

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA
EAP DE TECNOLOGÍA MÉDICA

**IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES
MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO
TEMPRANO DE LA DIABETES MELLITUS TIPO II,
EN UNA POBLACIÓN DE LIMA**

TESIS

PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE LICENCIADO
TECNÓLOGO MÉDICO EN LA ESPECIALIDAD DE LABORATORIO
CLÍNICO Y ANATOMÍA PATOLÓGICA

AUTOR

CARLOS ORLANDO VELÁSQUEZ FIGUEROA

Lima – Perú

2014

La mayoría de las ideas fundamentales de la ciencia son esencialmente sencillas y por regla general pueden ser expresadas en un lenguaje comprensible para todos.

Albert Einstein

(1879 – 1955)

En memoria de quien en vida fue Doña Victoria Magdalena Ronceros Napa de Figuroa, mi querida abuelita, una mujer luchadora quien combatió contra esta enfermedad hasta sus últimos días.

(1932 – 2013)

Esta tesis ha sido financiada por el Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, en mérito al ocupar el primer lugar del Concurso del Fondo de Promoción de Tesis de Pregrado 2012.

Resolución Rectoral – UNMSM N°: 04407-R-12

Agradecimientos

A mis padres, Don Carlos Velásquez Vásquez y Doña Martha Figueroa Ronceros, por su apoyo incondicional y aliento inagotable; a mi hermana Gabriela y su pequeña hija Isabella, luz que ilumina y llena de alegría a todo mi hogar.

A mi asesora de tesis, Dra. Doris Huerta Canales, por su gran paciencia y dedicación. Sin duda alguna, toda la experiencia aprendida a lo largo de estos años me ha servido para ser un mejor profesional y una mejor persona; no sólo me dio la libertad de tomar las decisiones que me parecieron más adecuadas, sino que además me permitió aprender de mis errores.

Al Dr. Oscar Acosta y la Mg. Cecilia Miranda por sus doctas aportaciones y sabios consejos, definitivamente su experiencia ha significado una valiosa herramienta para esta investigación.

Al Lic. TM Ricardo Rodríguez Torres e Int. TM Ángela Urbina Antezana por sus valiosos aportes, generosa colaboración y constante apoyo.

A todos mis profesores de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; en especial al PhD(c). Segundo León, la Dra. Maritza Puray, el Mg. Helí Barrón, el Mg. Raúl Sevilla y el Dr. William Cornejo, excelentes profesionales quienes han colaborado brindándome brillantes sugerencias y significativos aportes para el desarrollo de esta investigación.

A mis amigos de la Facultad de Medicina San Fernando, colegas del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas y compañeros de trabajo por su motivación, deferencia y buenos deseos.

Abreviaturas

SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
DM-I	Diabetes Mellitus tipo I
DM-II	Diabetes Mellitus tipo II
DG	Diabetes gestacional
DJ	Diabetes juvenil
<i>PPAR-γ2</i>	Receptor activador de los peroxisomas - gamma 2
<i>IL-6</i>	Interleuquina 6
HLA	Antígeno leucocitario humano
C	Citosina
G	Guanina
Pro	Prolina
Ala	Alanina
CIBN	Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición “Alberto Guzmán Barrón”
UNMSM	Universidad Nacional Mayor de San Marcos
RFLP	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
pb	Pares de bases
OR	Odds ratio
dNTPs	Desoxirribonucleótidos de ADN (oligonucleótidos)
CTLA4	Antígeno-4 asociado al linfocito T citotóxico
PTPN22	Proteína tirosín fosfatasa no-receptor tipo 22
CAPN10	Calpaína 10

Índice

I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCIÓN.....	3
III. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES	5
3.1 Epidemiología de la Diabetes Mellitus Tipo II	5
3.2 Clasificación de la Diabetes Mellitus.....	5
3.3 Diagnóstico de la Diabetes Mellitus	7
3.4 Genética de la Diabetes Mellitus tipo I.....	8
3.5 Marcadores moleculares de la Diabetes Mellitus tipo II	9
3.6 Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP).....	10
3.7 Polimorfismo Pro12Ala del gen PPAR-g2 (ID: Rs1801282) y su asociación con la Diabetes Mellitus tipo II	13
3.8 Polimorfismo 174 G/C del gen IL-6 (ID: Rs1800795) y su asociación con la Diabetes Mellitus tipo II	14
3.9 Otros polimorfismos asociados con la Diabetes Mellitus tipo II.....	15
3.10 Variables epigenéticas asociadas con la Diabetes Mellitus tipo II.....	17
3.10.1 Teoría del genotipo ahorrador.....	18
3.10.2 Teoría del fenotipo ahorrador.....	19
3.11 Equilibrio de Hardy-Weinberg.....	20
IV. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	22
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
5.1 Diseño de investigación.....	23
5.2 Variables	23
5.3 Población	23
5.4 Muestra	23
5.5 Tipo de muestreo	24
5.6 Criterios de inclusión y exclusión.....	24
5.6.1 Criterios de inclusión.....	24
5.6.2 Criterios de exclusión.....	24
5.7 Plan de recolección de datos.....	25
5.8 Técnicas e instrumentos.....	25
5.8.1 Procesamiento molecular.....	25

5.8.2 Análisis estadístico	27
5.9 Ética	28
VI. RESULTADOS.....	29
VII. DISCUSIÓN.....	34
VIII. CONCLUSIONES	42
IX. RECOMENDACIONES	43
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
XI. ANEXOS.....	51
Anexo N° 1: Otros tipos de Diabetes Mellitus	51
Anexo N° 2: Otros polimorfismos relacionados con la DM-II.....	53
Anexo N° 3: Operacionalización de variables	54
Anexo N° 4: Método de purificación de ADN	55
Anexo N° 5: Protocolos de amplificación y restricción	57

I. RESUMEN

Los marcadores de ADN son útiles en la identificación de genes y sus variantes que puedan influir en la predisposición genética a desarrollar una determinada enfermedad. Las personas con ciertos polimorfismos en múltiples genes pueden ser susceptibles a la diabetes; sin embargo, estudios realizados en otros países han demostrado que los polimorfismos Pro12Ala del gen *PPAR-γ2* y el 174G/C del gen *IL-6* cumplen un rol importante en el desarrollo de esta enfermedad y podrían ser considerados como genes candidatos en el diagnóstico molecular temprano de la Diabetes Mellitus tipo II (DM-II) en una población peruana; con el objetivo de evitar complicaciones de la Diabetes como retinopatías, daño renal, daños en el SNC, entre otros. De acuerdo a las cifras oficiales del Ministerio de Salud, en nuestro país existen más de 86,000 pacientes diabéticos y 2 de cada 10 adultos mayores sufren este mal; motivo por el cual vimos la necesidad de realizar este estudio. Objetivo: 1. Determinar las frecuencias genotípicas y alélicas de los genes *PPAR-γ2- Pro12Ala* y *IL-6- 174G/C* y 2. Establecer la asociación del polimorfismo de los genes *PPAR-γ2- Pro12Ala* y *IL-6- 174G/C*, con la Diabetes. Participantes: Muestras del Banco de Muestras del Laboratorio de Biología Molecular del CIBN. Materiales y métodos: A una muestra poblacional de Lima de 100 muestras, 50 muestras control y 50 muestras de pacientes con DM-II, se realizó extracción del ADN genómico, análisis del polimorfismo Pro12Ala de *PPAR-γ2* y 174G/C de *IL-6* mediante PCR/RFLP. Resultados: Las distribuciones de los genotipos del gen *PPAR-γ2* en los grupos de casos y controles estuvieron de acuerdo con la hipótesis del equilibrio de Hardy-Weinberg; sin embargo, las frecuencias genotípicas del gen *IL-6* no cumplieron con esta condición de equilibrio.

Palabras clave: Diabetes Mellitus II, SNP, *PPAR-γ2*, *IL-6*, PCR-RFLP.

I. ABSTRACT

DNA markers are useful in identifying genes and their variants that have an influence in a genetic predisposition to a certain disease. People with certain multiple genes polymorphisms may be susceptible to diabetes; however, studies in other countries have shown that Pro12Ala *PPAR-γ2* and the 174G/C *IL-6* genes polymorphisms play an important role in the development of this disease and could be considered as a genes candidates in the molecular early diagnosis of diabetes mellitus type II (DM-II) in a Peruvian population; in order to prevent complications of diabetes as retinopathy, kidney damage, CNS damage, etc. According to official information from the Ministry of Health, in our country there are more than 86,000 diabetic patients and 2 of 10 elderly subjects suffer from this problem; this reasons show us the importance for this study. Objective: 1. Determine the genotype and allele frequencies of the Pro12Ala *PPAR-γ2* and the 174G/C *IL-6* genes; 2. Establish the association between the polymorphism of the Pro12Ala *PPAR-γ2* and the 174G/C *IL-6* genes with Diabetes. Participants: Samples of Molecular Biology Laboratory CIBN. Materials and Methods: 100 samples from people that live in Lima, 50 control samples and 50 samples from patients with DM-II; extraction of genomic DNA was performed and analysis of polymorphism Pro12Ala *PPAR-γ2* and the 174G/C *IL-6* genes with PCR-RFLP were developed. Results: The distributions of the genotypes of *PPAR-γ2* gene in groups of cases and controls were in agreement with the hypothesis of Hardy-Weinberg equilibrium; however, the genotype frequencies of the *IL-6* gene did not have this condition.

Key words: Diabetes Mellitus II, SNP, *PPAR-γ2*, *IL-6*, PCR-RFLP.

II. INTRODUCCIÓN

La Diabetes Mellitus (DM) es una enfermedad que se produce cuando el páncreas no genera suficiente insulina o cuando el organismo no la puede utilizar eficazmente (OMS 2001); lo que genera gran discapacidad y mortalidad especialmente en el adulto y adulto mayor, significando un gran costo de recursos en todos los países¹³. Sus complicaciones son el resultado de interacciones entre factores genéticos, epigenéticos y ambientales⁴⁰; consecuentemente asociadas con anomalías metabólicas, vasculares e inflamatorias.

Diversas investigaciones han hecho lo propio con la Diabetes Mellitus tipo I (DM-I); estudios moleculares señalan al gen *HLA-DQb* como uno de los principales genes involucrados en la manifestación clínica de esta enfermedad¹. Los análisis genéticos de la Diabetes Mellitus tipo II (DM-II) han sido menos claros que los de la DM-I; al parecer existen varios genes involucrados pero con una influencia parcial en la enfermedad; como consecuencia, los pacientes quienes padecen de DM-II tienen una alta variabilidad genética y los genes relacionados tienen diferente distribución alélica en las distintas poblaciones.²

Actualmente, se han descrito más de 250 genes relacionados con la DM-II entre los que destacan los genes que codifican para las proteínas involucradas en la señalización de la insulina, en el transporte de la glucosa, en la síntesis del glucógeno, en la síntesis y absorción de ácidos grasos y en la diferenciación de los adipocitos. Algunos científicos concluyeron que los genes *CAPN10* y *PPAR-γ2* son los candidatos más prometedores para diagnosticar y prevenir de manera oportuna el desarrollo de la DM-II³; otros investigadores han determinado una asociación significativa entre la DM-II, resistencia a la insulina, hipertensión y otros trastornos metabólicos con el polimorfismo de un sólo nucleótido (SNP) 174G/C del gen de la Interleuquina 6 (*IL-6*).⁴

Resulta importante conocer los genes o familias de genes implicados en la DM-II y así poder predecir qué individuos poseen una predisposición genética a desarrollar

esta enfermedad. En nuestro país son escasos los estudios moleculares sobre este tipo de patologías (enfermedades multigénicas); por ello, el presente trabajo está orientado a obtener datos sobre la distribución polimórfica de dos genes candidatos como marcadores moleculares para el diagnóstico temprano de la DM-II en una población mestiza de Lima que permitan caracterizar el riesgo genético de padecer DM-II sobre la base de la identidad molecular de cada individuo.

El presente estudio busca obtener datos sobre las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos Pro12Ala del gen *PPAR-γ2* y 174G/C del gen *IL-6* con la finalidad de contribuir a incrementar la información disponible que sustente futuros estudios de asociación, que podrían sugerir la postulación de *PPAR-γ2* Pro12Ala e *IL-6* 174G/C como genes candidatos a marcadores moleculares de diagnóstico temprano de la DM-II en población local.

III. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

3.1 Epidemiología de la Diabetes Mellitus Tipo II

De acuerdo a las cifras de la Organización Mundial de la Salud (OMS), existen 140 millones de personas con DM-II en el mundo y se espera que para el 2025 esta cifra se duplique. Estimaciones dan cuenta de que el aumento será de casi el 40% en países desarrollados y de un 70% en países en vías de desarrollo.¹²

Actualmente se calcula que la prevalencia mundial de DM-II es alrededor del 9,2% entre los adultos de 20 a 79 años¹³. El 80% de la población que padece esta enfermedad corresponde al grupo etáreo comprendido entre los 40 a 60 años y la distribución de la enfermedad por género revela un discreto margen desfavorable para las mujeres.¹³

La prevalencia de acuerdo a la OMS para la DM-II en nuestro país es 6.81% (1'108,610 de casos en el grupo etáreo comprendido entre los 20 a 79 años). Algunos estudios locales han reportado datos de la prevalencia de las ciudades que presentan mayor número de casos de DM-II, en Lima 7.6%, Tarapoto 4,4% y Huaraz 1,3%.¹⁴

3.2 Clasificación de la Diabetes Mellitus

Esta enfermedad se clasifica en: 1) Diabetes Mellitus tipo I (DM-I) que resulta de la destrucción autoinmune de las células beta del páncreas (productoras de insulina) produciendo la insuficiencia de insulina, 2) Diabetes Mellitus tipo II (DM-II) causada por la disminución en la secreción de insulina y por la resistencia a la insulina de los tejidos blanco (hígado y músculos), 3) Diabetes gestacional (DG) que se define como un estado de intolerancia a la glucosa durante el embarazo y 4) Otros tipos específicos de Diabetes Mellitus, el cual deriva generalmente a partir de ciertas cirugías (iatrogenia) u otras enfermedades pre-existentes.¹⁶

La DM-I representa sólo el 5-10% de las personas con DM y es el resultado de una destrucción autoinmune de las células beta del páncreas. Los marcadores de esta destrucción autoinmune incluyen autoanticuerpos contra las células de los islotes, autoanticuerpos contra la insulina, autoanticuerpos contra la enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD65) y autoanticuerpos contra las tirosina fosfatasas IA- 2 e IA -2b. Por lo general, al menos dos de estos autoanticuerpos están presentes en 85-90 % de pacientes con DM-I. También, esta enfermedad tiene una fuerte asociación con el cluster HLA, directamente vinculado a los genes DQA y DQB, e influenciado por el gen DRB. ¹

En esta forma de diabetes la tasa de destrucción de células beta es muy variable; puede ser rápido en algunas personas (en su mayoría niños) y más lento en otras (principalmente adultos). Algunos pacientes, especialmente los niños y los adolescentes, pueden presentar cetoacidosis como primera manifestación de la enfermedad; otros tienen una modesta hiperglucemia en ayunas que puede cambiar rápidamente a la hiperglucemia y/o cetoacidosis grave en presencia de una infección u otro agente de estrés.

La etiología de la destrucción de las células beta es generalmente autoinmune pero existen casos de DM-I de origen idiopático, donde la medición de los anticuerpos conocidos da resultados negativos.¹⁶

La DM-II se presenta en personas con grados variables de resistencia a la insulina pero se requiere también que exista una deficiencia en la producción de insulina que puede o no ser predominante (ambos fenómenos deben estar presentes en algún momento para que se eleve la glicemia) ¹². Aunque no existen marcadores clínicos que indiquen con precisión cuál de los dos defectos primarios predomina en cada paciente, el exceso de peso sugiere la presencia de resistencia a la insulina mientras que la pérdida de peso sugiere una reducción progresiva en la producción de la hormona. Aunque este tipo de diabetes se presenta principalmente en el adulto, su frecuencia está aumentada en niños y adolescentes obesos.¹³

Definiciones recientes postulan a la DM-II como un desorden metabólico de etiología multifactorial, caracterizado por una hiperglicemia crónica debida a la resistencia periférica a la insulina o a una disfunción secretora de esta hormona, lo cual produce alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas y, en un lapso variable, lesiones macro y microvasculares, especialmente en ojos, riñón, nervios, corazón y vasos sanguíneos. La DM-II pertenece a un grupo de alteraciones metabólicas de carácter heterogéneo con grado variable de predisposición hereditaria y participación de diversos factores ambientales; esta enfermedad tiene un origen complejo y multifactorial, asociándose principalmente con obesidad, concentración elevada de triglicéridos, baja concentración de colesterol-HDL y resistencia a la acción de la insulina. La participación de factores genéticos relacionados con la susceptibilidad a padecer la DM-II, se asocian fuertemente cuando existen antecedentes de herencia familiar de diabetes.²¹

La Diabetes Mellitus gestacional (DMG) es una alteración del metabolismo de los carbohidratos, de severidad variable, se inicia o reconoce por primera vez durante el embarazo. Se aplica independientemente de si se requiere o no insulina, o si la alteración persiste después del embarazo y no excluye la posibilidad de que la alteración metabólica haya estado presente antes de la gestación.¹⁶ Otros tipos lo conforman patologías específicas que se enumeran en el Anexo N° 1.

3.3 Diagnóstico de la Diabetes Mellitus

El diagnóstico de la DM-I se basa en la determinación de anticuerpos por métodos de ELISA, siendo los más frecuentes: anticuerpos anti-células de islote (ICA), anti-descarboxilasa del ácido glutámico (GAD65), anti-insulina (IAA), y anticuerpos anti-proteína similar a tirosina fosfatasa (IA-2).

La DM-II es una enfermedad poco sintomática, por lo que su diagnóstico se efectúa en alrededor del 50% de los casos por exámenes de laboratorio solicitados por otra causa y no por sospecha clínica. La escasa sintomatología clásica determina que, con alta frecuencia, se diagnostica tardíamente y en

presencia de complicaciones crónicas. El riesgo de padecer de este tipo de DM aumenta con la edad, obesidad e inactividad física y habitualmente se asocia a otras patologías de alto riesgo cardiovascular, como la hipertensión y la dislipidemia.¹⁵

Para el diagnóstico de la DM-II se puede utilizar cualquiera de los siguientes criterios:¹⁶

- Síntomas de diabetes más una glicemia casual medida en plasma venoso que sea igual o mayor a 200 mg/dl (11.1 mmol/l). Casual se define como cualquier hora del día sin relación con el tiempo transcurrido desde la última comida. Los síntomas clásicos de diabetes incluyen poliuria, polidipsia y pérdida inexplicable de peso.
- Dosaje en plasma venoso de hemoglobina glicosilada (HbA1c) igual o mayor a 6.5%.
- Glicemia en ayunas medida en plasma venoso que sea igual o mayor a 126 mg/dl (7 mmol/l). En ayunas se define como un período sin ingesta calórica de por lo menos ocho horas.
- Glicemia medida en plasma venoso que sea igual o mayor a 200 mg/dl (11.1 mmol/l) dos horas después de una carga de glucosa durante una prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG).

3.4 Genética de la Diabetes Mellitus tipo I

Los factores genéticos tienen un papel muy importante en el desarrollo de la DM-I; algunas formas de la enfermedad resultan de mutaciones en un solo gen, en cambio otras son de origen poligénico. Las formas monogénicas de diabetes representan aproximadamente el 5% de los casos y son causadas por mutaciones en los genes que codifican a la insulina, el receptor de la insulina, enzimas de la vía glucolítica y de los factores de transcripción nuclear de los hepatocitos (HNF-1 α , HNF-1 β , HNF-4 α).¹⁷

La DM-I resulta de la destrucción autoinmune de las células productoras de insulina en el páncreas y representa el 5-10% del total de casos de Diabetes Mellitus en el mundo. La región del mapa genético que presenta una mayor susceptibilidad a producir DM-I se encuentra en la región HLA del cromosoma 6. Estudios moleculares indicaron en un inicio como marcadores de susceptibilidad a DM-I al gen HLA-DR (con alelos DR3 y DR4) del cluster HLA; sin embargo, estudios posteriores señalan al gen contiguo HLA-DQb (proteína DQB) que presenta una mayor correlación entre mutaciones y la enfermedad¹.

Se han asociado varias regiones cromosómicas y genes con la DM-I, que influyen en la susceptibilidad y resistencia e indican que en la mayoría de los casos se trata de una enfermedad poligénica. Esta hipótesis se ve apoyada por la concordancia de la DM-I más alta en gemelos monocigóticos que entre hermanos con un genotipo idéntico de HLA¹⁸. Se supone que la susceptibilidad a la DM-I está relacionada con un locus mayor y varios loci menores, que contribuyen al riesgo de la diabetes mediante interacción genética.

Otros genes relevantes implicados en la DM-I son el INS (gen de la insulina), el gen del antígeno-4 asociado al linfocito T citotóxico (CTLA4) y el gen de la protein tirosín fosfatasa no-receptor tipo 22 (PTPN22).¹⁸

3.5 Marcadores moleculares de la Diabetes Mellitus tipo II

Distintas líneas de evidencia sustentan la contribución del componente genético en la etiología de la DM-II, entre las que se encuentran la concordancia entre gemelos monocigotos y dicigotos, las diferencias en la prevalencia del padecimiento entre poblaciones de distinto origen étnico, la existencia de formas monogénicas de DM-II, la identificación de más de 30 regiones cromosómicas de susceptibilidad, así como el estudio de modelos animales donde se inactiva selectivamente la función de algunos genes.¹⁹

Existen distintas estrategias para la identificación de los genes que participan en la susceptibilidad al desarrollo de la enfermedad. Entre las más importantes están el análisis de genes candidatos y sus variantes, los estudios de mapeo genético, los estudios de expresión diferencial de genes o proteínas y los modelos animales donde se inactiva selectivamente la función de algunos genes en distintos tejidos.

20

Las investigaciones en la actualidad han dado cierto giro; aunque han seguido los esfuerzos por asociar los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) a la DM-II, actualmente muchas investigaciones están orientadas a buscar la asociación de varios SNP de distintos genes con algún otro factor que está relacionado con la DM-II. En este sentido, los SNPs representan una herramienta muy útil para construir mapas genéticos de alta resolución; debido a ello, la investigación de polimorfismos asociados a la DM-II ha ido cobrando más importancia, ya que en un futuro cercano se espera tener una serie de marcadores genéticos para estimar de modo temprano el riesgo a desarrollar esta enfermedad.

Un estudio meta-analítico arrojó datos sobre los estudios genéticos más recientes relacionados con la DM-II, de una base de 20,690 publicaciones de diferentes fuentes que reportan factores genéticos asociados a esta enfermedad, 61 artículos estaban relacionados directamente con estudios de SNP. De estos, sólo 30 reportaron una evidencia clara de asociación del SNP estudiado con la DM-II.²¹

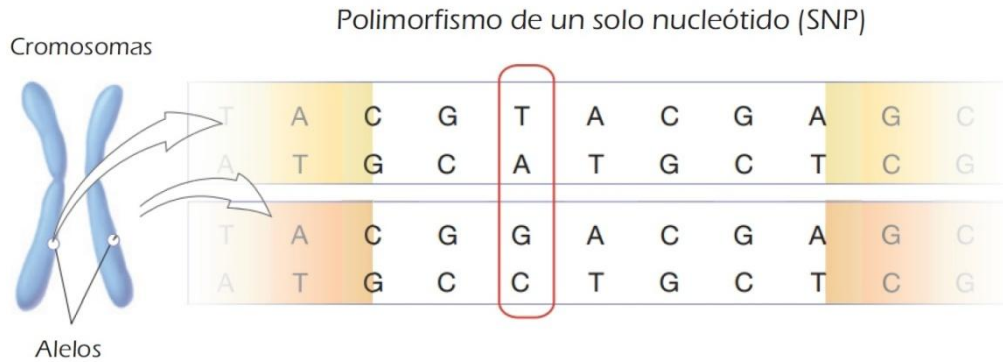
3.6 Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP)

Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) representan las variantes genéticas más comúnmente encontradas en el genoma humano; debido a su amplia distribución, estos polimorfismos se localizan en cualquier parte de la estructura de los genes y el genoma.⁵

Los SNPs son variaciones de una secuencia de ADN que se producen cuando un solo nucleótido de la secuencia es diferente de la norma (“alelo normal”) en al

menos uno por ciento de la población. Cuando estos polimorfismos ocurren dentro de un gen, crean diferentes alelos del mismo.⁶

Gráfico N° 1: Esquema de un SNP



Muchas enfermedades comunes como el síndrome metabólico, obesidad, DM-II entre otras, tienen un origen multifactorial; es decir, que para que se desarrollen se requiere la participación e interacción de múltiples genes y factores ambientales encontrados en cada población. Estas patologías complejas no tienen un patrón de herencia definido como sí lo tienen las enfermedades mendelianas; a pesar de esto, se sabe que las variantes comunes tipo SNP desempeñan un papel determinante en el desarrollo de estas patologías multifactoriales. Un hallazgo sorprendente del proyecto Genoma Humano fue encontrar una gran similitud genética entre dos humanos; cualquiera de estos comparten un 99.9% de identidad mutua en su secuencia, mientras que el resto constituye la variabilidad genética entre individuos. La variabilidad genética se ha relacionado principalmente con los SNP, y estos con la susceptibilidad a padecer diversas enfermedades comunes; así, estos polimorfismos representan los marcadores genéticos más ampliamente distribuidos en el genoma humano⁷.

Las variaciones en las secuencias de ADN de los seres humanos pueden afectar el cómo éstos desarrollan enfermedades y responden a los patógenos, productos químicos, medicamentos, vacunas y otros agentes. En este sentido, los SNPs son críticos para la medicina personalizada; sin embargo, su mayor importancia en la

investigación biomédica se da con la comparación de los SNPs entre poblaciones (como los grupos de casos y control) en los estudios de asociación.⁶

Un único SNP puede causar una enfermedad mendeliana; no obstante, para las enfermedades complejas, los SNPs no suelen funcionar individualmente, sino que trabajan en asociación con otros SNPs para manifestarse clínicamente.⁸ Hay evidencia de que algunos polimorfismos de los genes *PPAR-γ2* e *IL-6* están íntimamente ligados con algunas de las alteraciones metabólicas consecuencia de la DM-II.^{2, 4, 21, 24, 26, 27, 29, 32}

La sustitución de una citosina (C) por una guanina (G) en el codón 12 del gen *PPAR-γ2* produce un cambio de prolina a alanina en la proteína *PPAR-γ2*, responsable de modular la actividad transcripcional²³. Esta sustitución es muy cercana del sitio NH₂-terminal de la proteína en el dominio de activación independiente de ligando, cuya actividad se potencia a través de la fosforilación por la insulina. La estructura y en consecuencia la función de la proteína pueden ser afectados por este cambio de aminoácidos, ya que la alanina favorece la formación de α-hélices mientras prolina impide que éstas se formen. La isoforma alanina conduce a la estimulación menos eficiente de genes diana del factor de transcripción *PPARG-γ2* y predispone a las personas a una mayor acumulación de masa de tejido adiposo, que a su vez actúa disminuyendo la sensibilidad a la insulina jugando un papel importante en la patogénesis de la DM-II.²⁵

174G/C es un SNP en la región promotora del gen *IL-6* que afecta a los niveles plasmáticos de esta importante citoquina. Fue descrita por primera vez en 1988 cuando se demostró que el alelo C produce menos IL-6 que el alelo G, lo que apoyó la hipótesis de que el genotipo CC sería un “genotipo protector” para algunas afecciones inflamatorias crónicas.²⁹

Actualmente se han acumulado evidencias de que la DM-II está asociada con una inflamación subclínica sistémica que pudiera ser atribuible a una desregulación del sistema inmune innato; esta respuesta inmune se caracteriza por niveles elevados de marcadores de la respuesta de fase aguda y de su principal mediador, la IL-6.

Existen pruebas convincentes de que los niveles aumentados de IL-6 están asociados con la etiología de la DM-II. La alta tasa de depuración plasmática de IL-6 sugiere que la concentración de esta citoquina se regula constantemente a través de los procesos de transcripción y traducción; es allí donde el descubrimiento del SNP 174G/C en la región promotora del gen de la IL-6 planteó la posibilidad de que ciertos alelos del gen de la IL-6 pueden ser considerados como factores de riesgo para el desarrollo de la DM-II. ⁴

3.7 Polimorfismo Pro12Ala del gen *PPAR-g2* (ID: Rs1801282) y su asociación con la Diabetes Mellitus tipo II

El receptor activador de los peroxisomas (PPAR) es un receptor nuclear (factor de transcripción) que une ligandos naturales (hormonas) o sintéticos (fibratos), forma heterodímeros con receptores nucleares RXRs (receptores X de los retinoides) y de esta forma actúa regulando la expresión de ciertos genes inmunomoduladores y de respuesta inflamatoria²². Existen tres tipos de PPAR: PPAR- α , PPAR- β /PPAR- δ y PPAR- γ . El PPAR- α se expresa en hígado, riñón, corazón, músculo y tejido adiposo; el PPAR- β /PPAR- δ se expresa en muchos tejidos pero marcadamente en el cerebro, tejido adiposo y piel y el PPAR- γ , aunque codificado por un mismo gen, codifica tres isoformas producto de un splicing alternativo: PPAR- γ 1 se expresa en prácticamente todos los tejidos incluyendo el corazón, músculo, colon, riñón, páncreas y bazo; PPAR- γ 2 se expresa principalmente en el tejido adiposo y PPAR- γ 3 se expresa en los macrófagos y en el tejido adiposo blanco.

PPAR- γ 2 es altamente expresado en tejido adiposo para facilitar la absorción de glucosa y lípidos, estimular la oxidación de la glucosa, disminuir el nivel de ácidos grasos libres y mejorar la resistencia a la insulina²³. PPAR- γ 2 juega un papel importante en los casos de Diabetes tipo 2, también en el desarrollo y metabolismo de carbohidratos y proteínas además de lípidos, su función fundamental radica en el control de la grasa ectópica, predisponiendo a la obesidad, hipertrigliceridemia, HDLc bajo y síndrome metabólico. ²⁴

El PPAR- γ 2 participa en la regulación del almacenamiento de los ácidos grasos en el adipocito. El SNP *Pro-12Ala* se ha asociado con mayor riesgo de obesidad y con mayor índice de cintura cadera²⁵. Algunos estudios han relacionado dicho polimorfismo con bajo índice de masa corporal (IMC), con una mejor sensibilidad a la insulina y una reducción en riesgo de padecer DM-II.²⁶

Un estudio realizado en Túnez con 242 pacientes diabéticos y 246 controles sanos no reveló diferencias significativas en las frecuencias de los alelos *Pro-12Ala* del gen *PPAR- γ 2* entre los pacientes diabéticos y sujetos control; sin embargo, el alelo *Ala12* se encontró significativamente asociado con niveles altos de presión arterial sistólica en el grupo de pacientes diabéticos.²⁷

Un número limitado de estudios ha evaluado el riesgo común al combinar información de varios polimorfismos que predisponen genéticamente a la DM-II. En la mayoría los casos, los polimorfismos individuales sólo determinan un riesgo moderado, lo cual posee un valor clínico poco útil en la evaluación del riesgo genético a desarrollar la enfermedad. Un grupo de investigadores del Reino Unido evaluó el efecto combinado de múltiples alelos de susceptibilidad de tres SNPs comúnmente estudiados de forma individual (Lys23 de *KCNJ11*, *Pro12* de *PPAR- γ 2* y un alelo T en rs7903146 del *TCF7L2*). Los OR de los alelos individuales oscilaron entre 1.14 (95% IC, de 1.05 a 1.23) hasta 1.48 (95% IC, de 1.36 a 1.60). En este estudio no se encontró pruebas de la interacción SNP-enfermedad; sin embargo, los riesgos de múltiples alelos fueron consistentes con un modelo multiplicativo. Cada alelo de riesgo adicional aumentó las probabilidades de diabetes tipo 2 en 1.28 veces (95% CI, de 1.21 a 1.35).²⁸

3.8 Polimorfismo 174 G/C del gen *IL-6* (ID: Rs1800795) y su asociación con la Diabetes Mellitus tipo II

La Interleuquina 6 (*IL-6*) es una citoquina multifuncional producida por diferentes tipos celulares, incluyendo células del sistema inmune (células B, células T y macrófagos), células dendríticas, fibroblastos, células endoteliales, miocitos, tejido

adiposo, y células beta pancreáticas. Esta citoquina media la respuesta inflamatoria y el estrés. Se ha calculado que la tercera parte de la concentración circulante de IL-6 proviene del tejido adiposo y de acuerdo con observaciones recientes, la concentración circulante de IL-6 se relaciona con la acción de la insulina²¹. Uno de los diversos polimorfismos en la región promotora del gen *IL-6* que han sido descritos es el polimorfismo -174 G/C, que afecta la transcripción del gen de *IL-6* induciendo una mayor producción de esta citoquina relacionado con estados de insulinoresistencia.²⁹

La implicación de la IL-6 en la homeostasis energética está ampliamente documentada, de forma que su posible relación con el desarrollo de obesidad podría estar mediada por las acciones de esta citoquina y en función del polimorfismo -174G/C presente en el genoma³⁰. El gen de la *IL-6* se ha propuesto como un marcador de síndrome metabólico, ya que está implicada en muchas alteraciones relacionadas con la excesiva ganancia de peso; de este modo, el polimorfismo -174G/C de *IL-6* ha sido relacionado en la etiología de la resistencia a la insulina, de la DM-II, de la aterosclerosis y de la hipertensión arterial, entre otros procesos metabólicos.³¹

Diversos estudios han descrito una posible asociación del polimorfismo -174 G/C del gen de *IL-6* con susceptibilidad a la DM1, específicamente con la presencia del genotipo G/G. Un estudio desarrollado en pacientes chilenas con DM-I no determinó una asociación significativa entre este genotipo y la enfermedad; sin embargo, encontró una mayor tendencia de asociación para la presencia del alelo G con mayor IMC en pacientes con DM-I.³²

3.9 Otros polimorfismos asociados con la Diabetes Mellitus tipo II

Otro de los genes relacionados a la DM-II más estudiados es la Calpaína 10 (*CAPN10*), considerado un gen de susceptibilidad localizado en 2q37.3. *CAPN10* es una cistein-proteasa dependiente de calcio que interviene en el sistema de secreción de insulina, además de regular la proliferación y diferenciación celular.

Pacientes de algunas poblaciones de origen amerindio presentan diversas frecuencias alélicas de los SNP 19, 43 y 63 del gen *CAPN10*³⁵. En un estudio de polimorfismos agrupados en haplotipos, se observó un incremento del riesgo de DM-II en diferentes combinaciones haplotípicas de SNPs localizados en *CAPN10*. Análisis haplotípicos de estos marcadores moleculares sugieren que los genotipos 1-1, 1-2 y 2-1 de los SNP 43 y 19 confieren un incremento en el riesgo de desarrollar la enfermedad. Considerando lo anteriormente expuesto, los investigadores postularon a *CAPN10* como gen de susceptibilidad que explica un 14% del riesgo a desarrollar DM-II en mexicanos y 4% en población europea (mexicanos OR=3.58, finlandeses OR=2.55 y alemanes OR=4.97).³⁶

En nuestro país se ha realizado estudios para determinar las frecuencias alélicas de los polimorfismos más frecuentes de los genes *CAPN10* y *PPAR-γ2*. Un grupo de investigadores analizaron 116 muestras de controles del SNP19 de *CAPN10* encontrando una frecuencia de 41.38% del alelo 1 (155 pb) y 58.62% del alelo 2 (187 pb, alelo más común) ³⁷. Estos resultados guardan relación con las frecuencias alélicas del alelo más frecuente (187 pb) en población mexicana (57%) ³⁵. Estudios posteriores con este mismo gen han determinado las frecuencias alélicas del SNP19, 43.1% del alelo 1 (155 pb) y 56.9 % del alelo 2 (187 pb); del SNP43, 48.8% del alelo 1 (134 pb) y 51.2% del alelo 2 (152 pb); y del SNP63, 37.9% del alelo 1 (162 pb) y 51.2% del alelo 2 (192 pb).³⁸

El número de estudios en investigación para determinar si hay algún gen o afección genética que este asociado al desarrollo de la DM-II va en aumento y es abundante, ello se traduce en un gran número de candidatos a marcadores moleculares de esta enfermedad. Hyo-Jeong (2010), tiene reportado un trabajo en donde analiza la interrelación entre 408 SNPs en 87 genes que están altamente asociados con la DM-II, este estudio concluyó que hay 14 SNPs en 12 genes asociados en un 65% con la enfermedad. ²¹

Dado que la DM-II es una enfermedad multifactorial, algunos investigadores consideran que también los factores genéticos deben ser múltiples. ²¹ Algunos de los otros SNPs asociados con la DM-II se presentan en el Anexo N° 2.

3.10 Variables epigenéticas asociadas con la Diabetes Mellitus tipo II

Los cambios en la expresión genética que se producen sin cambios concomitantes en la secuencia primaria del ADN se denominan colectivamente como epigenéticos y, a nivel molecular, son codificadas por metilación del ADN y modificaciones de las histonas.

Existen indicios que apuntan a un componente epigenético importante para el desarrollo de diabetes tipo 2 y la obesidad⁴⁰. En primer lugar, la hipótesis del origen fetal de la diabetes (fenotipo ahorrador) establece que las deficiencias nutricionales y otras exposiciones durante la vida intrauterina generan cambios a largo plazo que posteriormente predisponen a la DM-II y a enfermedad cardiovascular. Esta hipótesis se basa en sólidos datos epidemiológicos que vinculan acontecimientos de la vida temprana con el riesgo de padecer la enfermedad en la vejez, como se ve, por ejemplo, en los supervivientes de los holandeses en el llamado "invierno del hambre." Estudios en los animales y humanos sobrevivientes establecieron que la base estructural del ADN sufrió una alteración en la metilación.⁴¹

Un segundo grupo de observaciones se desprende de la larga data producto del seguimiento de los miembros de la comunidad de nativos americanos Pima en Arizona, una población con una muy alta prevalencia de DM-II y obesidad. Los hijos de madres quienes desarrollaron DM-II en el embarazo presentan un riesgo considerablemente menor de desarrollar tanto DM-II (1,4 frente a 45%) y obesidad (17 frente a 58%) con respecto a los nacidos de mujeres quienes son diabéticas desde antes de quedar embarazadas⁴⁰. Fundamentalmente, esta diferencia se evidencia con mayor claridad cuando se analiza a los niños nacidos de la misma madre, es decir, los hijos nacidos después que la madre fuera diagnosticada con DM-II presentan tasas más altas de DM-II y obesidad con respecto a sus hermanos quienes nacieron mientras su madre no era diabética.

Estos hallazgos sugieren que el ambiente intrauterino es un determinante importante de la DM-II y la predisposición a la obesidad, y son ampliamente

consistentes con análisis comparativos de transmisión de esta enfermedad por líneas materna y paterna⁴². El aumento del riesgo de diabetes en la descendencia femenina de madres diabéticas establece claramente la posibilidad de una ampliación de la prevalencia de la diabetes a través de generaciones sucesivas.

Los procesos epigenéticos son fuertes candidatos a la mediación de los efectos descritos anteriormente, actualmente existen pocos estudios que han explorado la caracterización epigenética de los seres humanos en asociación con la DM-II, principalmente estos estudios se han centrado en la caracterización del estado de metilación de los sitios CpG de los genes candidatos a marcadores moleculares.⁴³

3.10.1 Teoría del genotipo ahorrador

Durante la era Paleolítica tardía (50.000–10.000 AC), los humanos sobrevivían como cazadores-recolectores, salían de casería varios días por semana y las mujeres recolectaban alimentos. De este modo, resulta evidente pensar que su vida estaba llena de actividad física intensa, alternando periodos de reposo. Algunos investigadores han postulado que el ejercicio físico y la procura de alimentos estaban íntimamente ligados a la supervivencia, por lo que es probable que hayan influido conjuntamente en la selección de genes que permitieran una regulación enzimática cíclica tanto del almacenamiento como de la utilización de sustratos energéticos.⁴⁴

En base a estos hechos, Neel (1962) propuso la noción de genes ahorradores, argumentando que ciertos genotipos fueron seleccionados en el genoma humano dada su ventaja selectiva sobre los menos ahorradores; él definió el genoma ahorrador como aquel excepcionalmente eficiente en la ingesta y/o utilización de alimentos⁴⁵. Actualmente esta teoría se extiende postulando que la supervivencia durante periodos de saciedad/hambre de los cazadores recolectores paleolíticos, con genes ahorradores; debió necesariamente estar relacionada a ciclos de actividad/inactividad física y por tanto la selección de genes y del genotipo ahorrador fue sustentada por una actividad física obligatoria.⁴⁴

Al igual que con la disponibilidad de alimentos, en los últimos cien años han ocurrido cambios dramáticos en nuestros niveles de actividad física y las sociedades modernas son notablemente sedentarias. Como consecuencia, aquellos alelos que favorecían la función y entregaban ventajas selectivas en la era paleolítica hoy en día resultan en una desventaja que promueve un aumento en la prevalencia de enfermedades metabólicas.⁴¹

3.10.2 Teoría del fenotipo ahorrador

La hipótesis del fenotipo ahorrador propone que el feto se adapta a un ambiente intrauterino adverso maximizando la utilización del escaso aporte nutricional para asegurar la supervivencia⁴⁶. Estas adaptaciones, que favorecen el desarrollo de algunos sistemas sobre otros, pueden llevar, sin embargo, a persistentes alteraciones en el crecimiento y función de los tejidos, si bien ellas favorecen al feto, podrían generar susceptibilidad frente a situaciones ambientales posteriores que incluyan un balance calórico positivo.⁴¹

Hoy en día se acepta que el ambiente temprano en el cual crece y se desarrolla un niño puede tener efectos a largo plazo en su salud. Un estudio clásico de Ravelli *et al.* (1976), mostró que la exposición del feto a la hambruna holandesa de 1944 - 1945, durante la primera mitad del embarazo, resultó en un significativo aumento en la tasa de obesidad a los 19 años.⁴⁷

Las modificaciones del ambiente intrauterino pueden impactar en el desarrollo del feto modificando la expresión de sus genes y los efectos que se generarán en la progenie dependerán del estado de diferenciación, proliferación o madurez funcional en que se encuentren los tejidos en desarrollo al momento de la alteración. Modificaciones epigenéticas han sido señaladas como responsables de la propagación del estado de actividad de los genes de una generación de células a la siguiente, contribuyendo al desarrollo de un fenotipo anormal.⁴⁸

Tomando todo esto en conjunto, algunos investigadores afirman que aquellos tejidos involucrados en la patogénesis de la DM-II pueden ser blanco de modificaciones epigenéticas inducidas por alteraciones en la vida intrauterina y

que estas modificaciones se heredarán de manera estable en las células lo que determinará un fenotipo que puede predisponer a enfermedades crónicas o a fenotipos intermedios. ⁴¹

3.11 Equilibrio de Hardy-Weinberg

En genética de poblaciones, el principio de Hardy-Weinberg establece que la composición genética de una población permanece en equilibrio mientras no actúe la selección natural ni ningún otro factor y no se produzca ninguna mutación. Esta ley afirma que, bajo ciertas condiciones, tras una generación de apareamiento al azar, las frecuencias de los genotipos de un locus individual se fijarán en un valor de equilibrio particular así como también estas frecuencias de equilibrio se pueden representar como una función sencilla de las frecuencias alélicas en ese locus.

Trabajando de manera independiente, Hardy y Weinberg concluyeron que las combinaciones que resultan del proceso de apareamiento y reproducción que ocurre en cada generación en los organismos diploides no involucran un cambio en la composición general del reservorio génico; para demostrar esto, propusieron un modelo teórico que permite examinar el comportamiento de los alelos en una población ideal en la cual rigen cinco condiciones:

- 1) No ocurren mutaciones.
- 2) No hay desplazamiento neto de individuos con sus genes hacia el interior de la población (inmigración) o hacia afuera (emigración).
- 3) La población es lo suficientemente grande como para que se apliquen las leyes de la probabilidad; o sea, es altamente improbable que el azar, por sí mismo, pueda alterar la frecuencia de los alelos.
- 4) El apareamiento entre individuos es al azar.
- 5) No hay diferencia en el éxito reproductivo de los genotipos considerados, es decir, que el llevar diferentes combinaciones alélicas no confiere ventaja a sus

portadores. La progenie de todos los apareamientos posibles tiene la misma probabilidad de sobrevivir y reproducirse en la generación siguiente (no hay selección natural).

Hardy y Weinberg demostraron matemáticamente que si una población cumple con las cinco condiciones mencionadas previamente, entonces las frecuencias o proporciones relativas de los alelos en la población no cambiarán de una generación a otra; más aun, la frecuencia de los genotipos posibles de estos alelos no cambiarán de una generación a la siguiente; es decir, el reservorio génico estará en un estado estacionario con respecto a estos alelos.¹¹

Así, la ecuación de Hardy-Weinberg establece que en una población ideal, en la cual se cumplan las cinco condiciones planteadas por el modelo, ni las frecuencias alélicas ni las frecuencias genotípicas cambian de una generación a otra y que ambas se encuentran en un estado de equilibrio.

IV. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivo general

Identificar marcadores moleculares para el diagnóstico temprano de la Diabetes Mellitus Tipo II, en una población de Lima.

Objetivos específicos

Determinar los polimorfismos Pro12Ala del gen *PPAR-γ2* y 174 G/C del gen *IL-6* en una población de Lima.

Determinar las frecuencias genotípicas y alélicas de los genes *PPAR-γ2* Pro12Ala e *IL-6* 174G/C en una población de Lima.

Hipótesis

La presencia de un polimorfismo de los genes *PPAR-γ2* (Pro12Ala) e *IL-6* 174G/C pueden ser utilizados como marcadores moleculares que permiten identificar la susceptibilidad a desarrollar DM-II.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Diseño de investigación

Descriptivo, observacional, retrospectivo de corte transversal tipo caso-control.

5.2 Variables

- Variable independiente: Diabetes Mellitus tipo - II
- Variable dependiente 1: Polimorfismo Pro12Ala de PPAR- γ 2
- Variable dependiente 2: Polimorfismo 174G/C de IL-6

Operacionalización de variables (Ver anexo N°3)

5.3 Población

- Casos: Pacientes con diagnóstico clínico de DM-II, residentes de la ciudad de Lima.
- Controles: Personas clínicamente sanas, residentes de la ciudad de Lima

5.4 Muestra

Se recolectaron en total 100 muestras de sangre total conservadas en FTA Cards (Whatman ®) que corresponden a sujetos de estudio de investigaciones previas, quienes firmaron un consentimiento informado en el que aceptan la conservación y utilización de las mismas en estudios que se deriven de los estudios iniciales.^{33, 49}

5.5 Tipo de muestreo

No probabilístico por conveniencia.

5.6 Criterios de inclusión y exclusión

5.6.1 Criterios de inclusión

Muestras de sujetos de estudio registrados y caracterizados por el Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición “Alberto Guzmán Barrón”.

- **Casos:** 50 muestras de pacientes con diagnóstico clínico de DM-II, con/sin antecedentes familiares de la enfermedad, de ambos sexos en igual proporción, de 40 a 85 años.
- **Controles:** 50 muestras de sujetos sin DM-II, sin sobrepeso, sin obesidad, sin hipertensión arterial, clínicamente saludables, con/sin antecedentes familiares de DM-II, de ambos sexos en igual proporción, de 40 a 85 años.

5.6.2 Criterios de exclusión

- Muestras de sujetos menores de 40 y mayores de 85 años de edad.
- Muestras de pacientes con diagnóstico clínico o sospecha de Diabetes Mellitus tipo I.
- Muestras de sujetos que presentan algún síndrome de resistencia a la insulina.
- Muestras de pacientes con antecedentes de enfermedad del riñón o del hígado.
- Muestras de sujetos con antecedentes de tratamiento con corticoides u hormonas.
- Muestras de mujeres embarazadas.

5.7 Plan de recolección de datos

- Selección de muestras a partir del banco de muestras, según los criterios de inclusión y exclusión.
- Distribución de las muestras, según su condición (casos y controles).
- Procesamiento molecular y determinación de genotipos.
- Registro de resultados en una base de datos en formato Excel versión 2010.
- Análisis estadístico.

5.8 Técnicas e instrumentos

5.8.1 Procesamiento molecular

a. **Purificación de ADN:** La extracción y purificación de ADN de sangre periférica se realizó según el protocolo recomendado por el fabricante FTA Cards (Whatman®). Ver anexo N° 4

b. **Reacción en cadena de la polimerasa:** El polimorfismo de *PPAR-γ2* Pro12Ala e *IL-6* G/C se determinó por la técnica de PCR-RFLP, estandarizado en el laboratorio de Biología Molecular del CIBN “Alberto Guzmán Barrón”, con *primers* específicos y las variantes fueron determinadas por digestión con las enzimas de restricción HhaI y SfaNI respectivamente.³³

Protocolo de amplificación y restricción *Pro12Ala* del gen *PPAR-γ2*

Máster mix: H₂O PCR: 9.04uL, Buffer10x: 1.2uL, dNTPs 2.5mM: 0.96uL, MgCl₂ 50mM; 0.36uL, PrimerF 10uM: 0.12uL, PrimerR 10uM: 0.12uL, Taq Platinum: 0.2uL, ADN punch: 4 unid.

Ciclos PCR: 94°C x 5min, 36 ciclos (94°C x 1min, 55°C x 1min, 72°C x 1min), 72°C x 10 min

Restricción: H₂O PCR: 8.0uL, BufferTango10X: 1.0uL, HhaI 10U/uL: 1.0uL, ADN amplificado: 5uL

T° Incubación: 37°C x 16 horas

Protocolo de amplificación y restricción 174 G/C del gen *IL-6*

Máster mix: H₂O PCR: 8.80uL, Buffer10x: 1.2uL, dNTPs 2.5mM: 0.96uL, MgCl₂ 50mM; 0.6uL, PrimerF 10uM: 0.12uL, PrimerR 10uM: 0.12uL, Taq Platinum: 0.2uL, ADN punch: 3 unid.

Ciclos PCR: 94°C x 10min, 35 ciclos (94°C x 1min, 55°C x 1.5min, 72°C x 1min), 72°C x 10 min

Restricción: H₂O PCR: 3.8uL, BufferTango10X: 1.0uL, SfaNI (Lwel) 10U/uL: 0.2uL, ADN amplificado: 5uL

T° Incubación: 37°C x 20 horas

c. **Electroforesis de ADN:** Para verificar la pureza del ADN se utilizó el método de electroforesis en gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio. Para visualizar los amplificados y determinar el número de pares de bases se empleó el método de electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio para el marcador 174G/C del gen *IL-6*, y electroforesis en gel de acrilamida/bisacrilamida al 8% con tinción de nitrato plata para el marcador Pro12Ala del gen *PPAR-γ2*.^{33, 49}

d. **Determinación del tamaño de pares de bases:** Con la ayuda de un marcador de peso molecular “ladder” en las corridas electroforéticas se logró identificar las

bandas de ADN en los geles respectivos. Sobre la base de la bibliografía revisada^{4,27}, en el presente estudio se emplearon los siguientes criterios para la lectura e interpretación de las corridas electroforéticas:

1. Para el polimorfismo Pro12Ala del gen *PPAR-γ2* los resultados se interpretaron bajo el criterio 154pb = Alelo Pro y 131pb = Alelo Ala.
2. Para el polimorfismo 174G/C del gen *IL-6* los resultados se interpretaron bajo el criterio 198pb = Alelo C y 140pb = Alelo G.

5.8.2 Análisis estadístico

- Se estableció la distribución de resultados según género y edad. (Excel versión 2010)
- Se establecieron las frecuencias genotípicas en los grupos de casos y controles. (Excel versión 2010)
- Se calcularon las frecuencias alélicas en los grupos de casos y controles. (Excel versión 2010)
- Se evaluó la distribución de los genotipos para determinar el equilibrio de Hardy-Weinberg en ambos genes. (STATA 10.0)
- Se determinó la asociación entre los alelos y genotipos con la DM-II a través de la prueba chi-cuadrado estableciéndose el Odds Ratio (OR) y p-value (p). (Excel versión 2010)

Equilibrio Hardy-Weinberg: Esta prueba permite determinar si la población en estudio es genéticamente homogénea, identificándose algún sesgo de homocigosidad o heterocigosidad de los alelos en una población. Se utilizó el programa STATA 10.0 en la prueba de Hardy-Weinberg; este análisis fue validado a través de la prueba chi-cuadrado de Pearson. Se considera que la población es genéticamente homogénea cuando la probabilidad del chi-cuadrado es mayor a 0.05 en los grupos caso y control. ¹¹

5.9 Ética

La presente investigación forma parte de la línea de investigación que siguen los investigadores del Laboratorio de Biología Molecular del CIBN “Alberto Guzman Barrón”, quienes cuentan con un Banco de Muestras proveniente de sujetos de estudio de investigaciones previas, quienes firmaron un consentimiento informado en el que aceptan la conservación y utilización de las mismas en estudios que se deriven del estudio inicial. Dicho documento incluye la finalidad de la investigación, condiciones en que se realiza, procedimientos, riesgos y beneficios, confiabilidad de los resultados y datos de los investigadores. Se consideraron las pautas mencionadas en Helsinki.⁶⁰

VI. RESULTADOS

La tabla N° 1 muestra la distribución de las muestras incluidas en el presente estudio y las frecuencias genotípicas de los polimorfismos Pro12Ala del gen *PPAR-γ2* y 174G/C del gen *IL-6* por género, grupos étnicos y presencia de antecedentes familiares de DM-II. Los grupos de casos y controles están formados por muestras de hombres y mujeres en igual proporción, cuyas edades promedio varían entre 62.32 ± 13.05 años (casos) y 62.06 ± 13.94 años (controles). El 74% de muestras del grupo de casos pertenecen a sujetos con antecedentes familiares de DM-II y sólo el 14% de muestras del grupo control pertenecen a sujetos con dichos antecedentes.

Los genotipos observados entre hombres y mujeres no muestran diferencias significativas. Se determinó la expresión del genotipo Pro/Ala del polimorfismo Pro12Ala del gen *PPAR-γ2* en el 38% de las muestras de los sujetos con una edad mayor o igual a 60 años; de las cuales, el 50% corresponde al grupo control.

Las frecuencias genotípicas de los polimorfismos Pro12Ala del gen *PPAR-γ2* y 174G/C del gen *IL-6* en los grupos de casos y controles se reportan en la tabla N°2. Estos resultados no evidencian diferencias significativas entre los casos y los controles según los genotipos de dichos polimorfismos. ($p > 0.05$).

Las frecuencias alélicas de los polimorfismos Pro12Ala del gen *PPAR-γ2* y 174G/C del gen *IL-6* en los grupos de casos y controles se reportan en la tabla N° 3. Según prueba Chi cuadrado no existen diferencias significativas entre los casos y los controles según las frecuencias alélicas de dichos polimorfismos ($p > 0.05$).

Tabla N°1. Resultados de los genotipos según característica

CARACTERÍSTICA	CASOS (n=50)						CONTROLES (n=50)					
	n	IL-6	PPAR-y2			Total	n	IL-6	PPAR-y2			Total
			Pro/Pro	Pro/Ala	Ala/Ala				Pro/Pro	Pro/Ala	Ala/Ala	
GENERO	Masculino	C/C	1	5	0	6	C/C	5	1	0	6	
		C/G	2	3	0	5	C/G	3	3	0	6	
		G/G	8	6	0	14	G/G	5	8	0	13	
	Femenino	C/C	3	3	0	6	C/C	4	3	0	7	
		C/G	1	4	1	6	C/G	1	1	0	2	
		G/G	9	4	0	13	G/G	10	6	0	16	
Total	50	Total	24	25	1	50	Total	28	22	0	50	
EDAD (años)	40 – 59	C/C	1	2	0	3	C/C	5	2	0	7	
		C/G	2	3	0	5	C/G	1	0	0	1	
		G/G	3	1	0	4	G/G	6	1	0	7	
	60 – 85	C/C	3	6	0	9	C/C	4	2	0	6	
		C/G	1	4	1	6	C/G	3	4	0	7	
		G/G	14	9	0	23	G/G	9	13	0	22	
Total	50	Total	24	25	1	50	Total	28	22	0	50	
ANTECEDENTE FAMILIAR	Con	C/C	3	6	0	9	C/C	1	1	0	2	
		C/G	3	6	0	9	C/G	0	1	0	1	
		G/G	12	7	0	19	G/G	0	4	0	4	
	Sin	C/C	1	2	0	3	C/C	8	3	0	11	
		C/G	0	1	1	2	C/G	4	3	0	7	
		G/G	5	3	0	8	G/G	15	10	0	25	
Total	50	Total	24	25	1	50	Total	28	22	0	50	

Tabla N°2: Frecuencias genotípicas de los polimorfismos Pro12Ala del gen *PPAR-γ2* y 174G/C del gen *IL-6*

Frecuencia genotípica	CASO		CONTROL		OR	IC 95%	<i>p</i>	
	n	%	n	%				
<i>PPAR-γ2</i>	Pro/Pro (C/C)	24	48	28	56	0.73	0.33 - 1.59	0.55
	Pro/Ala (C/G)	25	50	22	44	1.27	0.58 - 2.80	0.69
	Ala/Ala (G/G)	1	2	0	0	NC	-	-
	Total	50	100	50	100			
<i>IL-6</i>	C/C	12	24	13	26	0.9	0.36 - 2.22	1
	C/G	11	22	8	16	1.48	0.54 - 4.06	0.61
	G/G	27	54	29	58	0.85	0.39 - 1.87	0.84
	Total	50	100	50	100			

NC: Resultado no calculado debido a la frecuencia nula del genotipo Ala/Ala en el grupo control.

Tabla N°3: Frecuencias alélicas de los polimorfismos Pro12Ala del gen *PPAR-γ2* y 174G/C del gen *IL-6*

Frecuencia alélica	CASO		CONTROL		OR	IC 95%	<i>p</i>	
	n	%	n	%				
<i>PPAR-γ2</i>	Pro (C)	73	73	78	78	0.76	0.40 - 1.46	0.51
	Ala (G)	27	27	22	22	1.31	0.69 - 2.51	0.51
	Total	100	100	100	100			
<i>IL-6</i>	C	35	35	34	34	1.05	0.58 - 1.87	1
	G	65	65	66	66	0.96	0.53 - 1.71	1
	Total	100	100	100	100			

En la tabla N° 4 se observan los resultados de la prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg para los polimorfismos Pro12Ala del gen *PPAR-γ2* y 174G/C del gen *IL-6* en los grupos de casos y controles; hallándose que el SNP Pro12Ala *PPAR-γ2* ($p\text{-HW}_{\text{control}} = 0.09$, $p\text{-HW}_{\text{caso}} = 0.08$, $p\text{-HW} > 0.05$) está en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Las distribuciones genotípicas observadas en los grupos caso y control del SNP 174G/C *IL-6* no son concordantes con lo esperado bajo la hipótesis de equilibrio de Hardy-Weinberg ($p\text{-HW}_{\text{control}} = 0.0001$, $p\text{-HW}_{\text{caso}} = 0.0004$, $p\text{-HW} < 0.05$).

Tabla N°4: Prueba de Equilibrio de Hardy-Weinberg de los polimorfismos Pro12Ala del gen *PPAR-γ2* y 174G/C del gen *IL-6*

Equilibrio de Hardy-Weinberg			
SNP	Grupo	X ² Pearson	p-HW
Pro12Ala <i>PPAR-γ2</i>	Caso	8.41	0.09
	Control	NC	0.08
174G/C <i>IL-6</i>	Caso	16.71	0.0001
	Control	31.87	0.0004

NC: Resultado no calculado debido a la frecuencia nula del genotipo Ala/Ala en el grupo control.

El análisis de interacción pareado del Odds Ratio de los polimorfismos Pro12Ala del gen *PPAR-γ2* y 174G/C del gen *IL-6* en los grupos de casos y controles se establecen en la tabla N° 5. Las combinaciones genotípicas evaluadas no revelan diferencias significativas entre los grupos de casos y controles.

La evaluación del Odds Ratio de los SNPs combinados Pro12Ala del gen *PPAR-γ2* y 174G/C del gen *IL-6* en los grupos de casos y controles se muestran en la tabla N° 6. El análisis pareado del alelo “Ala” del gen *PPAR-γ2* con el alelo “C” del gen *IL-6* evidencia una diferencia significativa entre los grupos de casos y controles ($p=0.03$). A pesar de que se demuestra que en el análisis de las frecuencias alélicas pareadas existe una diferencia significativa entre los grupos casos y controles; debe desestimarse este resultado debido a que el grupo control del gen *IL-6* no cumplió con la condición de equilibrio de Hardy-Weinberg.

Tabla N°5: Análisis del Odds Ratio de la interacción pareada de los genotipos Pro12Ala del gen *PPAR-γ2* y 174G/C del gen *IL-6* en los grupos caso y controle.

<i>PPAR-γ2</i>	<i>IL-6</i>	Control	Caso	OR	IC 95%	<i>p</i>
Pro/Pro	C/C	9	4	0.4	0.11 – 1.38	0.23
	C/G	4	3	0.73	0.16 – 3.46	1
	G/G	15	17	1.2	0.51 – 2.79	0.83
Pro/Ala	C/C	4	8	2.19	0.62 – 7.80	0.36
	C/G	4	7	1.87	0.51 – 6.84	0.52
	G/G	14	10	0.64	0.25 – 1.62	0.48
Ala/Ala	C/C	0	0	NC	-	-
	C/G	0	1	NC	-	-
	G/G	0	0	NC	-	-

NC: Resultado no calculado debido a la frecuencia nula del polimorfismo en el grupo control.

Tabla N°6: Análisis del Odds Ratio de la interacción pareada de los alelos Pro12Ala del gen *PPAR-γ2* y 174G/C del gen *IL-6* en los grupos caso y controle.

<i>PPAR-γ2</i>	<i>IL-6</i>	Control	Caso	OR	IC 95%	<i>p</i>
Pro	C	56	45	0.75	0.47 – 1.17	0.25
	G	100	101	1.02	0.69 – 1.51	1
Ala	C	12	25	2.23	1.09 – 4.59	0.03
	G	32	29	0.89	0.51 – 1.54	0.78

VII. DISCUSIÓN

Actualmente la DM-II es considerada una pandemia que amenaza en convertirse en uno de los principales problemas de salud en los países en vías de desarrollo. Lamentablemente, en nuestro medio existen escasos estudios acerca de las determinantes genéticas de esta enfermedad. En los últimos años se han descrito más de 250 genes relacionados con la DM-II, algunos científicos concluyeron que los genes *CAPN10* y *PPAR-γ2* son los candidatos más prometedores para diagnosticar y prevenir de manera oportuna el desarrollo de la DM-II³; otros investigadores han determinado una asociación significativa entre la DM-II, resistencia a la insulina, hipertensión y otros trastornos metabólicos con el polimorfismo de un sólo nucleótido (SNP) 174G/C del gen de la Interleuquina 6 (*IL-6*)⁴. El número de estudios en investigación para determinar si hay algún gen o afección genética que este asociado al desarrollo de la DM-II va en aumento y es abundante, ello se traduce en un gran número de candidatos a marcadores moleculares de esta enfermedad. Hyo-Jeong (2010), tiene reportado un trabajo en donde analiza la interrelación entre 408 SNPs en 87 genes que están altamente asociados con la DM-II, este estudio concluyó que hay 14 SNPs en 12 genes asociados en un 65% con la enfermedad incluyendo el polimorfismo Pro12Ala del gen *PPAR-γ2* en esta lista.²¹

La finalidad de la presente investigación ha sido obtener datos sobre las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos Pro12Ala del gen *PPAR-γ2* y 174G/C del gen *IL-6* con el objetivo de contribuir a incrementar la información disponible que sustente futuros estudios de asociación, que podrían sugerir la postulación de *PPAR-γ2* Pro12Ala e *IL-6* 174G/C como genes candidatos a marcadores moleculares de diagnóstico temprano de la DM-II en población local.

Algunos autores consideran que la epidemiología molecular es la incorporación de métodos y herramientas moleculares a las investigaciones epidemiológicas⁵⁷. Tomando en cuenta la definición de epidemiología del Dr. Alarcón (Director del

Instituto de Medicina Tropical “Daniel Alcides Carrión” – UNMSM) la epidemiología molecular es definida como la ciencia que estudia las causas de la aparición, propagación, mantenimiento y descenso de los problemas de salud en poblaciones mediante el uso de las técnicas de la biología molecular -como el estudio del ADN para identificar biomarcadores en muestras humanas-, con la finalidad de prevenirlos o controlarlos; es decir, “*la biología molecular al servicio del enfoque epidemiológico*”.^{58, 59}

Antes de analizar al detalle los resultados obtenidos es importante precisar que, sobre la base de la bibliografía revisada, resulta crítico en los estudios de casos y controles de este tipo garantizar una adecuada estratificación de la población para evitar los “ruidos” que generan una heterogeneidad genética. Por ello, es importante realizar la prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg porque permite determinar si la población es genéticamente homogénea; o en su defecto, ayuda a identificar subpoblaciones sesgadas por factores genéticos, étnicos, socioeconómicos y/o culturales. Una población genéticamente heterogénea y estratificada en sub-poblaciones que no han sido adecuadamente identificadas, puede variar en la distribución de las frecuencias alélicas de un polimorfismo y dar resultados inexactos en los estudios caso-control⁵⁶; en consecuencia, el marcador molecular analizado puede realmente no estar asociado con el gen causal de la enfermedad.

Para efectos de este estudio, se ha evaluado las frecuencias genotípicas y se ha calculado los índices de equilibrio de Hardy-Weinberg (p-HW) con el software STATA 10.0 obteniéndose como resultados valores que cumplen con la condición de equilibrio sólo en el caso del gen *PPAR-γ2*. Los valores de p-HW en los grupos de casos y controles del gen *IL-6* no cumplen con la condición de equilibrio de Hardy-Weinberg; en consecuencia, la interpretación que podamos deducir a partir de los resultados generados con el gen *IL-6* es limitada.

Cualquier violación de las premisas del equilibrio de Hardy-Weinberg causa desviaciones en los valores esperados. Una población de poco tamaño causa un cambio aleatorio en las frecuencias genotípicas, especialmente si la población es

muy pequeña; esto debido al efecto de un error de muestreo que distorsiona las frecuencias alélicas y conduce a resultados inconsistentes. Este error de muestreo debe diferenciarse con el concepto de deriva génica, el cual es una fuerza evolutiva que actúa junto con la selección natural que cambia las frecuencias alélicas de una población de forma aleatoria; es decir, la deriva génica tiene lugar en cualquier población y responde a “los caprichos del azar”.

Sobre la base de lo anteriormente expuesto, podemos afirmar que probablemente la causa de que las frecuencias genotípicas del gen *IL-6* no cumplieran con la condición de equilibrio de Hardy-Weinberg esté relacionada con el tamaño y estratificación de la muestra (estructuración poblacional); lo que impacta en la representación de subgrupos. Para efectos del presente estudio, se estimó el número de elementos de una muestra probabilística aleatoria simple que representara el número de pacientes afectados por la DM-II en la ciudad de Lima ($n_{\text{caso}} = 368$, $n_{\text{control}} = 368$, $n_{\text{total}} = 736$); sin embargo, por razones relacionadas al elevado costo del análisis molecular de las muestras en cada grupo, se tomó por decisión incluir dentro del estudio sólo 100 muestras en los grupos de casos ($n=50$) y controles ($n=50$).

La mayoría de los estudios de la región utiliza la metodología PCR-RFLP para la determinación de polimorfismos en los estudios de casos y controles^{32, 33, 36, 37, 49}, para ello se utilizan primers específicos y protocolos validados para la amplificación del material genómico. Para la digestión de los fragmentos de restricción se utilizan enzimas específicas que cortan las secuencias que posteriormente serán visualizadas a través de electroforesis en gel. Estudios más complejos analizan el efecto sinérgico de la expresión de dos o más polimorfismos en cada muestra, determinando los genotipos por técnicas de secuenciamiento molecular^{4, 27, 50}. En el presente trabajo se ha utilizado la técnica de PCR-RFLP para la amplificación y restricción de las muestras. Para visualizar los productos de digestión se utilizó electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio para el gen *IL-6* y electroforesis en gel de acrilamida/bisacrilamida al 8% con tinción de nitrato plata para el gen *PPAR-γ2*; ello debido a que los fragmentos de

restricción son más pequeños y el gel de poliacrilamida permite que la resolución de bandas se visualice con mayor nitidez.

En nuestro país, Huerta D. et al (2012) analizó 90 muestras con el objetivo de determinar una asociación significativa entre las frecuencias genotípicas y/o alélicas de los polimorfismo Pro12Ala del gen *PPAR-γ2* y 174G/C del gen *IL-6* con el índice de masa corporal (IMC); sin embargo, los resultados de la investigación no establecieron diferencias significativas³³. Este equipo de investigación reportó además las frecuencias genotípicas del gen *PPAR-γ2*: Pro/Pro=55%, Pro/Ala=40%, Ala/Ala=5%; frecuencias alélicas del gen *PPAR-γ2*: Pro=75%, Ala=25%; frecuencias genotípicas del gen *IL-6*: G/G=73%, G/C=16%, C/C=11%; y las frecuencias alélicas del gen *IL-6*: G=81% y C=19% en controles sanos de la ciudad de Lima³³. Oré R. et al (2008) hallaron en 50 pacientes con síndrome de resistencia a la insulina las frecuencias genotípicas: Pro/Pro=42%, Pro/Ala=47%, Ala/Ala=11% y las frecuencias alélicas: Pro=66% y Ala=34%⁴⁹. Los datos obtenidos en nuestra investigación son consistentes con resultados previos que han sido publicados por Huerta D. et al (2012) y Oré R. et al (2008); sin embargo, en ningún caso se ha determinado una asociación significativa entre el SNP con la enfermedad.

Nuestros resultados no son concordantes con los hallazgos de Byung Cheol Lee et al en población coreana (casos n=283: Pro/Pro=90%, Pro/Ala=10%; controles n=141: Pro/Pro=91%, Pro/Ala=9%)⁵⁰ ni con los de Zouari Bouassida K. et al en población tunecina (casos n=242: Pro/Pro=89%, Pro/Ala=11%; controles n=246: Pro/Pro=90%, Pro/Ala=9%, Ala/Ala=1%)²⁷ quienes tampoco demostraron algún riesgo significativo asociado con los SNPs del gen *PPAR-γ2*; sin embargo, el alelo Ala12 se encontró significativamente asociado con niveles altos de presión arterial sistólica en el grupo de pacientes diabéticos²⁷. Estos resultados, aunque son muy diferentes a los encontrados en estudios de nuestra región^{33,49}, son concordantes entre sí.

Hebe N. et al desarrollaron un estudio meta-analítico con una revisión bibliográfica de 60 publicaciones que evaluaban una asociación entre el polimorfismo Pro12Ala

del gen PPAR- γ 2 y la DM-II en el 2009 con un total de 32 849 casos de DM-II y 47 456 sujetos control ⁵¹. Los investigadores calcularon un OR global combinado de 0.86 (IC=95%, 0.81-0.90). En todos los estudios revisados, la frecuencia del alelo 12Aa en los grupos control varió de 1,7% a 21,6% (mediana, 9,5%). La frecuencia del alelo 12Aa encontrada en nuestro trabajo supera ligeramente el límite superior de este rango de referencia (22%).

En los estudios que informan los controles como étnicamente asiáticos, la frecuencia del alelo 12Aa varió de 1,7% a 9,3% (mediana, 4,5%) ⁵². Estos resultados son consistentes con lo hallado por Byung Cheol Lee et al en población coreana (frecuencia del alelo 12Aa=4%). Otros estudios que reportaron los controles étnicamente caucásicos, la frecuencia del alelo 12Aa varió de 5,9% a 21,6% (mediana, 12,7%) ⁵³.

Weedon M. et al analizaron 2 343 muestras de pacientes con DM-II y 3 293 muestras de sujetos sanos en el Reino Unido ²⁸. Estos investigadores calcularon un OR del alelo 12Aa de 1,29 (IC=95%, 1,14-1,45) el cual representa un resultado bastante cercano al obtenido en este estudio (OR=1.31).

Como se ha descrito anteriormente, el análisis e interpretación de los resultados del SNP 174 G/C de *IL-6* son limitados ya que las frecuencias genotípicas encontradas no cumplen con el principio de equilibrio de Hardy-Weinberg.

Las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo 174 G/C del gen *IL-6* obtenidas en nuestro estudio no son concordantes con otros resultados de la región. Huerta D. et al (n=90; frecuencias genotípicas: C/C=10%, C/G=16%, G/G=74%, frecuencias alélicas: C=18%, G=82%)³³ y Pérez F. et al (n=103; frecuencias genotípicas: C/C=1%, C/G=26%, G/G=73%, frecuencias alélicas: C=15%, G=85%)³² obtuvieron resultados muy comparables entre sí en controles sanos de Perú y Chile respectivamente. En ambos estudios la muestra estudiada cumplió con el equilibrio de Hardy-Weinberg, hecho que refuerza nuestra teoría de que el tamaño y estratificación de la muestra influyó en nuestro análisis de validación poblacional.

Illig et al. (2004) determinaron la asociación del SNP -174G/C del gen de *IL-6* en 704 participantes de un estudio, hallando una asociación significativa con la DM-II en pacientes almenanes (OR=1.51, 95% IC, 1.11-2.07, $p=0.0096$)⁴; hallazgo similar al encontrado por un grupo de investigadores mexicanos, quienes determinaron una asociación significativa en 90 miembros de 30 familias en un estudio de de ligamiento entre el polimorfismo -174G/C de la *IL-6* con la DM-II (OR=1.23, 95% IC, 1.01 – 0.5)³⁴. Según Hyo-Jeong et al (2010), el estudio de Illig et al. (2004) demostró un grado de asociación bajo entre el polimorfismo 174G/C del gen de *IL-6* con la DM-II.²¹

Nuestros resultados tampoco guardan relación con los datos obtenidos por Illig et al⁴ en 704 participantes alemanes. Este equipo de investigación calculó un OR del alelo 174-G de 1,59 (IC=95%, 1,03-2,44) determinando una diferencia significativa entre los grupos de casos y controles ($p=0.036$).

Vaxillaire M. et al⁵⁵ no determinaron diferencias significativas entre los grupos de casos y controles en 3 106 sujetos caucásicos en un estudio prospectivo (OR=0.7, IC=95%, 0.57-0.88). Estos resultados son compatibles con los obtenidos en nuestra investigación (OR=0.95).

Un único SNP puede causar una enfermedad mendeliana; no obstante, para las enfermedades complejas, los SNPs no suelen funcionar individualmente, sino que trabajan en asociación con otros SNPs para manifestarse clínicamente⁸. Un número limitado de estudios ha evaluado el riesgo común al combinar información de varios polimorfismos que predisponen genéticamente a la DM-II; en la mayoría los casos, los polimorfismos individuales sólo determinan un riesgo moderado, lo cual posee un valor clínico poco útil en la evaluación del riesgo genético a desarrollar la enfermedad. Un grupo de investigadores del Reino Unido evaluó el efecto combinado de múltiples alelos de susceptibilidad de tres SNPs comúnmente estudiados de forma individual (Lys23 de KCNJ11, Pro12 de PPAR- γ 2 y un alelo T en rs7903146 del TCF7L2). Los OR de los alelos individuales oscilaron entre 1.14 (95% IC, de 1.05 a 1.23) hasta 1.48 (95% IC, de 1.36 a 1.60). En este estudio no se encontró pruebas de la interacción SNP-enfermedad; sin

embargo, los riesgos de múltiples alelos fueron consistentes con un modelo multiplicativo. Cada alelo de riesgo adicional aumentó las probabilidades de diabetes tipo 2 en 1.28 veces (95% CI, de 1.21 a 1.35).²⁸

El análisis pareado de las frecuencias genotípicas obtenidas en nuestro trabajo no mostró diferencias significativas entre los grupos de casos y controles ($p=0.6$, IC=95%, 0.32 - 0.87); sin embargo, las frecuencias alélicas combinadas de los SNPs en estudio si permitieron identificar una diferencia significativa de los alelos 12Aa de *PPAR- γ 2* y 174C de *IL-6* en los grupos de casos y controles, $p=0.03$. Este hallazgo sugiere que el análisis combinado de SNPs permite dar una mejor resolución a la asociación que existe entre las secuencias genómicas con este tipo de enfermedades; sin embargo, debe desestimarse este resultado debido a que el grupo control del gen *IL-6* no cumplió con la condición de equilibrio de Hardy-Weinberg.

Otro de los genes relacionados a la DM-II más estudiados es la Calpaína 10 (*CAPN10*); en nuestro país se han realizado estudios para determinar las frecuencias alélicas de los polimorfismos más frecuentes de los genes *CAPN10* y *PPAR- γ 2*. Paredes M. (2005) analizaron 116 muestras de controles del SNP19 de *CAPN10* encontrando una frecuencia de 41.38% del alelo 1 (155 pb) y 58.62% del alelo 2 (187 pb, alelo más común)³⁷. Estos resultados cumplieron con el principio de equilibrio de Hardy-Weinberg y guardan relación con las frecuencias alélicas del alelo más frecuente (187 pb) en población mexicana (57%)³⁵. Estudios posteriores con este mismo gen han determinado las frecuencias alélicas del SNP19, 43.1% del alelo 1 (155 pb) y 56.9 % del alelo 2 (187 pb); del SNP43, 48.8% del alelo 1 (134 pb) y 51.2% del alelo 2 (152 pb); y del SNP63, 37.9% del alelo 1 (162 pb) y 51.2% del alelo 2 (192 pb).³⁸

El conocimiento de los polimorfismos genéticos que permiten la evaluación del riesgo genético a desarrollar la DM-II permitirá en un futuro desarrollar modelos complejos con potencial diagnóstico y pronóstico. Actualmente existen extensas revisiones que resumen los resultados epidemiológico-moleculares de la DM-II; sin embargo, los avances sustanciales que se han concretado en los últimos años han

ampliado considerablemente el espectro de búsqueda de nuevos genes que sirvan como marcadores moleculares de la enfermedad, con nuevas variantes recientemente identificadas. Es todavía un reto en países en vías de desarrollo implementar este tipo de ensayos a gran escala para poder disponer de información epidemiológico-molecular propia de nuestra región que permitan comparar y proponer marcadores moleculares en nuestra población.

Cada vez resulta más evidente que la base genética de la DM-II implica múltiples genes y que la interacción con otros loci de susceptibilidad y/o factores ambientales pueden resultar en efectos más sustanciales.

Algunos equipos de investigación concluyen que el tamaño de la población (mayor a 300 casos) y el número de SNPs analizados (mayor a 3 SNPs) son variables importantes a considerar para la estabilidad de los análisis de asociación en este tipo de estudios. ^{8, 51, 54}

VIII. CONCLUSIONES

En el estudio realizado en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos entre el periodo de tiempo comprendido desde marzo del 2012 hasta febrero del 2014 se alcanzaron las siguientes conclusiones:

1. Las frecuencias genotípicas del polimorfismo Pro12Ala del gen *PPAR-γ2* de la muestra analizada cumplieron con el principio de equilibrio de Hardy-Weinberg; sin embargo, las frecuencias genotípicas del polimorfismo 174G/C del gen *IL-6* de la muestra estudiada no cumplieron con dicha condición.
2. No se determinaron diferencias significativas entre las frecuencias alélicas de los SNPs individuales y la DM-II en los grupos de casos y controles en la muestra estudiada, $p > 0.05$.
3. Sobre la base de nuestros resultados, no puede sustentarse la postulación de los polimorfismos Pro12Ala del gen *PPAR-γ2* y 174G/C del gen *IL-6* como candidatos a marcadores moleculares de la DM-II en la muestra estudiada.

IX. RECOMENDACIONES

1. Se debe reproducir este tipo de ensayos en población local con el objetivo de generar mayores recursos bibliográficos que sustenten la postulación de estos marcadores moleculares.
2. Se sugiere considerar una población homogénea de mayor escala (>300 casos) con el objetivo de incrementar la confianza estadística de los resultados.
3. Se deben emplear otras técnicas además del PCR-RFLP que tengan una mejor resolución y que limite las posibilidades de error.
4. Se recomienda incluir otros genes como *CAPN10* en el análisis de asociación.
5. Es recomendable incluir en el análisis comparativo información sobre los parámetros bioquímicos como concentración de glucosa, perfil lipídico, insulina, etc.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Todd JA, Bell JI and McDevitt HO. HLA-DQ (beta) gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* (1987) 329: 99-604.
2. Cruz M, García-Mena J, López-Orduña E, Valladares A, Sánchez R, Wachter-Rodarte N, Aguilar-Gaytán R y Kumate J. Genes candidatos como posibles marcadores de susceptibilidad a Diabetes Tipo II. *REB* (2005) 24(3, 4): 81-86.
3. Morlett J, Esquivel T, Flores I, Zugasti A, De la Cruz G, Cecilia A. Marcadores moleculares para el diagnóstico temprano de la diabetes mellitus. Universidad Autónoma de Coahuila. Facultad de Medicina (2011) Disponible en: <http://www.postgradoeinvestigacion.uadec.mx/Documentos/AQM/AQM2/MARCADORES%20MOLECULARES%20PARA%20EL%20DIAGNÓSTICO%20TEMPRANO%20DE%20LA%20DIABETES%20MELLITUS.pdf> [Consultado el 18 de febrero del 2013]
4. Illig T, Bongardt F, Schopfer A, Muller-Scholz S, Rathmann W, Koenig W, Thorand B, Vollmert C, Holle R, Kolb H, Herder C and members of the Cooperative Research in the Region Augsburg (KORA). Significant Association of the Interleukin-6 Gene Polymorphisms C-174G and A-598G with Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metabol* (2004) 89(10): 5053-5058.
5. Ramírez-Bello J, Vargas-Alarcón G, Tovilla-Zárate C, Fragoso J. Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP): implicaciones funcionales de los SNP reguladores (rSNP) y de los SNP-ARN estructurales (srSNP) en enfermedades complejas. *Gaceta Médica de México*. 2013;149:220-8.
6. U.S. National Library of Medicine – National Institutes of Health. SNP. 2012 Disponible en: <http://www.nlm.nih.gov/visibleproofs/education/dna/snp.pdf> [Consultado el 26 de marzo del 2013]
7. Carlson, Bruce. SNPs — A Shortcut to Personalized Medicine. *Gen Eng & Bio News* (Mary Ann Liebert, Inc.) 2008, 28 (12).

8. Singh, Monica; Singh, Puneetpal; Juneja, Pawan Kumar; Singh, Surinder; Kaur, Taranpal. SNP–SNP interactions within APOE gene influence plasma lipids in postmenopausal osteoporosis. *Rheum Int* 2010 31 (3): 421–3.
9. Mohini J, Jeshpande J. Polymerase chain reaction: Methods, principles and application. *Int J Bio Res* 2010 1(5): 81-97.
10. Cheng Hong Y, Yu-Huei C and Li-Yeh C. A Natural PCR-RFLP Primer design for SNP Genotyping Using a Genetic Algorithm. *Int Multiconferences Eng Comp Scient* 2010 1: 17-19
11. H. Horaguchi. Hardy-Weinberg Equilibrium and Mixed Strategy Equilibrium in Game Theory. *Theor Econ Let* 2013 3(2): 85-89
12. Alpízar S. Diabetes Mellitus: Historia y Epidemiología. *Endocrinología Clínica, Manual moderno. 2da Edición (2005). Pag. 297-301.*
13. Asociación Latinoamericana de Diabetes (ALAD). Guías ALAD de diagnóstico, control y tratamiento de la Diabetes Mellitus tipo 2. 2013 Disponible en:
http://www.issuu.com/alad-diabetes/docs/guias_alad_2013
[Consultado el 25 de abril del 2014]
14. García F, Solís J, Calderón J, Luque E, Neira L, Manrique H, Cancino R, Castillo O, et al. Prevalencia de Diabetes Mellitus y factores de riesgo relacionados en una población urbana. *Rev Soc Peru Med Interna* 2007. 20(3): 90-94.
15. Susan L, Devan K, Christina B and Rongwey F. Screening Adults for Type 2 Diabetes: A Review of the Evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med* (2008)148: 855-868.
16. American Diabetes Association. Diagnosis and Classifications of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2014 37(S1): 81-90.
17. Horikawa Y, Oda N, Cox NJ, Li X, Orho-Melander M, Hara M, Hinokio Y, Lindner TH, Mashima H, Schwarz PE et al. Genetic variation in the gene encoding calpain 10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet* (2000) 26:163-75.
18. J.C. Wiebe, A.M. Wägner, F.J. Novoa Mogollón. Genética de la diabetes mellitus. *Nefrologia Sup Ext* 2011 2(1):111-9.

19. Khan CR. Knockout mice challenge our concepts of glucose homeostasis and the pathogenesis of diabetes. *Exp Diabetes Res* 2003 4: 169-182.
20. Tusié M, Bustos J, Castañeda P, Hernández O, Huerta R, et al. El componente genético de la diabetes tipo 2. *Mensaje Bioquímico XXXII* 2008 1: 9-66.
21. Eduardo L, Oscar R, Norma U, Olga L, Angel V. Polimorfismos genéticos asociados a la Diabetes Mellitus tipo II. *Rev Mex Cienc Farmaceutic* (2010) Vol. 41, Num. 4, Pag. 7-17.
22. R. Semple, V. Chatterjee, S. O'rahilly. PPAR gamma and human metabolic disease. *J Clin Invest* (2006) 116(3): 581-589.
23. Mollie A. Jay and Jun Ren. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) in Metabolic Syndrome and Type 2 Diabetes Mellitus. *Current Diabetes Rev* (2007) 3:33-39.
24. R. Valve, K. Sivenius and Meittinen. Two polymorphisms in the peroxisome proliferator activated receptor-gamma gene are associated with severe overweight among obese women. *J Clin Endocrinol Metabol* (1999) 84, 10: 3708-3712.
25. Kersten S, Desvergne B and Wahli W. Roles of PPARs in health and disease. *Nature* (2010) Vol. 405: 421-424.
26. Doney A, Fischer B, Frew D, Cumming A, Flavell D, World M, Montgomery H, Boyle D, Moris A and Palmer C. Haplotype Analysis of the PPARs gamma Pro12Ala and C1431T variants reveals opposing associations with body weight. *BMC Genet* (2002) 3:3-21.
27. Bouassida K, Chouchane L, Jellouli K, Chérif S, Haddad S, Gabbouj S, Danguir J. The Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma 2 (PPARg2) Pro-12Ala Variant: Lack of Association with Type 2 Diabetes in Obese and non Obese Tunisian Patients. *Diabetes Metab* (2005) 31:119-123.
28. Weedon M, McCarthy M, Hitman G, Walker M, Groves C, Zeggini E, Rayner W, Shields B, Owen K, Hattersley A, Frayling T. Combining Information from Common Type 2 Diabetes Risk Polymorphisms Improves Disease Prediction. *Plos Med* (2006) Vol. 3, Issue10, e374.

29. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* (1998) 102: 1369-76.
30. Klipstein-Grobusch K, Möhlig M, Spranger J, Hoffmann K, Rodriguez F, Sharma A, Klaus S, Pfeiffer A, Boeing H. Interleukin-6 G-174G/C promoter polymorphism is associated with obesity in the EPIC-Potsdam Study. *Obesity (Silver Spring)*. Jan (2006); 14(1):14-8.
31. Goyenechea E, Parra M, Martínez J. Implicación de la IL-6 y su polimorfismo -174G>C en el control del peso corporal y en las complicaciones metabólicas asociadas a la obesidad. *An. Sist. Sanit. Navar* (2005); 28 (3): 357-366.
32. Pérez F, Soto F, López P, Eyzaguirre F, Codner E. Polimorfismo -174G/C del gen promotor de Interleuquina 6 en mujeres con diabetes mellitus tipo 1. *Rev Med Chile* (2011) 139: 158-164.
33. Huerta D, Acosta O, Pajuelo J. Polimorfismo de los genes PPAR- γ 2 e IL-6 -174G/C y su asociación con obesidad, sobrepeso, grasa corporal y el riesgo de enfermedad cardiovascular, en una población adulta de Lima. *An Fac med* (2012); 73 Supl 1.
34. Guzmán-Guzmán I, Muñoz J, Flores-Alfaro E, Salgado-Goytia L, Salgado-Bernabé A and Parra-Rojas I. Interleukin-6 gene promoter polymorphism and cardiovascular risk factors. A family study. *Dis Mark* (2010) 28; 29-36.
35. Horikawa Y, Oda N, Li X, Orho-Melander M, Hara M, Hinokio Y, Lindner TH, Mashima H, Schwarz P, Del Bosque-Plata L, Yoshieuchie I, Colilla S. Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nature genetics* (2000) 26: 163-175.
36. Paredes M, Lizaraso F, Rodríguez E, Lissón R, Rodríguez E, Calderón J, Fujita R. Determinación de la frecuencia alélica del SNP 19 del gen Calpaína 10 (CAPN10) y factores de riesgo de Diabetes 2 en población peruana. *Rev Horizon Med* (2005) 5: 13-16.
37. Paredes M, Lizaraso F, Lissón R, Rodríguez E, Calderón J, Rodríguez E, García G y Fujita R. Variación y distribución genética de los SNP's 19, 43 Y

- 63 del gen de susceptibilidad de diabetes tipo 2 Calpaina 10 (Capn10) en la población peruana. *Rev Horizon Med* (2005) 5 (2): 7-11.
38. Ishihara K, Hirano T. IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* (2002) 3: 357-68.
39. Willer J, Bonnycastle L, Conneely N, Duren W, Jackson A, Scoot L, Narisu N, Chines S, Sckol A, et al. Screening of 134 Single Nucleotide Polimorphysm (SNP) Previously Associated with Type 2 Diabetes Replicates Association with 12 SNPs in Nine Genes. *Diabetes* 2007 56: 256 – 264.
40. AW Drong, CM Lindgren and MI McCarthy. The Genetic and Epigenetic Basis of Type 2 diabetes and Obesity. *Clin Pharm Therap* 92 (6): 707-715.
41. Márquez J, Salazar L. Epigenomic influence of the physical activity/inactivity in the origin of type 2 diabetes. *Rev Int Cienc Deporte* 16(5): 1-20.
42. Dabelea D, Hanson RL, Lyndsay RS, Imperatore G, Bennet PH, et al. Intrauterine exposure to diabetes conveys risks for type 2 diabetes and obesity: a study of discordant sibships. *Diabetes* 2000 49: 2208–2211.
43. Kuehnen P. et al. An Alu element-associated hypermethylation variant of the POMc gene is associated with childhood obesity. *PLoS Genet* 2012 8(3): 197-209.
44. Chakravarthy M. & Booth F. Eating, exercise, and “thrifty” genotypes: connecting the dots toward an evolutionary understanding of modern chronic diseases. *J Appl Physiol*, 2004 96; 3–10.
45. Neel JV. Diabetes mellitus a “thrifty” genotype rendered detrimental by “progress”? *Am J Hum Genet* 1962 14: 352-353.
46. Simmons R. Developmental origins of adult metabolic disease: concepts and controversies. *Trends Endocrinol Metab* 2005 16(8): 390-394.
47. Ravelli G, Stein Z and Susser M. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *N Engl J Med* 1976 295(7): 349-353.
48. Doherty S, Mann M, Tremblay D, Bartolomei S and Schultz M. Differential effects of culture on imprinted H19 expression in the preimplantation mouse embryo. *Biol Reprod* 2000; 62(6): 1526-1535.

49. Oré R, Huerta D, Valdiviezo L, Polo S, Bardales R et al. Polimorfismo del gen PPAR-gamma2 y su asociación con la adiposidad, resistencia a la insulina y perfil lipídico en una población peruana. *An Fac Med Lima* 2008; 69 Supl 1.
50. Byung Cheol L, Hye-jung L, Joo-Ho C et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 Pro12Ala polymorphism is associated with reduced risk for ischemic stroke with type 2 diabetes. *Neuroscience Letters* 410 (2006) 141–145.
51. Hebe N, Gurdeep S, Anne-Helen H, Jan Y, Manjinder S et al. The Association Between the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-g2 (PPARG2) Pro12Ala Gene Variant and Type 2 Diabetes Mellitus: A HuGE Review and Meta-Analysis. *Am J Epidemiol* 2010;171:645–655.
52. Hara K, Yamauchi T, Kubota N, et al. The role of PPARg in the onset of type 2 diabetes [in Japanese]. *Nippon Yakurigaku Zasshi*. 2003;122(4):317–324.
53. Yen C, Beamer B, Negri C et al. Molecular scanning of the human peroxisome proliferator activated receptor c (hPPARg) gene in diabetic Caucasians: identification of a Pro12Ala PPARg 2 missense mutation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;241(2):270–274.
54. Lohmueller K, Pearce C, Pike M et al. Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. *Nat Genet*. 2003;33(2):177–182.
55. Vaxillaire M, Jacques V, Christian D, Christine P, Stephane C et al. Impact of Common Type 2 Diabetes Risk Polymorphisms in the DESIR Prospective Study. *Diabetes* 57:244–254, 2008.
56. Sham Pak (1999). Association between a complex disorder and a marker. In: *Statistics in Human Genetics*, edited by Nicki Dennis, London: Arnold Publishers Co, pp: 161-183.
57. Hunter D. The future of molecular epidemiology. *Inter J Epidemiol*. 1999; 28 (S): 1012-14.
58. Alarcon J. Epidemiología, conceptos, usos y perspectivas. *Rev Peru Epidemiol*. 2009; 13 (1)

59. Wong P, Puray M, Gonzales A, Sevilla CR. Epidemiología molecular de la tuberculosis en el Perú. Rev Peru Epidemiol. 2011. 15 (1): 11
60. 18° Asamblea Médico Mundial, Helsinki, Finlandia, Junio 1964. Disponible en: <http://www.iacs.aragon.es/econocimiento/documentos/ceica/2013-declaracion-helsinki-brasil.pdf>
- [Consultado el 17 de junio del 2014]

XI. ANEXOS

Anexo N° 1: Otros tipos de Diabetes Mellitus (ALAD)¹³

Defectos genéticos de la función de la célula beta	Defectos del cromosoma 20, HNF-4alfa del cromosoma 7 (antes MODY 1) , glucoquinasa del cromosoma 12 (antes MODY 2), HNF-1alfa del DNA mitocondrial (antes MODY 3) y otros.
Defectos genéticos en la acción de la insulina	Resistencia a la insulina tipo A, leprechaunismo, síndrome de Rabson-Mendenhall, diabetes lipoatrófica y otros.
Enfermedades del páncreas exocrino	Pancreatitis, trauma del páncreas, pancreatectomía, neoplasia del páncreas, fibrosis quística, hemocromatosis, pancreatopatía fibrocalculosa y otros.
Endocrinopatías	Acromegalia, síndrome de Cushing, glucagonoma, feocromocitoma, hipertiroidismo, somatostinoma, aldosteronoma y otros.
DM inducida por drogas o químicos	Vacor, pentamidina, ácido nicotínico, glucocorticoides, hormonas tiroideas, diazóxido, agonistas betaadrenérgicos, tiazidas, fenitoína, alfa-interferón y otros.
Infecciones	Rubeola congénita, citomegalovirus y otros.
Formas poco comunes	Síndrome del “hombre rígido” (stiff-man syndrome),

de diabetes mediada
inmunológicamente

anticuerpos contra el receptor de la insulina y otros.

Otros síndromes
genéticos alguna vez
asociados con
diabetes

Síndrome de Down, síndrome de Klinefelter, síndrome de Turner, síndrome de Wolfram, ataxia de Friedreich, corea de Huntington, síndrome de Laurence Moon Beidel, distrofia miotónica, porfiria, síndrome de Prader Willi y otros.

Anexo N° 2: Otros polimorfismos relacionados con la DM-II (Willer et al.).³⁹

Gen	dbSNP ID	Gen	dbSNP ID	Gen	dbSNP ID
<i>ABCA1</i>	rs2020927	<i>HNFI1/TCF1</i>	GE117881_360	<i>PKLR</i>	rs1052176
<i>ABCC8</i>	rs1799854		GE117884_349		rs1052177
	rs1799858		rs1169289		rs2071053
	rs1801261		rs1800574		rs3020781
	rs2074308		rs1920792	<i>PPARG</i>	rs1801282
	rs2283257		rs2178463		rs3856806
	rs4148628		rs2393792	<i>PPARGC1A</i>	rs3755863
	rs4148643		rs2701175		rs8192678
	rs4148646	<i>HSD11B1</i>	rs12086634	<i>PPP1R3A</i>	rs1799999
	rs757110	<i>HTR2C</i>	rs3813929	<i>PRKCZ</i>	rs436045
	rs8192692	<i>IDE</i>	rs4646953	<i>PTGS2</i>	rs20417
<i>ABCC9</i>	rs1283802	<i>IL6</i>	rs1800795		rs2066826
<i>ACDC</i>	lle164Thr		rs1800797	<i>PTPN1</i>	rs2282146
	rs1501299	<i>IL6R</i>	rs8192284		rs16995309
	rs16861194	<i>INS</i>	rs3842752		rs718630
	rs17300539	<i>INSR</i>	rs1799816		rs2206656
	rs2241766		rs2860177		rs3787345
	rs266729		rs2860178		rs4811078
<i>ADCYAP1</i>	rs2856966		rs7252268		rs718049
<i>ADRB2</i>	rs1042711	<i>IPF1</i>	ipf1_2		rs941798
	rs1042714	<i>IRS1</i>	rs12053536		rs718050
<i>ADRB3</i>	rs4994		rs13306465	<i>PYY</i>	rs162430
<i>AKR1B1</i>	rs759853		rs1801123	<i>RETN</i>	rs1862513
<i>ALDOB</i>	rs506571		rs1801278	<i>SLC2A1</i>	rs841853
<i>APOD</i>	rs2280520	<i>IRS2</i>	rs1805097	<i>SLC2A2</i>	rs5398
<i>BCHE</i>	rs1803274	<i>ITGB3/GPIIIa</i>	rs5918		rs5400
<i>CAPN10</i>	rs2975760	<i>KCNJ11</i>	rs5210		rs5404
	rs3792267		rs5218		rs5406
	rs5030952		rs5219		rs6785803
<i>CASQ1</i>	rs2275703	<i>KCNJ9</i>	rs2180752	<i>SORBS1</i>	rs2281939
	rs617599		rs2737705	<i>SOS1</i>	rs7577088
	rs617698		rs2753268	<i>SPINK</i>	rs17107315
<i>CD38</i>	rs1800561	<i>LEP</i>	rs2278815	<i>SREBF1</i>	rs2297508
<i>COG2</i>	rs1051038	<i>LIPC</i>	rs8192701	<i>TNF</i>	rs1799724
<i>CRP</i>	rs2794521	<i>LPL</i>	rs285		rs1800610
<i>ENPP1</i>	rs1044498	<i>LTA</i>	rs1041981		rs1800629
<i>FABP2</i>	rs1397613	<i>MCP1</i>	rs3760399	<i>UCP1</i>	rs10011540
<i>FRDA</i>	rs2498429	<i>MET</i>	rs38848		rs2270565
<i>GCGR</i>	rs1801483		rs41736	<i>UCP2</i>	rs659366
<i>GFPT2</i>	rs2303007	<i>NEUROD1</i>	rs1801262		rs660339
<i>GNB3</i>	rs5443	<i>NOS3</i>	rs1799983	<i>UCP3</i>	rs1800849
<i>GYS1</i>	rs8103451	<i>PAX4</i>	rs2233578	<i>UTS2</i>	rs2890565
<i>HFE</i>	rs1799945	<i>PCK1</i>	rs2071023	<i>VLDLR</i>	rs2242103
	rs1800562			<i>WFS1</i>	rs1801208
					rs734312
				<i>WNT5B</i>	rs2270031
					rs2270036

Anexo N° 3: Operacionalización de variables

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	TIPO DE VARIABLE	DIMENSIÓN DE LA VARIABLE	UNIDADES DE MEDIDA
DM-II	La DM-II es una enfermedad poligénica. Se han descrito más de 250 genes relacionados con esta enfermedad.	Enfermedad	Cualitativa	Sujeto sano Paciente con diagnóstico clínico de DM-II	Ficha de registro
Polimorfismo Pro12Ala del gen <i>PPAR-γ2</i>	Diversos estudios han determinado una asociación significativa entre un polimorfismo de este gen con la DM-II	Candidato a marcador molecular	Cualitativa	Alelo Pro (C) – Normal Alelo Ala (G) – Riesgo DM-II	154 pb 131 pb
Polimorfismo 174G/C del gen <i>IL-6</i>	Diversos estudios han determinado una asociación significativa entre un polimorfismo de este gen con la DM-II	Candidato a marcador molecular	Cualitativa	Alelo C – Protector DM-II Alelo G – Normal	198 pb 140 pb

Anexo N° 4: Método de purificación de ADN FTA Cards Whatman®

- Depositar 12 punch de la muestra de sangre total en un tubo de 2 ml con tapa.
- Agregar 300 uL de solución FTA®.
- Mezclar la suspensión con ayuda de un vortex por 2 minutos, dejar en reposo por 2 minutos.
- Repetir el paso anterior 2 veces.
- Descartar el sobrenadante.
- Agregar 200 uL de solución FTA®.
- Mezclar la suspensión con ayuda de un vortex por 2 minutos, dejar en reposo por 2 minutos.
- Repetir el paso anterior 2 veces.
- Descartar el sobrenadante.
- Agregar 200 uL de solución FTA®.
- Mezclar la suspensión con ayuda de un vortex por 2 minutos, dejar en reposo por 2 minutos.
- Repetir el paso anterior 2 veces.
- Descartar el sobrenadante.
- Añadir 300 uL de buffer TE (10mM Tris-HCl, 0.1mM EDTA, pH 8.0)
- Mezclar la suspensión con ayuda de un vortex por 2 minutos, dejar en reposo por 2 minutos.
- Repetir el paso anterior 2 veces.
- Descartar el sobrenadante.
- Añadir 200 uL de buffer TE (10mM Tris-HCl, 0.1mM EDTA, pH 8.0)
- Mezclar la suspensión con ayuda de un vortex por 2 minutos, dejar en reposo por 2 minutos.
- Repetir el paso anterior 2 veces.
- Descartar el sobrenadante.
- Añadir 200 uL de buffer TE (10mM Tris-HCl, 0.1mM EDTA, pH 8.0)

- Mezclar la suspensión con ayuda de un vortex por 2 minutos, dejar en reposo por 2 minutos.
- Repetir el paso anterior 2 veces.
- Descartar el sobrenadante.
- Dejar secar a 37°C por 24 horas.

Anexo N° 5: Protocolos de amplificación y restricción

Polimorfismo Pro12Ala del gen *PPAR-γ2*

Master mix: H₂O PCR: 9.04uL, Buffer10x: 1.2uL, dNTPs 2.5mM: 0.96uL, MgCl₂ 50mM; 0.36uL, PrimerF 10uM: 0.12uL, PrimerR 10uM: 0.12uL, Taq Platinum: 0.2uL, ADN punch: 4 unid.

Ciclos PCR: 94°C x 5min, 36 ciclos (94°C x 1min, 55°C x 1min, 72°C x 1min), 72°C x 10 min

Restricción: H₂O PCR: 8.0uL, BufferTango10X: 1.0uL, HhaI 10U/uL: 1.0uL, ADN amplificado: 5uL

T° Incubación: 37°C x 16 horas

Polimorfismo 174G/C del gen *IL-6*

Master mix: H₂O PCR: 8.80uL, Buffer10x: 1.2uL, dNTPs 2.5mM: 0.96uL, MgCl₂ 50mM; 0.6uL, PrimerF 10uM: 0.12uL, PrimerR 10uM: 0.12uL, Taq Platinum: 0.2uL, ADN punch: 3 unid.

Ciclos PCR: 94°C x 10min, 35 ciclos (94°C x 1min, 55°C x 1.5min, 72°C x 1min), 72°C x 10 min

Restricción: H₂O PCR: 3.8uL, BufferTango10X: 1.0uL, SfaNI (Lwel) 10U/uL: 0.2uL, ADN amplificado: 5uL

T° Incubación: 37°C x 20 horas