fatty acid levels. *Diabetes*, 51(8), 2658–64.

14. Saíñz González, Enrique. Detección de los polimorfismos SNP-43, SNP-19 y SNP-63 del gen de la Calpaina 10 en población sinaloense con Diabetes Mellitus Tipo 2. México DF, 2012. 119h. Tesis para obtener el título de maestro en ciencias. INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL: ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA POSGRADO.
15. Song, Y., You, N., Hsu, Y.-H., Sul, J., Wang, L., Tinker, L., Eaton, C. B., *et al.* (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), 2960–71. doi:10.1093/hmg/ddm256
16. Tusié M. (2008). El componente genético de la Diabetes tipo 2, *Mensaje Bioquímico*, Vol. XXXII, México-DF, México.

TABLES

Table 1. Clinical characteristics of diabetics and controls

Clinic and anthropometric features	Diabetic	Non-diabetic	p-value
Percentage of women	67%	55%	-
Age (years)	64,93 ±11,00	66,26±9,5	-
BMI (kg/m ²)	29,27 ±4,63	26,13±4,06	<0,001*
TAS/TAD	137,26±21,02/78,06 ±9,45	120,36±16,54/75,28±10,87	0,015*
Cholesterol (mg/dl)	211,83 ±44,13	199,51±43,2	0,012*
HDL (mg/dl)	47,70 ±14,26	50,28±13,46	0,039*
Triglycerides (mg/dl)	198,79±121,85	168,00±73,74	0,011*
LDL (mg/dl)	123,18 ±47,03	115,26±39,97	0,079
Fasting glucose (mg/dl)	146,48 ±55,78	89,27±8,58	<0,001*
Postprandial glucose(mg/dl)	182,97 ±74,63	ND	-
HbA1 (%)	7,69 ±1,69	ND	-
Insuline (mU/ml)	ND	8,87±6,69	-

BMI: Body Mass Index, SBP: systolic blood pressure, DBP: diastolic blood pressure, HDL: high density lipoprotein, LDL: Low Density Lipoproteins; * Test Chi-square, *p*-value < 0.05.

Table 2. Genotype and allele frequencies of SNP-63 polymorphism in the calpain-10 gene

Polymorphism	Genotipo	DT2	No diabéticos	OR (IC 95%)	p-value*
SNP 63	C/C	115 (0,60)	86 (0,58)		0,854
	C/T	70 (0,36)	50 (0,34)	0,95 (0,60-1,51)	0,811
	T/T	7 (0,04)	12 (0,08)		0,248
	Frecuencia alélica	C: 300 (0,78) T: 84 (0,22)	C: 222 (0,75) T: 74 (0,25)	1,19(0,83-1,70)	0,157

* Test Chi-square, *p*-value < 0.05. MedCalc OR (IC 95%).

Table 3. Genotype and allele frequencies of SNP-63 polymorphism in men and women of the diabetic group.

GENOTYPE FREQUENCIES				
SNP-63	SEX		OR (IC 95%)	p-value*
	Men n=64	Women n=128		
C/C	36 (56,2%)	79 (61,7%)	Referencia	
C/T	25 (39,1%)	45 (35,2%)	0,82 (0,44-1,54)	0,536
T/T	3 (4,7%)	4 (3,1%)	0,61 (0,13-2,86)	0,528

ALLELE FREQUENCIES				
SNP-63	SEX		OR (IC 95%)	p-value*
	Men n=64	Women n=128		
C	97 (61%)	203 (79%)	Referencia	
T	61 (39%)	53 (21%)	0,42 (0,24-0,64)	0,0001

OR: odds ratio, CI: confidence interval. * Test Chi-square, p -value < 0.05. MedCalc OR (IC 95%).

Table 4. Allele frequencies of SNP-63 polymorphism between diabetic and non-diabetic women.

ALLELE FREQUENCIES				
SNP-63	STATE		OR (IC 95%)	p-value*
	Diabetic women n=132	Non-diabetic Women n=100		
C	203 (79%)	108 (78%)	Referencia	
T	53 (21%)	30 (22%)	1,06 (0,64-1,76)	0,809

OR: odds ratio, CI: confidence interval. * Test Chi-square, p -value < 0.05. MedCalc OR (IC 95%).

1. INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) es una de las principales enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) en la actualidad y se encuentra extendida por todo el mundo. Siendo una de las principales causas de muerte en la mayor parte de países de ingresos económicos altos; considerándose por ello un problema epidémico en países económicamente desarrollados y en naciones recién industrializadas. La diabetes es indudablemente uno de los problemas de salud pública más importantes en el siglo XXI.¹ Las complicaciones de la diabetes, tales como: enfermedad coronaria y vascular periférica, accidente cerebrovascular, neuropatía diabética, amputaciones, insuficiencia renal y ceguera, causan el aumento de las tasas de discapacidad, reducción de la esperanza de la vida y enormes gastos de salud para la sociedad.²

Según la Federación Internacional de Diabetes (IDF) se estima que la población mundial para el año 2030 será de aproximadamente de 8.4 billones de habitantes, de los cuales 438 millones padecerán de diabetes, lo que corresponde al 7,8% de prevalencia global. Estimándose para el mismo año un incremento del 65,1% de diabetes, preferentemente en la región de América Central y del Sur.⁹ La Organización Mundial de la Salud estima que alrededor de 250 millones de personas viven actualmente con diabetes mellitus tipo 2 (DT2), casi el 80% de las muertes se produce en países de ingresos bajos o medios; y se espera que este número se incremente aproximadamente a 380 millones en el año 2025.³

En países desarrollados, la mayoría de la población con diabetes tiene un promedio de edad de más de 60 años; mientras que en los países en vía de desarrollo, la mayoría de las personas diabéticas corresponden a la población trabajadora, comprendida entre los 40 y 60 años. Esta diferencia, probablemente estará presente hasta el año 2030, aunque menos marcada, ya que la edad media de las poblaciones de los países en vías de desarrollo aumentará ligeramente más que en los países desarrollados. El aumento de población, el envejecimiento de poblaciones, la urbanización con el cambio de modo de vivir y el gran aumento de la obesidad, probablemente conducirá a un aumento del 54% de los números mundiales de la diabetes hacia el año 2030.^{1,2}

La importancia social de la diabetes a nivel mundial se comprende fácilmente si tenemos en cuenta su elevada prevalencia, en poblaciones adultas de América para el año 2000, estimada por la Organización Mundial de la Salud para Estados Unidos, Canadá, Argentina, Chile y Uruguay fue de 6,1% y 8,1%. En Brasil, Perú, Venezuela, Colombia y Cuba la prevalencia de diabetes fue estimada entre 5,1% y 6% de los

¹ Shaw, J. E., Sicree, R. a, & Zimmet, P. Z. (2010). Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes research and clinical practice*, 87(1), 4–14. doi:10.1016/j.diabres.2009.10.007.

² Montero, A. C. (2007). DIABETOLOGÍA Epidemiología, genética y mecanismos patogénicos de la diabetes mellitus, 3–11.

³ Organización Mundial de la Salud. www.who.int/es/

⁹ Federación Internacional de Diabetes. www.idf.org

adultos, mientras que en Bolivia, Paraguay, Ecuador, Panamá, Costa Rica y Guatemala fue de entre 4,1% y 5%; y en Surinam, Guyana, Nicaragua y Honduras de entre 3,1% y 4,0% de la población adulta.^{2,4}

2. ANTECEDENTES

2.1. DIABETES

La DM es un grupo de trastornos metabólicos crónicos degenerativos muy heterogéneos, que presenta un componente hereditario y la participación de diversos factores ambientales. Se caracteriza por hiperglucemia crónica debido a la deficiencia en la producción o acción de la insulina o ambas, que afecta al metabolismo de carbohidratos. Esta patología se asocia con daño a largo plazo y disfunción en varios órganos, especialmente en los ojos, riñones, nervios, corazón, vasos sanguíneos y cerebro.^{5,6}

En Latinoamérica el número de DT2 en el año 2000 fue de 35 millones, y que esta cifra subirá a 64 millones en el año 2025, de las cuales 40 millones (62%) corresponden a América Latina y el Caribe.⁷

En la actualidad la DT2 es una de las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) más comunes en nuestro país. El estilo de vida, fundamentalmente el exceso de ingesta calórica, la obesidad y el sobrepeso han provocado un incremento acelerado en la última década. En Ecuador, los casos informados fueron de 92 629 en el 2010, con una prevalencia del 5.5%, en donde la diabetes ocupó la segunda causa de muerte para la población en general, la cuarta para el sexo masculino y la primera para el sexo femenino.⁸ Durante este año, 4017 personas fallecieron debido a la diabetes y/o complicaciones producidas por esta patología. En este sentido se cree que Ecuador presente una prevalencia entre el 6 y el 8% de la población para el año 2025. (Figura 1).

En Loja se estima que el 5% de los habitantes, es decir 20 mil personas, son afectados por diabetes. En el 2011, 1145 personas fallecieron debido a esta patología, lo que corresponde al 5,7% de las personas afectadas por la enfermedad.⁷

² Montero, A. C. (2007). DIABETOLOGÍA Epidemiología, genética y mecanismos patogénicos de la diabetes mellitus, 3–11.

⁴ Montero Jiménez, Yuridia. Pardo Cevallos, Betsy. Hemoglobina Glicosilada (HbA1c) como parámetro de control metabólico en personas con diabetes mellitus tipo 2 que asisten a consulta externa de los hospitales: Regional “Isidro Ayora” y “Manuel Ignacio Monteros” periodo agosto 2009 - febrero 2010. Loja, 2011. 66h. Tesis previo a la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico. Universidad Técnica Particular de Loja. Escuela de Bioquímica y Farmacia. Disponible en: <http://cepra.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/2459/1/Tesis%20final.pdf>

⁵ ADA. (2012). Standards of medical care in diabetes--2012. Diabetes care, 35 Suppl 1(October 2011), S11–63. doi:10.2337/dc12-s011.

⁶ González, E., Pascual, I., & Laclaustra, M. (2005). Síndrome Metabólico: Retos y Esperanzas. Síndrome metabólico y diabetes mellitus.

⁷ López-Jaramillo, P., Rey, J. J., Gómez-Arbeláez, D., Rodríguez, Y. a., & López-López, J. (2011). Combatir la epidemia de diabetes mellitus tipo 2 en Latinoamérica: características especiales que demandan acciones innovadoras. Clínica e Investigación en Arteriosclerosis, 23(2), 90–99. doi:10.1016/j.arteri.2011.02.004

⁸ Instituto Nacional de estadísticas y Censos, Tabulados 2011. www.inec.gov.ec

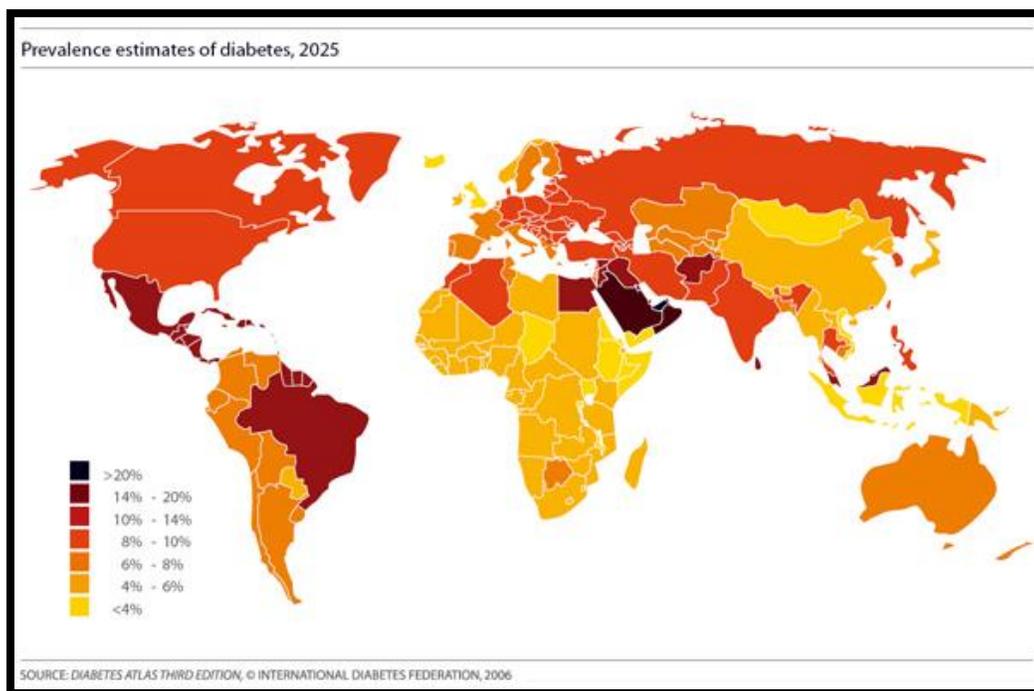


Figura 1. Prevalencia estimada de Diabetes Mellitus para el año 2025.
Tomado de la Federación Internacional de Diabetes, 2006.⁹

2.1.1. Clasificación de la diabetes

De acuerdo con la Asociación Americana de Diabetes (ADA, 2011), este trastorno se clasifica de la siguiente manera:

2.1.1.1. Diabetes tipo 1

La Diabetes tipo 1 (DT1), antes conocida como diabetes juvenil o insulino-dependiente, es la forma más frecuente de diabetes en niños y adolescentes caracterizada por la destrucción autoinmune de las células β de los Islotes de Langerhans del páncreas; produciendo una deficiencia absoluta de insulina, lo que lleva al individuo a depender de la administración de esta hormona. Es una enfermedad autoinmune que tiene una predisposición genética sobre la que actúan factores ambientales. Este tipo de diabetes afecta del 5-10% de toda la población diabética.¹⁰

2.1.1.2. Diabetes tipo 2

La DT2 es un complejo trastorno metabólico de múltiples etiologías en el que coexisten una disminución de la secreción pancreática de insulina y una disminución de su acción biológica (insulinorresistencia) en los

⁹ Federación Internacional de Diabetes. www.idf.org

¹⁰ ADA. (2011). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*, 34 Suppl 1, S62-9. doi:10.2337/dc11-S062.

tejidos musculares, hepático y adiposo, debido a disturbios en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas resultando en una hiperglucemia; 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. Esto está determinado genéticamente y es agravado por factores ambientales como la obesidad central o abdominal, el sedentarismo, la dieta hiper-calórica, rica en grasas saturadas e hidratos de carbono simples y pobres en fibras, y la edad. Representa del 90 al 95% de las personas con diabetes.⁹

2.1.1.3. Otros tipos de diabetes

Otras causas de DM son defectos genéticos específicos de la secreción o acción de la insulina, alteraciones metabólicas que trastornan la secreción de insulina, trastornos mitocondriales y un sin número de situaciones que alteran la tolerancia a la glucosa.^{9,11,12} Entre los que podemos citar:

- a. Defectos genéticos de la función celular β
 - Cromosoma 20, HNF-4 α (MODY 1)
 - Cromosoma 7, glucocinasa (MODY 2)
 - Cromosoma 12, HNF-1 α (MODY 3)
 - Cromosoma 13, factor promotor de insulina 1 (IPF-1; MODY4)
 - Cromosoma 17, HNF-1 β (MODY 5)
 - Cromosoma 2, Neuro D1 (MODY 6)
 - DNA mitocondrial
 - Otros
- b. Defectos genéticos de la acción de insulina
 - Resistencia a la insulina A
 - Leprechaunismo
 - Síndrome de Rabson –Mendenhall
 - Diabetes lipoatrófica
 - Otros
- c. Enfermedades del páncreas exocrino
 - Pancreatitis
 - Trauma, pancreatectomía
 - Neoplasia
 - Fibrosis quística
 - Hemocromatosis
 - Pancreatopatía fibrocalculosa
 - Otras

⁹ ADA. (2011). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes care, 34 Suppl 1, S62–9. doi:10.2337/dc11-S062.

¹¹ Cueva González, Pablo. Caracterización clínico epidemiológica de la Diabetes Mellitus 2 en pacientes del Centro de Atención Ambulatoria del IESS de Loja, en el Periodo mayo 2010 a mayo 2011. Loja, 2011. 110 h. Tesis de fin de carrera previa a la obtención del título de: MÉDICO. Universidad Técnica Particular de Loja. Escuela de Medicina. Disponible en: <http://cepra.utpl.edu.ec/handle/123456789/741>

¹² McPhee, S., Ganong, W. Fisiopatología médica: una introducción a la medicina clínica. 5ta edición. México: Editorial El Manual Moderno, 2007.

- d. Endocrinopatías
 - Acromegalia
 - Síndrome de Cushing
 - Glucagonoma
 - Feocromocitoma
 - Hipertiroidismo
 - Somatostatina
 - Aldosterona
 - Otros
- e. Inducida por fármacos o químicos
 - Pentamidina
 - Ácido nicotínico
 - Glucocorticoides
 - Hormona tiroidea
 - Otros
- f. Infecciones
 - Rubeola
 - Citomegalovirus
 - Otras
- g. Formas infrecuentes de diabetes mediadas inmunitariamente
 - Síndrome “Stiff-man” (hombre rígido)
 - Anticuerpos anti-receptor insulina
- h. Otros síndromes genéticos asociados ocasionalmente a diabetes
 - Síndrome de Down
 - Síndrome de Klinefelter
 - Síndrome de Turner
 - Síndrome de Wolfram
 - Ataxia de Friedreich
 - Corea de Huntington
 - Distrofia miotónica
 - Otros

2.1.1.4. Diabetes mellitus gestacional

La Diabetes Gestacional (DG) es cualquier grado de intolerancia a la glucosa, que se inicia o diagnostica en algunas mujeres durante el embarazo, pero generalmente desaparece después del parto. Aparece en el 4% de las mujeres embarazadas y puede recidivar en embarazos subsiguientes. Se acompaña con un notable incremento en el riesgo, hasta de un 50% en mujeres obesas de desarrollar posteriormente de diabetes (predominantemente DT2). Este tipo de diabetes suele presentarse en la segunda mitad del embarazo precipitada por el aumento en las concentraciones de hormonas, todas con efectos contra-reguladores anti-insulina.^{9,11}

2.1.2. Factores de riesgo a diabetes tipo 2

Los factores de riesgo para el desarrollo de DT2 son:

2.1.2.1. **Factores genéticos:** la mayoría del riesgo genético para el desarrollo de DT2 se basa en una compleja interacción entre diversos factores poligénicos y el ambiente. Existe un mayor riesgo cuando se tiene antecedentes familiares, si uno de los padres es diabético el riesgo es del 50%, pero este aumenta cuando ambos progenitores lo son.^{13,14} En la sección 2.1.3. se hablará de este tema con más detalle.

2.1.2.2. **Características demográficas:**

2.1.2.2.1. Sexo y edad. La prevalencia de diabetes aumenta con la edad. Es inferior al 10% en personas menores de 60 años y entre el 10-20% entre los 60 y 79 años de edad. Existe una mayor prevalencia en varones de 30 y 69 años y en las mujeres mayores de 70 años.¹²

2.1.2.2.2. Etnia. El riesgo a desarrollar diabetes es menor en caucásicos que en el resto de etnias estudiadas (raza negra, asiáticos e hispanos).^{4,12}

2.1.2.3. **Comportamiento y estilo de vida:**

2.1.2.3.1. Obesidad. La mayor parte de los individuos con DT2 (80%) son obesos. Esta condición se relaciona con un incremento en la resistencia a la insulina y subraya su importancia por el hecho de que la pérdida de peso en estos individuos puede aminorar o incluso evitar el trastorno.^{4,12} El exceso de peso, expresado en función del índice de masa corporal (IMC), se ha relacionado de forma consistente con la DT2, de modo que cada aumento unitario del IMC se asocia con un incremento del riesgo del 12%. Por cada kilogramo de aumento de peso se eleva en 4,5% el riesgo de desarrollar diabetes en los próximos 10 años. Además, la distribución de la grasa corporal se ha mostrado como un poderoso factor de riesgo; la obesidad centrípeta y el síndrome metabólico potencian la resistencia insulínica y aumentan el riesgo, con independencia del IMC.^{2,13}

2.1.2.3.2. Inactividad física. Constituye un factor principal de la causa de muertes, enfermedades y discapacidades. Duplicando el riesgo en ciertas enfermedades como

² Montero, A. C. (2007). DIABETOLOGÍA Epidemiología, genética y mecanismos patogénicos de la diabetes mellitus, 3–11.

⁴ ADA. (2012). Standards of medical care in diabetes--2012. Diabetes care, 35 Suppl 1(October 2011), S11–63. doi:10.2337/dc12-s011.

⁹ ADA. (2011). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes care, 34 Suppl 1, S62–9. doi:10.2337/dc11-S062.

¹¹ McPhee, S., Ganong, W. Fisiopatología médica: una introducción a la medicina clínica. 5ta edición. México: Editorial El Manual Moderno, 2007.

¹³ Cortázar A., Daza P., Etxebarria A., Ezkurra P., Idarreta I., Jaio N., Machimbarrena M., Moreno M., Rotaache R., Sola M., Villa I., Yoldi A. Grupo de trabajo de la Guía de Práctica Clínica sobre Diabetes tipo 2. Guía de Práctica Clínica sobre Diabetes tipo 2. Madrid: Plan Nacional para el SNS del MSC. Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias del País Vasco; 2008. Guías de Práctica Clínica en el SNS: OSTEBA N° 2006/08.

¹⁴ Hemminki, K. Li X., Sundquist, K. & Sundquist, J. (2010). Familial risks for type 2 diabetes in sweden. Diabetes Care, 33 (2), 293-297.

la DT2 y la obesidad.^{4,11} La actividad física se relaciona inversamente con el riesgo de diabetes. En múltiples estudios se ha demostrado que el ejercicio se acompaña de un descenso en la incidencia de diabetes, que es independiente de la pérdida de peso. El ejercicio mejora la sensibilidad a la insulina y reduce las concentraciones sanguíneas de la hormona.^{2,15}

2.1.2.3.3. Dieta. El patrón dietético influye en el riesgo de padecer DT2, al igual que influye en el desarrollo de la obesidad.^{4,11} Múltiples componentes de la dieta han sido relacionados con el desarrollo de diabetes y, sin embargo, los resultados no han sido suficientemente consistentes en muchos casos. En general, la ingesta de grasas poliinsaturadas, ácidos grasos omega-3, alimentos de bajo índice glucémico, fibra y vegetales por lo que parece ser beneficiosa.^{2,14}

2.1.2.3.4. Tabaco. Estudios publicados desde los años noventa demuestran que los fumadores tienen un riesgo entre 1,2 y 2,6 veces superior de desarrollar diabetes en comparación con los no fumadores, y este riesgo es independiente de la actividad física y la obesidad.^{2,14}

2.1.2.4. Factores metabólicos y determinantes de categorías intermedias de riesgo a DT2:

2.1.2.4.1. Intolerancia a la glucosa. Esta es una condición en la que los niveles de glucosa en ayunas son superiores a los normales (100 mg/dl), pero inferiores a los de diagnóstico de DT2, se conoce con el nombre de prediabetes (>100 hasta ≤125mg/dl).^{4,11}

2.1.2.4.2. Resistencia a la insulina. Es una condición que aumenta las probabilidades de desarrollar DT2 y enfermedades del corazón. En esta patología el cuerpo no responde a la acción de la insulina y con el tiempo los niveles elevados de glucosa comienzan a afectar el organismo.^{4,11}

2.1.2.4.3. Diabetes gestacional. El riesgo a desarrollar DT2 es mayor en mujeres con antecedentes de diabetes gestacional.^{4,12}

² Montero, A. C. (2007). DIABETOLOGÍA Epidemiología, genética y mecanismos patogénicos de la diabetes mellitus, 3–11.

⁴ ADA. (2012). Standards of medical care in diabetes--2012. Diabetes care, 35 Suppl 1(October 2011), S11–63. doi:10.2337/dc12-s011.

¹¹ McPhee, S., Ganong, W. Fisiopatología médica: una introducción a la medicina clínica. 5ta edición. México: Editorial El Manual Moderno, 2007.

¹² Cortázar A., Daza P., Etxebarria A., Ezkurra P., Idarreta I., Jaio N., Machimbarrena M., Moreno M., Rotaeche R., Sola M., Villa I., Yoldi A. Grupo de trabajo de la Guía de Práctica Clínica sobre Diabetes tipo 2. Guía de Práctica Clínica sobre Diabetes tipo 2. Madrid: Plan Nacional para el SNS del MSC. Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias del País Vasco; 2008. Guías de Práctica Clínica en el SNS: OSTEBA N° 2006/08.

¹⁵ Gutierrez Valverde, Juana. Riesgo de desarrollar diabetes tipo 2: interacción gen-medio ambiente. México, 2010, 180 h. Trabajo de tesis (Doctor en ciencias de enfermería). Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Enfermería. Disponible en: http://eprints.uanl.mx/2653/1/Riesgo_de_desarrollar_Diabetes_tipo_2_Interacci%C3%B3n_Gen-Medio_Ambiente_Juana_Mercedes_Guti%C3%A9rez_Val.pdf

2.1.3. Genética de la diabetes tipo 2

La DT2 comprende un grupo de enfermedades con diferentes causas genéticas. En la mayor parte de los pacientes, esta patología resulta de alteraciones de varios genes, cada uno con un efecto aditivo. El patrón de herencia es complejo, y los factores ambientales juegan un papel importante que favorece o retrasa la expresión de la enfermedad.^{16,17}

Con la información completa del genoma humano ha sido posible realizar genotipificaciones por medio de los denominados polimorfismos de un solo nucleótido o SNP (“single-nucleotide polymorphisms”) realizándose así estudios de asociación a gran escala con la enfermedad, entre ellos tenemos a los SNPs 43, 44, 63 e Indel 19 del gen de calpaína 10 (CAPN10).^{18,19} En el caso de este gen, el trabajo llevado a cabo por Horikawa *et al*, mediante estudios de posicionamiento clonal y ensayos de mapeo genético en población México-Americana, reportaron que cambios en CAPN10 confieren un mayor riesgo a desarrollar DT2.^{20,21}

En la DT2 no ha sido posible establecer un gen único involucrado con la enfermedad. A la fecha se ha demostrado la participación de diversos alelos en las regiones cromosómicas 1q25.3, 2q37.3, 3p24.1, 3q28, 10q26.13, 12q24.31, y 18p11.22 con una asociación significativa.¹⁷ Se han descrito más de 250 genes relacionados con la DT2, entre éstos destacan los genes que codifican para las proteínas involucradas en la señalización de la insulina, en el metabolismo de la glucosa (transportadores de glucosa GLUT-1 y GLUT-4, el gen de hexocinasa II, fosfofructocinasa, glucógeno-sintasa, CAPN10 entre otros), en la síntesis del glucógeno, en la síntesis y absorción de los ácidos grasos y en la diferenciación de los adipocitos.^{16,17}

Según Horikawa *et al.*, el riesgo viene dado en parte por los diferentes SNPs; entre los que se consideran al SNP63, SNP43 y la inserción/delección de 32 pb conocida como Indel 19, así como sus correspondientes haplotipos. De estos haplotipos ha sido considerados como de riesgo el 112/121((SNP43 G, Indel19 2 repeticiones de 32pb, SNP63 T) / (SNP43 G, Indel19 3 repeticiones de 32pb, SNP63 C)). Además en el año 2004, Del Bosque-Plata *et al*, publica un trabajo en población mestiza mexicana, en la que se analizaron 5 polimorfismos para el gen de CAPN10 (SNP-43, Indel-19, SNP-63, SNP-44 y SNP-110), encontrando diferencia significativa en el SNP-44 (p 0.017) en las frecuencias genotípicas entre individuos diabéticos y no

¹⁶ Tusie, T. (2005). Genes and Type 2 Diabetes Mellitus. Archives of Medical Research, 36, 210–222.

¹⁷ Wiebe, J. C., Wagner, A. M., & Mogollón, F. J. N. (2011). Genética de la diabetes mellitus, 111–119. doi:10.3265/NefrologiaSuplementoExtraordinario.pre2011.Mar.10918.

¹⁸ Cruz, M., García-mena, J., López-orduña, E., & Valladares, A. (2005). GENES CANDIDATOS COMO POSIBLES MARCADORES DE SUSCEPTIBILIDAD A DIABETES TIPO 2*. Nature Genetics, 24(1), 81–86.

¹⁹ Paredes, M., Lizaraso, F., & Huapaya, J. (2010). Asociación del SNP19 del gen «calpaína 10» a diabetes mellitus tipo 2 y factores de riesgo en población peruana Diabetología Artículo original, 184–188.

²⁰ Horikawa, Y, Oda, N., Cox, N. J., Li, X., Orho-Melander, M., Hara, M., Hinokio, Y., *et al.* (2000). Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. Nature genetics, 26(2), 163–75. doi:10.1038/79876.

²¹ Del Bosque-Plata, L., Aguilar-Salinas, C. a, Tusié-Luna, M. T., Ramírez-Jiménez, S., Rodríguez-Torres, M., Aurn-Gómez, M., Ramírez, E., *et al.* (2004). Association of the calpain-10 gene with type 2 diabetes mellitus in a Mexican population. Molecular Genetics and Metabolism, 81(2), 122–126. doi:10.1016/j.ymgme.2003.10.005.

diabéticos, por tanto un mayor riesgo a DT2. Sin embargo en este grupo poblacional el haplotipo 112/121 no confirió riesgo para con la enfermedad. Por otra parte, en el año 2010 Morocho V. y Loaiza D., realizaron la determinación del polimorfismo Indel 19 en 370 individuos diabéticos y no diabéticos del IESS de la ciudad de Loja cuyos resultados no fueron significativos para frecuencias alélicas ni genotípicas.

Estudios del SNP-63 se han realizados en diversas poblaciones entre ellas: México-Americana (p 0,447)²⁰, población Sinaloense (México DF) (p 0,30)²² y en un grupo de mujeres Americanas (p 0,21)²³; en las cuales los resultados no fueron significativos para frecuencias alélicas y genotípicas en relación a la DT2. Estos resultados nos demuestran que la diversidad en la estructura genética de las diferentes poblaciones tiene mucho que ver con el desarrollo de la enfermedad.²⁴

2.2. CALPAÍNAS

Las calpaínas son proteasas de cisteína no lisosomales (672 aminoácidos), dependientes de Ca^{2+} , que se encuentran en todos los tejidos. Son peptidasas que modulan la acción de proteínas estructurales por hidrólisis y al ser activadas participan en los procesos de regulación de señalización intracelular, diferenciación y proliferación.²⁵ Aunque no se conoce por completo la función fisiológica de CAPN10, se cree que está implicada en una variedad de procesos celulares regulados por calcio, tales como; señales de transducción, proliferación celular, diferenciación, apoptosis, progresión del ciclo celular, fusión de membranas y activación de plaquetas.^{26,27} También se ha identificado su importancia en la supervivencia de las células β pancreáticas.^{23,28} Otra de las funciones observadas en las células β pancreática para la CANP10, es la reorganización de la actina durante la secreción de insulina estimulada por glucosa.²³

²⁰ Del Bosque-Plata, L., Aguilar-Salinas, C. a, Tusié-Luna, M. T., Ramírez-Jiménez, S., Rodríguez-Torres, M., Aurón-Gómez, M., Ramírez, E., *et al.* (2004). Association of the calpain-10 gene with type 2 diabetes mellitus in a Mexican population. *Molecular Genetics and Metabolism*, 81(2), 122–126. doi:10.1016/j.ymgme.2003.10.005.

²² Saínez González, Enrique. Detección de los polimorfismos SNP-43, SNP-19 y SNP-63 del gen de la Calpaína 10 en población sinaloense con Diabetes Mellitus Tipo 2. México DF, 2012. 119h. Tesis para obtener el título de maestro en ciencias. Instituto Politécnico Nacional: Escuela Superior de Medicina Posgrado. Disponible en: <http://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/8433/tesis%20sainz.pdf?sequence=1>

²³ Song, Y., You, N., Hsu, Y.-H., Sul, J., Wang, L., Tinker, L., Eaton, C. B., *et al.* (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), 2960–71. doi:10.1093/hmg/ddm256.

²⁴ Berhouma, Rym; Kouidhi, Soumaya; Ammar, Mariem; Abid, Hafawa; Baroudi, Thouraya; Ennafaa, Hajer; and Benammar-Elgaaied, Amel (2012) "Genetic Susceptibility to Type 2 Diabetes: A Global Meta-Analysis Studying the Genetic Differences in Tunisian Populations," *Human Biology: Vol. 84: Iss. 4, Article 9*. Available at: http://digitalcommons.wayne.edu/humbiol_preprints/3

²⁵ Díaz-Villaseñor, A., Hiriart, M., Cebrián, M. E., Zacarías-Castillo, R., & Ostrosky-Wegman, P. (2008). The activity of calpains in lymphocytes is glucose-dependent and is decreased in diabetic patients. *Blood cells, molecules & diseases*, 40(3), 414–9. doi:10.1016/j.bcmd.2007.08.009.

²⁶ Suzuki, K., Hata, S., Kawabata, Y., & Sorimachi, H. (2004). Structure, activation, and biology of calpain. *Diabetes*, 53 Suppl 1(February), S12–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14749260>

²⁷ Córdova A. (2009). Determinación del polimorfismo Indel-19, en el gen decalpain-10 en individuos diabéticos y no diabéticos de la ciudad de Loja, Previo a la obtención del título Bioquímica Farmacéutica, Ecuador: Universidad Técnica Particular de Loja, [en línea], citado el 06-04-2012, disponible en internet: <http://dspace1.utpl.edu.ec/handle/123456789/1865>

²⁸ Lynn, S., Evans, J. C., White, C., Frayling, T. M., Hattersley, A. T., Turnbull, D. M., Horikawa, Y., *et al.* (2002). Variation in the calpain-10 gene affects blood glucose levels in the British population. *Diabetes*, 51(1), 247–50. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11756349>

2.2.1. Estructura de las calpaínas

Inicialmente fueron identificadas dos calpaínas, denominadas según el requerimiento de Ca^{2+} : la micro-molar calpaína (u-CAPN) y mili-molar calpaína (m-CAPN) (Figura 2). La primera se la conoce como CAPN1 y necesita 35 μM de Ca^{2+} , la otra es CAPN2 y requiere 325 μM . Ambas presentan dos unidades, descritas a continuación.^{21,25,26}

2.2.2. Unidades de las calpaínas

Las calpaínas son heterodímeros formados por una unidad catalítica o mayor, y una reguladora o menor. Además de estas unidades, en la m-calpaína se expresa una región extra, formada por 248 aminoácidos, que al unirse con la unidad catalítica produce una proteólisis de la enzima, activándola en un 70%, por lo que puede sustituir a la unidad reguladora.^{21,29}

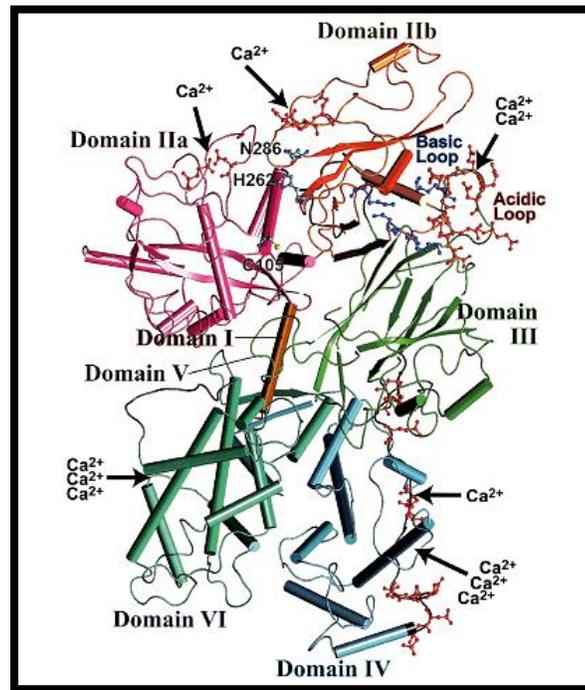


Figura 2. Estructura de la m-calpaína. Tomado de Suzuki *et al.*, 2004.²⁶

²¹ Saíenz González, Enrique. Detección de los polimorfismos SNP-43, SNP-19 y SNP-63 del gen de la Calpaína 10 en población sinaloense con Diabetes Mellitus Tipo 2. México DF, 2012. 119h. Tesis para obtener el título de maestro en ciencias. Instituto Politécnico Nacional: Escuela Superior de Medicina Posgrado. Disponible en: <http://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/8433/tesis%20sainz.pdf?sequence=1>

²⁵ Córdova A. (2009). Determinación del polimorfismo Indel-19, en el gen decalpaina-10 en individuos diabéticos y no diabéticos de la ciudad de Loja, Previo a la obtención del título Bioquímica Farmacéutica, Ecuador: Universidad Técnica Particular de Loja, [en línea], citado el 06-04-2012, disponible en internet: <http://dspace1.utpl.edu.ec/handle/123456789/1865>

²⁸ Lynn, S., Evans, J. C., White, C., Frayling, T. M., Hattersley, A. T., Turnbull, D. M., Horikawa, Y., *et al.* (2002). Variation in the calpain-10 gene affects blood glucose levels in the British population. *Diabetes*, 51(1), 247–50. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11756349>

²⁹ Goll, D. E., Thompson, V. F., Li, H., Wei, W. E. I., & Cong, J. (2003). The Calpain System, 1990(284), 731–801.

2.2.2.1. Unidad catalítica o mayor

Tiene un peso molecular de alrededor de 80kDa. Los genes que codifican a esta unidad se encuentran ubicados en el cromosoma 11 para la u-calpaína y en el cromosoma 1 para la m-calpaína.^{21,27,30} Presenta 4 dominios:

Dominio I.- Contiene el N-terminal.^{21,27}

Dominio II.- Porción proteolítica que está formada por dos subdominios (IIa y IIb) que se encuentran separados, pero que se unen al activarse la enzima. En el dominio IIa se encuentra la Cys en la posición 105 (m-Calpaína) o 115 (u-Calpaína), y en el dominio IIb la His en la posición 262 (m-Calpaína) o 272 (u-Calpaína) y la Asn en la 272 (u-Calpaína) o 286 (m-Calpaína). Estos aminoácidos forman una triada característica de las proteasas de cisteína, y son los que cumplen con la función catalítica.^{21,24,27}

Dominio III.- Se relaciona con la regulación de la actividad de la calpaína por medio de uniones electrostáticas con los fosfolípidos de la membrana celular, y estabiliza el dominio II por medio de un lazo ácido. Presenta dos secuencias EF-hand de unión a Ca^{2+} , 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^{2+} en algunas calpaína.^{21,24,27}

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^{2+} . La m-calpaína posee dos dominios extra uno de 18 residuos de aminoácidos que se ubican entre el dominio I y II, y el otro es de 17 entre los dominios III y IV; denominándolos dominios de unión.^{21,27}

2.2.2.2. Unidad reguladora o menor

Tiene un peso molecular de 28 kDa; y cumple con función de chaperona. Presenta 2 dominios:

Dominio V.- Tiene una porción hidrofílica y una hidrofóbica, la cual es rica en glicina (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.^{21,27}

Dominio VI.- Presenta cuatro EF-hands que se unen a Ca^{2+} para formar un complejo que permite la unión con la membrana celular.^{21,27}

²¹ Saíenz González, Enrique. Detección de los polimorfismos SNP-43, SNP-19 y SNP-63 del gen de la Calpaína 10 en población sinaloense con Diabetes Mellitus Tipo 2. México DF, 2012. 119h. Tesis para obtener el título de maestro en ciencias. Instituto Politécnico Nacional: Escuela Superior de Medicina Posgrado. Disponible en: <http://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/8433/tesis%20sainz.pdf?sequence=1>

²⁴ Suzuki, K., Hata, S., Kawabata, Y., & Sorimachi, H. (2004). Structure, activation, and biology of calpain. *Diabetes*, 53 Suppl 1(February), S12–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14749260>

²⁷ Goll, D. E., Thompson, V. F., Li, H., Wei, W. E. I., & Cong, J. (2003). The Calpain System, 1990(284), 731–801.

³⁰ Morocho V., Loaiza D. (2010). Determinación del polimorfismo Indel-19, en el gen decalpain-10 en diabéticos y no diabéticos, Previo a la obtención del título Bioquímica Farmacéutica, Ecuador: Universidad Técnica Particular de Loja, [en línea], citado el 06-04-2012, disponible en internet: <http://dspace1.utpl.edu.ec/handle/123456789/1875>

2.2.3. Activación de las calpaínas

Se encuentran inactivas en el citosol, tras incrementar la cantidad de Ca^{2+} las calpaínas van hacia la membrana, y se unen a una molécula de Ca^{2+} en el dominio IIa y dos en el IIb haciendo que estas dos subunidades se unan. Otra molécula de 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 (Figura 2). Para facilitar el paso de la calpaína a la membrana se produce una hidrólisis en el dominio I, proceso se sigue dando de una forma auto-catalítico.^{24,25,31}

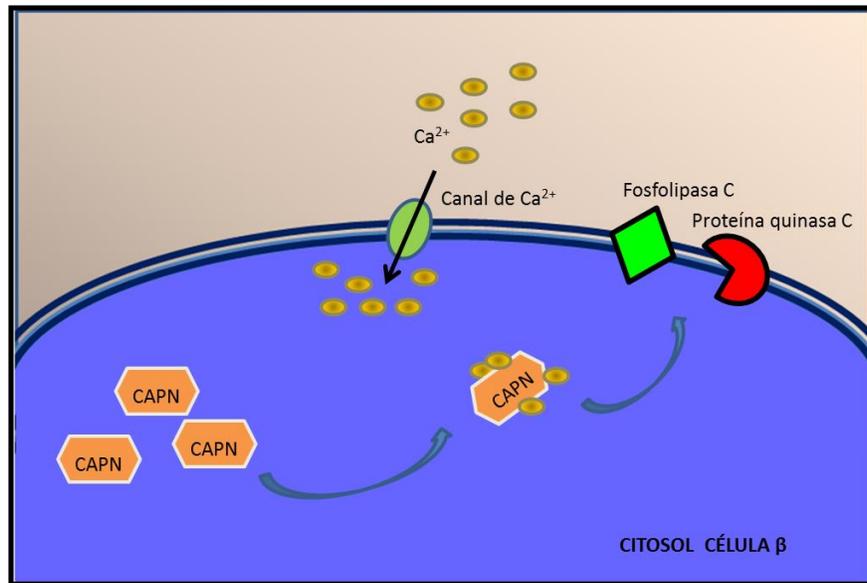


Figura 3. Activación de las calpaínas

2.2.4. Inactivación de las calpaínas

La actividad de las calpaínas cesa cuando disminuye la concentración intracelular de Ca^{2+} , pues las subunidades IIa y IIb se separan y se inactiva la enzima. La quinasa A es capaz de mantener las calpaínas en un estado inactivo por medio de una fosforilación en la Ser-369 del dominio III.²⁴ El único inhibidor intracelular específico de las calpaínas es la calpastatina (CAST), la cual se ubica en el citosol y está formada por tres regiones conservadas: A, B y C; las dos primeras se unen con los dominios IV y VI de las calpaínas para inactivarlas, y la tercera se encarga de la auto-regulación. De acuerdo a estas características la CAST sólo inactiva a aquellas calpaínas de tipo diméricas (1, 2 y 9).²⁴ La CAST pertenece a la familia de las

²⁴ Suzuki, K., Hata, S., Kawabata, Y., & Sorimachi, H. (2004). Structure, activation, and biology of calpain. *Diabetes*, 53 Suppl 1(February), S12–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14749260>

²⁵ Córdova A. (2009). Determinación del polimorfismo Indel-19, en el gen decalpain-10 en individuos diabéticos y no diabéticos de la ciudad de Loja, Previo a la obtención del título Bioquímica Farmacéutica, Ecuador: Universidad Técnica Particular de Loja, [en línea], citado el 06-04-2012, disponible en internet: <http://dspace1.utpl.edu.ec/handle/123456789/1865>

³¹ Orho-Melander, M., Klannemark, M., Svensson, M. K., Ridderstråle, M., Lindgren, C. M., & Groop, L. (2002). Variants in the calpain-10 gene predispose to insulin resistance and elevated free fatty acid levels. *Diabetes*, 51(8), 2658–64. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12145185>

calpaínas, por lo que requiere Ca^{2+} para cumplir su función.²⁷ 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-Leunorleucinal.²⁴

2.2.5. Calpaína y secreción de insulina

La liberación de insulina se lleva a cabo por medio de una maquinaria de fusión exocitótica, en la que deben ocurrir varios procesos (Figura 4). El ICA512 (islotos autoantígenos celular) es un receptor tirosina-proteinfosfataza que se encuentra asociado a los gránulos o vesículas de insulina en las células β . ICA512 está unido a un complejo formado por β 2-Syntrophin-utrofina y actina, el cual puede anclar los gránulos de secreción al citoesqueleto de actina.^{21,29} La entrada de Ca^{2+} estimula la desfosforilación de β 2-Syntrophin y promueve la disociación del complejo (2-Syntrophin-utrofina y F-actina), el cual se une con ICA512 que está unido a los gránulos de insulina. Una vez disociados, el dominio citoplasmático de ICA512 es dividido por la calpaína (activado por Ca^{2+}), lo que promueve la movilización de los gránulos de insulina y facilita la exocitosis.^{21,29} Las moléculas que operan en la fase tardía de la vía secretora son las N-etilmaleimida solubles, sensibles a la proteína de fusión del receptor de fijación (SNARE), estas forman el núcleo de la maquinaria de fusión vesículas/gránulo. Presentan una estructura helicoidal, y a su vez forman en conjunto paquetes helicoidales entre los gránulos/vesículas (v-SNARE) y las membranas diana (t-SNARE) facilitando la fusión de membranas. En las células β la exocitosis de los gránulos esta mediada por la vesícula asociada a proteínas de membrana VAMP2, inmovilizando gránulos en la membrana plasmática mediante la interacción con la t-SNARE syntaxina 1 y SNAP-25.³⁰

Estudios llevados a cabo para CAPN10 la han involucrado como parte del complejo proteolítico de la maquinaria de secreción de las células β y que en respuesta a un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular, proteolisa parcialmente a la proteína SNAP-25, hecho que produce la fusión del granulo de insulina (v-SNARE) con la membrana celular (t-SNARE), para dar lugar a la exocitosis de la insulina.²³

²¹ Saíñz González, Enrique. Detección de los polimorfismos SNP-43, SNP-19 y SNP-63 del gen de la Calpaína 10 en población sinaloense con Diabetes Mellitus Tipo 2. México DF, 2012. 119h. Tesis para obtener el título de maestro en ciencias. Instituto Politécnico Nacional: Escuela Superior de Medicina Posgrado. Disponible en: <http://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/8433/tesis%20sainz.pdf?sequence=1>

²³ Díaz-Villaseñor, A., Hiriart, M., Cebrián, M. E., Zacarías-Castillo, R., & Ostrosky-Wegman, P. (2008). The activity of calpains in lymphocytes is glucose-dependent and is decreased in diabetic patients. *Blood cells, molecules & diseases*, 40(3), 414–9. doi:10.1016/j.bcmd.2007.08.009.

²⁴ Suzuki, K., Hata, S., Kawabata, Y., & Sorimachi, H. (2004). Structure, activation, and biology of calpain. *Diabetes*, 53 Suppl 1(February), S12–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14749260>

²⁷ Goll, D. E., Thompson, V. F., Li, H., Wei, W. E. I., & Cong, J. (2003). The Calpain System, 1990(284), 731–801.

²⁹ Orho-Melander, M., Klannemark, M., Svensson, M. K., Ridderstråle, M., Lindgren, C. M., & Groop, L. (2002). Variants in the calpain-10 gene predispose to insulin resistance and elevated free fatty acid levels. *Diabetes*, 51(8), 2658–64. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12145185>

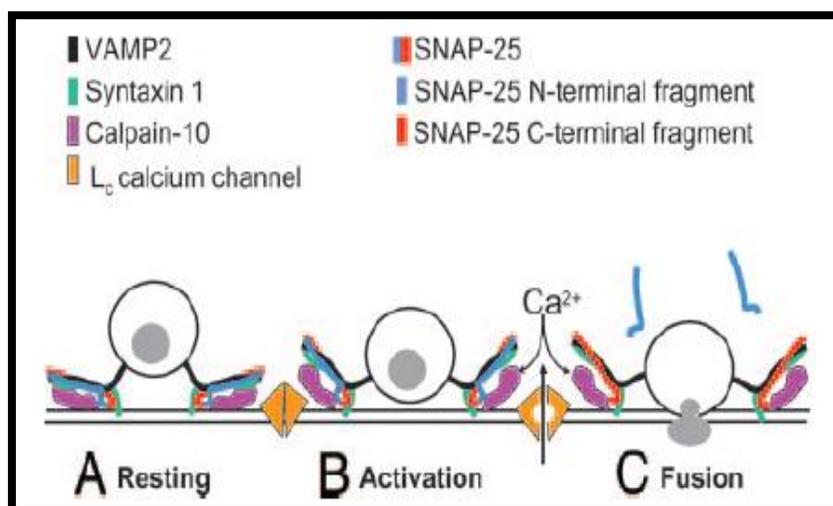


Figura 4. Interacción propuesta entre CAPN-10 y las proteínas SNARE durante la exocitosis. Tomado de Marshall *et al*, 2005³²

2.3. Calpaína 10

El gen de CAPN10, que codifica una proteína del mismo nombre, está ubicado en la región NIDDM1 del cromosoma 2q37.3; y está formado por 15 exones.^{24,28,33} Sus diferentes productos se localizan en la membrana celular o en el citoplasma de todos tejidos, los mismos que presentan una actividad enzimática intracelular tipo cisteína-proteasa.^{16,17} Regula gran variedad de funciones celulares y pueden intervenir en la diferenciación de los adipocitos y en la desregulación del receptor de insulina.

Este gen codifica 8 isoformas de Calpaína10 (CAPN10 a – CAPN10 h), de estas la CAPN10a es la forma más abundante en varios tejidos (Figura 2); expresándose 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

¹⁶ Wiebe, J. C., Wägner, A. M., & Mogollón, F. J. N. (2011). Genética de la diabetes mellitus, 111–119. doi:10.3265/NefrologiaSuplementoExtraordinario.pre2011.Mar.10918.

¹⁷ Cruz, M., García-mena, J., López-orduña, E., & Valladares, A. (2005). GENES CANDIDATOS COMO POSIBLES MARCADORES DE SUSCEPTIBILIDAD A DIABETES TIPO 2*. *Nature Genetics*, 24(1), 81–86.

²⁴ Córdova A. (2009). Determinación del polimorfismo Indel-19, en el gen decalpaina-10 en individuos diabéticos y no diabéticos de la ciudad de Loja, Previo a la obtención del título Bioquímica Farmacéutica, Ecuador: Universidad Técnica Particular de Loja, [en línea], citado el 06-04-2012, disponible en internet: <http://dspace1.utpl.edu.ec/handle/123456789/1865>

²⁸ Morocho V., Loaiza D. (2010). Determinación del polimorfismo Indel-19, en el gen decalpaina-10 en diabéticos y no diabéticos, Previo a la obtención del título Bioquímica Farmacéutica, Ecuador: Universidad Técnica Particular de Loja, [en línea], citado el 06-04-2012, disponible en internet: <http://dspace1.utpl.edu.ec/handle/123456789/1875>

³² Marshall, C., Hitman, G. a, Partridge, C. J., Clark, A., Ma, H., Shearer, T. R., & Turner, M. D. (2005). Evidence that an isoform of calpain-10 is a regulator of exocytosis in pancreatic beta-cells. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md.), 19(1), 213–24. doi:10.1210/me.2004-0064.

³³ Salamanca-Gómez Fabio, 2001., Un nuevo gen de predisposición a la diabetes tipo 2., *Gac Méd Méx* Vol. 137 No. 1.

pancreáticos y adipocitos. La CANP10c y g se han detectado en muchos tejidos en tanto que las CANP10b, 10d, 10e y 10f son menos abundantes.^{24,34}

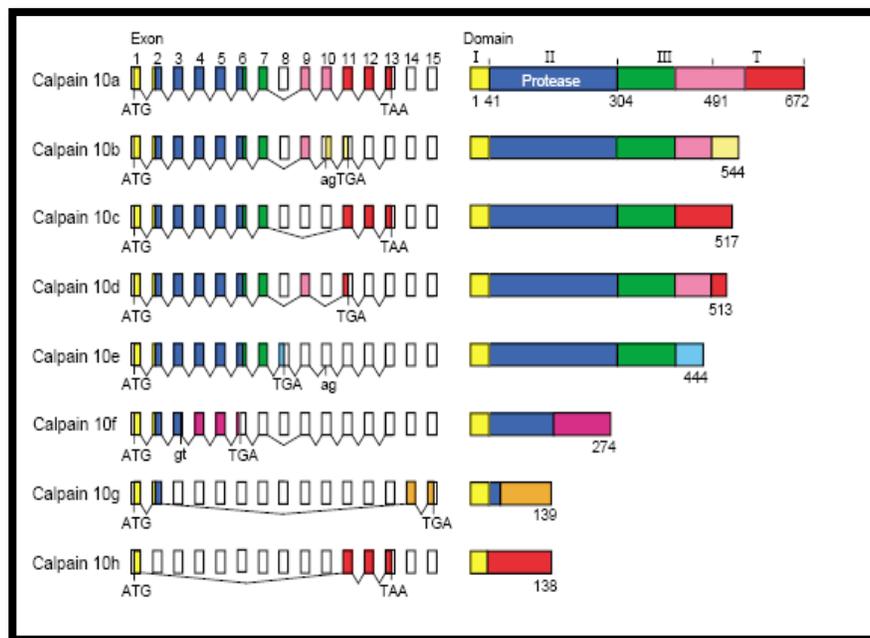


Figura 5. Isoformas de la Calpaína-10. Tomado de Horikawa *et al.*, 2000.¹⁹

¹⁹ Horikawa, Y, Oda, N., Cox, N. J., Li, X., Orho-Melander, M., Hara, M., Hinokio, Y., *et al.* (2000). Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nature genetics*, 26(2), 163–75. doi:10.1038/79876.

²⁴ Suzuki, K., Hata, S., Kawabata, Y., & Sorimachi, H. (2004). Structure, activation, and biology of calpain. *Diabetes*, 53 Suppl 1(February), S12–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14749260>

³⁴ Horikawa, Yukio. (2006). Calpain-10 (NIDDM1) as a Susceptibility Gene for Common Type 2 Diabetes. *Endocrine journal*, 53(5), 567–76. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23111731>.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

A partir de las muestras de individuos tomadas por Córdova A. en el 2009; y Morocho V. y Loaiza D. en el 2010, se realizó el análisis y determinación de la presencia del SNP-63; de cuyos individuos se tiene los datos antropométricos y otras características clínicas relacionadas con la enfermedad.

3.1. DETERMINACIÓN DEL SNP 63

La determinación del SNP 63 se realizó mediante PCR, empleando el kit Go Taq Colorless Master Mix de Promega (Buffer 5x colorless Go Taq, dNTP 10 nM, Taq Polimerasa 5 U/ul) y los primers: sentido (5`TCGGGACACTGCTGTTAGGT3`) y antisentido (5`CTGGCTGGAGTT TGGAGAAG3`) Invitrogen (PTF 10 uM, PTR 10 uM), siguiendo las instrucciones descritas por el protocolo del proveedor. El programa empleado fue: desnaturalización inicial a 94°C por 2 minutos, 40 ciclos a 94°C por 30 segundos, 54°C por 30 segundos y 72°C por 80 segundos; y una extensión final de 72°C por 5 minutos, utilizando el equipo Termociclador A&B.

Para la comprobación del producto de PCR, se corrió un gel de agarosa al 2% en TBE 1X, con las siguientes condiciones de corrida: 100 voltios, 300 mA y 35 min, identificándose un producto de PCR de 418pb que corresponde al SNP-63.

3.2. SECUENCIACIÓN

Las muestras de SNP-63 fueron secuenciadas en Applied Biosystems ABI 3500 siguiendo las indicaciones del proveedor. La amplificación se realizó utilizando: Big Dye Terminator Cycle Sequencing, primer 5uM, producto de PCR 5 a 10ng/ul, agua destilada y desionizada y buffer. A continuación, se realizó la purificación de los productos amplificados utilizando: SAM y Bigdye Xterminator Purification; finalmente se secuenció en Applied Biosystems versión de software de análisis de secuenciación de Applied Biosystems DNA 5.1.

3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó mediante el uso de los programas: SPSS versión 19.0 programa para Windows con la prueba de Mann Whitney (considerando significativo si el valor de p es <0,05) para la determinación de frecuencias alélicas y genotípicas, y su relación con los datos antropométricos; SNPstas para determinar si la población se encuentra en el equilibrio de Hardy-Weinberg (<http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats>), y MedCalc para la determinación del OR (Odds ratio) (http://www.medcalc.org/calc/odds_ratio.php).

3.4. ESQUEMA DE PROCEDIMIENTO

Análisis de muestras



Determinación del SNP-63 por PCR



Primers SNP 63:

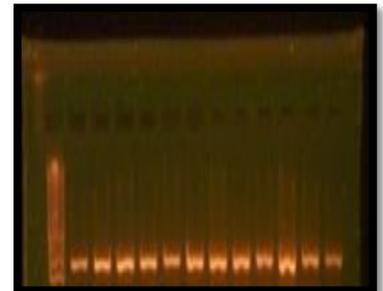
F: tcg gga cac tgc tgt tag gt

R: ctg gct gga gtt tgg aga ag

Secuenciación: Applied Biosystems ABI 3500



Gel de agarosa al 2%



Análisis Estadístico
(Programas SPSS,
SNPstats, MedCalc)

4. RESULTADOS

4.1. ANÁLISIS DE CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS Y CLÍNICAS

En el presente estudio se analizaron las características físicas y clínicas de ambos grupos de estudio; los diabéticos formados por 197 individuos: 132 mujeres y 65 hombres; y los no diabéticos formados por 183 individuos: 100 mujeres y 83 hombres. Los diabéticos y no diabéticos fueron emparejados por edad, con una media entre ambos grupos de 65,57 (35 a 92) años.

Como era de esperarse, encontramos diferencias significativas entre los dos grupos en la glucosa en ayunas ($146,48 \pm 55,78$ frente $89,27 \pm 8,58$, $p < 0,001$), además de una diferencia en el colesterol ($p 0,012$), HDL ($p 0,039$) y triglicéridos ($p 0,011$) (tabla 1). Se encontró también una diferencia significativa en el índice de masa corporal (IMC) ($29,27 \pm 4,63$ frente $26,13 \pm 4,06$, $p < 0,001$). De acuerdo al IMC, formamos tres grupos: el primero incluyó individuos con un IMC de $18-24,99 \text{ kg/m}^2$, considerados dentro del peso normal, se encontró 12.18% de diabéticos y 34.43% de no diabéticos; en el segundo grupo individuos con un IMC de $25-29,99 \text{ kg/m}^2$, encontramos 51.27% de diabéticos y 44.81% de no diabéticos; y finalmente en el tercer grupo individuos con un IMC de $\geq 30 \text{ kg/m}^2$, encontramos 36.55% de diabéticos y 20.77% de no diabéticos. De acuerdo a la clasificación de la OMS, los individuos con $\text{IMC} > 25 \text{ kg/m}^2$ son considerados con sobrepeso, lo que representa un factor de riesgo para estos individuos ya que la obesidad y el sobrepeso son considerados factores determinantes en la aparición de la DT2.

Tabla 1. Características clínicas de diabéticos y no diabéticos.

Datos Clínicos y Antropométricos	Diabéticos (n=197)	No Diabéticos (n=183)	p-value*
Porcentaje de mujeres	67%	55%	-
Edad (años)	64,93 \pm 11,00	66,26 \pm 9,5	-
IMC (kg/m^2)	29,27 \pm 4,63	26,13 \pm 4,06	<0,001*
TAS/TAD	137,26 \pm 21,02 / 78,06 \pm 9,45	120,36 \pm 16,54 / 75,28 \pm 10,87	0,015*
Colesterol (mg/dl)	211,83 \pm 44,13	199,51 \pm 43,2	0,012*
HDL (mg/dl)	47,70 \pm 14,26	50,28 \pm 13,46	0,039*
Triglicéridos (mg/dl)	198,79 \pm 121,85	168,00 \pm 73,74	0,011*
LDL (mg/dl)	123,18 \pm 47,03	115,26 \pm 39,97	0,079
Glucosa en ayunas (mg/dl)	146,48 \pm 55,78	89,27 \pm 8,58	<0,001*
Glucosa postprandial (mg/dl)	182,97 \pm 74,63	ND	-
HbA1 (%)	7,69 \pm 1,69	ND	-
Insulina (mU/ml)	ND	8,87 \pm 6,69	-

IMC: Índice de Masa Corporal, TAS: Tensión Arterial Sistólica, TAD: Tensión Arterial Diastólica, HDL: Lipoproteínas de Alta Densidad, LDL: Lipoproteínas de Baja Densidad; Prueba de *Chi-cuadrado, p-value < 0,05.

4.2. ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO SNP-63

Las frecuencias genotípicas y alélicas para el polimorfismo SNP-63 se muestran en la Tabla 2. Las frecuencias alélicas entre los sujetos diabéticos (C=0,78 y T=0,22) y los no diabéticos (C=0,75 y T=0,25) no muestran valores significativos (p 0,157). Con respecto a las frecuencias genotípicas encontramos que en sujetos diabéticos, el genotipo C/C fue del 60%, T/T del 4% y para el C/T del 36%; mientras que para los sujetos no diabéticos el C/C fue del 58%, T/T del 8% y para el C/T del 34%. Este polimorfismo se encontró en equilibrio de Hardy Weinberg (p 0,88), y no confiere un riesgo a DT2 (OR=0,48 (0,16-1,48), p 0,19).

Tabla 2. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo SNP 63 en el gen de calpaína-10.

Polimorfismo	Genotipo	DT2	No diabéticos	OR (IC 95%)	p -value*
SNP 63	C/C	115 (0,60)	86 (0,58)	0,95 (0,60-1,51)	0,854
	C/T	70 (0,36)	50 (0,34)		0,811
	T/T	7 (0,04)	12 (0,08)		0,248
	Frecuencia alélica	C: 300 (0,78) T: 84 (0,22)	C: 222 (0,75) T: 74 (0,25)	1,19(0,83-1,70)	0,157

Prueba de *Chi-cuadrado, p -value <0.05. MedCalc OR (IC 95%).

4.3. ANÁLISIS ENTRE SEXOS

Se realizó un análisis entre hombres y mujeres del grupo de diabéticos para ver si el sexo presenta alguna influencia en el desarrollo de la enfermedad cuando se es portador de algún genotipo en particular; no se encontró diferencias significativas en la distribución de los genotipos. Sin embargo, al realizar el análisis en la distribución alélica se encontró que el alelo T brinda cierta protección en hombres para el desarrollo de la enfermedad (OR=0,42 (0,24-0,64), p 0,0001).

Tabla 3. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo SNP-63 en hombres y mujeres del grupo diabético.

SNP-63	FRECUENCIA GENOTÍPICAS		OR (IC 95%)	p -value*
	Hombres n=64	Mujeres n=128		
C/C	36 (56,2%)	79 (61,7%)	Referencia	
C/T	25 (39,1%)	45 (35,2%)	0,82 (0,44-1,54)	0,536
T/T	3 (4,7%)	4 (3,1%)	0,61 (0,13-2,86)	0,528

FRECUENCIAS ALÉLICAS				
SNP-63	SEXO		OR (IC 95%)	p-value*
	Hombres n=64	Mujeres n=128		
C	97 (61%)	203 (79%)	Referencia	
T	61 (39%)	53 (21%)	0,42 (0,24-0,64)	0,0001

OR: Odds Ratio, IC: Intervalo de Confianza. Prueba de *Chi-cuadrado, p-value <0,05. MedCalc OR (IC 95%).

4.4. ANÁLISIS ENTRE MUJERES

Se llevó a cabo un análisis entre mujeres del grupo de diabéticos y de no diabéticos, y no se encontró diferencia significativa para el polimorfismo SNP-63 (Tabla 4).

Tabla 4. Frecuencias alélicas del polimorfismo SNP-63 entre mujeres diabética y no diabéticas.

FRECUENCIAS ALÉLICAS				
SNP-63	ESTADO		OR (IC 95%)	p-value*
	Mujeres Diabéticas n=132	Mujeres No Diabéticas n=100		
C	203 (79%)	108 (78%)	Referencia	
T	53 (21%)	30 (22%)	1,06 (0,64-1,76)	0,809

OR: Odds Ratio, IC: Intervalo de Confianza. Prueba de *Chi-cuadrado, p-value <0,05. MedCalc OR (IC 95%).

4.5. RELACIÓN ENTRE EL IMC Y EL POLIMORFISMO SNP-63

Para realizar este análisis se dividió a los diabéticos en dos grupos: el primero incluyó a los individuos con $IMC \leq 24,99 \text{ kg/m}^2$, y el segundo individuos con $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$. Los resultados se muestran en la Tabla 5, como se observa no se encontró diferencias estadísticamente significativas para el SNP-63 entre diabéticos con $IMC \leq 24,99 \text{ kg/m}^2$ y diabéticos con $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$.

Tabla 5. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo SNP-63 distribuido de acuerdo al IMC.

FRECUENCIA GENOTÍPICAS				
SNP-63	IMC		OR (IC 95%)	p-value*
	$\leq 24,99 \text{ kg/m}^2$ n=33	$\geq 25 \text{ kg/m}^2$ n=164		
C/C	16 (48,5%)	104 (63,4%)	Referencia	
C/T	15 (45,5%)	55 (33,5%)	0,56 (0,26-1,23)	0,148
T/T	2 (6,1%)	5 (3%)	0,38 (0,07-2,15)	0,276

FRECUENCIAS ALÉLICAS				
SNP-63	IMC		OR (IC 95%)	p-value*
	≤24,99 kg/m ² n=33	≥25kg/m ² n=164		
C	47 (71%)	263(80%)	Referencia	
T	19 (29%)	65 (20%)	0,61 (0,34-1,11)	0,106

OR: Odds Ratio, IC: Intervalo de Confianza, IMC: Índice de Masa Corporal. Prueba de Chi-cuadrado, p-value <0,05. MedCalc OR (IC 95%).

5. DISCUSIÓN

El gen de CAPN10, es uno de los 250 genes implicados en el desarrollo de la DT2. Siendo identificado por posicionamiento clonal y sus polimorfismos presentando una asociación del doble o triple riesgo a padecer DT2 en diferentes poblaciones. Estos polimorfismos y haplotipos asociados a la enfermedad, así como sus frecuencias, difieren de un estudio a otro así como en las diferentes poblaciones.²⁹

En este estudio se analizaron a 197 diabéticos y 183 no diabéticos, encontrándose que el polimorfismo SNP-63 no presenta una diferencia significativa entre los grupos de estudio (p 0,25); resultados similares fueron encontrados en población México-Americana (p 0,447)²⁰, población Sinaloense (México DF) (p 0,30)²¹ y en un grupo de mujeres Americanas (p 0,21)²².

En relación a los resultados obtenidos para las frecuencias alélicas no se encontró diferencia significativa, encontrándose el alelo T en un 22% y el alelo C en el 78% en diabéticos, y para los no diabéticos las frecuencias fueron similares. Resultados similares se encontraron en estudio realizados en otras poblaciones: México-Americana 23% para el alelo T y 77% para el alelo C²⁰, Sinaloense 17% el alelo T y 83% el alelo C²¹, Japonesa 26% el alelo T y 74% el alelo C³⁵, Finlandeses 11.1% el alelo T y 89.9% el alelo C²⁹; con lo que podemos señalar que no existen diferencias notables de las frecuencias alélicas en estos grupos poblacionales.

El polimorfismo SNP-63 ha sido estudiado en diferentes poblaciones, formando parte del haplotipo de riesgo que favorece al desarrollo de la enfermedad; entre estas tenemos: Mexicana (p 0,447)²⁰, Sinaloense (México)

²⁰ Del Bosque-Plata, L., Aguilar-Salinas, C. a, Tusié-Luna, M. T., Ramírez-Jiménez, S., Rodríguez-Torres, M., Aurón-Gómez, M., Ramírez, E., *et al.* (2004). Association of the calpain-10 gene with type 2 diabetes mellitus in a Mexican population. *Molecular Genetics and Metabolism*, 81(2), 122–126. doi:10.1016/j.ymgme.2003.10.005.

²¹ Saíñz González, Enrique. Detección de los polimorfismos SNP-43, SNP-19 y SNP-63 del gen de la Calpaína 10 en población sinaloense con Diabetes Mellitus Tipo 2. México DF, 2012. 119h. Tesis para obtener el título de maestro en ciencias. Instituto Politécnico Nacional: Escuela Superior de Medicina Posgrado. Disponible en: <http://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/8433/tesis%20sainz.pdf?sequence=1>

²² Song, Y., You, N., Hsu, Y.-H., Sul, J., Wang, L., Tinker, L., Eaton, C. B., *et al.* (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), 2960–71. doi:10.1093/hmg/ddm256.

²⁹ Orho-Melander, M., Klannemark, M., Svensson, M. K., Ridderstråle, M., Lindgren, C. M., & Groop, L. (2002). Variants in the calpain-10 gene predispose to insulin resistance and elevated free fatty acid levels. *Diabetes*, 51(8), 2658–64. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12145185>

³⁵ Horikawa, Y., Oda N, Yu L, Imamura S, Fujiwara K, Makino M, Seino Y, Itoh M, Takeda J., (2003). Genetic Variations in Calpain-10 Gene Are Not a Major Factor in the Occurrence of Type 2 Diabetes in Japanese. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88(1), 244–247. doi:10.1210/jc.2002-020847.

(p 0,30)²¹, Americana (p 0,21)²², en las que el polimorfismo cuando se expresa por sí solo no confiere riesgo a DT2, pero presenta influencia cuando se encuentra asociado al haplotipo de riesgo (SNPs 43, 19 y 63).^{19,20}

Además del factor genético, la DT2 está condicionada también por otros factores como el sexo, la edad, la raza y determinados factores ambientales como la obesidad y el sedentarismo, los cuales se asocian con un mayor riesgo al desarrollo de la enfermedad. En cuanto a la edad, la enfermedad se presenta más frecuentemente en adultos mayores de 40 años, tanto en hombres como en mujeres, y le siguen las personas de la tercera edad.⁷ De acuerdo a lo antes mencionado, en el grupo de diabéticos se obtuvo una media de 64,93±11,00 años y de 66,26 ±9,5 años para el grupo de no diabéticos. Con respecto al sexo, en esta investigación se analizó a individuos mestizos de la ciudad de Loja, y se encontró una mayor prevalencia de la enfermedad en mujeres (56,9%) que en hombres (43,9%), lo que concuerda con lo reportado por el INEC en el 2011.

Al comparar la glucosa en ayunas entre ambos grupos, encontramos una diferencia estadísticamente significativa como era de esperarse, con medias de 146,48±55,78 mg/dl para el grupo de diabéticos y 89,27±8,58 mg/dl para los no diabéticos (p <0,001) (Tabla 1). En este sentido, el genotipo TT del SNP-63 se ha asociado con un incremento en las concentraciones de AGL (ácidos grasos libres).²⁹ Al comparar las medias entre colesterol y triglicéridos, se obtuvieron resultados significativos para ambas variables (p 0,012 y p 0,011, respectivamente) (Tabla 1), resultados similares se encontraron en población Tunecina árabe y China.^{36,37}

Al realizar el análisis entre sexos, encontramos diferencia estadísticamente significativa para el alelo T (OR=0,42 CI (0,24-0,64), p 0,0001). Pero al comparar las mujeres del grupo diabético con las del grupo no diabético, no se encontraron diferencias significativas para ninguno de los alelos. Por lo que esto nos lleva a pensar que debe haber la presencia de otros factores que favorezcan el desarrollo de la enfermedad.

⁷ Instituto Nacional de estadísticas y Censos, www.inec.gov.ec

¹⁹ Horikawa, Y, Oda, N., Cox, N. J., Li, X., Orho-Melander, M., Hara, M., Hinokio, Y., *et al.* (2000). Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nature genetics*, 26(2), 163–75. doi:10.1038/79876.

²⁰ Del Bosque-Plata, L., Aguilar-Salinas, C. a, Tusié-Luna, M. T., Ramírez-Jiménez, S., Rodríguez-Torres, M., Aurón-Gómez, M., Ramírez, E., *et al.* (2004). Association of the calpain-10 gene with type 2 diabetes mellitus in a Mexican population. *Molecular Genetics and Metabolism*, 81(2), 122–126. doi:10.1016/j.ymgme.2003.10.005.

²¹ Saíñz González, Enrique. Detección de los polimorfismos SNP-43, SNP-19 y SNP-63 del gen de la Calpaína 10 en población sinaloense con Diabetes Mellitus Tipo 2. México DF, 2012. 119h. Tesis para obtener el título de maestro en ciencias. Instituto Politécnico Nacional: Escuela Superior de Medicina Posgrado. Disponible en: <http://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/8433/tesis%20sainz.pdf?sequence=1>

²² Song, Y., You, N., Hsu, Y.-H., Sul, J., Wang, L., Tinker, L., Eaton, C. B., *et al.* (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), 2960–71. doi:10.1093/hmg/ddm256.

²⁹ Orho-Melander, M., Klannemark, M., Svensson, M. K., Ridderstråle, M., Lindgren, C. M., & Groop, L. (2002). Variants in the calpain-10 gene predispose to insulin resistance and elevated free fatty acid levels. *Diabetes*, 51(8), 2658–64. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12145185>

³⁶ Ezzidi, I., Turki, A., Messaoudi, S., Chaieb, M., Kacem, M., Al-khateeb, G. M., Mahjoub, T., *et al.* (2010). Common polymorphisms of calpain-10 and the risk of Type 2 Diabetes in a Tunisian Arab population : a case-control study, 8–10.

³⁷ Chen SF, Lu XF, Yan WL, Huang JF, Gu DF. Variations in the calpain-10 gene are associated with the risk of type 2 diabetes and hypertension in northern Han Chinese population. *Chin Med J* 2007; 120:2218-2223.

Debido a que la obesidad es el factor de riesgo de mayor relevancia en el desarrollo de DT2, comparamos los individuos de ambos grupos de acuerdo al IMC y obtuvimos resultados estadísticamente significativos ($p < 0.001$; Tabla 1). Resultados similares fueron encontrados por Chen SF *et al.* 2007, en población diabética China; pero al relacionar el IMC con el polimorfismo no se encontró diferencia significativa ($p 0,10$). La asociación positiva entre obesidad y riesgo de DT2 es un hallazgo constante en todos los estudios epidemiológicos realizados en las diversas poblaciones. Según el INEC el aumento en la predisposición de obesidad que empiezan en la niñez y adolescencia, implica que la diabetes empezará a afectar cada vez a grupos más jóvenes, perjudicando a las personas durante su período de vida económicamente activo (15-64 años).

De acuerdo a lo mencionado anteriormente, el polimorfismo analizado en esta investigación no presenta ninguna influencia en el desarrollo de obesidad, lo cual se probó al comparar individuos con un $IMC < 24,99 \text{ kg/m}^2$ contra individuos de $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$; OR 0,38 CI (0,07-2,15; $p 0,28$). Sin embargo, debido a que la obesidad es uno de los factores determinantes para el desarrollo de DT2, se debería ampliar el tamaño de muestra a analizar para poder determinar con más exactitud estos resultados.

6. CONCLUSIONES

- La presencia de DT2 afecta significativamente las funciones metabólicas del organismo en relación con las personas no diabéticas, ya que se obtuvieron diferencias significativas al comparar las medias obtenidas para algunos parámetros bioquímicos como tensión arterial sistólica y diastólica, colesterol, HDL, triglicéridos, LDL y glucosa.
- La obesidad es el factor de riesgo de gran relevancia en el desarrollo de DT2 en nuestra población, lo cual fue evidente en este estudio.
- El polimorfismo SNP-63 no se asocia con el riesgo de padecer DT2 en la población lojana. Los genotipos CC, CT y TT del polimorfismo parecen tener cierta asociación con el sexo femenino y riesgo a DT2, ya que entre ellos hubo valores de OR menores a 1, pero para comprobar esto es necesario la ampliación de la muestra para así poder obtener datos más reales que puedan probar su asociación.

7. RECOMENDACIONES

- Dados los resultados encontrados para el polimorfismo SNP-63 en individuos diabéticos y no diabéticos de la ciudad de Loja, sería necesario realizar la determinación de los polimorfismos SNP 43 y 44; los cuales han sido relacionados con riesgo a DT2 en varias poblaciones.
- Realizar una evaluación sobre la influencia de las variantes del gen de CAPN-10 (SNP-43, Indel 19, SNP-63) y sus haplotipos en población ecuatoriana, para así determinar su influencia en el desarrollo de la enfermedad.

8. ANEXOS:

PROTOCOLO PARA SECUENCIACIÓN DE FRAGMENTOS CORTO (200-500pb)

Al producto de PCR, se lo puede cuantificar con NanoDrop, recomendándose trabajar con valores de 5 a 10ng/ul

1. Preparación del mix de la amplificación:

REACTIVOS	VOLUMEN (por muestra)
Big Dye Terminator Cycle Sequencing	1ul
Primer 5uM	1
Producto de PCR 5 a 10ng/ul	1ul
Agua destilada y des ionizada	5ul
Buffer	2
Volumen final	10ul

2. Adicionalmente a las muestras colocar el control positivo de la amplificación:

REACTIVOS	VOLUMEN
Big Dye Terminator Cycle Sequencing	2ul
Primer	4
PGEN	1ul
Agua destilada y des ionizada	1ul
Buffer	2
Volumen final	10ul

3. Correr el programa para el SEQ BDT3 que se encuentra en el termociclador A&B.

PURIFICACIÓN

1. Se toma 5ul del producto de esta PCR y se le agrega el siguiente mix:

REACTIVOS	VOLUMEN (por muestra)
SAM	20
BigdyeXterminatorPurification	5

2. Mantener en movimiento por 30 a 40 minutos. Centrifugar 2 min a 4680 rpm.
3. Tomar 10ul del sobrenadante y colocar en la placa de 96 pocillos para llevar al secuenciador A&B.