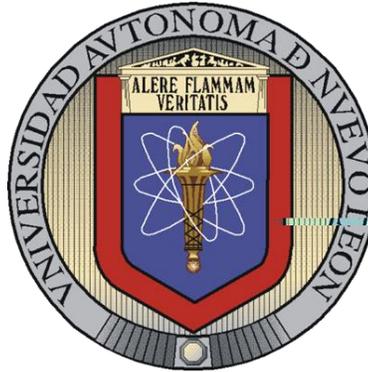


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**ANÁLISIS GENÉTICO Y ECOLÓGICO DE UNA POBLACIÓN
MESTIZA MEXICANA DEL NORESTE CON DIABETES MELLITUS
TIPO 2**

Por

M en C. ROXANA ALICIA RIVERA PRIETO

**Como requisito parcial para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en Biotecnología**

Noviembre, 2005

**ANÁLISIS GENÉTICO Y ECOLÓGICO DE UNA POBLACIÓN
MESTIZA MEXICANA DEL NORESTE CON DIABETES MELLITUS
TIPO 2**

Aprobación de la Tesis:

Dr. Ricardo M. Cerda Flores
Asesor Externo

Dr. Benito Pereyra Alférez
Asesor Interno

Dr. Carlos E. Hernández Luna
Secretario

Dr. Luis J. Galán Wong
Vocal

Dr. Hugo Alberto Luna Olvera
Vocal

Dr. Roberto Mercado Hernández
Vocal

Dra. María Julia Verde Star
Subdirector de la División de Estudios de Posgrado

INSTITUCIONES PARTICIPANTES EN EL PROYECTO:

- 1.- Centro de Investigación Biomédica del Noreste.
Instituto Mexicano del Seguro Social.
- 2.- Instituto de Biotecnología.
Facultad de Ciencias Biológicas (UANL).
- 3.- Unidad de Medicina Familiar #7, IMSS.
- 4.- Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genética.
Departamento de Bioquímica.
Facultad de Medicina, UANL.
- 5.- Cuerpo Académico de Cronicidad y Auto-cuidado.
Facultad de Enfermería, UANL.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Mexicano del Seguro Social quien a través del Centro de Investigación Biomédica del Noreste me apoyó como becaria de investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a quien agradezco el apoyo financiero brindado.

Al Dr. Ricardo M. Cerda Flores por proporcionarme la dirección, el consejo y todo el apoyo necesario para la realización de esta investigación.

A La Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, y al Dr. Benito Pereyra Alférez por su valioso apoyo en la dirección y revisión del presente trabajo.

Al Comité de Tesis, por sus valiosas sugerencias en la revisión de la misma.

A la Clínica de Medicina Familiar No. 7, a la Facultad de Enfermería de la UANL y a los pacientes, que contribuyeron proporcionándome las muestras hematológicas necesarias para el presente proyecto.

A la Dra. Rocío Ortiz López y al Dr. Hugo A. Barrera Saldaña por brindarme la oportunidad de trabajar en la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Génica (ULIEG) de la UANL. De igual forma a los químicos Víctor M. Ortiz Gálvez y José A. Gaspar Belmonte por compartir conmigo su experiencia profesional en el laboratorio, la cual fue muy valiosa en la realización de la presente investigación.

A mi compañera y amiga Ana Laura Calderón por brindarme su compañía, comprensión y apoyo.

A mi familia y de manera muy especial a los autores de mi vida, el Sr. Raúl Rivera Arroyo y la Sra. Victoria Prieto Ramírez por su incondicional apoyo y comprensión.

Con todo mi amor para mis hijos:

Rodolfo, Daniel y David

*Por quienes todo esfuerzo
vale la pena.*

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
1. RESUMEN Y ABSTRACT	1
2. INTRODUCCION	3
3. HIPÓTESIS	5
4. OBJETIVOS	6
4.1. Objetivo General	6
4.2. Objetivos Específicos	6
4.2.1 Estructura genética	6
4.2.2 Estructura ecológica	6
5. ANTECEDENTES	7
5.1 Diabetes melitus	7
5.1.1 Epidemiología	7
5.1.2 Tipos de diabetes	8
5.1.3 Sistema de control de la glicemia normal	8
5.1.4 Síntomas y complicaciones	9
5.1.5 Genética de la diabetes	11
5.2 Polimorfismo genético y marcador genético	11
5.2.1 Generalidades	12
5.2.2 Polimorfismos de DNA	12
5.2.2.1 RFLPs	12
5.2.2.2 DNA satélite	12
5.2.3 Locus D7S820	14
5.2.4 Locus D16S539	15
5.2.5 Locus D13S317	17
5.3. Genética Forense y perfiles de DNA	19
5.3.1 Huella genética	19
5.3.2 Perfiles unilocus de DNA	19
5.3.3 Aplicaciones de los perfiles de DNA	20
5.4 Estructura Biológica de las poblaciones	20
5.4.1. Estructura Genética	20

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Cromosoma 7 y localización del locus D7S820.	15
2. Cromosoma 16 y localización del locus D16S539.	16
3. Cromosoma 13 y localización del locus D13S317	18
4. Metodología General de Laboratorio realizada para el Análisis de 3 STRs en una muestra poblacional con DM2	26
5. Verificación de la calidad y concentración aproximada del ADN en gel de agarosa al 0.8%.	27
6. Verificación de la amplificación de 3 STRs en gel de de agarosa al 2%	32
7. Tipificación de 3 STRs en gel de poliacrilamida al 6%.	33
8. Distribución de las frecuencias alélicas del D13S317 en una población seleccionada con DM2 y una población aleatoria	34
9. Distribución de las frecuencias alélicas del D7S820 en una población seleccionada con DM2 y una población aleatoria.	35
10. Distribución de las frecuencias alélicas del D16S539 en una población seleccionada con DM2 y una población aleatoria.	35
11. Distribución de las poblaciones: Española (s), Indígena (i), Africana (a), Mestiza sin DM2 (mn) y con DM2 (dm) para tres componentes principales basados en 3 STRs.	40

12. Ubicación de las zonas de la República Mexicana donde
nacieron los abuelos de las personas con DM2.42

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Número de repeticiones de los alelos reportados para el marcador D7S820, su tamaño en pares de bases y la estructura de las repeticiones.	15
II. Número de repeticiones de los alelos reportados para el marcador D16S539, su tamaño en pares de bases y la estructura de las repeticiones.	17
III. Número de repeticiones de los alelos reportados para el marcador D13S317, su tamaño en pares de bases y la estructura de las repeticiones.	18
IV. Secuencia de los iniciadores para PCR de los marcadores D7S820, D16S539 y D13S317 tanto Forward (sentido) como Reverse (antisentido)	28
V. Volúmenes de los componentes de la PCR para los STRs D16S539, D7S820 D13S317.	28
VI. Programa de amplificación para SilverSTR™ Triplex (D16S539, D7S820 y D13S317)	29
VII. Frecuencias alélicas para los locus D7S820, D13S317 y D16S539 en población seleccionada con DM2 y población aleatoria del Noreste de México.	34
VIII. Frecuencias genotípicas de los locus D7S820, D13S317 y D16S539 en población seleccionada con DM2 y población aleatoria del Noreste de México	36
IX. Número de loci heterocigóticos (NHL) para los Microsatélites D7S820, D13S317 y D16S539 en población con DM2 y aleatoria.	37

X.	Estadísticos forenses para los microsatélites D7S820, D13S317 y D16S539 en población con DM2 y aleatoria..	38
XI.	Porcentaje de contribución de Españoles, Amerindios y Africanos al pool genético en Población mestiza aleatoria y seleccionada con DM2 en el Noreste de México.	39
XII.	Estimación del porcentaje de inmigración de acuerdo al lugar de nacimiento de una población de individuos con DM2	41
XIII.	Comparación del lugar de nacimiento de los abuelos paternos y maternos de una población de individuos con DM2.	43
XIVa.	Características ecológico-demográficas de una población seleccionada con DM2.	44
XIVb.	Características ecológico-demográficas de una población seleccionada con DM2.	45
XV.	Presencia de diabetes en la familia de los individuos de una población seleccionada con DM2.	46

1. RESUMEN

La DM2 es la primera causa de mortalidad en México y el estado de Nuevo León tiene la mayor tasa de mortalidad en el país. En cuanto a prevalencia, México tiene 10.9% y en nuestro estado 9.7%. En la presente tesis se tomó una población seleccionada con DM2 (diabetes mellitas tipo 2) debido a su alta frecuencia en México. La homogeneidad genética es un importante factor de la estructura genética de las poblaciones. Este concepto significa que hay poca variabilidad en la población y que por lo tanto no existe subestructura o estratificación poblacional. Para determinar si existe homogeneidad genética en una población con DM2 se plantearon los siguientes objetivos: 1) conocer la estructura genética de una población mestiza (n =103) con DM2 y, 2) comparar esta población con una población aleatoria (n =143) previamente analizada. Para alcanzar estos objetivos se utilizaron 3 STRs (secuencias cortas repetidas en tandem): D16S539, D7S820 y D13S317, las cuales se amplificaron por PCR y posteriormente se tipificaron en geles de poliacrilamida teñidos con plata. Las frecuencias alélicas y genotípicas de los 3 STRs de las poblaciones con DM2 y aleatoria estuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg y fueron similares. El número de loci heterocigóticos (NLH) en la población con DM2 y aleatoria fue también similar. En cuanto a las contribuciones ancestrales (española, amerindia y africana), las comparaciones entre población con DM2 y aleatoria fueron similares. El análisis de los componentes principales explicó un 98% de la variabilidad, siendo las poblaciones con DM2 y aleatoria similares e intermedias con respecto a las 3 poblaciones ancestrales. En cuanto a estadísticos forenses [heterocigosidad, contenido de información polimórfica (PIC), poder de discriminación (PD) y poder de exclusión (PE)], fueron similares en ambas poblaciones. Estos resultados nos indican la existencia de homogeneidad genética en la población con DM2, y esto facilitará la búsqueda de genes candidatos e investigación farmacogenómica a través de los nuevos estudios de asociación (admixture mapping).

ABSTRACT

DM2 is the first cause of death in Mexico and Nuevo Leon has the highest death rate in the country. About prevalence, Mexico have 10.9% and in our state we have 9.7%. On this research a diabetes mellitus type 2 (DM2) population was took because its high frequency in Mexico. Genetic homogeneity is an important factor in population genetics. This concept mean that, there is a little variability into the population and therefore there is not substructure or population stratification. To determine if exist genetic homogeneity in a DM2 population we proposed the following aims: 1) to know the genetic structure of a mestizo population (n= 103) with DM2 and, 2) to compare this population with a random population (n= 143) previously analyzed. We analyzed and categorized 3 STRs (D16S539, D7S820 and D13S317) in polyacrilamide gels dyed with silver. The allelic and genotypic frequencies for the 3 STRs in the DM2 and random population were in Hardy-Weinberg equilibrium and similar. The number of heterocigosity loci (NLH) in the DM2 and random population were also similar. About the ancestral contributions (spanish, amerindian and african), the comparison between the DM2 and random populations were similar. The analysis of principal components explained 98% of the variability and the DM2 and random populations being similar and intermediate with respect the 3 ancestral populations. With respect to forensic statistics[heterocigosity, polimorfic information content (PIC), power of discrimination (PD) and power of exclusion (PE)], were similar in both populations. These results indicate genetic homogeneous in the population with DM2, and so these findings will facilitate the search of candidate genes and pharmacogenomics research through association studies (admixture mapping).

2. INTRODUCCIÓN

El presente proyecto es la parte inicial de un estudio multicéntrico que tiene como finalidad la búsqueda de genes asociados a la DM2 en poblaciones mexicanas. Como primer paso nos propusimos determinar si existe homogeneidad genética en una población con DM2 y compararla con una población aleatoria previamente analizada utilizando para ello 3 marcadores STRs con un alto grado de polimorfismo. La homogeneidad genética es un factor importante de la estructura genética de las poblaciones. Este concepto significa que hay poca variabilidad en la población y que por lo tanto no existe subestructura o estratificación poblacional. En México se han realizado estudios en poblaciones aleatorias (Cerde-Flores *et al.*, 1991; Cerde-Flores *et al.*, 1994; Cerde-Flores y Dávila-Rodríguez. 2000; Cerde-Flores *et al.*, 2002; Cerde-Flores *et al.*, 2002b; Cerde-Flores *et al.*, 2002c; Luna-Vázquez *et al.*, 2003) y se ha encontrado homogeneidad genética. Sin embargo, no se han realizado este mismo tipo de estudios en poblaciones seleccionadas con enfermedades poligénicas y degenerativas como la DM2. Es importante probar homogeneidad genética en estudios de asociación porque en estudios epidemiológicos en donde se busca asociar un gen a una enfermedad, se asume que las poblaciones bajo estudio (casos y controles) son homogéneas, pero puede suceder que no lo sean y se trate de poblaciones estratificadas que incluyen subpoblaciones con diferentes frecuencias alélicas, inclusive para el gen candidato. Esto último provocaría confusión en los resultados, por lo que la asociación establecida entre el gen candidato y la enfermedad sería erróneamente estimada. Se puede eliminar esta fuente de confusión determinando si estas poblaciones son en realidad homogéneas (Satten *et al.*, 2001).

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es un problema de salud pública de gran relevancia a nivel mundial por sus consecuencias e implicaciones médicas y socioeconómicas (Tusié. 1997). En los últimos años ha aumentado su prevalencia en la mayoría de los países. De acuerdo a la última información disponible, México se ubica entre los diez primeros países en cuanto al número de casos registrados a nivel mundial (Diabetes Atlas. 2003). A nivel nacional se estima una prevalencia de 10.9% (Dirección General de Epidemiología. 2001) y en Nuevo León de 9.7% (Encuesta Nacional de Salud. 2000). Además, esta enfermedad ocupó la primera causa de muerte en México a partir del 2001 (Principales causas de mortalidad general México. 2001 y 2003). Dado lo anterior, requieren atención prioritaria las acciones dirigidas a la prevención, detección y adecuado control de la enfermedad. Dentro del área de prevención adquiere cada vez mayor importancia la búsqueda de genes asociados o de susceptibilidad de la DM2, ya que la identificación de cuántos y cuáles son los genes que predisponen al desarrollo de este padecimiento es fundamental para el diseño e implementación de mejores

herramientas terapéuticas y de pronóstico. Por lo tanto, posterior a este estudio, el siguiente paso sería realizar estudios encaminados a la búsqueda de genes asociados en poblaciones mexicanas mediante el método AMHP “Association mapping in homogeneous populations” (Rannala. 2000).

3. HIPOTESIS

La estructura genética de los individuos con DM2 presenta homogeneidad genética y una estructura genética similar a la población aleatoria del Noreste de México previamente analizada.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Conocer la estructura genética de una población mestiza del Noreste de México con DM2, compararla con una muestra aleatoria mediante el uso de 3 STRs (D13S317, D16S539 y D1S820), así como determinar algunos parámetros ecológicos de la misma y formar un Banco de DNA de personas con DM2.

4.2. Objetivos específicos.

4.2.1 Estructura genética.

- a) Obtener las frecuencias alélicas y genotípicas de 3 marcadores STRs: D13S317, D16S539 y D1S820.
- b) Determinar si los 3 STRs están en equilibrio de Hardy-Weinberg.
- c) Calcular el número de loci heterocigóticos (NHL) para los 3 STRs estudiados.
- d) Calcular el porcentaje de mezcla génica de la población con y sin DM2.
- e) Calcular los análisis de estadísticos forenses: heterocigosidad (H), poder de exclusión (PE), poder de discriminación (PD) y contenido de información polimórfica (PIC).
- f) Comparar la estructura genética de esta población seleccionada versus la estructura genética de un estudio previo con población aleatoria en el Noreste de México (Cerde-Flores y cols. 2000c).

4.2.2 Estructura Ecológica

Describir para la población con DM2 algunos parámetros ecológico-demográficos: a) edad; b) lugar de nacimiento; b) estado civil; c) número de hijos; d) edad de diagnóstico; e) tiempo de padecer la enfermedad; f) tratamiento médico; g) peso y estatura; h) índice de masa corporal (IMC); j) escolaridad. También se analizará el porcentaje de migración en función del lugar de nacimiento de los cuatro abuelos del paciente.

5. ANTECEDENTES

5.1 Diabetes mellitus

5.1.1 Epidemiología

De acuerdo a la FID (Federación Internacional de Diabetes), se calcula que la cifra de personas con diabetes en el mundo aumentará desde los 194 millones que había en el 2003 hasta alcanzar los 333 millones en el año 2025, debido en gran medida al crecimiento de la población, el envejecimiento, la urbanización y la vida sedentaria.

De acuerdo a los últimos datos reportados en el 2003 por la Federación Internacional de Diabetes, nuestro país se ubica entre los de mayor número de casos registrados a nivel mundial, ocupando el noveno lugar con 4.4 millones (20-79 años) y se estima que para el 2025 aumentará hasta 9 millones. En cuanto a prevalencia y para el mismo año la misma Federación estima un valor de 7.4% y para el 2025 de 10.3%. (Diabetes Atlas. 2003).

En México la mortalidad por DM2 ha mostrado un incremento sostenido durante las últimas décadas manteniéndose en tercer lugar hasta 1999, pero en el 2001, ya ocupaba el primer lugar con 11.3% y una tasa de 48.96* (Principales causas de mortalidad general México. 2001), variando estos valores al considerar sólo a los hombres (9.1% y 44.6*) y a las mujeres (14% y 54.0*) (Estadísticas de mortalidad en México 2001.). Los últimos datos disponibles del 2003 arrojan una tasa general de mortalidad de 56.73* (Principales causas de mortalidad general, México 2003).

En el Estado de Nuevo León la mortalidad es alta, ya que en un estudio realizado sobre mortalidad causada por DM2 en diferentes delegaciones del Instituto Mexicano del Seguro Social (1979-1987), la delegación de Nuevo León presentó la mayor tasa de mortalidad ajustada por edad (45.29) en todo el país (Vázquez- Robles y Escobedo. 1990).

En cuanto a prevalencia a nivel nacional y en mayores 20 años, se estimó un valor total de 7.5% (mujeres 7.8% y hombres 7.2%), y para Nuevo León de 9.7% ocupando nuestro estado el segundo lugar a nivel nacional, superado solamente por Coahuila que posee el 10.1% (Encuesta Nacional de Salud. 2000). Datos más recientes

* por cada 100,00 habitantes

muestran que ésta va en aumento ya que en el 2001 se estimó una prevalencia Nacional de 10.9% (Dirección General de Epidemiología, 2001).

Con respecto a incidencia, esta enfermedad alcanza el 8% a nivel Nacional (Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas. 1994). De acuerdo a lo anteriormente mencionado, vemos que la DM2 constituye un grave problema de salud pública en el país por lo que requiere una atención prioritaria.

5.1.2 Tipos de diabetes

La diabetes es reconocida como un grupo de desordenes heterogéneos en donde los elementos comunes son hiperglicemia e intolerancia a la glucosa, debido a insuficiencia en la secreción de insulina, disminución de la efectividad de la insulina (resistencia a la insulina) o ambas (Diabetes Atlas. 2003) .

Las formas más comunes de diabetes son el tipo 1 (DM1) y el tipo 2 (DM2). Otros tipos de diabetes, como la diabetes gestacional y algunos otros tipos causados por la mutación específica de un simple gen son muy raras (Dean y McEntyre. 2004).

•**Diabetes tipo 1:** resulta de la destrucción autoinmune de las células beta del páncreas causando la pérdida de la producción de insulina. Se presenta principalmente en la niñez, pero puede ocurrir en todas las edades y el cuadro clínico varía con la edad (Diabetes Atlas. 2003). Corresponde aproximadamente al 5% de todos los casos de diabetes.

•**Diabetes tipo 2:** se caracteriza por la relativa deficiencia en la producción de insulina y la resistencia a la acción de la insulina, cualquiera de estas puede estar presente al tiempo que la diabetes se manifieste. Se presenta generalmente después de los 40 años y corresponde aproximadamente del 85% al 95 % de todos los casos de diabetes (Diabetes Atlas. 2003). Este tipo de diabetes se está volviendo más común debido al creciente número de personas mayores, el aumento de la obesidad y la falta de ejercicio.

5.1.3 Sistema de control de la glicemia normal

Cuando el nivel de glucosa en la sangre se incrementa después de una comida, se dispara la liberación de insulina por el páncreas. La insulina estimula entonces al músculo y a las células grasas a remover la glucosa de la sangre y a el hígado a metabolizar glucosa, causando que los niveles de azúcar en la sangre disminuyan a niveles normales (Lodish *et al.*, 2000). Una persona normal de 70 Kg ingiere unas 2500 Kcal al día de las cuales el 40% (1000 Kcal) provienen de carbohidratos. Como cada gramo de carbohidratos da 4 Kcal, entonces una persona ingiere aproximadamente 250 gramos de carbohidratos al día, los cuales son procesados rápidamente en el tubo

digestivo hasta transformarse en glucosa. La glucosa que está dentro del intestino es absorbida rápidamente (en menos de 5 minutos) y llega a la circulación sanguínea. La glicemia normal es de 70 a 110 mg/dL. Ya que un adulto tiene 6 litros de sangre, de los cuales 3 litros son de plasma, y tenemos 1 gramo de glucosa por litro de plasma, en toda la sangre de una persona habrá apenas tres gramos de glucosa. Si ingerimos un racimo de uvas de 100 gramos que tiene 30 gramos de glucosa, esta se absorbe casi instantáneamente. Teóricamente, la glicemia debiera subir a 1000 mg/dL. Sin embargo esto no ocurre porque las células Beta del páncreas producen insulina en respuesta a la glicemia y la insulina controla el nivel de glucosa en la sangre. El páncreas tiene aproximadamente 10^6 islotes de Langerhans y en cada uno de los cuales hay 10^3 células Beta. Estas son las células productoras de insulina. Las células Beta producen insulina de dos maneras. Una producción basal (0,35 unidades x Kg de peso por día) ya sea que se ingiera o no alimento. Además una producción pradiaral de insulina, que ocurre con cada comida. La producción pradiaral se hace gracias a que la célula Beta es capaz de medir la glicemia. Esta respuesta normal de insulina pradiaral es tan perfecta, que tiene un tiempo de alza 20 minutos. Finalmente la perfección es tal que en personas normales el error de estado de régimen es cero. Una vez en la sangre, la insulina es llevada a los órganos blanco principales: las células del tejido adiposo y las células de los músculos. Estas células tienen receptores específicos para insulina en su superficie. La insulina se une a la porción extracelular del receptor haciendo que la porción intracelular adquiera capacidad de kinasa y se autofosforile. El receptor fosforilado a su vez hace que se incorpore fosfato a otra molécula llamada Substarato-I del receptor de la insulina (IRS-1). EL IRS-1 fosforilado se una a varias proteínas llamadas “proteínas SH2”. Una de estas proteínas SH2 es la fosfatidil-Inositol-3 Kinasa (PI-3 Kin). El complejo IRS-1+ PI-3 Kin se une a la proteína RAB-4, que es la encargada de anclar las microvesículas que contienen a las moléculas transportadoras de glucosa “Glut-4”. El complejo IRS-1 +PI-3 Kin libera a la vesícula y permite la translocación del Glut-4 hacia la membrana plasmática de la célula, donde esta permite la entrada de glucosa a gran velocidad. Sin embargo durante el ejercicio, el transportador Glut-4 puede también ser translocado hacia la membrana de la célula muscular, sin intervención de la insulina (Olmos. 2001; Díaz- Hernández y Burgos-Herrera. 2002).

5.1.4 Síntomas y complicaciones.

Los principales síntomas en la diabetes son niveles elevados de glucosa y resistencia periférica a la acción de la insulina. Estas alteraciones metabólicas desencadenan dos tipos de complicaciones vasculares: microvasculares y macrovasculares. En los microvasculares se presenta un daño endotelial en la microcirculación. Este daño es el causante de nefropatía que lleva a provocar insuficiencia renal crónica (en el 40% de los pacientes). De igual forma causa neuropatía periférica (en el 70% de los pacientes). Además es el causante de retinopatía que termina por producir ceguera. En cambio las complicaciones macrovasculares se asocian con un trastorno metabólico profundo que se correlaciona con la resistencia a la insulina y no con hiperglicemia. Están vinculados a enfermedad cardiovascular con un estado de aterosclerosis acelerada, mayor riesgo de

trombosis, de 2 a 4 veces mayor frecuencia de sufrir un infarto al miocardio e hipertrigliceridemia (Cruz *et al.*, 2002) .

De acuerdo con diversas fuentes, las complicaciones renales son la primera causa de hospitalización, seguida por los trastornos de la circulación periférica, las complicaciones neurológicas y finalmente, las oftálmicas. Las muertes que ocurren cada año en México a causa de la DM2 están relacionadas fundamentalmente con las complicaciones, entre las que destacan por su frecuencia, la nefropatía, seguida de los trastornos de la circulación periférica.

5.1.5 Genética de la Diabetes

La herencia tiene un papel muy importante en el desarrollo de la DM2. A diferencia de las enfermedades genéticas como Corea de Hughtinton donde existe un solo gen alterado; en las enfermedades complejas como la DM2, no se conoce un patrón mendeliano de herencia y en su desarrollo participan múltiples genes (Tusié-Luna. 1997), además de las contribuciones ambientales necesarias para el desarrollo de la enfermedad.

El peso específico del componente hereditario se suele estimar con estudios de concordancia entre gemelos univitelinos, que demuestran que la contribución hereditaria es más importante en DM2 (concordancia 70-90%) que la DM1 (concordancia 25-50%). Esto se traduce en que un familiar de primer grado de un paciente con diabetes mellitus tipo 1 (DM1) tiene un riesgo de padecer la enfermedad del 5-10% (comparado con un 0.4% de riesgo para la población general), mientras que para la DM2 es de un 30-40% (Salido *et al.*, 2001). La DM1 suele iniciarse rápidamente y al parecer se debe a una predisposición hereditaria de destrucción o degeneración de las células beta. La DM2, parece ser resultado de degeneración o supresión de las células beta como consecuencia del envejecimiento más rápido en personas más susceptibles que otras.

Se han seguido principalmente dos estrategias en la búsqueda de genes responsables de la predisposición hereditaria a las formas habituales de diabetes:

- a) Estudio de genes candidatos. Son genes cuya función secuencia y localización se conocen previamente y que codifican proteínas que juegan un papel conocido en la fisiopatología de la enfermedad, por ejemplo el gen del receptor de la insulina. Se trata de estudios de casos y controles donde se busca una posible asociación entre variantes alélicas de estos genes y marcadores genéticos físicamente cercanos. Esta estrategia busca demostrar ligamiento (asociación estadísticamente significativa) de la enfermedad con los marcadores genéticos físicamente cercanos a los distintos genes candidato (Salido *et al.*, 2001). El número de genes candidatos o de predisposición a diabetes reportados hasta el momento por la Online Mendelian Inheritance in Man [OMIM], para la Diabetes es de 242 (<http://www.cdc.gov/genetics>).
- b) Tamizaje completo del genoma. (genome wide scanning). Se trata de la identificación y aislamiento de genes nuevos a través de “sondear” el genoma completo

para demostrar ligamiento con marcadores distribuidos en todos los cromosomas y cuya localización se conoce. Se la conoce como “tamizaje completo del genoma”. Esta estrategia ha rendido varias regiones de interés, en general diferentes según las poblaciones analizadas. Un resumen de estos hallazgos se ha publicado recientemente (Almind *et al.*, 2001).

5.1.6 Genes de susceptibilidad a la diabetes

En la DM2 participan varios genes de susceptibilidad o predisposición, que interactúan en forma compleja y permanente con factores de índole ambiental (Salido *et al.*, 2001). Como consecuencia de las características genéticas de cada población a causa de su particular origen ancestral, las distintas poblaciones poseen frecuencias alélicas diferentes a múltiples factores genéticos y dentro de ellos a los genes (y a los polimorfismos de los mismos) que predisponen a padecimientos poligénicos como la diabetes. Esto es, los genes que dan lugar a enfermedades como la DM2, es algo que depende de los grupos étnicos (Tusié-Luna. 2001), por tal motivo se ha encontrado evidencia de la participación de distintos genes o combinaciones de ellos en el desarrollo de la diabetes entre distintas poblaciones. Así vemos que los genes o regiones genéticas de susceptibilidad que predisponen al desarrollo de esta enfermedad no son los mismos entre mexicanos, México-americanos, asiáticos y caucásicos (Sánchez-Corona *et al.*, 2004; Stern *et al.*, 1996; Hanis *et al.*, 1996). Por lo tanto, para comprender mejor las formas en que el genoma le confiere particularidades locales a la enfermedad es necesario hacer estudios en poblaciones mexicanas (Tusié-Luna. 2001), es por eso que son de gran importancia los estudios encaminados a caracterizar genéticamente a las poblaciones mexicanas.

Basados en los resultados de varios escaneos en varios grupos raciales, parece ser que están involucrados múltiples genes, cada uno contribuyendo en una pequeña cantidad del riesgo total (Permutt y Hattersley. 2000).

5.2 Polimorfismo genético y marcador genético

5.2.1 Generalidades

Cuando se habla de la ocurrencia en una población de dos o más alelos para un locus con frecuencias alélicas mayores que lo que podría ser mantenido por mutación, estamos hablando de un polimorfismo genético. Los polimorfismos proporcionan variación dentro de las especies. Se dice que un polimorfismo existe si el alelo más común para un locus tiene una frecuencia menor al 99%.

Existen polimorfismos genéticos que son fácilmente detectables, a estos se les denomina marcadores genéticos. Un marcador puede ser o no ser parte de un gen expresado. En general, los marcadores genéticos más valiosos son aquellos que son más polimórficos.

Los marcadores genéticos han sido importantes herramientas en el estudio de la estructura genética de las poblaciones humanas. Al principio se utilizaron marcadores no moleculares (sistema ABO, HLA, etc.), posteriormente y como consecuencia del desarrollo de nuevas técnicas para analizar loci altamente polimórficos o hipervariables, se han utilizado marcadores de DNA, los cuales son amplificadas por PCR e identificados por electroforesis.

5.2.2 Polimorfismos de DNA

El tipo de polimorfismo más utilizado en Genética de Poblaciones son los polimorfismos del DNA y son la base de los análisis genéticos, éstos se mencionan a continuación.

5.2.2.1 RFLPs (Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica)

Las primeras variantes en la secuencia del DNA humano que se analizaron fueron los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs), que son variaciones hereditarias en la secuencia del DNA que resultan en la ganancia o pérdida de un sitio reconocido por una enzima de restricción (por ejemplo, *EcoRI* o *TaqI*). Son transmitidos como características codominantes y han sido ampliamente usados en los estudios de ligamiento y mapeo genético. Estos son detectados por medio de PCR y southern blot (hibridación con sondas).

5.2.2.2 DNA Satélite

El DNA satélite consiste en repeticiones de una secuencia unidad “core” en tandem esto es, se disponen una a continuación de la otra en el genoma. Están ampliamente distribuidas a través del genoma humano (aproximadamente el 10%). Como las secciones del DNA a los lados de estos loci repetitivos son característicos, se pueden distinguir utilizando iniciadores específicos a estas secuencias mediante técnicas de PCR. Presentan gran variabilidad entre los individuos de una población por lo que se utilizan como marcadores genéticos en varios campos incluyendo mapeo genético, análisis de ligamiento, pruebas de identidad y genética forense. Se transmiten como características codominantes simples. El DNA satélite se clasifica en dos categorías: minisatélites y microsátélites dependiendo del tamaño de la secuencia que se repite. Los minisatélites son también llamados VNTRs (Variable Number of Tandem Repeats) y son polimorfismos de número variable de repeticiones en tandem con una secuencia “core” de 9-80 pares de bases y con alelos que van de 1 a 30 kb de

longitud. Por otro lado, los microsatélites o polimorfismos de repeticiones cortas en tandem (STRs de sus siglas en inglés); se encuentran esparcidos en todo el genoma, se componen de unidades o secuencias “core” repetitivas en *Tandem* de 2, 3, o 4 nucleótidos y los alelos tienen por lo general una longitud menor a 1 kb .

El carácter polimórfico de los STRs es el resultado de la variabilidad en el número de repeticiones en tandem de un alelo a otro. La variabilidad de los alelos en una población es tal que se puede obtener un alto grado de discriminación entre los individuos de una población cuando se analizan varios loci a la vez.

Los diferentes alelos pueden ser detectados con tinción con plata o en forma automatizada utilizando diferentes compuestos fluorescentes (Kimpton *et al.*, 1993; Urquhart *et al.*, 1995).

Algunas de las ventajas en la utilización de STRs son las siguientes: a) se pueden utilizar muestras degradadas ya que los productos amplificados tienen menos de 400 pares de bases de longitud, b) el proceso de PCR permite el análisis de cantidades extremadamente pequeñas de DNA (1 ng), c) el número potencial de loci que se puede analizar es muy grande, d) el proceso es rápido (generalmente de 1-2 días). Además su segregación responde a las leyes mendelianas transmitiéndose como características codominantes simples.

Por todas las características antes mencionadas, los STRs, son los marcadores genéticos más informativos para individualizar muestras biológicas (Edwards *et al.*, 1991; Edwards *et al.*, 1992), es un método ampliamente utilizado para realizar la identificación de individuos (Fregeau y Fourney. 1993; Kimpton *et al.*, 1993) y también son de gran utilidad para la estimación de parámetros de Heterocigocidad, Homocigocidad, diversidad biológica, evolución molecular, y mapeo genético en poblaciones (Cerdeña-Flores *et al.*, 2002c).

Hay literalmente cientos de sistemas de STRs que han sido descritos y mapeados en el genoma humano (Edwards *et al.*, 1991), pero los más utilizados son las repeticiones de tetranucleótidos debido a su alta fidelidad en la amplificación por PCR (Kimpton *et al.*, 1996; Hochmeister *et al.*, 1994). En la actualidad se cuenta con 13 marcadores, denominados serie CODIS (Combined DNA Index System), utilizados para la identificación de individuos por el FBI y usados ampliamente en la Genética de poblaciones en el ámbito mundial (Budowle *et al.*, 2001). Para estos marcadores se han descrito metodologías de tipificación utilizando electroforesis en geles de poliacrilamida y escaneo fluorescente (Budowle *et al.*, 2000). Además se pueden detectar los fragmentos con tinción de plata o en forma automatizada utilizando diferentes compuestos fluorescentes (Kimpton *et al.*, 1993 y 1994; Urquhart *et al.*, 1995).

Actualmente, se pueden amplificar varios loci STRs mediante PCR multiplex. La compañía Promega ha desarrollado algunos estuches de tipificación que proveen todos los materiales requeridos para la reacción de amplificación, excepto la Taq DNA polimerasa. Uno de estos productos es SilverSTR™ III Triplex que amplifica 3 STRs de

la serie CODIS (D16S539, D7S820 y D13S317). Este estudio ya ha sido validado en muestras forenses (Moretti *et al.*, 2001) y en una población de España (Entrala *et al.*, 1999).

5.2.3 Locus D7S820

STR localizado en el cromosoma 7 (figura 1), su secuencia core (GATA)_n presenta n repeticiones, donde n puede ser: 6,7,8,9,10,11,12,13 y 14 (Tabla I). Las siguientes secuencias muestran la ubicación de la región para alineamiento del primer o iniciador, así como la región de repetición en Tandem para el caso de 11 repeticiones. En la región sombreada se ubica el sitio de reconocimiento de los respectivos iniciadores, (forward y reverse), las flechas indican la dirección de los mismos y las bases nucleotídicas en cuadro señalan la región de repetición en tandem (11 repeticiones), teniendo así un tamaño total de 222 pares de bases.

***D7S820: LOCUS G08616, 334 bp, 11 GATA repeats . DNA linear STS size 222bp
05-FEB-1997. (NCBI Sequence Viewer v2.0, GeneBank)***

```

1 aat t t t t g t a   t t t t t t a g   a g a c g g g g t t   t c a c c a t g t t   g g t c a g g c t g   a c t a t g g a g t
61 t a t t t t a a g g   t t a a t a t a t a   t a a a g g g t a t   g a t a g a a c a c   t t g c a t a g t   t t a g a a c g a a
121 c t a a c g a t a g   a t a g a t a g a t   a g a t a g a t a g   a t a g a t a g a t   a g a t a g a t a g   a t a g a c a g a t
181 t g a t a g t t t t   t t t t a t c t c   a c t a a a t a g t   c t a t a g t a a a   c a t t t a a t t a   c c a a t a t t t g
241 g t g c a a t t c t   g t c a a t g a g g   a t a a a t g t g g   a a t c g t t a t a   a t t c t t a a g a   a t a t a t a t t c
301 * c c t c t g a g t t   t t t g a t a c c t   c a g a t t t t a a   g g c c

```

*complemento



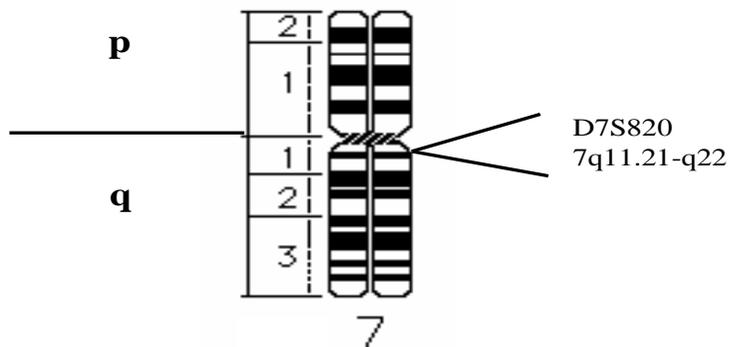


Figura 1. Cromosoma 7 y localización del locus D7S820.

Tabla I.

Número de repeticiones de los alelos reportados para el marcador D7S820, su tamaño en pares de bases y la estructura de las repeticiones.

D7S820		
Alelos (Repeticiones)	Longitud (pb)	Estructura de las repeticiones
6	202	(GATA)6
7	206	(GATA)7
8	210	(GATA)8
9	214	(GATA)9
10	218	(GATA)10
11	222	(GATA)11
12	226	(GATA)12
13	230	(GATA)13
14	234	(GATA)14

5.2.4 Locus D16S539

STR localizado en el cromosoma 16 (figura 2), su secuencia core (GATA)_n, presenta n repeticiones, donde n puede ser: 5,8,9,10,11,12,13,14 y 15 (Tabla 2). Las

siguientes secuencias muestran la ubicación de la región para alineamiento del primer o iniciador, así como la región de repetición en Tandem para el caso de 11 repeticiones. En la región sombreada se ubica el sitio de reconocimiento de los respectivos iniciadores, (forward y reverse), las flechas indican la dirección de los mismos y las bases nucleotídicas en cuadro señalan la región de repetición en tandem (11 repeticiones), teniendo así un tamaño total de 157 pares de bases.

D16S539: LOCUS G07925, 426 bp, 11 GATA repeats .DNA linear. STS size 157 bp 05-FEB-1997 (NCBI Sequence Viewer v2.0, GeneBank)

```

1 atggctgcc tcacggctgc accgggagga tgactgtntt cccactctca gtctgccga
61 ggtgctgac agccctgcac ccaggagctg gggggcttaa gagcttgtaa aaagtgtaca
121 agtgccagat gtcggttg cacaatcta aatgcagaaa agcactgaaa gaagaatcca
181 gaaaccaca gttccattt ttatatggga gcaaacaag gcagatccca agctcttct
241 cttcctaga tcaatacaga cagacagaca ggtggataga tagatagata gatagataga
301 tagatagata gatagatatc attgaaagac aaaacagaga tggatgatag atacatgctt
361 * acagatgcac acacaaacgt aatggtatg aaaaatggga tgcactctg tagggtgtt
421 ttacc

```

* complemento

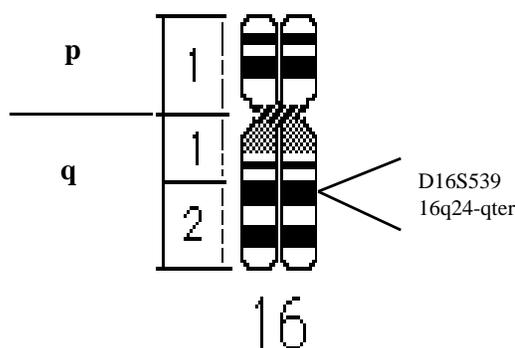


Figura 2. Cromosoma 16 y localización del locus D16S539.

Tabla II.

Número de repeticiones de los alelos reportados para el marcador D16S539, su tamaño en pares de bases y la estructura de las repeticiones.

D16S539		
Alelos (Repeticiones)	Longitud (pb)	Estructura de las repeticiones
5	133	(GATA)5
8	145	(GATA)8
9	149	(GATA)9
10	153	(GATA)10
11	157	(GATA)11
12	161	(GATA)12
13	165	(GATA)13
14	169	(GATA)14
15	173	(GATA)15

5.2.5 Locus D13S317

STR localizado en el cromosoma 13 (figura 3), su secuencia core (TATC)_n, presenta n repeticiones, donde n puede ser: 7,8,9,10,11,12,13,14 y 15 (Tabla III). Las siguientes secuencias muestran la ubicación de la región para alineamiento del primer o iniciador, así como la región de repetición en Tandem para el caso de 13 repeticiones.

D13S317: LOCUS G09017, 286 bp, 13 TATC repeats .DNA linear. STS size 189 bp. 05-FEB-1997 (NCBI Sequence Viewer v2.0, GeneBank)

```

1  tgggatgggt tgctggacat ggtatcacag aagtctggga tgtggaggag agttcatttc
61  tttagtgggc atccgtgact ctctggactc tgacctatct aacgcctatc tgtatttaca
121 aatacatat ctatctatct atctatctat ctatctatct atctatctat ctatctatca
181 atcatctatc tatctttctg tctgtctttt tgggctgcct atggctcaac ccaagttgaa
241 ggaggagatt tgaccaaaa tcaagctct ctgaatatgt tttgaa

```

*complemento

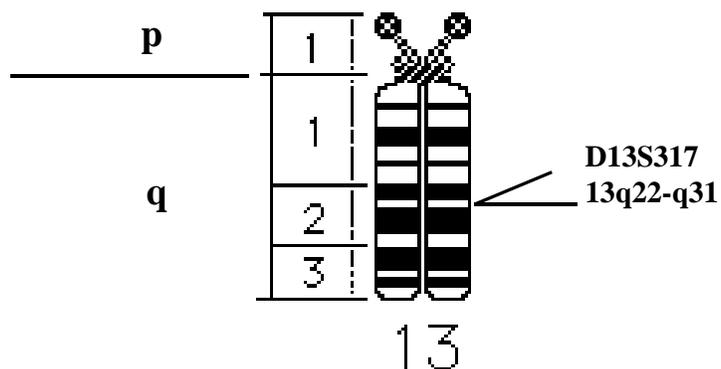


Figura 3. Cromosoma 13 y localización del locus D13S317.

Tabla III.

Número de repeticiones de los alelos reportados para el marcador D13S317, su tamaño en pares de bases y la estructura de las repeticiones.

D13S317		
Alelos (Repeticiones)	Longitud (pb)	Estructura de las repeticiones
7	262	(TATC)7
8	266	(TATC)8
9	270	(TATC)9
10	274	(TATC)10
11	278	(TATC)11
12	282	(TATC)12
13	286	(TATC)13
14	290	(TATC)14
15	294	(TATC)15

5.3 Genética forense y Perfiles de DNA.

En el siglo pasado surgió la Hemogenética Forense como una rama de la Criminalística, cuyo objetivo era la identificación genética tanto en casos de investigación criminal como en estudios biológicos de paternidad. Inicialmente los estudios se centraban en el estudio de antígenos eritrocitarios (sistemas ABO, Rh, MN), proteínas séricas, enzimas eritrocitarias y sistema HLA. Con el estudio de dichos marcadores, sólo se podía incluir o excluir a una persona como posible sospechoso por poseer una combinación genética igual o diferente a la del vestigio biológico hallado en el lugar de los hechos. Posteriormente y gracias al descubrimiento del DNA y al posterior avance en las técnicas de análisis de dicha molécula, la Hemogenética Forense evolucionó considerablemente hasta lo que hoy conocemos como Genética Forense. Dicha ciencia estudia básicamente unas regiones del DNA que presentan variabilidad entre los distintos individuos, es decir, estudia regiones polimórficas del DNA. Así, analizando un determinado número de regiones polimórficas, la probabilidad de que dos individuos sean genéticamente iguales es prácticamente nula (excepto en gemelos univitelinos). Los primeros casos de criminalística fueron resueltos gracias a la técnica de RFLPs en Inglaterra por Jeffreys (Entrala. 2000). Posteriormente se descubrieron los primeros VNTRs, los cuales se analizan por medio de la técnica de southern blot. Estas sondas pueden ser de dos tipos, cuando se analiza un sólo sitio o locus en el genoma se utilizan sondas mono-locus, mientras que cuando se analizan varios loci del genoma a la vez se utilizan sondas multi-locus. Dependiendo del tipo de sonda que se utilice los perfiles del DNA pueden ser de dos tipos: huella genética (DNA “finger print”) y perfiles unilocus (DNA “profiling”).

5.3.1 Huella genética o DNA “finger-print”

Esta consiste en la obtención de un modelo de múltiples bandas que se detectan mediante la utilización de sondas de DNA que reconocen simultáneamente diferentes regiones minisatélites (sondas multi-locus). Cada una de estas sondas permite explorar más de 30 loci autosómicos en un único análisis, por lo que en el revelado se observa varias bandas en cada individuo y una gran variabilidad entre las bandas de los distintos individuos. La imagen obtenida son una verdadera huella genética individual .

5.3.2 Perfiles unilocus de DNA o “DNA profiling”

Son específicas para una región de un determinado cromosoma y como resultado se observan una o dos bandas por individuo según sea homocigoto o heterocigoto (bandas

monolocus). Generalmente se analizan varios loci y el patrón de bandas obtenido consiste en la suma de los perfiles de cada uno de los loci analizados.

Gracias a la utilización de la PCR y la capacidad de los geles de poliacrilamida para resolver sus productos, es posible realizar el tipaje preciso de los alelos y por consiguiente hallar las frecuencias alélicas de los mismos (Entrala. 2000; Martínez de Pancorbo. 1992).

5.3.3 Aplicaciones de los perfiles de DNA

Las aplicaciones del perfil genético individual son muy numerosas, tanto en investigación básica como aplicada. En el campo de la genética de poblaciones se utilizan para determinar la estructura de las poblaciones, en genética forense para la identificación de individuos, también se utilizan en diagnóstico de paternidad y parentesco biológico (Martínez de Pancorbo. 1992)..

5.4 Estructura Biológica de las poblaciones

La genética de poblaciones y la ecología de poblaciones están íntimamente ligadas entre sí. De esta manera, el ecólogo de poblaciones necesita sustentar sus estudios en poblaciones genéticamente homogéneas y considerar parámetros poblacionales como selección, deriva genética, heterocigosidad, etc. De manera similar, el genetista de poblaciones quien analiza cambios en las frecuencias génicas, tasas de mutación y otros factores de la genética de poblaciones, necesita considerar aspectos fundamentales de la estructura de la población, como edades, proporción de sexos, tasas de fecundidad, lugar de nacimiento, etc. (Ravinovich. 1980) . De esta manera vemos que la estructura biológica de toda población tiene dos componentes: la estructura genética y la estructura ecológica.

5.4.1 Estructura Genética

Con respecto a la estructura genética, por lo general en el diseño de todo estudio se considera que el 100% de la población presenta homogeneidad genética. Pero el aceptar este criterio puede propiciar que el investigador obtenga sesgos en sus resultados ya que las ecuaciones en los campos de la ecología y epidemiología asumen homogeneidad genética (Ravinovich. 1980).

5.4.2 Estratificación poblacional

En estudios de caso-control, ambas poblaciones deben ser claramente originarios de la misma población. De no ser así, pueden existir diferencias genéticas entre estas poblaciones en muchos loci debido a las distancias génicas entre las dos poblaciones. Si este es el caso, es difícil probar que una diferencia observada para un solo polimorfismo refleje un impacto causal de la patogénesis de la enfermedad, en vez de una simple diferencia genética general a nivel poblacional entre pacientes y controles. Pero aún y cuando se utilicen criterios de inclusión étnicos, los estudios de caso control están sujetos a desviación por estratificación, lo cual puede encubrir la verdadera relación o bien conducir a una falsa relación entre el polimorfismo probado y la enfermedad bajo estudio (Belliver, F. 2003).

Esta fuente de confusión se puede eliminar determinando si estas poblaciones son en realidad homogéneas, o bien incluyen subpoblaciones (estratificación poblacional) que varían en sus frecuencias alélicas (Satten *et al.*, 2001). Esta estratificación poblacional es la razón mas frecuente de que los resultados de asociación genética no sean replicables (Cardon y Palmer. 2003).

Afortunadamente, si las subestructuras de la población afectan las frecuencias alélicas del gen candidato, entonces al igual afectarán las frecuencias de otros genes. Es por esto que los marcadores genéticos pueden usarse para hacer inferencias acerca de la existencia de subestructura poblacional en una muestra. (Satten *et al.*, 2001).

Se ha sugerido que los estudios de caso-control deberían considerar la obtención de información genotípica de los casos y controles en loci no relacionados con la enfermedad, como los loci forenses STR, como indicadores de la cantidad de diversidad entre casos y controles. En la medida en que los marcadores son independientes de aquellos que afectan a la enfermedad de interés, ellos reflejarán diferencias genéticas entre casos y controles. De esta manera el grado de las diferencias de las poblaciones pueden ser cuantificadas y probadas, y en ausencia de cualquier diferencia, el estudio de caso control entonces puede llevarse a cabo. Por lo tanto, la caracterización de un juego de loci que tienen variabilidad a lo largo de subpoblaciones humanas, es útil para identificar el efecto de la estratificación poblacional sobre estudios de caso-control (Satten *et al.*, 2001; Pritchard y Rosenberg. 1999).

5.4.3 Estructura genética en población mexicana

Con respecto a la estructura genética de poblaciones mexicanas se sabe que tienen diferentes componentes ancestrales (caucásicos, amerindios y africanos) dependiendo de la región geográfica. Inicialmente las investigaciones encaminadas a conocer la estructura genética de la población mexicana se realizaron utilizando marcadores no moleculares, posteriormente con el adelanto de las técnicas de Biología Molecular se

han continuado realizando estos estudios con marcadores de DNA. Enseguida se mencionan algunos de estos estudios.

Una población Mexicana residente del Área Metropolitana de Monterrey (AMM), fue agrupada por generaciones y por lugar de nacimiento de sus cuatro abuelos [AMM, San Luis Potosí (SLP) y Zacatecas (ZAC)]. En ella se obtuvieron las frecuencias de nueve sistemas de grupos sanguíneos con lo cual se determinó el grado de variación genética y las diferencias genéticas entre los individuos nativos en el AMM y las poblaciones inmigrantes de SLP y ZAC. El análisis de distancia genética indica que SLP y ZAC son semejantes al AMM, independientemente del lugar de nacimiento y de las generaciones. El análisis de diversidad genética (G_{st}) sugiere que más del 96% del total de diversidad genética (H_t) puede ser atribuida a la variación individual dentro de la población. El análisis de mezcla genética sugiere que los individuos del AMM, SLP y ZAC, estratificados por lugar de nacimiento y generación, han recibido una contribución predominantemente Española (78.5%), seguida por una contribución indígena mexicana (21.5%). Similarmente se utilizó el análisis de mezcla genética, para conocer el grado de contribución que ha tenido la población de Nuevo León (estratificada en tres generaciones) de las poblaciones del AMM, ZAC y SLP, se observó una mayor contribución del AMM (64.6%), seguida por la de ZAC (22.1%) y la de SLP (13.3%). Se demostró que no hay asociación no-aleatoria de los alelos de los sistemas sanguíneos analizados y que existe homogeneidad genética en la población aleatoria del Noreste de México, a pesar de que esta población es de origen mestizo (Cerde-Flores *et al.*, 1991).

Al realizar una comparación entre poblaciones del Noreste de México con las México-americanas con respecto a homogeneidad genética, utilizando cinco marcadores genéticos no moleculares, no se encontró diferencias entre los perfiles de ellas (Cerde-Flores *et al.*, 1994).

Al analizar una población de mujeres con fertilidad natural del Noreste de México con respecto a su estructura genética, se encontró que más del 99.1% del total de la diversidad puede atribuirse a variación entre los individuos dentro de la población. Esta población ha recibido predominantemente una mayor contribución española y una menor Amerindia y presentó homogeneidad genética (Cerde-Flores y Dávila-Rodríguez, 2000).

Posteriormente se empezaron a utilizar marcadores de DNA en el estudio de la estructura genética de las poblaciones mexicanas. Así se encontró que en población aleatoria no emparentada y sana, los haplotipos del DNAm_t (DNA mitocondrial) eran 100% de origen Amerindio (A = 39.86%, B = 4.20%, C = 36.36% y D = 19.58%). Al agruparse la población por lugar de nacimiento de las abuelas maternas se encontró una distribución homogénea de acuerdo a las cuatro zonas (Cerde-Flores *et al.*, 2002b).

Al realizar una comparación entre tres poblaciones Mestizas Mexicanas (Nuevo León, Jalisco y Distrito Federal) con respecto a los marcadores D1S80 y HLA-DQA1 se encuentra que estas presentan una distribución homogénea. Estos resultados apoyan el uso de estos marcadores genéticos en el análisis de homogeneidad genética. Aunado a

esto, se realizaron comparaciones de las contribuciones ancestrales encontradas (59.99% para Españoles, 36.99% para Amerindios y 3.02% para Africanos) con respecto a un estudio previo realizado por los mismos autores donde se habían utilizado grupos sanguíneos (59.03% para Españoles, 31.03% para Amerindios y 9.94% para Africanos) y no se encontraron diferencias significativas (Cerde-Flores *et al.*, 2002a).

En una población de mestizos del Noreste de México no emparentados y sanos, se determinaron las frecuencias alélicas de 13 STRs de la serie CODIS y se encontró que se distribuían homogéneamente entre esta población aleatoria. Además, los resultados de mezcla génica (54.99% para Españoles, 39.99% para Amerindios y 5.02% para Africanos) fueron similares a los encontrados previamente por los mismos autores al utilizar grupos sanguíneos (59.03% para Españoles, 31.03% para Amerindios y 9.94% para Africanos) y los marcadores moleculares D1S80 y HLA-DQA1 (59.99% para Españoles, 36.99% para Amerindios y 3.02% para Africanos) (Cerde-Flores *et al.*, 2002c).

En una población de mestizos mexicanos de la ciudad de México implicados en pruebas de paternidad se analizaron las frecuencias alélicas de 9 STRs de la serie CODIS. Se obtuvieron las frecuencias alélicas para estos marcadores las cuales se compararon con las frecuencias reportadas para estos mismos marcadores en el Noreste de México y no se presentaron diferencias para la mayoría de los STRs analizados (Luna Vázquez *et al.*, 2003).

Con la finalidad de buscar en los apellidos un posible indicador de susceptibilidad para la DM2, se analizó una muestra poblacional de individuos de ocho Unidades Médicas del IMSS del Estado de Nuevo León. Se encontró que los mexicanos con apellidos Polifiléticos (Martínez, García, Hernández González y Sánchez) presentan una razón de momios (OR) seis veces mayor de desarrollar diabetes que los mexicanos con apellidos Monofiléticos (Garza, Chapa, Treviño, Montemayor y Cantú). Además dentro de los Polifiléticos aquellos con uno o ambos apellidos Martínez o Rodríguez tuvieron una mayor prevalencia cruda de DM2 (81.3%) con un OR tres veces mayor que los que no tienen estos apellidos (18.5%; Cerde-Flores *et al.*, 2003).

5.4.4 Estructura genética en otras poblaciones

Actualmente se cuenta con las frecuencias alélicas STRs de la serie CODIS para diferentes poblaciones incluyendo a africo-americanos, caucásicos, hispanos, asiáticos y nativos americanos (Budowle *et al.*, 2001; GenePrint® STR Systems). Aunque estos marcadores son no codificantes, hay un estudio en una población de China en donde se asocian 4 STRs con diabetes mellitus (Zhang *et al.*, 2000). Se han obtenido las frecuencias alélicas para los marcadores D16S539, D7S820 y D13S317 en una población de españoles caucásicos (Entrala *et al.*, 1999)..

6. METODOS

6.1 Metodología de muestreo

La muestra de individuos con DM2 provino de dos fuentes: 58 pacientes de la Clínica No. 7 del Instituto Mexicano del Seguro Social y 45 pacientes participantes en el proyecto “Educación en adultos con DM2” de la Facultad de Enfermería de la U.A.N.L. Todos los pacientes fueron diagnosticados con exactitud como DM2, basados en el criterio de la OMS y cumplieron los criterios de inclusión establecidos, que fueron los siguientes: personas diagnosticadas con DM2 y ≥ 40 años de edad.

A las personas participantes en el proyecto se les explicó el objetivo del mismo, después de lo cual firmaron la hoja de consentimiento informado (Apéndice 4), donde autorizaron su participación en el mismo. Después de llenar una encuesta en donde se recopiló información descriptiva y ecológica del paciente (Apéndice 3), se le tomaron 5 ml de sangre periférica, la cual se colocó en un tubo Vacutainer (16 x 100 mm) con EDTA. Posteriormente con una micropipeta de precisión se tomaron 0.5 ml de sangre que se colocaron en tarjetas FTA (FTATM Fitzco Inc, Maple Plain, MN), cuya presentación es de cuatro círculos. A cada uno de estos se les aplicó 125 μ l de sangre. La tarjeta FTA se colocó en una superficie plana. se dejó secar al medio ambiente hasta el día siguiente y posteriormente se colocó en una bolsa de plástico (Fitzco Inc, Maple Plain, MN) con silicato (absorbente de humedad) [SORB-IT, UD Belen, NM]. La muestra restante de sangre se almacenó en refrigeración a 4° C.

6.2 Cálculo del tamaño de la muestra

El cálculo del tamaño de la muestra se basó en el criterio de Chakraborty, quien utilizando la teoría de equilibrio mutación-deriva para el modelo de mutaciones alelo-infinito concluye que para un promedio de heterocigosidad de 70% o mayor en un locus, se requieren de 100 a 150 individuos para tener una adecuada información de la variación intra-poblacional (Chakraborty 1992). Puesto que en poblaciones aleatorias del Noreste de México se sabe que los STRs utilizados presentan un valor de heterocigosidad $\geq 80\%$ (Cerdeira-Flores y Cols. 2002a), se consideró que un tamaño de muestra de 103 individuos es suficiente para la realización del presente estudio.

6.3 Tipo de estudio

Observacional, descriptivo, analítico, transversal y comparativo.

6.4 Universo de trabajo

- 1) 103 personas \geq 40 años DM2 del Noreste de México
- 2) 143 personas de una población aleatoria del Noreste de México.

6.5 Metodología del trabajo de laboratorio

En la Figura 4 se muestra la estrategia general llevada a cabo en el trabajo de laboratorio realizado en la presente investigación.

6.5.1 Extracción de DNA genómico

La extracción del DNA se realizó a partir de sangre periférica mediante el Método de Salado o “Saltin out” (Miller y Cols. 1988), que consiste en la lisis de eritrocitos, seguida de lisis de leucocitos, degradación de proteínas con proteinasa-k, purificación del DNA a través de extracciones con cloruro de sodio saturado y finalmente recuperación del DNA por precipitación del mismo con etanol (Apéndice A).

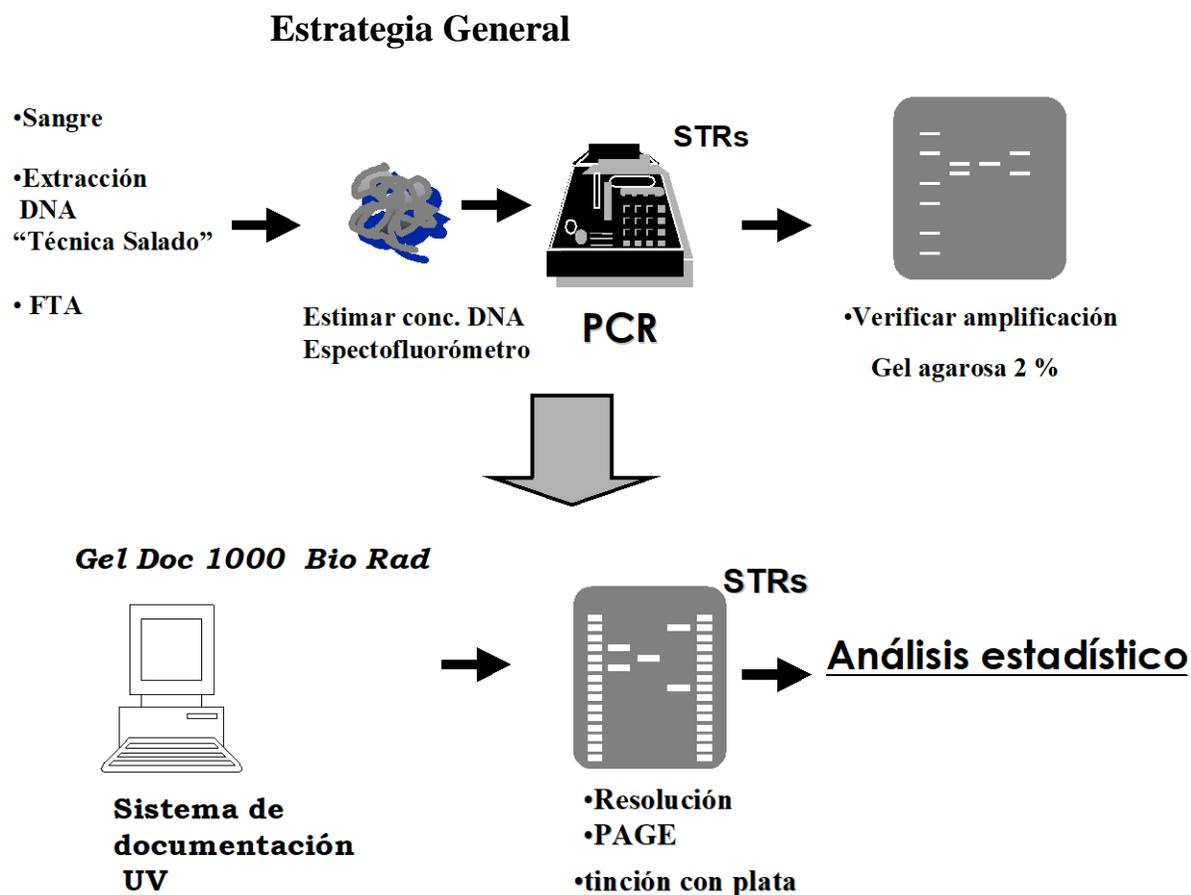


Figura 4. Estrategia general de laboratorio realizada para el análisis de 3 STRs en una muestra poblacional con DM2: extracción de DNA (técnica salado), amplificación (PCR) y resolución de los fragmentos amplificados (PAGE).

6.5.2 Verificación de la calidad y concentración de DNA

Una vez obtenido el DNase procedió a determinar visualmente su calidad y concentración aproximada con geles de agarosa al 0.8% (figura 5) y dependiendo de su concentración se realizaron diluciones desde 1:10 hasta 1:40. Posteriormente a estas diluciones se les determinó su concentración precisa, cuantificando la cantidad de DNA por microlitro de volumen, esto se realizó a través de un Fluorómetro (Versa Fluor Fluorometer, Bio-Rad). Enseguida y mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó el proceso de amplificación para cada de los marcadores.

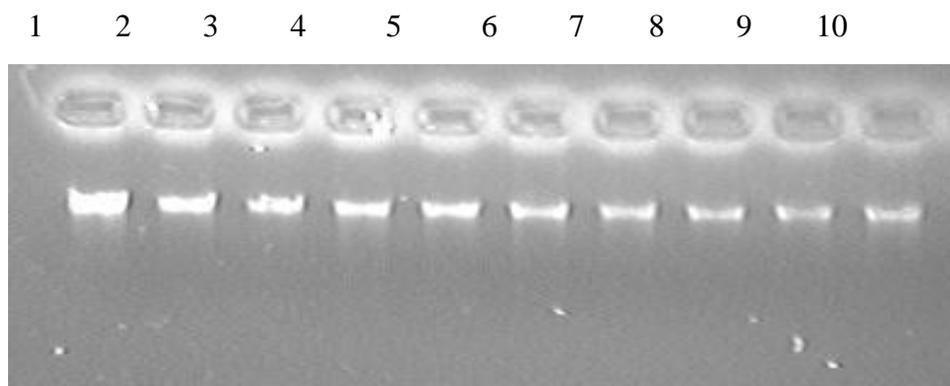


Figura 5. Gel de agarosa al 8% con muestras de DNA (1,2...10) obtenido mediante la técnica de extracción de salado. Verificación de la calidad y concentración aproximada del ADN en gel de agarosa al 0.8%.

6.5.3 Amplificación de los STRs

Para los STRs autosómicos D7S820, D16S539 y D13S317 se utilizó el estuche comercial Gene Print Silver STRTM III Triplex (Promega Corporation, Madison, WI, USA), el cual amplifica los 3 STRs de la serie CODIS a la vez, y proporciona todos los componentes para la PCR a excepción de la Taq-polimerasa. La secuencia de los iniciadores para estos microsatélites se proporcionan en la tabla IV.

Los volúmenes de los componentes de la PCR para los STRs se basaron en el protocolo sugerido por Promega, pero se ajustaron para obtener un volumen total de reacción de 15µl. El volumen de DNA en la reacción varió, ya que de acuerdo a su concentración era necesario ajustarlo para obtener 4ng de DNA por microlitro de reacción. En la tabla 5 se muestran las concentraciones y volúmenes para cada uno de los componentes de la PCR.

Tabla IV.

Secuencia de los iniciadores para PCR de los marcadores D7S820, D16S539 y D13S317 tanto Forward (sentido) como Reverse (antisentido).

D7S820*	Forward: 5'-TGT CAT AGT TTA GAA CGA ACT AAC G-3' Reverse: 5'-CTG AGG TAT CAA AAA CTC AGA GG-3'
D13S317	Forward: 5'-ACA GAA GTC TGG GAT GTG GA-3' Reverse: 5'-GCC CAA AAA GAC AGA CAG AA-3'
D16S539*	Forward: 5'-GAT CCC AAG CTC TTC CTC TT-3' Reverse: 5'-ACG TTT GTG TGT GCA TCT GT-3'

*CBI Séquence Viewer. GeneBank

Tabla V.

Volúmenes de los componentes de la PCR para los STRs D16S539, D7S820 y D13S317.

Componentes	Volumen (µl)
Buffer 10X	1.50
Primer-mix	1.50
Taq-pol 5U/µl	0.09
BSA 100X	0.24
DNA 60 ng/µl	1.00
Agua MQ	10.67
Total	15.00

En cuanto al programa de amplificación para SilverSTR™ Triplex (D16S539, D7S820 y D13S317), se programó de acuerdo al sugerido por Promega (Tabla 6). Se utilizó el Termociclador GeneAmp PCR System 9600 (Applied Biosystems)

Tabla VI.

Programa de amplificación para D16S539, D7S820 y D13S317
(SilverSTR™ Triplex)

Ciclos	Temperatura °C	Tiempo (minutos)
1	96	2
2	94	1
3	60	1
4	70	1.5
5	Ir 9 veces al paso 2	
6	90	1
7	60	1
8	70	1.5
9	Ir 19 veces al paso 6	
10	60	30

6.5.4 Verificación de la amplificación.

Se corroboró la amplificación de los marcadores en geles de agarosa al 2%. En una cámara horizontal se colocaron 2 μ l de muestra en cada pozo y se dejaron correr por espacio de 1 hora a 100 volts. Posteriormente se tiñó con bromuro de etidio y se observó en un equipo de fotodocumentación Gel Doc 1000 (Bio Rad Laboratories). En estos geles además de corroborar la amplificación se obtuvo un calculo aproximado de su concentración, dato muy útil para determinar la cantidad de amplificado que se colocaría posteriormente en los geles de poliacrilamida.

6.5.5 Resolución de los fragmentos amplificados.

La tipificación de los alelos se realizó con geles de poliacrilamida al 6%. Se utilizaron vidrios de 15 x 35 centímetros y peines de 0.8 mm de grosor con 20 carriles. El protocolo seguido para la preparación de los vidrios se menciona en apéndice 2. Se preparó la solución del gel para un volumen de 50 ml (50 ml acrilamida al 6% + 800 μ l persulfato 10% y + 80 μ l TEMED), la cual se cargó entre los vidrios con ayuda de una jeringa y se dejó polimerizar por espacio de 15 a 30 minutos. Los vidrios se montaron en una cámara vertical con Buffer TBE 0.5X. Las condiciones de pre-corrimento del gel

fueron 2000 volts - 40 miliampers - 50 watts por espacio de 40 minutos. Se desnaturalizaron las muestras antes de cargarlas a 95° por espacio de cinco minutos, esto se realizó en un termociclador. Se cargaron de 0.5 a 0.8 µl de DNA (de acuerdo a la concentración del amplificado) disuelto con la misma cantidad del colorante formamida. Bajo estas condiciones se dejaron correr las muestras por espacio de 1 hora. Una vez transcurrido este tiempo se desmontó el gel, se realizó el proceso de tinción (Apéndice 3.) y se dejó secar en posición horizontal hasta el día siguiente. Posteriormente se escaneó el gel para conservar la imagen del mismo y se procedió a identificar los alelos mediante una comparación visual de las bandas de cada muestra con respecto a las escaleras alélicas de cada uno de los marcadores.

6.6 Análisis estadístico

6.6.1 Equilibrio Hardy-Weinberg, frecuencias alélicas y genotípicas

Se utilizó el paquete DNA type. La comparación de las distribuciones de las frecuencias alélicas y genotípicas entre las poblaciones con y sin DM2 para todos los marcadores, se realizó mediante el análisis de tablas de contingencia utilizando el paquete RXC, Estadístico G con 10,000 simulacros (Guo y Thompson. 1992).

6.6.2 Número de loci heterocigóticos NHL (0, 1, 2 y 3)

El NHL de los tres microsatélites tipificados para cada población se realizó mediante el método de Brown (Brown *et al.*, 1980) y la comparación entre ellas mediante tablas de contingencia RXC con 10,000 simulacros.

6.6.3 Cálculo de porcentaje de mezcla génica

El grado de contribuciones ancestrales (española, amerindia y africana) se determinó mediante el método de máxima verosimilitud de Elston para poblaciones trihíbridas (Elston. 1971).

6.6.4 Comparación de las proporciones de mezcla génica

La comparación de ambas poblaciones mestizas se realizó mediante la prueba de Rao: X^2 para proporciones (Rao. 1973).

6.6.5 Visualización de las poblaciones en un plano tridimensional.

Para visualizar en un plano tridimensional la ubicación de las poblaciones de NL aleatoria y con DM2 se utilizó el análisis multivariado de tipo factorial con componentes principales

6.6.6 Estadística forense.

Se determinaron las heterocigosidades observadas y esperadas, el poder de discriminación (PD), el poder de exclusión (PE) y el contenido de información polimórfica (PIC), mediante los métodos de Ohno 1982.

7. RESULTADOS

7.1 Estructura Genética

7.1.1 Frecuencias génicas y genotípicas.

Después de realizada la amplificación de los STRs se verificó su amplificación mediante geles de agarosa al 8% (figura 6) y se realizó su tipificación mediante geles de poliacrilamida (figura 7). Una vez realizada la tipificación se obtuvieron las frecuencias génicas y genotípicas.

Figura 6. Verificación de la amplificación de 3 STRs en gel de agarosa al 2%.

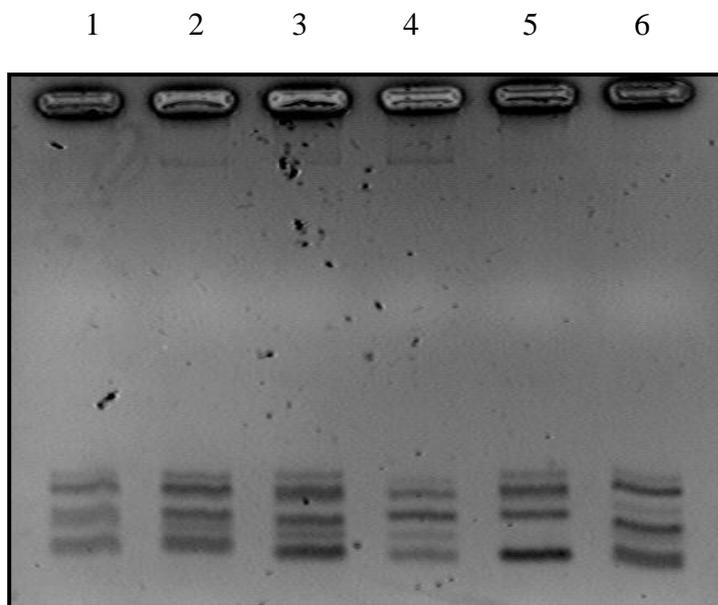
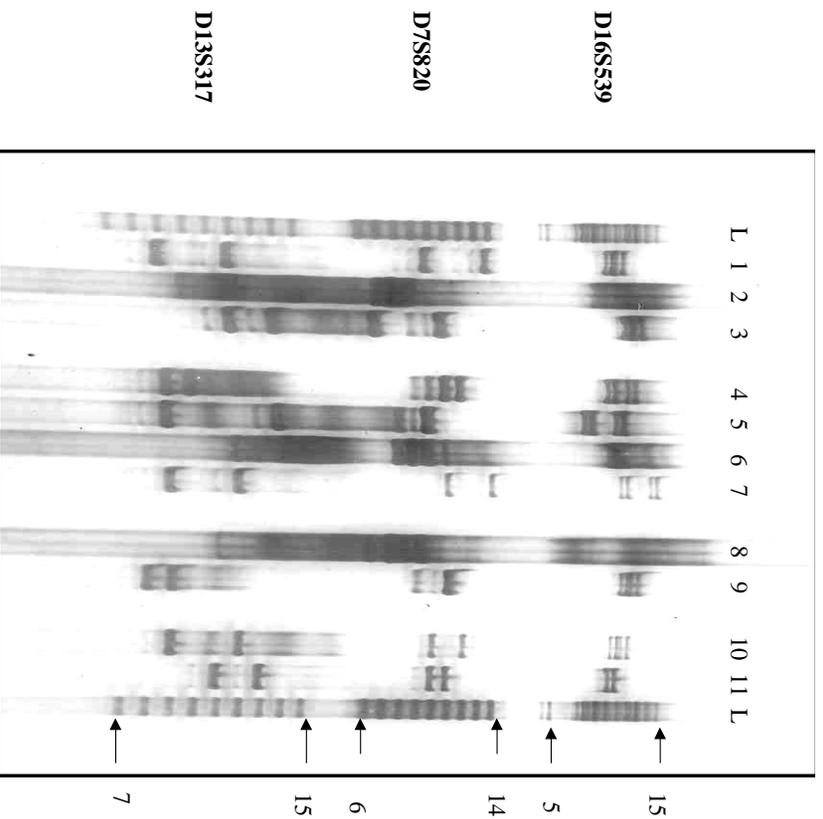


Figura 7. Tipificación de 3 STRs en gel de poliacrilamida al 6% teñido con plata. Se observan muestras individuales (1-11) amplificadas con Silver STR III Triplex (D16S539, D7S820 y D13S317) y la escalera alélica (L).



Las frecuencias alélicas de los locus STRs D16S539, D7S820 D13S317 tanto para la población con DM2 como para la aleatoria estuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg y se muestran en la tabla VII. Ambas poblaciones presentaron las mismas clases alélicas para cada uno de los locus, a excepción del locus D13S317 donde en la población con DM2 presentó el alelo 15 el cual no esta presente en la población aleatoria. Al realizar una comparación entre las frecuencias alélicas de ambas poblaciones para cada marcador no se observaron diferencias significativas, obteniéndose valores de $p=0.59$ para D16S539, $p=0.62$ para D7S820 y $p=0.10$ para D13S317. De igual manera en las figuras 8 (D13S317), 9 (D7S820) y 10 (D16S539) se esquematizan estas comparaciones.

TABLA VII.

Frecuencias alélicas para los locus D7S820, D13S317 y D16S539 en población seleccionada con DM2 y población aleatoria del Noreste de México.

Alelos	D7S820		D13S317		D16S539	
	DM2 ^a	Aleatoria ^b	DM2 ^a	Aleatoria ^b	DM2 ^a	Aleatoria ^b
7	0.0145	0.0140				
8	0.1019	0.0839	0.0825	0.0909	0.0194	0.0035
9	0.0873	0.0909	0.2427	0.2308	0.1068	0.0979
10	0.2427	0.2902	0.1068	0.0699	0.2087	0.1958
11	0.3058	0.2797	0.2378	0.1958	0.3252	0.3182
12	0.2038	0.1993	0.1456	0.2517	0.2427	0.2692
13	0.0242	0.0385	0.1262	0.1224	0.0922	0.0979
14	0.0194	0.0035	0.0534	0.0385	0.0048	0.0175
15			0.0048			
p*	0.625	0.10	0.591			

* Probabilidad obtenida al usar el paquete RXC con 10, 000 simulacros.

a = población seleccionada con DM2 (presente estudio).

b = población aleatoria del Noreste de México (Cerde Flores *et al.*, 2002c).

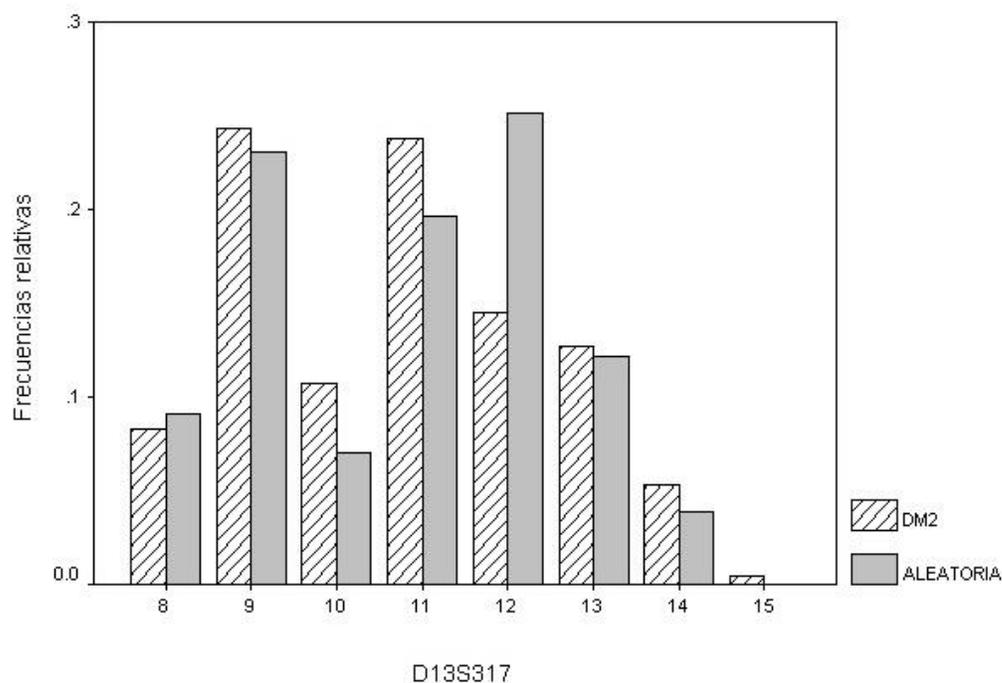


Figura 8. Distribución de las frecuencias alélicas de D13S317.

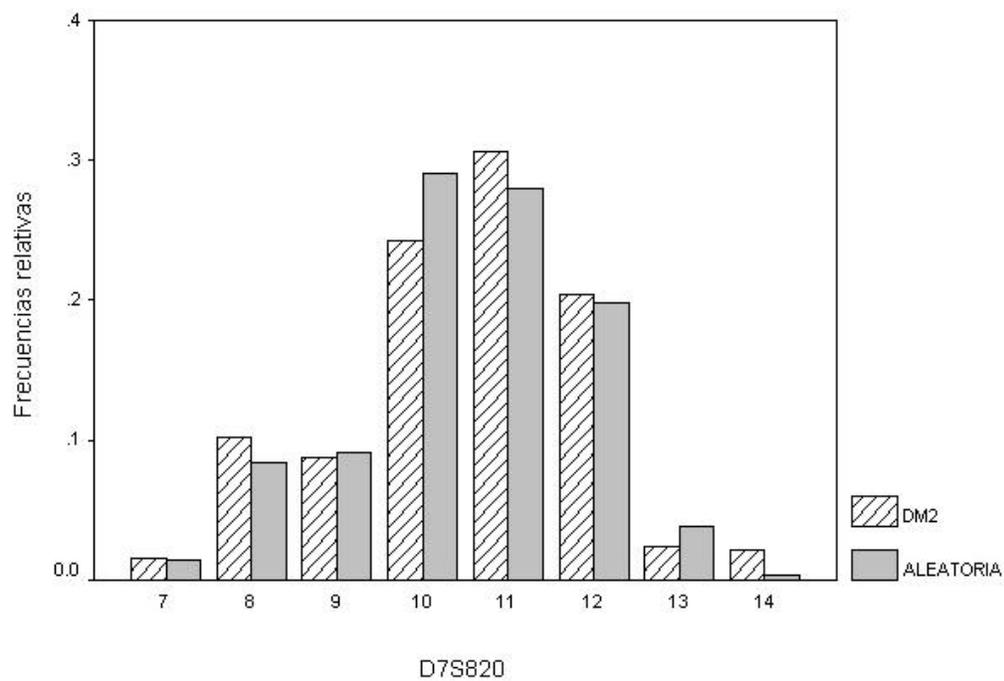


Figura 9. Distribución de las frecuencias alélicas de D7S820

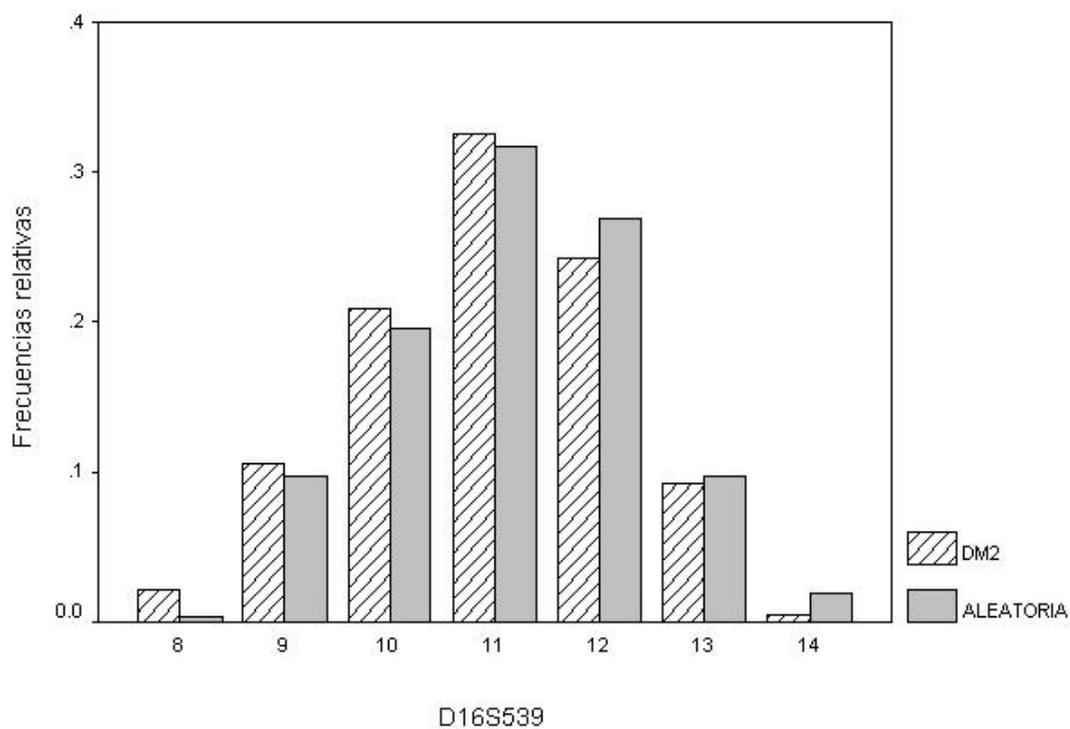


Figura 10. Distribución de las frecuencias alélicas de D16S539

Las frecuencias genotípicas de las poblaciones con DM2 y aleatoria se muestran en la tabla VIII. Al comparar ambas poblaciones no se observaron diferencias significativas con un valor de $p=0.62$ para D16S539, $p=0.79$ para D7S820 y $p=0.93$ para D13S317.

TABLA VIII

Frecuencias genotípicas de los microsatélites D7S820, D13S317 y D16S539 en población seleccionada con DM2 y población aleatoria del Noreste de México

CLASES GENOTÍPICAS	D7S820		D13S317		D16S539	
	DM2 ^a	Aleatoria ^b	DM2 ^a	Aleatoria ^b	DM2 ^a	Aleatoria ^b
7/8	0.0194	0.0070				
7/10	0.0000	0.0140				
7/11	0.0097	0.0070				
8/8	0.0097	0.0070	0.0097	0.0140		
8/9	0.0291	0.0210	0.0583	0.0350	0.0097	0.0000
8/10	0.0388	0.0629	0.0097	0.0280	0.0097	0.0070
8/11	0.0291	0.0350	0.0194	0.0420		
8/12	0.0583	0.0280	0.0194	0.0280	0.0194	0.0000
8/13	0.0097	0.0000	0.0194	0.0070		
8/14			0.0194	0.0140		
9/9	0.0000	0.0070	0.0680	0.0769	0.0000	0.0140
9/10	0.0097	0.0420	0.0583	0.0070	0.0485	0.0559
9/11	0.0777	0.0629	0.0777	0.0839	0.0874	0.0559
9/12	0.0583	0.0280	0.0485	0.1259	0.0583	0.0350
9/13	0.0000	0.0070	0.0874	0.0350	0.0097	0.0140
9/14			0.0194	0.0210	0.0000	0.0070
10/10	0.0485	0.0629			0.0291	0.0070
10/11	0.2039	0.1538	0.0777	0.0420	0.1262	0.1608
10/12	0.0971	0.1399	0.0388	0.0350	0.1068	0.0699
10/13	0.0194	0.0350	0.0291	0.0280	0.0680	0.0769
10/14	0.0194	0.0000			0.0000	0.0070
11/11	0.0777	0.0839	0.0680	0.0350	0.1359	0.0839
11/12	0.1262	0.1189	0.0388	0.0839	0.1068	0.1888
11/13	0.0000	0.0140	0.0680	0.0350	0.0485	0.0559
11/14	0.0097	0.0000	0.0485	0.0350	0.0097	0.0070
11/15			0.0097	0.0000		
12/12	0.0194	0.0280	0.0583	0.0639	0.0680	0.0979
12/13	0.0194	0.0210	0.0194	0.0979	0.0583	0.0420
12/14	0.0097	0.0070	0.0097	0.0070	0.0000	0.0070
13/13			0.0097	0.0210		
13/14			0.0097	0.0000	0.0000	0.0070
Probabilidad*	0.798		0.933		0.624	

* Probabilidad obtenida al usar el paquete RXC con 10, 000 simulacros.

a = población seleccionada con DM2 (presente estudio).

b = población aleatoria del Noreste de México (Cerde Flores *et al.*, 2002c)

Los resultados, obtenidos en cuanto a la comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas entre la población seleccionada con DM2 y la población general aleatoria, apoyan la hipótesis propuesta en el presente estudio.

7.1.2 Número de loci heterocigóticos

En cuanto al porcentaje del número de loci heterocigóticos (NHL), para los tres marcadores en la población con DM2 analizada, se encontró que el 91.26 % de la población es heterocigota para dos de los tres marcadores analizados. En la tabla IX se muestran estos resultados, lo mismo que los reportados anteriormente en población aleatoria. Al realizarse una comparación entre ambas poblaciones no se observaron diferencias significativas ($p = 0.823 \pm 0.0058$).

TABLA IX

Número de loci heterocigóticos (NHL) para los microsatélites D7S820, D13S317 y D16S539 en población con DM2 y Aleatoria.

NHL	DM2 ^a (%)	Aleatoria ^b (%)
0	1 (0.97)	1 (0.70)
1	8 (7.77)	15 (10.49)
2	43 (41.75)	53 (37.06)
3	51 (49.51)	74 (51.75)
Probabilidad	0.8230 \pm 0.0058	

* Probabilidad obtenida al usar el paquete RXC con 10, 000 simulacros.

a = población seleccionada con DM2 (presente estudio).

b = población aleatoria del Noreste de México (Cerde Flores *et al.*, 2002c).

7.1.3. Estadística forense

Los resultados de la estadística forense para la población analizada con DM2 y los reportados anteriormente con población aleatoria se observan en la tabla X, y son los siguientes: las heterocigosidades observadas fueron 0.83, 0.77 y 0.79 para DM2 y 0.79, 0.79 y 0.81 para la población aleatoria; el contenido de información polimórfica

fue similar para ambas poblaciones; el poder de discriminación (PD) combinado de los tres locus fue > 0.99 tanto para DM2 como para la población aleatoria; el poder de exclusión (PE) combinando los tres locus fue > 0.93 tanto para DM2 como para la población aleatoria.

TABLA X

Estadísticos forenses para los microsatélites D7S820, D13S317 y D16S539 en población con DM2 y Aleatoria.

ESTADÍSTICOS FORENSES	DM2^a (n=103)	ALEATORIA^b (n=143)
<i>Heterocigocidad</i>	0.83	0.79
D13S317	0.77	0.79
D16S539	0.79	0.81
D7S820		
<i>PIC</i>		
D13S317	0.80	0.79
D16S539	0.74	0.73
D7S820	0.76	0.74
<i>PD</i>		
D13S317	0.95	0.94
D16S539	0.91	0.90
D7S820	0.91	0.91
combinada	0.99955	0.99957
<i>PE</i>		
D13S317	0.65	0.63
D16S539	0.56	0.55
D7S820	0.59	0.57
Combinada	0.93690	0.93074

a = población seleccionada con DM2 (presente estudio).

b = población aleatoria del Noreste de México (Cerde Flores *et al.*, 2002c).

Al compararse ambas poblaciones mediante la prueba estadística de Z para proporciones, no se encontraron diferencias significativas.

7.1.4. Contribuciones ancestrales (española, amerindios y africana).

En cuanto al porcentaje de contribución de españoles, amerindios y africanos en la población con DM2 se obtuvo una proporción de 56% para españoles, 43% para amerindios y 1% para africanos. En la tabla XI se muestran estos resultados, lo mismo que los reportados anteriormente en población aleatoria. Al realizar una comparación de la mezcla génica entre ambas poblaciones no se observaron diferencias significativas con respecto a españoles ($p=0.45$), amerindios ($p=0.272$) y africanos ($p=0.860$) no mostraron diferencias significativas entre ellas.

TABLA XI

Porcentaje de contribución de españoles, amerindios y africanos al pool genético en población mestiza aleatoria y seleccionada con DM2 en el Noreste de México.

POBLACIÓN MESTIZA	ESPAÑOLES	AMERINDIOS	AFRICANOS
DM2^a	0.4603 ± 0.0895	0.5302 ± 0.0640	0.0094 ± 0.0698
Aleatoria^b	0.5602 ± 0.0990	0.4303 ± 0.0646	0.0094 ± 0.0820
X² Rao	0.56	1.21	0.03
*Probabilidad	0.454	0.272	0.860

* Probabilidad obtenida al usar el paquete RXC con 10, 000 simulacros.

a = población seleccionada con DM2, (presente estudio).

b = población aleatoria del Noreste de México (Cerde Flores *et al.*, 2002c).

El análisis de los componentes principales en la distribución de las poblaciones explicó un 98% de la variabilidad, ubicando a las poblaciones de DM2 y general en un plano similar y a una distancia media de las poblaciones ancestrales española e indígena, y alejándose de la africana (Figura 11).

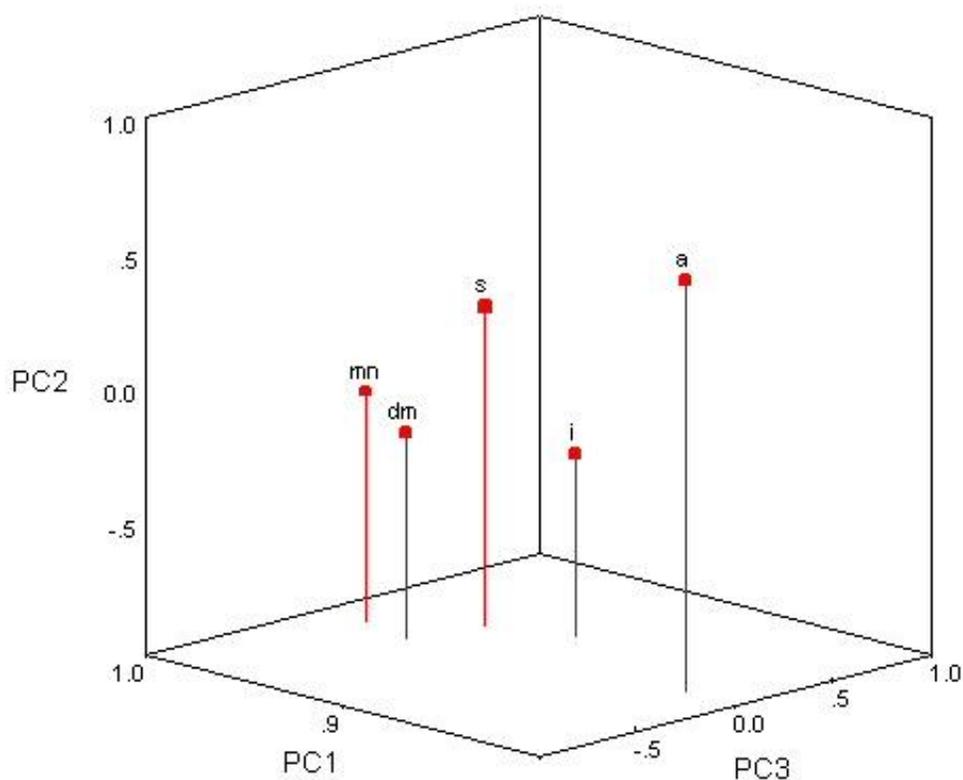


Figura 11. Distribución de las poblaciones: Española (s), Indígena (i), Africana (a), Mestiza sin DM2 (mn) y con DM2 (dm) para tres componentes principales basados en 3 STRs.

De acuerdo a todos los parámetros sobre estructura genética analizados en esta tesis, se demuestra homogeneidad genética entre ambas poblaciones (DM2 y aleatoria), tal homogeneidad es importante porque esto facilita la realización de estudios

posteriores enfocados al análisis la base genética de esta enfermedad. Esto último posibilita una fácil colecta de grandes series de casos y controles en investigaciones posteriores encaminadas hacia la búsqueda de genes candidatos o de susceptibilidad e investigación farmacogenómica.

7.2 Estructura ecológica.

Se analizaron algunos datos ecológico-demográficos de la población estudiada para conocer su estructura. A continuación se especifican estas características.

Para categorizar a las personas con respecto al lugar de nacimiento de sus abuelos, se dividió al país en cinco zonas. La zona No. 1 corresponde a NL y las restantes a diferentes zonas del país (figura 12).

Se estimó el porcentaje de inmigración mediante el análisis de la zona de nacimiento de los cuatro abuelos, observándose una fuerte inmigración ya que sólo el 19.07% nacieron en Nuevo León, mientras que el restante 80.3% procedían de otros estados (Tabla XII). Esto último posibilita un muestreo representativo en nuestra localidad de la población del resto de la República Mexicana

TABLA XII

Estimación del porcentaje de inmigración de acuerdo al lugar de nacimiento de los cuatro abuelos de los individuos con DM2.

Zona de nacimiento	Abuelos				%
	Paternos		Maternos		
	P	M	P	M	
I	15	16	21	22	19.07
II	63	64	61	58	63.40
III	9	8	7	7	7.99
IV	5	4	4	5	4.64
V	5	4	5	5	4.90
Total	97	96	98	97	100



Figura 12. Ubicación las zonas de la República Mexicana donde nacieron los abuelos de las personas con DM2.

-  ZONA I : Nuevo León.
-  ZONA II : San Luis Potosí, Coahuila, Chihuahua, Zacatecas y Durango.
-  ZONA III : Guanajuato, México, Aguascalientes, Querétaro, Puebla, Hidalgo, Morelos, Tlaxcala y Distrito Federal.
-  ZONA IV : Tamaulipas, Veracruz, Tabasco, Campeche, Yucatán Quintana Roo.
-  ZONA V : Chiapas, Oaxaca, Guerrero, Michoacán, Colima, Jalisco, Nayarit, Sinaloa, Sonora, Baja California Sur y Baja California Norte.

Además no se observaron diferencias significativas al comparar el lugar de nacimiento de ambos abuelos paternos $p = 1$, y maternos $p = 0.99$; lo mismo ocurrió al comparar el total de abuelos paternos con el total de abuelos maternos $p = 0.6$ (Tabla XIII).

TABLA XIII

Comparación del lugar de nacimiento de los abuelos paternos y maternos de una población de individuos con DM2.

Lugar de nacimiento	Paternos ($p = 1.00$)		Maternos ($p = 0.99$)		Total de abuelos paternos	Total de abuelos maternos	Total de abuelos	%
	P	M	P	M	$p = 0.60$			
1	15	16	21	22	31	43	74	19.07
2	63	64	61	58	127	119	246	63.40
3	9	8	7	7	17	14	31	7.99
4	5	4	4	5	9	9	18	4.64
5	5	4	5	5	9	10	19	4.90
Total	97	96	98	97	193	195	388	100

p = probabilidad obtenida al usar el paquete RXC con 10, 000 simulacros.

Otros valores descriptivos de la población que se obtuvieron fueron, el valor promedio de la edad del paciente (57 años), la edad promedio de diagnóstico (45 años), el tiempo promedio de padecer la enfermedad (11 años), el peso corporal promedio (77 kilos) y la estatura promedio (1.60 metros). Las variables anteriores se compararon con respecto al sexo y no se encontraron diferencias significativas (Tabla XIVa).

TABLA XIVa

Características ecológico-demográficas de una población seleccionada con DM2.

Característica	0 n = 113	Hombres (0) n= 48	Mujeres (0) n= 65	t-student	Probabilidad
Edad	57	60 ± 11	54 ± 9	-2.91	0.004
Edad de diagnóstico	45	48 ± 13	43 ± 10	-2.40	0.018
Tiempo con DM2	11	11 ± 9	11 ± 9	-0.30	0.760
Peso (Kg)	77	80.2 ± 12.7	73.8 ± 11.2	-2.80	0.006
Estatura (mts)	1.60	1.67 ± 0.76	1.54 ± 0.63	-9.95	0.000

En la tabla XIVb se describen algunas otras características de la población, destacando que en cuanto al índice de masa corporal, únicamente el 10% de los pacientes tenían su peso normal, mientras que el 46% tenían sobrepeso y el resto (44%) presentaban algún grado de obesidad. Esto indica que muy probablemente estos pacientes no están bien controlados con respecto a su enfermedad.

Con respecto al grado de estudios, se observó que el 10% no tenía ningún estudio, mientras que un 59 % sólo tenían estudios de primaria, solamente un 11% poseían un nivel escolar de preparatoria o superior a él.

En cuanto al tratamiento para su diabetes, el 75% tomaba pastillas mientras que el 15% se inyectaba insulina. Se comparó el comportamiento de estos parámetros entre hombres y mujeres y no se encontraron diferencias significativas.

Al analizar la presencia de diabetes en la familia del paciente, se observó lo siguiente: en el 66% la madre es diabética, mientras que en el 34% no lo es. En cambio sólo en el 19% su padre es diabético, mientras que en el 81% no lo es. Esto podría hablarnos de un posible factor presente en las mujeres que influye en un mayor riesgo para que se presente la enfermedad en sus hijos.

Con respecto a la presencia de diabetes en los hermanos del paciente, se observó que el 53% no tenían hermanos diabéticos, mientras que el 47% tenían cuando menos un hermano con diabetes.

TABLA XIVb

Características ecológico-demográficas de una población seleccionada con DM2.

Característica	Hombres N=48	Mujeres N=65	Total	%	X ²	p
IMC*						
Normal	8	3	11	10.0		
Sobrepeso	24	26	50	45.5		
Obesidad I	10	22	32	29.1		
Obesidad II	5	9	14	12.7		
Obesidad III	3	3	3	2.7	8.85	0.65
Estado civil						
Soltero	1	4	5	4.0		
Casado	43	55	98	87.0		
Viudo	2	5	7	6.0		
Divorciado	2	1	3	3.0	2.38	0.49
Grado estudios						
Ninguno	5	7	12	10		
Primaria	26	41	67	59		
Secundaria	5	6	11	10		
Comercial/Técnica	3	8	11	10		
Preparatoria	6	1	7	6		
Profesional	1	1	2	2	7.57	0.27
Maestría	2	1	3	3		
Tratamiento médico						
Ninguno	0	1	1	1.0		
Dieta	5	4	9	8.0		
Natural	0	1	1	1.0		
Hipoglucemiantes	38	47	85	75.0	3.46	0.48
Insulina	5	12	17	15.0		
Descendencia (hijos)						
0	2	2	4	3.54		
1-3	14	21	35	30.97		
4-8	26	32	58	51.33		
9-15	6	10	16	14.16	0.47	0.92

IMC = peso / estatura².

En cuanto a su descendencia, únicamente el 10 % ya presentaba diabetes a la fecha de la entrevista, mientras que un 90% no la presentaba. Esto probablemente es consecuencia de que éstos aún no presentan la edad suficiente para que se manifieste, ya que algunos de ellos aún son muy jóvenes.

No se observaron diferencias significativas en cuanto a estos resultados con respecto a hombres y mujeres (tabla XV).

TABLA XV

Presencia de diabetes en la familia de los individuos de una población seleccionada con DM2.

Familiar con DM2	Población analizada con DM2		Total	%	X ²
	Hombres	Mujeres			
Madre					
Si	15	23	38	34	
No	32	42	74	66	0.15
Padre					
Si	7	14	21	19	
No	39	49	88	81	0.84
Hermanos					
0	27	33	60	53	
1-2	17	22	39	34	
3-4	2	9	11	10	
5-7	2	1	3	3	4.22
Descendencia					
0	42	57	99	90	
1	4	5	9	8	
2	0	1	1	1	
4	1	0	1	1	2.10

8. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en cuanto a la comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas entre la población seleccionada con DM2 y la población general aleatoria apoyan la hipótesis propuesta en el presente estudio, esto es, no hay diferencias significativas entre la estructura genética de ambas poblaciones. Además esto es apoyado por los resultados similares encontrados en cuanto a contribuciones ancestrales de la población de españoles, amerindios y africanos (Cerde-Flores *et al.*, 2002a; Cerde-Flores *et al.*, 2002c). La demostración de tal homogeneidad es importante porque esto facilita la realización de estudios posteriores enfocados al análisis la base genética de esta enfermedad. Esto último posibilita una fácil colecta de grandes series de casos y controles en investigaciones posteriores encaminadas hacia la búsqueda de genes candidatos o de susceptibilidad e investigación farmacogenómica.

En cuanto al alto porcentaje de heterocigosidad encontrado en nuestra población además de coincidir con lo reportado para la población aleatoria (Cerde Flores *et al.*, 2002c), nos habla de la validez de estos marcadores altamente polimórficos en estudios de genética de poblaciones

Por otro lado, la similitud de los valores estadísticos forenses en ambas poblaciones nos indica que independientemente de la selección que se haga de un individuo en una población mexicana (en este caso con DM2) el uso de los marcadores STRs utilizados permitirán una identificación confiable de su perfil.

En cuanto a la descripción de la población seleccionada, llaman la atención lo siguiente: a) se observa una fuerte inmigración de otros estados de la República hacia Nuevo León lo que posibilita un muestreo representativo en nuestra localidad de la población del resto de la República; b) encontramos un grado de escolaridad muy bajo entre nuestros pacientes, esta información puede ser de utilidad para conocer hacia que tipo de población deben ir dirigidas las campañas de prevención y manejo de la enfermedad, esta relación de prevalencia de la diabetes con el nivel educativo ya se ha detectado anteriormente (Encuesta Nacional de Enfermedades crónicas 2004), probablemente cuando se tiene menor capacidad adquisitiva, se tiende a compensar la calidad de los alimentos con la cantidad, lo que explica el elevado riesgo de desarrollar diabetes en población de bajo nivel educativo. Esta información puede ser de utilidad para conocer hacia que tipo de población deben ir dirigidas las campañas de prevención y manejo de la enfermedad; c) el hecho de que la gran mayoría de nuestros pacientes tenga sobrepeso o bien algún grado de obesidad nos indica que muy probablemente estos pacientes no están bien controlados con respecto a su enfermedad; d) en cuanto a

la agregación familiar de la enfermedad, al parecer influye en mayor proporción el hecho de que la madre sea diabética con respecto a que el padre lo sea, para que se presente la enfermedad. Esto podría hablarnos de un posible factor presente en las mujeres que influye en un mayor riesgo para que se presente la enfermedad en sus hijos. Por otro lado, el hecho de que solamente el 10% de los hijos de los pacientes presenten la enfermedad probablemente es consecuencia a que éstos aún no presentan la edad suficiente para que se manifieste, ya que algunos de ellos aún son muy jóvenes.

9. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados del presente trabajo se concluye lo siguiente:

- Existe homogeneidad genética en la población estudiada con DM2.
- No hay diferencias significativas entre la estructura genética de la población seleccionada con DM2 y una población aleatoria previamente analizada.
- Existe un alto porcentaje de heterocigosidad en la población estudiada.
- En cuanto a mezcla génica (españoles, amerindios y africanos), no se observaron diferencias significativas entre ambas poblaciones.
- Se encontró similitud en los valores de estadísticos forenses en ambas poblaciones.

En cuanto a la descripción de la población seleccionada, es importante considerar lo siguiente:

- Se observa una fuerte inmigración de otros estados de la República hacia Nuevo León.
- Encontramos un grado de escolaridad muy bajo en la población con DM2.
- La gran mayoría de los pacientes tiene sobrepeso o bien algún grado de obesidad.
- En cuanto a la agregación familiar de la enfermedad, influye en mayor proporción para que se presente la enfermedad el hecho de que la madre sea diabética con respecto a que el padre lo sea.

10. PERSPECTIVAS

Ya que en el presente estudio se encontró homogeneidad genética en la población con DM2, inferimos (desde un punto de vista genético-epidemiológico) importantes implicaciones en estudios de asociación en enfermedades poligénicas con un fuerte componente genético como es el caso de la DM2, ya que ahora se facilitará el muestreo tanto de individuos afectados como de controles, sin necesidad de detallar información acerca de su historia residencial o historia de migración entre Estados del país. Esto último posibilita una fácil colecta de grandes series de casos y controles aplicables posteriormente a la búsqueda de genes candidatos. Además, se plantea mediante el uso de marcadores altamente polimórficos y SNPs, lo siguiente: 1) la búsqueda de nuevos genes candidatos mediante un “screening” de DNA, y 2) la validación genes candidatos ya reportados en la literatura. Todas estas perspectivas serán de gran utilidad en los nacientes campos en México de la Epidemiología Molecular, Medicina Genómica y Farmacogenómica y de gran beneficio para el área biomédica.

11. LITERATURA CITADA

Almind K., A. Doria, CR. Kahn. 2001. Putting the genes for type II diabetes on the map. *Nat Med* **7**:277-279.

Belliver F., 2003. Genetic association studies: Definition of cases and controls. *Methods Mol Med*, **77**: 127-141.

Brown AHD., MW. Feldman , E. Nevo . 1980. Multilocus structure of natural populations of *Hordeum spontaneum*. *Genetics* **98**:523-536.

Budowle B., J. Smith, T. Moretti, J. DiZinno. 2000. DNA Typing Protocols: Molecular and Forensic Analysis. Eaton Publishing, Natick, MA. p. 135-154.

Budowle B., B. Shea, S. Niezgoda, Chakraborty. 2001. CODIS STR loci data from 41 sample populations. *J. Forensic Sci.* **46**:453-489.

Cardon LR., Palmer L. 2003. Population stratification and spurious allelic association. *Lancet* **361** :598-604. www.thelancet.com

Cerda-Flores RM., GK Kshatriya, SA. Barton, CH. Leal-Garza, R. Garza-Chapa, WJ. Schull, R. Chakraborty. 1991. Genetic structure of the populations migrating from San Luis Potosí and Zacatecas to Nuevo León in México. *Hum. Biol.* **63**:309-327.

Cerda-Flores RM., SA. Barton, CL. Hanis, R. Chakraborty .1994. Genetic variation by birth-cohorts in Mexican Americans of Starr County, Texas. *Amer. J. Hum. Biol.* **6**:669-674.

Cerda-Flores RM. y MI. Dávila-Rodríguez. 2000. Natural fertility in northeastern México. Genetic structure by birthyear and birthplace. *Arch. Med. Res. México* **31**:520-525.

Cerda-Flores RM., MC. Villalobos-Torres, HA. Barrera-Saldaña, L. Cortes-Prieto, LO. Barajas, F. Rivas, A. Carracedo , Y. Zhong, SA. Barton, R. Chakraborty. 2002a. Genetic admixture in three Mexican mestizo populations based on D1S80 and HLA-DQA1. *Am. J. Hum. Biol.* **14**:257-263.

Cerda-Flores RM., L. Jin, SA. Barton, R. Chakraborty. 2002b. Distribution of mtDNA data in Northeastern Mexico. *Am. J. Hum. Biol.* **14**:257-263.

Cerda-Flores RM., B. Budowle, L. Jin, SA. Barton, R. Chakraborty. 2002c. Maximum Loglikelihood estimates of admixture in Northeastern Mexico using 13 short tandem repeat loci. *Am. J. Hum. Biol.* **14**:429-439.

Cerda-Flores RM., MI. Dávila-Rodríguez, EI. Cortéz-Gutiérrez, RA. Rivera Prieto, AL. Calderón-Garcidueñas, JA. Gaspar-Belmonte, E. Ibarra-Costilla, MA. Rojas Alvarado. 2003. Genética de la Diabetes mellitus tipo 2 en el Noreste de México. Prevalencia en los individuos con los apellidos Martínez y Rodríguez. *RESPYN* **4**(3). <http://www.uanl.mx/publicaciones/respyn/iv/3/comunicaciones/genetica.dm.htm>

Chakraborty R. 1992. Sample size requirements for addressing the population genetic issues of forensic use of DNA typing. *Hum. Biol.* **64**:141-159.

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

Dean L. y J. McEntyre. 2004. The Genetic Landscape of diabetes. NCBI books. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=diabetes>

Diabetes Atlas. 2003. 2nd Edition. International Diabetes Federation. www.eatlas.idf.org

Dirección General de Epidemiología 2001. Dirección de Vigilancia Epidemiológica de Enfermedades No transmisibles.

Díaz-Hernández DP. y LC. Burgos-Herrera. 2002. ¿Cómo se transporta la glucosa a través de la membrana celular?. *ATREIA* **15**: 179-189.

Edwards A., A Civitello, HA. Hammond, CT. Caskey. 1991. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am. J. Hum. Genet.* **49**:746-756

Edwards A., HA. Hammond, L. Jin, CT. Caskey, R. Chakraborty. 1992. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics* **12**: 241-253.

Elston RC. 1971. The estimation of admixture in racial hybrids. *Ann. Hum. Genet.* **35**:9-17.

Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas (1994).

Encuesta nacional de Salud. 2000 (SSA-INSP). Cuestionario de adultos. p 94-101.

Entrala C. 2000. Técnicas de análisis de ADN en genética forense. Laboratorio de ADN forense, Depto. de Medicina Legal. Universidad de Granada, España.
www.ugr.es/~eiane/Biotecnologia/forensetec.htm.

Entrala C., JA. Lorente, M. Lorente, JC. Alvarez, B. Budowle, E. Villanueva 1999. Spanish population data on the loci D13S317, D7S820 and D16S539 generated using silver staining (SilverSTR III Multiplex). *J. Forensic Sci.* **44**:1032-1034.

Estadísticas de mortalidad en México : muertes registradas en el año 2001. 2002. *Salud pública de México.* **44**: 565-573.

Fregeau CJ. y RM. Fourney 1993. DNA typing with fluorescently tagged short tandem repeats: A sensitive and accurate approach to human identification. *Bio Techniques* **15**:100-119.

Gene Print ® STR Systems (Silver Stain Detection). En: Thechnical Manual No.D004. Promega Corporation. www.promega.com

Guo SW. y EA. Thompson. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* **48**:361-372.

Hanis CL., E. Boerwinkle, R. Chakraborty, DL. Ellsworth, P. Concannon, B. Stirling, VA. Morrison, B. Wapelhorst, RS. Spielman, KJ. Gogolin-Ewens, JM. Shepared, SR. Williams, N. Risch, D. Hinds, N. Iwasaki, M. Ogata, Y Omori, C. Petzold, H. Rietzch, HE. Schroder, J. Schulze, NJ. Cox, S. Menzel, VV. Bororaj, X.

Chen. 1996. A genome wide search for human non-insulin dependent (type II) diabetes genes reveals a major susceptibility locus on chromosome 2. *Nat. Genet.* **13**:161-166.

Hochmeister MN., JM. Jung, B. Budowle, UV. Borer, R. Dirnhofer. 1994. Swiss population data on three tetrameric short tandem repeat loci—VWA, HUMTH01 and F13A1 derived using multiplex PCR and laser fluorescence detection. *Int.J.Legal Med.* **107**:34-36.

Kimpton CP., P. Gill, A. Walton, A. Urquhart, ES. Millican, M. Adams. 1993. Automated DNA profiling employing multiplex amplification of short tandem repeat loci. *PCR. Methods Appl.* **3**:13-22.

Kimpton CP., D. Fisher, S. Watson, M. Adams, A. Urquhart, J. Lygo, P. Gill. 1994. Evaluation of a automated DNA profiling system employing multiplex amplification of four tetrameric STR loci *INT J. Legal Med.* **106**:302-311.

Kimpton CP., NJ. Oldroyd, SK. Waltson, RR. Frazier, PE. Johnson, ES. Millican, A. Urquhart, BL. Sparkes, P. Gill. 1996. Validation of highly discriminating multiplex short tandem repeat amplification systems for individual identification. *Electrophoresis* **17**:1283-1293.

Lodish, Berk, Matsudaira, Kaiser, Krieger, Scott, Zipursky and Darnell. Cell to cell signaling hormones and receptors. En: Molecular Cell Biology. 2000. W.H. Freeman and Company .

<http://www.ncbi.nlm.gov/books/bv.fcgi?tool=bookshelf&call=bv.View.ShowSection&rid=mcb.figgrp.5903>

Luna-Vázquez A., G. Vilchis-Dorantes, Paez-Riberos L.A., Muñoz-Valle F., González-Martin A., Rangel-Villalobos H. 2003. Population data of nine STRs of mexican-mestizos from México City. Forensic Sci. Int. 136: 96-98.

Martínez de Pancorbo M. Lecciones de Genética. Genotipado y Medicina Forense. 1977. Boletín de la Sociedad Española de Genética. 10: 1-3.

Miller SA., DD. Dykes y HF. Polesky. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Research 16: 1215.

Moretti TR., AL. Baumstark, DA. Defenbaugh, KM. Keys, JB. Smerick, B. Budowle. 2001. Validation of short tandem repeats (STRs) for forensic usage: performance testing of fluorescent multiplex STR systems and analysis of authentic and simulated forensic samples. 2001. J. Forensic Sci. 46:647-660.

Ohno Y., JM. Sebetan y S. Akaishi. 1982. A simple method for calculating the probability of excluding paternity with any number of codominant alleles. Forensic Sci. Int. 19:93-98.

Olmos P. 2001. Sistema de control Biomédico-Glicemia Normal. En: Teoría de Control, Fisiología y Enfermedad, Capítulo 2. IEE 3802, p 7-10.

Permutt MA. y AT. Hattersley. 2000. Searching for type 2 diabetes genes in the Post-Genome Era. Trends in endocrinology and metabolism. 11: 383-93.

Principales causas de mortalidad general, México 2001. Base de datos de defunciones INEGI/Secretaría de Salud. Dirección general de Información en salud. CONAPO, 2002. Proyecciones de la población de México, 2000-2050. Estadística tomada del sitio www.salud.gob.mx/estadisticas

Principales causas de mortalidad general, México 2003. INEGI/Secretaría de Salud. Dirección general de información en salud.

Pritchard, JK. y N.A. Rosenberg. 1999. Use of unlinked genetic markers to detect population stratification in association studies. Am. J. Hum. Genet. 65: 220-228.

Rannala, B. 2001. Finding genes influencing susceptibility to complex diseases in the Post-Genome Era. Am. J. Pharmacogenomics. 1:203-221.

Rao CR. 1973. Linear statistical inference and its applications, 2nd Ed. New York, John Wiley.

Ravinovich JE., Introducción a la ecología de poblaciones animales . México, CECSA.

Salido E., D. Hernández y A.Torres. 2001. Avances moleculares y terapéuticos en la diabetes: perspectivas de futuro. NEFROLOGÍA. Vol. XXI: 112-120.

Sánchez-Corona J., SE. Flores-Martínez, MV. Machorro-Lazo, C. Galaviz-Hernández, MC. Morán-Moguel, FJ. Perea, KI. Mújica-López, L. Vargas-Ancona HA. Laviada-Molina, V. Fernández, J. Pardío, P. Arroyo, H. Barrera-Saldaña, RL. Hanson. 2004. Polymorphisms in candidate genes for type 2 diabetes mellitus in a Mexican population with metabolic syndrome findings. Diabetes Research and Clin. Practice 63: 47-55.

Satten GA., D. Flanders, Q Yang. 2001. Accounting for unmeasured population substructure in case-control studies of genetic association using a novel latent-class model. Am. J. Genet. 68:466-477.

Stern MP., R. Duggirala, BD. Mitchell, LJ. Reinhart, S. Shivakumar, PA. Shipman, OC. Uresandi, E. Benavides, J. Blangero, P. O'Connel. 1996. Evidence for linkage of regions on chromosomes 6 and 11 to plasma glucose concentrations in Mexican Americans. Genome Res. 6:724-734

Tusié-Luna MT. 1997. Caracterización genética de familias mexicanas con diabetes mellitus no insulino dependientes de aparición temprana incluyendo tipo MODY. Premios Funsalud Año 1 número 3. www.silanes.com.mx/ingles/publica/genetica.html.

Tusié-Luna MT. 2001. México sí contribuye al estudio del genoma humano. Circular Guanabios 3(4):noticia ISSN 1527-9723. <http://noticias.guanabios.org/2001/abr/20010410-1.html>.

Urquhart A, NJ. Oldroyd, CP. Kimpton, P. Gill.1995. Highly discriminating heptaplex short tandem repeat PCR system for forensic identification. Bio Techniques 18: 116-121.

Vázquez-Robles M. y J. Escobedo de la Peña. 1990. Análisis de la mortalidad por Diabetes mellitus en el Instituto Mexicano del Seguro Social (1979-1987). Rev. Med. IMSS. 28: 157-170.

Zhang AZ, C. Xiao, W. Li, Y. Hou, J. Zhu, J. Wang. 2000. Polymorphisms of four STRs and the ir associations with IDDM in Chinese Han population. Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi. 17:248-251.

12. APÉNDICES

APÉNDICE A. EXTRACCIÓN DE DNA A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA MEDIANTE LA TÉCNICA DE SALADO (salting out)

- 1.- Colocar 5 ml de sangre anticoagulada con EDTA 5 mM en un tubo de 50 ml y agregar 20 ml de solución de lisis de eritocitos (NH_4Cl 155 mM, NaHCO_3 10mM, EDTA 0.1 mM pH 7.4).
- 2.- Incubar la muestra en hielo durante 15 minutos, mezclando ocasionalmente (a los 5 y a los 10 minutos).
- 3.- Centrifugar 10 minutos a 5000 rpm.
- 4.- Descartar el sobrenadante y resuspender la pastilla de leucocitos en 10 ml de solución de lisis para eritocitos.
- 5.- Dejar 5 minutos en hielo.
- 6.-Centrifugar 10 minutos a 5000 rpm.
- 7.- Eliminar el sobrenadante . Lavar la pastilla con solución de lisis de eritocitos sin desprenderla.
- 8.- Centrifugar 5 minutos a 5,000 rpm.
- 9.- Resuspender la pastilla en 3 ml de buffer de lisis para células blancas (Tris-HCl 10 mM, NaCl 400 mM, EDTA 2mM pH 8.2).
- 10.- Se deja en agitación suave por 10 minutos para disolver la pastilla.
- 11.- Agregar 0.2 ml de SDS al 10% y 60 μl de proteinasa K (10 mg /ml).
- 12.- Incubar a 37 °C toda la noche. Si no se llevara a cabo la digestión, agregar otros 60 μl de proteinasa a la muestra.
- 13.- Transferir la solución a un tubo de 15 ml y agregar 1 ml de NaCl saturado (6M).

- 14.- Agitar vigorosamente (con vórtex) por aproximadamente 15 segundos.
- 15.- Centrifugar 15 minutos a 5,000 rpm.
- 16.- Transferir el sobrenadante a un tubo de 15 ml y centrifugar 15 min. a 5,000 rpm.
- 17.- Transferir el sobrenadante a otro tubo de 15 ml y precipitar el DNA con 2 volúmenes de Etanol al 100%.
- 18.- Mover el tubo lentamente hacia un lado y otro por espacio de 10-15 minutos. Poco a poco se va a ir formando una hebra de DNA.
- 19.- Transferir la hebra de DNA con ayuda de una micropipeta a un tubo eppendorf de 1 ml.
- 20.- Centrifugar a 14,000 rpm por 10 minutos.
- 21.- Decantar el sobrenadante y lavar la pastilla con 1 ml de Etanol al 70 %.
- 22.- Centrifugar a 14,000 rpm durante 15 minutos.
- 23.- Descartar sobrenadante y secar la pastilla en la cercanía de un mechero dentro de una campana (o bien dejarla secar hasta el día siguiente).
- 24.- Diluir la pastilla en 200 a 500 μ l de TE 1X.
- 25.- Guardar en refrigeración.

APÉNCICE B. GEL DE POLIACRILAMIDA: PREPARACIÓN, CORRIMIENTO Y TEÑIDO CON PLATA

Preparación del gel de poliacrilamida.

- 1.- Ambos vidrios (15 x 35 cm) se tallan (con kimwipes) y etanol al 100% 4 veces, dejando pasar 5 minutos entre cada uno de los lavados.
- 2.- Al vidrio corto (el que tiene la muesca) se le aplican 3 μ l de Bindsilane (1 ml de *ácido acético-etanol + 3 μ l de BindSilane) que se esparcen uniformemente sobre el vidrio con ayuda de kimwipes.
- 3.- Se deja secar por una hora .
- 4.- Aplicar 3 lavados con etanol al 100 % dejando pasar 5 minutos entre cada uno. Se deja secar.
- 5.- Al vidrio largo se le aplican 1.5 ml de silmacote.
- 6.- Se deja secar por espacio de media hora.
- 7.- Quitar el exceso de silmacote lavando suavemente con 1.5 a 2 ml de agua MQ con ayuda de kimwipes.
- 7.- Se montan los vidrios con los separadores de 1 mm de grosor con ayuda de cinta adhesiva y pinzas de presión.
- 8.- Se prepara la solución del gel para un volumen de 50 ml (50 ml acrilamida al 6% + 800 μ l **persulfato 10% + 80 μ l TEMED).
- 9.- Se vacía esta solución entre los vidrios con ayuda de una jeringa, cuidando que no se formen burbujas.
- 10.- Se deja polimerizar por espacio de 15-30 minutos.
- 11.- Se quita la cinta de la parte inferior y se lleva a lavar a la llave de agua para quitar el exceso de acrilamida, aquí también se quita el peine.
- 12.- Se montan los vidrios en la cámara vertical con buffer TBE 0.5X.
- 13.- Ya montado el gel, se quita el exceso de acrilamida de los pozos con una pipeta

*250 microlitros de ac. acético aforar a 50 ml con etanol al 95%

** persulfato al 10%

Soluciones de acrilamida:**Acrilamida-bis 40% (250 ml)**

Acrilamida-----95 gr
Bis-acrilamida-----5 gr
Aforar a 250 ml con agua MQ

Acrilamida-bis 6% (300 ml)

Urea-----126.4 gr
Agua MQ-----145 ml
TBE 10X-----15 ml
Acrilamida 40%----45 ml

Preparación de muestras y corrimiento del gel.

- 1.- Es indispensable precorrer el gel antes de cargar las muestras. Condiciones de precorrimento: 2000 volts, 40 miliampers y 50 watts durante 40 minutos.
- 2.- En tubos de PCR se colocan de 0.5 a 1 μ l de muestra + la misma cantidad de colorante formamida
- 3.- Antes de cargar las muestras es necesario desnaturalizarlas. Esto se realiza en un termociclador a 95°C por 5 minutos.
- 4.- En cuanto salgan las muestras del termociclador se ponen en hielo y se cargan inmediatamente con una puntilla delgada. Se carga todo el contenido de la muestra.
- 5.- Se ponen 1.5-1.8 μ l de la escalera alélica cada 4-5 muestras, además de un control ya tipificado.
- 6.- Condiciones de corrimiento: 2000 volts, 40 miliampers y 50 watts durante 1 hora.
- 7.- Transcurrido el tiempo de corrimiento se desmonta el gel y se pasa a teñir.

Tinción del gel con nitrato de plata.

El siguiente proceso es necesario realizarlo sobre una plancha de agitación.

- 1.- Se desmonta el gel de la cámara de electroforesis:

- ✓ Se quitan las cintas adhesivas de los lados del vidrio con mucho cuidado
- ✓ Con ayuda de un separador se despegan suavemente los vidrios iniciando por la parte de superior y se continua hasta terminar en la parte inferior (es muy importante despegar adecuadamente, porque si se rompe el gel se pierde todo el trabajo anterior).
- ✓ Se lleva al recipiente donde se encuentra la solución fijadora

- 1.- Se coloca el vidrio en la solución fijadora (ácido acético glacial al 10%) por 20 minutos.
- 2.- Se realizan 4 lavados del vidrio con agua destilada con una duración de 2 minutos cada una.
- 3.- Se pasa a la solución de tinción por 30 minutos.
- 4.- Se realiza un lavado con agua destilada por 10 segundos.
- 5.- Se pasa a la solución reveladora y se espera a que aparezcan las bandas, esto sucede aproximadamente en 3-4 minutos.
- 6.- Se fija y se detiene la tinción, vertiendo solución fijadora en la solución anterior (5 minutos)
- 7.- Se realizan dos lavados con agua destilada (de 2 minutos cada uno).
- 8.- Se deja secar al medio ambiente para leer hasta el siguiente día.

Solución de tinción:

Nitrato de plata ----- 1 gr
 Formaldehído al 37% ----- 1.5 ml
 Agua destilada ----- 1 litro

Solución reveladora:

Carbonato de sodio ----- 30 gr
 Agua destilada ----- 1 litro

Disolver lo anterior y enfriar en hielo por media hora. Inmediatamente antes de usarla agregar:

Tiosulfato de sodio 10 % ----- 200 μ l
 Formaldehído 37% ----- 1.5 ml

APÉNDICE C. HOJA DE ENCUESTA

Encuestador _____

Fecha _____

PROTOCOLO DE DIABETES MELLITUS

1. Estado _____
2. Institución _____
3. Nombre de la persona _____
4. Expediente _____ Edad _____
- 5.-Peso _____ Talla _____
6. Ocupación _____ Tiempo de última ocupación _____
7. Fecha de Nacimiento _____ Lugar _____
- 8 Grado máximo de estudios _____
9. Estado civil _____ Años de último estado civil _____
10. Dirección actual _____
11. Años de última residencia _____ Teléfono _____

DATOS DE LA MADRE

12. Nombre _____
13. Fecha de nacimiento _____
14. Lugar de nacimiento _____
15. Vive? _____ Causa de muerte _____
16. Enfermedades _____
17. Ocupación _____

ABUELOS MATERNOS

Nombre	Lugar nacimiento	Edad	Causa muerte	de
H				
M				

DATOS DEL PADRE

20. Nombre _____
21. Fecha de nacimiento _____
22. Lugar de nacimiento _____
23. Vive? _____ Causa de muerte _____
24. Enfermedades _____
25. Ocupación _____

ABUELOS PATERNOS

Nombre	Lugar nacimiento	Edad	Causa de muerte
H			
M			

HERMANOS (AS)

28. Número total _____ Vivos: H _____ M _____ Muertos: H _____ M _____

29. Causas de muerte: _____

30. Historia neoplásica: _____

HIJOS (AS)

31. Número total _____ Vivos: H _____ M _____ Muertos: H _____ M _____

32. Causas de muerte: _____

33. Historia neoplásica: _____

CÓNYUGE

34. Nombre _____ Fecha nacimiento _____

35. Lugar de nacimiento _____ Ocupación _____

36. Enfermedades _____

CASA HABITACIÓN

37. Propia _____ Rentada _____ Prestada _____

38. Número de personas que la habitan _____

39. Número de cuartos (sin contar cocina ni baños) _____

40. Agua potable si _____ no _____ Drenaje si _____ no _____

HISTORIA GINECO-OBSTETRICA Y PATOLÓGICA

41. Menarquía _____ Menopausia _____ Causa _____

42. IVSA _____ gestas _____ Abortos _____ Partos _____ Cesáreas _____

43. Edad al primer parto _____ Edad primera lactación _____ Meses tot _____

44. Enfermedades previas y/o concomitantes y duración _____ - _____

44. Edad al diagnóstico de la enfermedad

45. Historia de diabetes mellitus familiar _____

46. Complicaciones clínicas de la diabetes :

Insuficiencia renal : no _____ si _____ Diálisis peritoneal _____ Hemodiálisis _____

Retinopatía (Ha perdido visión, le han coagulado por dentro del ojo?) si _____ no _____

Le han amputado algún miembro: no _____ si _____Cuál? _____

Tienen presión arterial alta? No ___ si _____

Ha estado internado por causa de la diabetes? no ___ si ___ Causa _____

Ha sufrido algún infarto miocárdico (ataque al corazón)? no ___ si ___

Ha tenido embolias cerebrales? No ___ Si _____

47. Tratamiento:

Dieta solamente _____

Naturista _____

Hipoglucemiantes orales (pastillas para la diabetes mellitus)

Insulina _____

APÉNDICE D. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Clave del proyecto _____ Fecha _____

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Mediante la presente carta, autorizo mi participación en el estudio de investigación
“Estructura Biológica de las poblaciones mestizas mexicanas con Diabetes mellitus”
 ”

que tiene por objeto determinar si existe homogeneidad genética esta población. Mi participación en este estudio, es voluntaria y tengo la opción de retirarme en cualquier momento, sin que esto represente pérdida de mis derechos como paciente. Mi participación en este estudio, incluirá contestar un cuestionario sobre el lugar de origen de mis padres y abuelos, así como antecedentes familiares de enfermedades. También incluirá la donación de 5 ml. de sangre obtenida por punción venosa periférica. Mi participación en el estudio no incluye recibir tratamientos experimentales, ni riesgos adicionales, excepto los relacionados con la punción venosa y puede ser terminada en una sola entrevista. Los resultados del estudio no me benefician directamente como paciente, pero contribuyen al conocimiento general del fondo genético del paciente con Diabetes. Estoy enterado (a) y acepto que los monitores, auditores, el Comité de Investigación y Ética y las autoridades regulatorias pertinentes están autorizadas a tener acceso directo a mis registros médicos originales con la finalidad de verificar los procedimientos y los datos generados de la investigación, sin violar la confidencialidad de los mismos. De igual manera estoy enterado (a) que todos los registros que me identifican con mi nombre permanecerán confidenciales. Los resultados del estudio se enviarán al Comité de Investigación y Ética del hospital, al cual podré recurrir en caso de requerir información adicional sobre el proyecto de investigación o directamente con el (la) investigador (a) y cuyo nombre aparece al calce. Dado que se trata de un estudio multicéntrico, con población de seis estados de la República Mexicana y participación aproximada de 1200 personas, el tiempo estimado para el reporte definitivo de resultados es de dos años, a partir de la fecha de participación. Acepto pues, de manera voluntaria participar en el referido proyecto de investigación.

Participante:

Nombre _____ Firma _____

Investigador:

Nombre _____ Firma _____

Testigos:

Nombre _____ Firma _____

Nombre _____ Firma _____

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Roxana Alicia Rivera Prieto

Candidata para el Grado de

Doctor en Ciencias con Especialidad en Biotecnología

Tesis: ANALISIS GENÉTICO Y ECOLÓGICO DE UNA POBLACIÓN
MESTIZA MEXICANA DEL NORESTE CON DIABETES
MELLITUS TIPO 2.

Campo de Estudio: Genética de poblaciones y Biotecnología

Datos Personales: Nacida en Nuevo Laredo, Tamaulipas el 2 de Abril
de 1960, hija de Raúl rivera Arroyo y Victoria Prieto Ramírez.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado
obtenido Maestro en Ciencias con Especialidad en Genética.

Experiencia Profesional: Becaria de Investigación del Centro de Investigación
Biomédica del Noreste (CIBIN) 2002-2005; profesionista de apoyo del
Centro de Biotecnología del ITESM 2000-2001.